

UNIVERSIDAD DE CORDOBA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

“EFECTO COMPARATIVO DE UNA DIETA RICA EN
GRASA MONOINSATURADA SOBRE LA
DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN
PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO EN
ESTADO POSTPRANDIAL”.

Trabajo presentado por
María Eugenia Meneses Álvarez
para obtener el grado de Doctor



Córdoba, España 2012

TITULO: *EFEECTO COMPARATIVO DE UNA DIETA RICA EN GRASA
MONOINSATURADA SOBRE LA DISFUNCION DEL TEJIDO
ADIPOSO EN PACIENTES CON SINDROME METABOLICO EN
ESTADO POSTPRANDIAL*

AUTOR: *MARÍA EUGENIA MENESES ÁLVAREZ*

© 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: “EFECTO COMPARATIVO DE UNA DIETA RICA EN GRASA MONOINSATURADA SOBRE LA DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO EN ESTADO POSTPRANDIAL”.

DOCTORANDO/A: MARÍA EUGENIA MENESES ÁLVAREZ

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS.

D. JOSÉ LÓPEZ MIRANDA Y D. ANTONIO CAMARGO GARCÍA,

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado “EFECTO COMPARATIVO DE UNA DIETA RICA EN GRASA MONOINSATURADA SOBRE LA DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO EN ESTADO POSTPRANDIAL” ha sido realizado por D^a María Eugenia Meneses Álvarez bajo nuestra dirección, en la Unidad de Investigación de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía/ Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

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, 5 de Octubre de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.:

Dr. José López Miranda

Fdo.:

Dr. Antonio Camargo García

“Ideals are like stars; you will not succeed in touching them with your hands, but like the seafaring man on the desert of waters, you choose them as your guides, and following them you will reach your destiny.”

Carl Schurz

Mi más sincero agradecimiento a:

A mis directores de tesis el Dr. José López Miranda y el Dr. Antonio Camargo García:
Para mí fue un privilegio haber contado con su conocimiento y experiencia durante el desarrollo de la presente investigación. Gracias por contribuir en gran medida con su consejo, apoyo y dedicación a que esta tesis llegara a materializarse.

Al Dr. Francisco Pérez Jiménez: Gracias por brindarme la oportunidad de formar parte del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica en Córdoba (IMIBIC) y poder realizar el presente trabajo, así como por el apoyo que me ha brindado a lo largo del doctorado.

A la Universidad de Córdoba por el financiamiento que me otorgó para la realización de la estancia de investigación en la Universidad de Warwick, U.K, así como a todas las personas que contribuyeron a que pueda optar al Doctorado con mención internacional. En especial al Dr. Philip Mc Ternan, al Dr. Armando Tovar, al Dr. Sergio Rodríguez-Cuenca y al Dr. Manuel Castro Cabeza.

A los integrantes de la Unidad de lípidos y Aterosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía por su compañerismo, en especial al equipo de la Facultad de Medicina por haber compartido el día a día durante estos años.

A las personas que por su amistad se llegaron a convertir en mi segunda familia durante mi estancia en Córdoba. Gracias por todos los momentos compartidos y formar parte de esta gran experiencia personal. También agradezco a los amigos de siempre, a los que estuvieron al pendiente de mí en la distancia, brindándome su apoyo, ánimo y cariño.

Un especial agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por la beca que me otorgó para la realización del Doctorado en la Universidad de Córdoba.

A todas las personas que contribuyeron en algún momento a que pudiera llegar a esta etapa final. GRACIAS.

Quiero dedicar esta tesis a las personas más importantes en mi vida:

A mi Madre

A mis hermanos María Estela y Fernando

A Itzel, Elizabeth, Diego, Yareni, Alejandra y María Fernanda

A mi Padre

ABREVIATURAS**ABBREVIATIONS****I. RESUMEN****ABSTRACT****II. INTRODUCCIÓN****1. TEJIDO ADIPOSO**

1.1. Tejido adiposo blanco.....	1
1.2. Función endocrina del tejido adiposo.....	3
1.3. Metabolismo de lípidos en tejido adiposo.....	5
1.3.1. Captación de lípidos en tejido adiposo.....	6
1.3.2. Lipogénesis de novo.....	7
1.3.3. Lipogénesis.....	11
1.3.4. Lipólisis.....	12
1.3.5. Almacenamiento de lípidos en el adipocito.....	16
1.4. Disfunción de tejido adiposo.....	18
1.4.1. Estrés del retículo endoplásmico.....	19
1.4.2. Proceso inflamatorio en tejido adiposo.....	23
1.4.3. Disfunción del tejido adiposo y resistencia a la insulina.....	28

2. SÍNDROME METABÓLICO

2.1. Definición.....	29
2.2. Etiología.....	33
2.3. Prevalencia.....	35
2.4. Diagnóstico.....	35

3. DIETA

3.1. Importancia del estado postprandial.....	37
3.2. Dieta y estado postprandial.....	38
3.3. Dieta y estado inflamatorio.....	43
3.4. Efecto de la dieta sobre la función del tejido adiposo.....	44

III. HIPÓTESIS..... 49**HYPOTHESIS**..... 51**IV. OBJETIVOS**..... 53**OBJECTIVES**..... 55**V. MATERIAL AND METHODS**

1. Participants and recruitment.....	57
--------------------------------------	----

1.1. Sample size calculation.....	57
2. Design	58
3. Randomization and intervention diet.....	60
3.1. Postprandial study	63
4. Measurements	66
5. Statistical analysis.....	71
VI. RESULTS	
1. Baseline characteristics	74
2. Achievement of dietary targets	75
3. Postprandial lipemia	78
4. Gene expression of adipokines in adipose tissue.....	79
5. Expression of lipid metabolism-related genes in adipose tissue	83
6. Expression of endoplasmic reticulum stress-related genes in adipose tissue.....	95
7. Expression of genes related with inflammatory response in adipose tissue.....	99
8. Relationship between gene expression of the pathways studied	103
9. Relationship between gene expression in adipose tissue and indicators of metabolic risk in patients with metabolic syndrome.....	105
9.1 Relationships between adipokines expression in adipose tissue and indicators of metabolic risk	105
9.2 Relationships between lipid metabolism related genes in adipose tissue and indicators of metabolic risk.....	107
9.3 Relationships between endoplasmic reticulum stress-related genes in adipose tissue and indicators of metabolic risk.....	110
9.4 Relationships between inflammation-related genes in adipose tissue and indicators of metabolic risk.....	113
10. Relationships between gene expression in adipose tissue and body mass index	115
VII. DISCUSIÓN	117
VIII. CONCLUSIONES	133
CONCLUSIONS	137
IX. ANEXOS	

ABREVIATURAS

Abreviaturas más utilizadas a lo largo del texto:

AGL: Ácidos grasos libres.

ATGL: Adipo-triglicérido-lipasa.

BiP: Proteína chaperona BiP, 78kDa.

CNX: Calnexina.

CRT: Calreticulina.

CT: Colesterol Total.

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2.

ECV: Enfermedades cardiovasculares.

FABP4: Proteína de unión a ácidos grasos 4.

FASN: Acido graso sintasa.

GSTP1: Glutación S-transferasa p 1.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

HSL: Lipasa sensible a hormonas.

IL1 β : Interleuquina 1 β .

IL-6: Interleuquina 6.

IMC: Índice de masa corporal.

IRSs: Sustratos receptores de insulina.

JNK: Quinasa amino terminal de c-Jun.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LDN: Lipogénesis de novo.

LPL: Lipoproteína lipasa.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1.

MGL: Monoglicerol lipasa.

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados.

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NF- κ B: Factor nuclear kappa B.

oxLDL: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno 1.

PDIA-3: Proteína disulfuro isomerasa 3.

PPARG: Receptor del activador del proliferador de peroxisoma gamma.

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

RBP4: Proteína transportadora de retinol 4.

RE: Retículo endoplásmico.

SCD1: Esteroil-CoA desaturasa.

SFA: Ácidos grasos saturados.

SMet: Síndrome Metabólico.

SREBP1: Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides.

TAB: Tejido adiposo blanco.

TG: Triglicéridos.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

XBP-1: Proteína ligadora de la caja X.

ABBREVIATIONS

Abbreviations used throughout the text:

ATGL: Adipose triglyceride lipase.

BiP: Glucose-regulated protein, 78kDa.

BMI: Body mass index.

CNX: Calnexin.

CRT: Calreticulin.

CVD: Cardiovascular diseases.

FABP4: Fatty acid binding protein 4.

FASN: Fatty acid synthase.

GSTP1: Glutathione S-transferase pi 1.

HDL: High density lipoprotein.

HSL: Sensitive lipase hormone.

LDL: Low density lipoprotein.

LPL: Lipoprotein lipase.

MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1.

MetS: Metabolic Syndrome.

MGL: Monoacylglycerol lipase.

MUFA: Monounsaturated fatty acids.

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor.

PAI-1: Plasminogen activator inhibitor 1.

PDIA-3: Protein disulfide isomerase family A, member 3.

PUFA: Polyunsaturated Fatty acids.

RBP4: Retinol binding protein type 4.

RE: Reticulum endoplasmic.

T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus.

SFA: Saturated fatty acids.

SCD1: Stearoyl-CoA desaturase-1.

SREBP1: Sterol regulatory element binding protein 1.

VLDL: Very low density lipoprotein.

XBP-1: X-box binding protein 1.

I. RESUMEN.

Introducción: Una de las características más comunes de los pacientes con síndrome metabólico (SMet) es la obesidad abdominal. El aumento y expansión que experimenta el tejido adiposo (TA) en personas obesas provoca una serie de alteraciones fisiopatológicas entre las que destaca la disfunción del TA. La exposición a un balance positivo de energía durante un largo periodo de tiempo produce fenómenos de hiperplasia (incrementa el número de adipocitos) e hipertrofia (incrementa el tamaño de los adipocitos) en el TA que desemboca en una disfunción de éste, así como en la infiltración de macrófagos en el mismo. La disfunción del TA a menudo ocasiona la alteración de los procesos que regulan el metabolismo lipídico (lipogénesis y lipólisis), y el contenido de masa grasa corporal, lo que puede ejercer un papel importante en las patologías asociadas a la obesidad. Por otra parte, la disfunción del TA ha sido relacionada con la disfunción de varias organelas del adipocito, provocando el estrés del retículo endoplásmico (RE) y estrés oxidativo (disfunción de la mitocondria), fenómenos que han sido asociados con la activación de las vías inflamatorias y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, y que contribuyen al estado inflamatorio de bajo grado característico en obesidad y SMet, lo que a su vez influye en el fenómeno de resistencia a insulina y desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV). Los avances en el conocimiento del efecto de la cantidad y tipo de grasa en la dieta sobre la disfunción del TA contribuyen al desarrollo de medidas para mejorar el tratamiento y prevención del SMet y sus patologías asociadas.

Hipótesis: La cantidad y tipo de grasa en la dieta puede modular la función endocrina y el metabolismo lipídico, así como procesos relacionados con enfermedad cardiovascular en el TA de pacientes con SMet.

Objetivo principal: Evaluar si el consumo de cuatro modelos dietéticos con diferente cantidad y tipo de grasa modula a largo plazo en ayunas y durante el estado postprandial la función endocrina del TA, modificando la expresión génica de adiponectina, resistina, leptina, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), RBP4 (retinol binding protein type 4), en el TA subcutáneo de pacientes con SMet.

Objetivos secundarios: **1)** Investigar el efecto a largo plazo en ayunas y en estado postprandial del consumo de cuatro modelos dietéticos con diferente cantidad y tipo de grasa sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (captación de lípidos de la dieta por el TA; lipogénesis; lipogénesis de novo; lipólisis, almacenamiento de lípidos en los adipocitos). **2)** Investigar el efecto a largo plazo en ayunas y en estado postprandial del consumo de cuatro modelos dietéticos con diferente cantidad y tipo de grasa sobre la expresión de genes relacionados con el estrés de RE. **3)** Investigar el efecto a largo plazo en ayunas y en estado postprandial del consumo de cuatro modelos dietéticos con diferente cantidad y tipo de grasa sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria en TA subcutáneo de pacientes con SMet. **4)** Analizar la relación de la expresión en TA de los genes involucrados en la diferentes rutas metabólicas estudiadas tanto en estado de ayunas antes y después de la intervención dietética, así como en estado postprandial. **5)** Analizar la relación entre la expresión génica en TA de los procesos estudiados y los indicadores de riesgo metabólico como son sensibilidad a la insulina, valores de lipemia postprandial e índice de masa corporal.

Sujetos, diseño y metodología: El estudio con diseño aleatorizado se llevó a cabo con un subgrupo de 39 pacientes con SMet del estudio LIPGENE, éstos pacientes fueron asignados a una de las siguientes cuatro dietas por un periodo de 12 semanas: **A.** Modelo de dieta occidental, rica en grasa saturada (HSFA), 38% energía proveniente de la grasa; **B.** Dieta rica en grasa monoinsaturada (HMUFA), 38% energía proveniente de la grasa; **C.** Dieta pobre en grasa (28% energía), rica en hidratos de carbono complejos (LFHCC); **D.** Dieta pobre en grasa (28% energía), rica en hidratos de carbono complejos suplementada con 1.24 g/d n-3 PUFA. (LFHCC n-3). Después de la intervención dietética se administró una comida grasa con la misma composición de ácidos grasos que la dieta original. Antes y después de la intervención dietética en estado de ayuno y después de 4 hrs de la ingesta de la comida grasa se tomaron muestras de TA subcutáneo. Nosotros hemos determinado la expresión de genes relacionados con la función endocrina (adiponectina, resistina, leptina, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), RBP4 (retinol binding protein type 4)), relacionados con el metabolismo de lípidos (involucrados en la captación de lípidos de la dieta por el TA (LPL (lipoprotein lipase), lipogenesis, de novo lipogenesis

(SREBP1 (Sterol regulatory element binding protein 1), FASN (Fatty acid synthase), SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase-1)), lipólisis (HSL (sensitive lipase hormone), ATGL (adipose triglyceride lipase), MGL (monoacylglycerol lipase)), genes relacionados con el almacenamiento de lípidos en los adipocitos (perilipina, vimentina, caveolina y FABP4 (fatty acid binding protein 4)), así como también fueron estudiados los genes relacionados con el estrés de RE (XBP-1 (X-box binding protein 1), CNX (calnexina), CRT (calreticulina), PDIA-3 (protein disulfide isomerase family A, member 3), BiP (glucose-regulated protein, 78kDa), GSTP1 (glutathione S-transferase pi 1)), y relacionados con la respuesta inflamatoria (sub unidad p65 de NF-kB y la subunidad alfa y β de su inhibidor (IkB α , IkB β 2) y la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6, MCP-1 y IL1 β)). El análisis se llevó a cabo por PCR a tiempo real en TA subcutáneo de pacientes con SMet.

Resultados: El consumo a largo plazo de las dietas HSFA, LFHCC, y LFHCC n-3 disminuyó los niveles de mRNA de adiponectina ($p=0,021$, $p=0,023$, y $p=0,046$, respectivamente) y de perilipina ($p=0,010$, $p=0,002$, y $p=0,002$, respectivamente) en ayunas. En contraste, la ingesta de la comida HMUFA indujo una disminución postprandial en la expresión de adiponectina ($p=0,008$) y de perilipina ($p=0,014$). El consumo de las dietas LFHCC y LFHCC n-3 redujo los niveles de mRNA de RBP4 ($p=0,039$ y $p=0,027$, respectivamente) en ayunas. El consumo de la dieta LFHCC n-3 disminuyó los niveles de mRNA de SREBP1 ($p=0,007$) y SCD-1 ($p=0,043$) en estado de ayunas después del periodo de intervención dietética en comparación con la dieta LFHCC. Además, hemos observado que la expresión de ATGL aumenta en estado de ayunas después del consumo de la dieta HSFA en comparación con el consumo de las dietas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3 (todas $p=0,001$), y en estado postprandial ($p=0,002$, $p=0,001$ y $p<0,001$ respectivamente). La expresión génica de XBP-1 se induce en el estado postprandial, independientemente de la dieta consumida ($p<0,001$). Además, la expresión génica de BiP aumenta en el estado postprandial después del consumo de las comidas HMUFA ($p=0,006$), LFHCC ($p=0,028$) y LFHCC n-3 ($p=0,028$), y tiende a aumentar después del consumo de la comida HSFA ($p=0,062$). También, hemos observado que la expresión génica de p65, IkB α , MCP-1 y IL1 β se induce en TA en estado postprandial (p65 ($p=0,003$), e IkB α , MCP-1 y IL1 β ($p<0,001$)), independientemente de la calidad y cantidad de la grasa de la dieta.

Conclusión principal: La cantidad y tipo de grasa en la dieta modula la expresión de adipoquinas en tejido adiposo al interactuar con mecanismos de regulación comunes, que controlan en paralelo la expresión de adipoquinas y genes relacionados con el almacenamiento y procesamiento de lípidos.

Conclusiones secundarias: Nuestros resultados sugieren que el proceso de lipogénesis en TA de pacientes con SMet es susceptible de ser modulado por el tipo de grasa en la dieta. De hecho, nuestro estudio demostró que la dieta LFHCC parece inducir el proceso de lipogénesis y la suplementación de esta dieta con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 evita esta inducción. El consumo de grasa saturada aumenta el proceso de lipólisis en TA de pacientes con SMet tanto en estado de ayunas como en estado postprandial. Además, en el estado postprandial tiene lugar un incremento de estrés de RE y una exacerbada respuesta inflamatoria en TA de pacientes con SMet la cual parece ser independiente de la calidad y cantidad de la grasa de la dieta. Por otra parte, nuestros resultados demostraron que el aumento de estrés de RE y la inducción de la respuesta inflamatoria en el estado postprandial en TA son procesos relacionados entre sí. Hemos observado que existe una relación entre la expresión génica de las rutas estudiadas en TA subcutáneo de pacientes con SMet y los indicadores de riesgo metabólico. La función endocrina y la respuesta inflamatoria postprandial del TA de pacientes con SMet están asociadas con los valores de lipemia postprandial. Además, una apropiada respuesta al estrés de RE en TA en estado postprandial parece estar asociada con la reducción de la glucemia y lipemia postprandial. Por último, hemos observado que la obesidad, en términos de índice de masa corporal, determina la expresión de los genes que codifican para la adiponectina, la leptina y la ATGL, en TA de pacientes con SMet.

I. ABSTRACT.

Introduction: One of the most common components of the metabolic syndrome (MetS) is the abdominal obesity. The growth and expansion of adipose tissue (AT) in obesity leads to several pathophysiological changes, being the most important the AT dysfunction. A positive energy balance over a long period of time produces phenomena of hyperplasia (increased number of fat cells) and hypertrophy (increased size of adipocytes) in AT, which lead to AT dysfunction, as well as to the macrophage infiltration. AT dysfunction in turn, leads alteration on the processes that regulate lipid metabolism in AT (lipogenesis and lipolysis), and the disruption of the homeostasis of body fat mass content, and plays an important role in the pathologies associated to obesity. On the other hand, AT dysfunction has been linked to the dysfunction of several adipocyte organelles, causing both endoplasmic reticulum (ER) stress and oxidative stress (mitochondrial dysfunction), phenomena that have been associated with the activation of inflammatory pathways and the production of proinflammatory cytokines, which contribute to low-grade inflammatory state characteristic of obesity and MetS, and which in turn influences on the phenomenon of insulin resistance and development of cardiovascular disease (CVD). Advances in the knowledge of the effect of the quantity and quality of dietary fat on AT dysfunction can contribute to the development of diet-based treatment in the prevention of MetS and its associated pathologies.

Hypothesis: The quantity and the quality of dietary fat can modulate the endocrine function as well as the lipid metabolism and cardiovascular disease-related processes in the AT of patients with MetS.

Main objective: To evaluate whether the consumption of four dietary models with different quantity and quality of fat modulates, after a long-term consumption in fasting and at the postprandial state, the endocrine function of AT by modifying the gene expression of adiponectin, resistin, leptin, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), RBP4 (retinol binding protein type 4) in the subcutaneous AT of patients with MetS.

Secondary objectives: 1) To investigate the effect of the long-term consumption in fasting state and at the postprandial state of four dietary models with different quantity

and quality of fat on the expression of genes related to the lipid metabolism (uptake of dietary lipids by the AT, lipogenesis, de novo lipogenesis, lipolysis and lipid storage in adipocytes). **2)** To investigate the effect of the long-term consumption in fasting state and at the postprandial state of four dietary models with different quantity and quality of fat on the expression of genes related to ER stress. **3)** To investigate the effect of the long-term consumption in fasting state and at the postprandial state of four dietary models with different quantity and quality of fat on the expression of genes related to inflammatory response in subcutaneous AT of MetS patients. **4)** To analyze the relationship between the different metabolic pathways studied each other by comparing the AT gene expression of genes involved in different metabolic pathways studied in the fasting state before and after the dietary intervention and at the postprandial state. **5)** To analyze the relationship between AT gene expression and metabolic risk indicators such as sensitivity to insulin, postprandial lipemia values and body mass index.

Subjects, design and methodology: A randomized, controlled trial conducted within the LIPGENE study assigned 39 MetS patients to one of four diets for 12 weeks: **A.** Western diet model: rich in saturated fat (HSFA), 38% energy from fat; **B.** Diet rich in monounsaturated fat (HMUFA), 38% energy from fat; **C.** Low-fat diet (28% energy), rich in complex carbohydrates supplemented with placebo (LFHCC); **D.** Low-fat diet (28% energy), rich in complex carbohydrates supplemented with 1.24 g / d n-3 PUFA (LFHCC n-3). A fat challenge reflecting the fatty acid composition as the original diets was conducted post-intervention. Before and after dietary intervention in fasting state and 4 h after the intake of the meals, samples of subcutaneous AT were collected. We have determined the expression of genes related with endocrine function (adiponectin, resistin, leptin, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), RBP4 (retinol binding protein type 4)), related with lipid metabolism (involved in the uptake of dietary lipids by the AT (LPL (lipoprotein lipase), lipogenesis, de novo lipogenesis (SREBP1 (sterol Regulatory element binding protein 1), FASN (Fatty acid synthase), SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase-1)), lipolysis (HSL (sensitive lipase hormone), ATGL (adipose triglyceride lipase), MGL (monoacylglycerol lipase)) and genes related to lipid storage in adipocytes (perilipin, vimentin, caveolin and FABP4 (fatty acid binding protein 4)), related to ER stress (XBP-1 (X-box binding protein 1) , CNX (calnexin), CRT (calreticulin), PDIA-3 (protein disulfide isomerase family A, member

3), BiP (glucose-regulated protein, 78kDa), GSTP1 (glutathione S-transferase pi 1)), and related to inflammatory response (p65 subunit of NF-kB and the alpha subunit and β of its inhibitor (IkB α , IkB β 2) and the expression of proinflammatory cytokines (IL-6, MCP-1 and IL1 β)) by real time PCR in the subcutaneous AT of patients with MetS.

Results: The long-term consumption of HSFA, LFHCC, and LFHCC n-3 diets decreased of the adiponectin ($p=0.021$, $p=0.023$, and $p=0.046$, respectively) and the perilipin fasting mRNA level ($p=0.010$, $p=0.002$, and $p=0.002$, respectively). In contrast, HMUFA meal induced a postprandial decrease in the adiponectin ($p=0.008$) and the perilipin gene expression ($p=0.014$). LFHCC and LFHCC n-3 diets consumption reduced the fasting mRNA level of RBP4 ($p=0.039$) ($p=0.027$) respectively. The consumption of LFHCC n-3 diet decreased SREBP1 ($p=0.007$) and SCD-1mRNA levels ($p=0.043$) in fasting state after the dietary intervention period as compared to LFHCC diet. We found that ATGL gene expression increased after HSFA diet consumption as compared with HMUFA, LFHCC and LFHCC n-3 diets in fasting state after dietary intervention (all $p=0.001$), and at postprandial state ($p=0.002$) ($p=0.001$), ($p<0.001$) respectively. We found that expression of XBP-1 is induced in the postprandial state irrespective of diet consumed ($p<0.001$). Additionally, BiP gene expression increased at the postprandial state after consumption of HMUFA ($p=0.006$), LFHCC ($p=0.028$), and LFHCC n-3 ($p=0.028$) meals, and tended to increase after consumption of HSFA meal ($p=0.062$). We found that p65, IkB α , MCP-1 and IL1 β gene expression is induced in AT at the postprandial state (p65 $p=0.003$) and IkB α , MCP-1 and IL1 β ($p<0.001$), regardless of the quality and quantity of the dietary fat.

Main Conclusion: Dietary fat induces a differential adipokines gene expression by interaction with common mechanisms controlling the expression of adipokines and lipid storage and processing genes.

Secondary conclusions: Our results suggest that the lipogenesis is susceptible to be modulated by dietary fat in AT of patients with MetS. In fact, our study showed that LFHCC diet appears to induce the process of lipogenesis and the supplementation of this diet with n-3 PUFA avoids this induction. The consumption of saturated fat increases lipolysis in AT of patients with MetS both in the fasting state and postprandial

state. Moreover, at the postprandial state, it takes place an increase of ER stress and an exacerbated inflammatory response in AT of patients with MetS which seem to be independent of the quality and quantity of dietary fat. On the other hand, our results showed that the increase of ER stress and induction of an inflammatory response in the postprandial state in AT are related processes in patients with MetS. We found a relationship between the gene expression of the pathways studied in subcutaneous AT of patients with MetS and cardiometabolic risk indicators. Our results suggest that the endocrine function and the postprandial expression of inflammatory genes of AT in patients with MetS is related with postprandial lipemia. Additionally, an appropriate postprandial response to ER stress in AT seems to be associated with reduction in the postprandial glycemia and lipemia in patients with MetS. Lastly, obesity, in terms of body mass index, determines the expression of several genes (adiponectin, leptin, ATGL) in AT of patients with MetS.

II. INTRODUCCIÓN.

1. TEJIDO ADIPOSO.

La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial, siendo considerada la enfermedad metabólica más frecuente en los países desarrollados. Actualmente la obesidad es considerada un problema importante de salud pública debido al estrecho vínculo con el incremento de las enfermedades cardiovasculares (ECV).

El concepto de obesidad se refiere al incremento de tejido adiposo corporal, como consecuencia de un largo periodo de balance energético positivo, en el que las calorías ingeridas son mayores a las consumidas, originando una ganancia de peso (1). El incremento drástico en la incidencia de la obesidad y su asociación a diversas patologías ha generado un creciente interés por estudiar el adipocito como célula diana y el tejido adiposo como órgano metabólicamente activo, que en condiciones de aumento ó expansión, influye en el desarrollo de un ambiente proaterogénico, debido al nexo de la obesidad con un estado inflamatorio crónico de bajo grado y aumento de estrés oxidativo que ocurre en obesidad y al hecho de que ambos procesos estén implicados en el desarrollo de aterosclerosis y resistencia a la insulina (2).

En base a su histología, distribución y funcionalidad, el tejido adiposo puede clasificarse en tejido adiposo marrón o multilocular y tejido adiposo blanco (TAB) o unilocular (3). La principal función del tejido adiposo marrón es generar calor debido a la presencia de mitocondrias ricas en proteínas desacoplantes (UCP, Un-Coupling Protein) (4), y aunque se ha demostrado que está presente en la vida adulta, son necesarios más estudios para esclarecer su relación con la obesidad y otros trastornos metabólicos (5). En este sentido, hemos centrado nuestro estudio en el TAB, debido a la función endocrina y a su participación en la regulación de la homeostasis del metabolismo lipídico que ejerce en el organismo, así como su relación con las patologías relacionadas con la obesidad cuando éstas funciones se encuentran alteradas.

1.1 Tejido adiposo blanco.

Características histológicas.

El TAB está constituido por un 30-60% de adipocitos, junto con células sanguíneas, células endoteliales, precursores de los adipocitos (fundamentalmente fibroblastos, preadipocitos, células mesenquimales pobremente diferenciadas), monocitos y macrófagos infiltrados, aumentando éstos últimos con el grado de obesidad (6, 7). A nivel extracelular, este tejido se caracteriza por una red de pequeños vasos sanguíneos que facilitan el constante flujo bidireccional de nutrientes y oxígeno.

Los adipocitos, son uniloculares (una sola gota lipídica), generalmente tienen diámetros superiores a las 100 micras, forma poliédrica y presentan un núcleo asimétrico (8). El tamaño del adipocito puede variar en función de la cantidad de triglicéridos (TG) que almacena. El incremento en la masa grasa se manifiesta como el aumento de lípidos intracelulares y gran tamaño del adipocito (hipertrofia) y en el número de adipocitos (hiperplasia). En términos de desarrollo y diferenciación, el aumento de tamaño del adipocito cambia con más rapidez que su número, indicando un predominio del mecanismo de hipertrofia sobre el de hiperplasia (9).

Distribución.

El TAB se encuentra distribuido principalmente en los compartimentos subcutáneo y visceral. El subcutáneo se ubica bajo la piel y comprende alrededor del 80% de la grasa corporal total (10), mientras que el visceral, que supone un 10% del total, se localiza profundamente rodeando las vísceras. El tejido adiposo restante se encuentra en zonas retroperitoneales, perirrenales, orbitales e intramusculares (11).

En el adulto, el TAB se localiza principalmente en la región subcutánea, abdominal o central e intramuscular, representando en el hombre en condiciones normales, entre un 9 y un 18% del peso corporal total, y entre un 19 y un 28% en la mujer. La distribución del tejido adiposo es diferente según el sexo y la edad. En las mujeres, al aumentar la edad, el tejido adiposo se deposita principalmente en la región inferior del cuerpo y en área subcutánea, mientras que en los varones lo hace en la mitad superior con mayor tendencia en las regiones abdominales (12).

En función de donde se almacene la grasa, se pueden distinguir dos tipos de obesidad; la obesidad androide y la obesidad ginecoide. En el fenotipo de obesidad

androide o “tipo manzana”, el depósito de grasa se encuentra en la región central o visceral y se ha relacionado con el riesgo de desarrollar las patologías asociadas a la obesidad incluyendo resistencia a la insulina e incremento del riesgo cardiovascular. Por este motivo se considera la medida de circunferencia de cintura y la relación cintura/cadera, un indicador de riesgo más adecuado que el índice de masa corporal (IMC). También se ha observado que el tejido adiposo subcutáneo abdominal profundo está estrechamente relacionado con la resistencia a la insulina de manera muy similar a la grasa visceral **(13)**.

El depósito glúteo-femoral (fenotipo de obesidad ginecoide o “tipo pera”) se caracteriza por un predominante depósito de grasa en las partes inferiores del cuerpo, principalmente en el tejido adiposo femoral y gluteal. A diferencia de la obesidad androide este tipo de obesidad tiene menor relevancia a nivel patológico **(14)**.

1.2 Función endocrina del tejido adiposo.

El tejido adiposo había sido considerado durante mucho tiempo únicamente como un reservorio de energía. Sin embargo, actualmente es considerado un órgano que desempeña una importante actividad endocrina **(15)**. El tejido adiposo libera numerosas proteínas llamadas adipocitoquinas o adipoquinas, que participan en la regulación autócrina y parácrina del propio tejido pero que también afectan a órganos distantes, tales como el hígado, músculo, páncreas y cerebro **(16)**. Las adipoquinas están implicadas en la regulación del peso corporal, la sensibilidad a la insulina, el metabolismo de la glucosa y de lípidos, así como también influyen en los procesos inflamatorios **(17)**.

Entre las adipoquinas con funciones de mayor relevancia en el organismo se encuentran: adiponectina, resistina, leptina, RBP4 (Proteína transportadora de retinol tipo 4), y PAI-1 (Inhibidor del activador del plasminógeno 1).

Adiponectina

También conocida como adipoQ, la adiponectina es una proteína de 244 aminoácidos expresada en tejido adiposo. El aumento del tejido adiposo ha sido asociado con la disminución de la producción de adiponectina, a la cual se le atribuyen

propiedades antidiabéticas, antiateroscleróticas y antiinflamatorias (18). Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de adiponectina están relacionados de manera positiva con la regulación de la actividad del receptor de insulina tirosina quinasa en músculo esquelético y el grado de sensibilidad a la insulina (19).

El efecto antiinflamatorio de la adiponectina se debe en parte a que inhibe la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1), debido a su acción inhibidora de la síntesis de TNF α , el cual induce la expresión de esta moléculas. Además, disminuye la respuesta inflamatoria inhibiendo la maduración de los macrófagos y suprimiendo la formación de células espumosas (20). Por otra parte, su expresión en tejido adiposo se ha relacionado negativamente con las concentraciones circulantes de proteína C-reactiva (21). La adiponectina además, reduce la concentración de ácidos grasos libres (AGL) circulantes, lo que disminuye la resistencia a la insulina (22). Algunos estudios han demostrado que los niveles de esta adipoquina estimula la síntesis de óxido nítrico, y reducen la proliferación de la íntima de vasos sanguíneos lesionados (23, 24).

Resistina

La resistina es una proteína de 114 aminoácidos, relacionada con el proceso de adipogénesis (25). La resistina ha sido asociada positivamente con resistencia a la insulina en hígado, musculo esquelético y tejido adiposo (26). En músculo esquelético, reduce la translocación de GLUT-4 (transportador de glucosa tipo 4) y por tanto, la captación de glucosa, contribuyendo de esta manera a un estado de resistencia a la insulina y desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (27). A su vez, también ha sido relacionada con el aumento en la secreción de citoquinas inflamatorias como TNF α (26).

Leptina

La leptina tiene un efecto directo sobre el hipotálamo, donde produce la sensación de saciedad. Se considera que las altas concentraciones de leptina en personas obesas está relacionada con una resistencia a la leptina. Por otra parte, se ha demostrado

que el transporte de leptina esta alterado en personas obesas, y que el efecto anorexígeno de la leptina a nivel hipotálamo esta deteriorado (28). Esta adipoquina está asociada a un estímulo de la lipólisis; la inhibición de la lipogénesis, el incremento del metabolismo de glucosa y la estimulación de la oxidación de ácidos grasos. Por otra parte, ha sido implicada en procesos de proliferación de linfocitos, producción de citoquinas inflamatorias, y estrés oxidativo entre otros (25, 29).

RBP4

Esta adipoquina se secreta predominantemente en tejido adiposo visceral y en hígado. Sus niveles plasmáticos aumentan en condiciones de resistencia a la insulina, DMT2, dislipemia, hipertensión, síndrome metabólico (SMet), respuesta inflamatoria (30-32) y adiposidad visceral (33). En humanos, se ha observado una relación inversa de la expresión de RBP4 en suero con GLUT4 en adipocitos, por lo que la delección de GLUT 4 podría causar resistencia a la insulina sistémica e incrementar el riesgo de padecer DMT2 (34).

PAI-1

Es una proteína de 379 aminoácidos que inhibe el sistema fibrinolítico. Se han observado niveles circulantes elevados de PAI-1 en estados inflamatorios como la obesidad y el SMet (35). Se ha descrito que la síntesis de PAI-1 aumenta por la insulina, los glucocorticoides, la angiotensina II, y por citoquinas como TNF α (36), así como también se han relacionado los ácidos grasos de la dieta con los niveles de PAI-1 en plasma (37). La fibrinólisis se encuentra disminuida en la obesidad, se debe probablemente a un incremento en la expresión de PAI-1 en el tejido adiposo, ya que se ha observado que la pérdida de peso es eficaz en la reducción de los niveles de PAI-1 en plasma y en tejido adiposo subcutáneo abdominal (38).

1.3. Metabolismo de lípidos en tejido adiposo.

La principal función del tejido adiposo es el almacenamiento del exceso de energía ingerida, y la liberación de energía hacia otros tejidos, tales como el músculo esquelético y el hígado.

Existen dos procesos principales implicados en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo. La lipogénesis que es considerada la reacción bioquímica por la cual son sintetizados los ácidos grasos y esterificados con el glicerol para formar grasas de reserva, o lípidos estructurales y la lipólisis, que es el proceso metabólico mediante el cual los lípidos del tejido adiposo son hidrolizados para producir ácidos grasos y glicerol para cubrir las necesidades energéticas. Todas estas vías metabólicas están rigurosamente controladas por factores nutricionales, metabólicos y neurohormonales, siendo la insulina el regulador clave del metabolismo de los ácidos grasos en el tejido adiposo (39).

1.3.1 Captación de lípidos en tejido adiposo.

La mayor parte de lípidos en los alimentos se encuentran formando TG. El metabolismo de los TG depende de la longitud de la cadena de los ácidos grasos que los forman. Los TG que contienen ácidos grasos de cadena corta y media son hidrolizados en la boca y en el estómago a 2-monoglicerol (2-MG) y AGL por acción de la lipasa lingual y por la lipasa gástrica, y son absorbidos directamente por las células epiteliales del intestino, entrando posteriormente a la sangre portal y así transportados al hígado unidos a la albúmina. El resto de la grasa proveniente de la dieta llega al intestino donde es emulsionada por las sales biliares en pequeñas partículas. La grasa emulsionada es hidrolizada por la enzima lipasa y la colipasa pancreáticas; la secreción de sales biliares y de enzimas pancreáticas está estimulada por la hormona intestinal colecistoquinina. Los ácidos grasos y 2-MGs producidos por digestión de los TG son a su vez emulsionados por las sales biliares y empaquetados en micelas. Las micelas viajan a la superficie de las microvellosidades de las células del epitelio intestinal donde los ácidos grasos y 2-MG son absorbidos. Una vez dentro de las células del intestino los ácidos grasos son re-esterificados en el retículo endoplásmico liso para formar TG. Las células intestinales empaquetan los TG junto con proteínas, colesterol, vitaminas liposolubles y fosfolípidos en lipoproteínas llamadas quilomicrones, que posteriormente se segregan a

la linfa y alcanzan el plasma a través del conducto torácico. La principal apoproteína de los quilomicrones es la apoB48, pero además contienen las apoproteínas A, C y E. Cuando los quilomicrones alcanzan los tejidos periféricos, y principalmente en tejido adiposo, sus TG son hidrolizados a través de la acción de la LPL (lipoproteína lipasa). La LPL es una glucoproteína localizada en la superficie endotelial, sintetizada principalmente en el tejido adiposo, y encargada de hidrolizar los TG transportados por las lipoproteínas hasta AGL y glicerol. Dentro de los adipocitos, los AGL son esterificados con glicerol para formar TG y ser almacenados dentro de las gota lipídica (40).

La regulación de la síntesis y actividad de la LPL adipocitaria se encuentra modulada por diferentes factores hormonales y nutricionales. Respecto a los factores hormonales, se ha descrito que la insulina es el principal modulador de la actividad de la LPL (41) y las hormonas sexuales ejercen un papel directo sobre el control del metabolismo de lípidos en tejido adiposo. La testosterona inhibe la actividad de la LPL en adipocitos, reduciendo por tanto la entrada de ácidos grasos en la célula y por el contrario, la progesterona incrementa su actividad (42). También se ha observado que los glucocorticoides estimulan la expresión del gen de la LPL en tanto que la insulina induce la transcripción del gen, la glicosilación y dimerización de la enzima, necesarias para su maduración (43).

A nivel nutricional, se ha descrito que la actividad de la LPL disminuye en el ayuno y en el estado postprandial aumenta por acción de la insulina (44) y en personas obesas se ha observado que tiene una relación positiva con el tamaño del adipocito (41).

1.3.2 Lipogénesis de novo.

La lipogénesis de novo (LDN) es el proceso por el cual se sintetizan ácidos grasos a partir de la glucosa, y ocurre principalmente en tejidos hepático y adiposo. La LDN se activa en situaciones de ingesta excesiva de energía y específicamente cuando proviene de los hidratos de carbono. La lipogénesis comprende los procesos de síntesis de ácidos grasos y la posterior síntesis de TG. La síntesis de ácidos grasos se inicia con acetil-CoA y se acumula por la adición de dos unidades de carbono. Muchas de las enzimas para la síntesis de ácidos grasos están organizadas en un complejo multienzimático llamado ácido graso sintetasa. Los principales sitios de síntesis de

ácidos grasos son el tejido adiposo y el hígado. La insulina es un indicador del nivel de azúcar en la sangre del cuerpo, ya que su concentración aumenta proporcionalmente con los niveles de azúcar en sangre. La insulina estimula la lipogénesis en dos formas principales: la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), que forma acetil-CoA y acetil-CoA carboxilasa (ACC), que forma el malonil-CoA a partir de acetil-CoA. Así, un nivel alto de insulina conduce a un aumento global en los niveles de malonil-CoA, que es el sustrato necesario para la síntesis de ácidos grasos (45). La LDN se ha señalado como una vía implicada en el desarrollo de obesidad, debido a que se activa cuando un alto porcentaje de la energía ingerida proviene de hidratos de carbono, y la abundancia de glucosa llevaría a mayor disponibilidad de acetil-CoA, citrato y subsecuentemente malonil-CoA, inhibiendo la oxidación de AG y convirtiendo este exceso de hidratos de carbono a grasa (46).

Genes implicados en el proceso de LDN.

SREBP1 (proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1)

Esta ruta metabólica está regulada por los factores de transcripción llamados proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides o SREBP. Las enzimas que intervienen en la LDN son transcripcionalmente reguladas por SREBP1, un miembro de la familia de proteínas SREBP. Las proteínas SREBP activan a nivel transcripcional la cascada enzimática de la síntesis de colesterol, ácidos grasos, TG y fosfolípidos y son consideradas reguladores fundamentales de la colesterogénesis y la lipogénesis. Además estos factores de transcripción tienen una función fundamental en la regulación de la diferenciación adipocitaria y en la expresión génica dependiente de insulina (47). Por otra parte, se ha involucrado a estas proteínas en el control transcripcional de las enzimas de la vía biosintética de los ácidos grasos, lo que se sugiere que la familia SREBP tiene una función central en la coordinación de la regulación de la síntesis de todos los compuestos lipídicos que forman las membranas biológicas, es decir ácidos grasos y colesterol (48).

FASN (Acido graso sintasa)

La enzima FASN cataliza la síntesis de los ácidos grasos en la célula y juega un papel central en la LDN. FASN cataliza todos los pasos en la síntesis de palmitato a partir de acetil-coA y malonil-coA en presencia de NADPH. El incremento en la expresión génica de FASN en tejido adiposo está vinculada a la acumulación de grasa visceral, la alteración de la sensibilidad a la insulina, aumento de la insulina circulante en ayunas, y además, se ha relacionado con la expresión de IL-6, leptina y RBP4. Esta relación sugiere un papel importante de las vías lipogénicas con el desarrollo de la obesidad y DMT2 (49).

SCD-1 (Estearoil-CoA desaturasa)

SCD-1 es una enzima que cataliza la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, principalmente oleico (C18:1) y palmitoleico (C16:1), componentes de los fosfolípidos de membrana, los TG, y ésteres de colesterol (50). SCD-1 es expresada abundantemente en el TAB (51), habiéndose observado una sobreexpresión en el músculo esquelético de personas con obesidad extrema (52). En roedores deficientes de SCD-1, se observó una disminución en la adiposidad corporal, y resistencia a la ganancia de peso después del consumo de una dieta alta en grasa (53). Estos datos sugieren que una elevada expresión de SCD-1 en el músculo esquelético contribuye a un anormal metabolismo de lípidos y a la progresión de la obesidad y la DMT2.

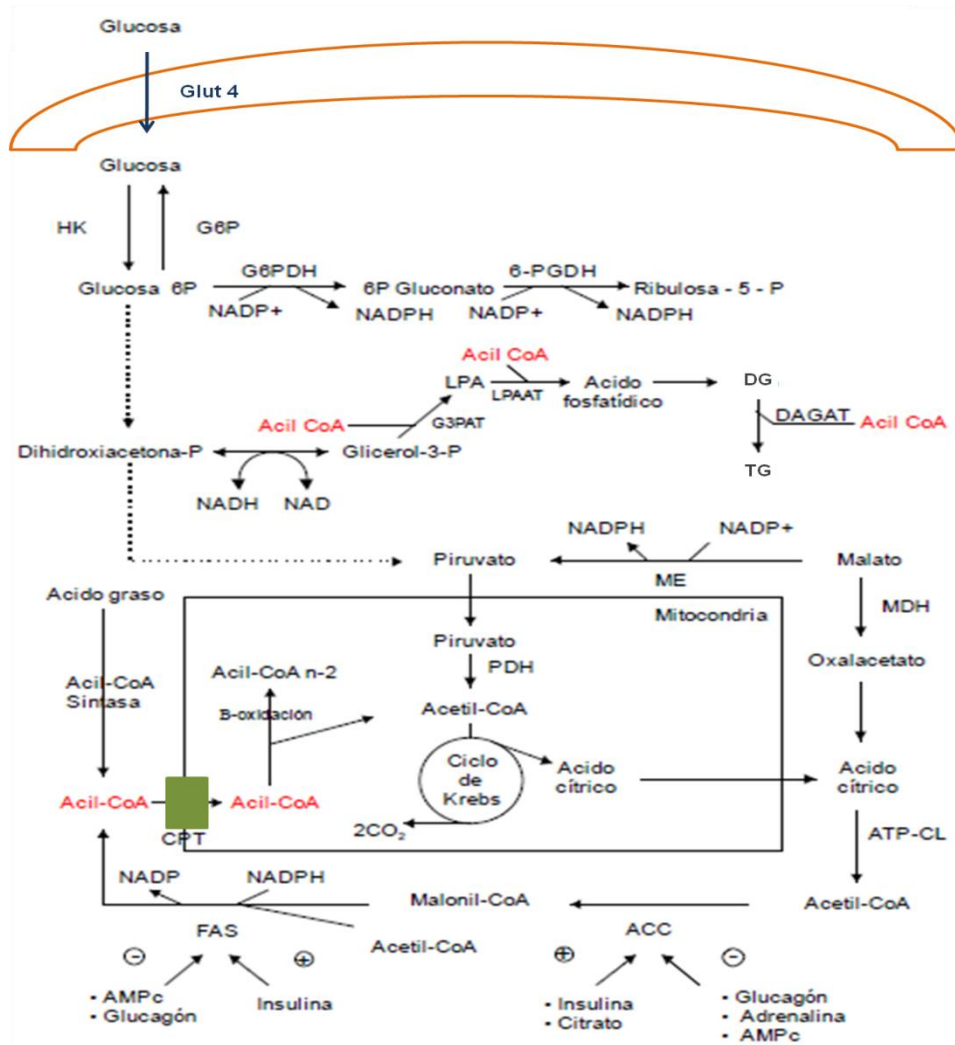


Figura 1. Lipogénesis de novo: Glut 4: Transportador de glucosa 4, LPA: ácido lisofosfatídico, LPAAT: ácido lisofosfatídico aciltransferasa, G3PAT: glicerol malato dehidrogenasa, HK: hexoquinasa, G3P: Glicerol 3 fosfato, DAGAT: diacilglicero aciltransferasa, G6PDH: Glucosa 6 Fosfato dehidrogenasa, 6PGDH: 6 fosfogluconato dehidrogenasa, ME: enzima málica, PDH: piruvato dehidrogenasa, CPT: carnitina palmitoiltransferasa, FAS: sintetasa de los AG, ACC: acetil CoA carboxilasa, ATP-CL: ATP citrato liasa, G6P: glucosa fosfatasa, DG: diglicérido, TG: triglicérido.

1.3.3. Lipogénesis.

La lipogénesis es el proceso de formación de TG a partir de la esterificación de 3 cadenas de AGL con una molécula de glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P). Este proceso tiene lugar principalmente en hígado y tejido adiposo, bien sea a partir de la glucosa (LDN) o a partir de los ácidos grasos procedentes de la dieta.

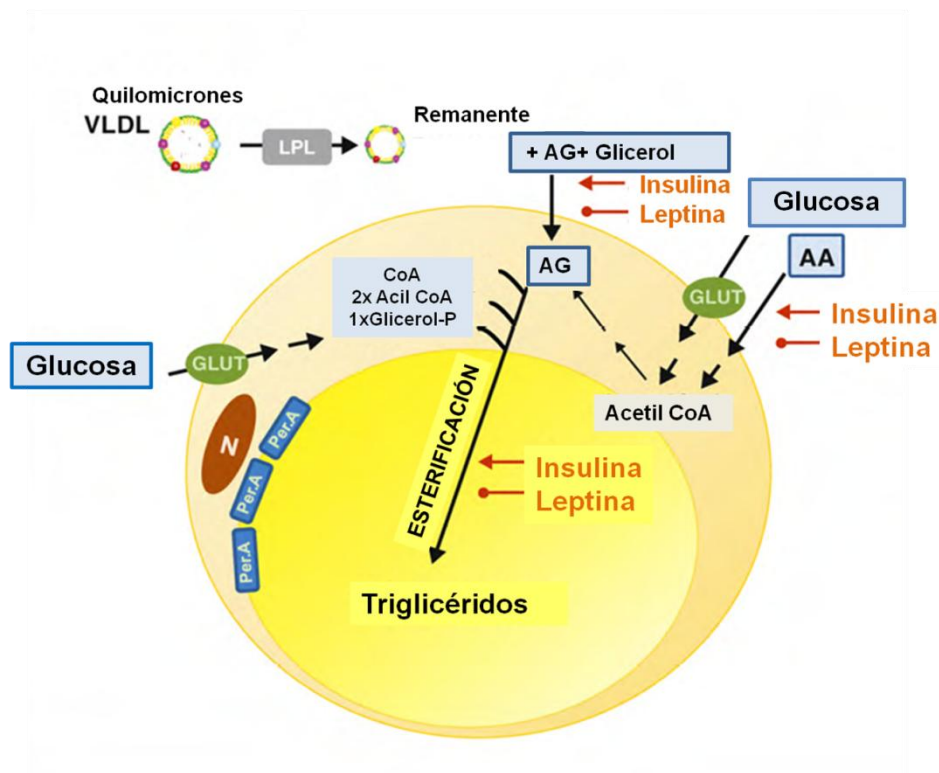


Figura 2. Lipogénesis.

El aumento en los niveles de la insulina en el postprandio conduce a la inducción de la lipogénesis y la inhibición de la lipólisis. La lipoproteína lipasa (LPL) es la enzima que hidroliza los triglicéridos de las VLDL y los quilomicrones hasta AGL y monoglicerol, para después ser almacenados por el tejido adiposo. Estos AGL son captados por los adipocitos a través de procesos de transporte activo mediado por proteínas transportadoras específicas de AG. Dentro de los adipocitos, los AGL son esterificados con glicerol para formar triglicéridos y ser almacenados dentro de las gotas lipídicas. La leptina antagoniza la lipogénesis y promueve la lipólisis. Abreviaturas. CoA:(coenzima A); glicerol-P: fosfo-glicerol; PERA: perilipina A; GLUT: glucosa transportadora; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; *Adaptada de Genevieve M y Streamson Ch,2010 (40).*

1.3.4. Lipólisis.

El proceso de lipólisis libera 3 AGL y una molécula de glicerol por cada TG (54). Este proceso se lleva a cabo en etapas sucesivas por un complejo enzimático formado por la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la adipo-triglicérido-lipasa (ATGL) que catalizan las dos primeras reacciones de hidrólisis, y por la monoglicerol lipasa (MGL) responsable de la escisión del último ácido graso del glicerol.

La HSL se expresa principalmente en el tejido adiposo y en el músculo esquelético y su actividad está sujeta a un control realizado por hormonas y neurotransmisores que modulan la concentración intracelular de AMPc (Adenosín monofosfato cíclico). El control de la función del adipocito involucra varios subtipos diferentes de adrenorreptores (β_1 , β_2 , β_3 , α_2). Los receptores adrenérgicos β_1 , β_2 , y β_3 que activan la adenilato ciclasa para generar AMPc coexisten en el mismo adipocito con el adrenorreceptor α_2 que la inhiben. Una elevación del AMPc intracelular lleva a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (AMPc-PK) la cual lleva a cabo, a través de fosforilaciones, la activación de la HSL. Por otro lado, la estimulación del receptor α_2 promueve la inhibición de la adenilato ciclasa, reduciendo el contenido intracelular de AMPc y por consiguiente la inhibición de la lipólisis (55).

Cuando la HSL es fosforilada, migra desde el citosol hacia la superficie de la gota lipídica del adipocito. A su vez, la fosforilación de las perilipinas, unas proteínas localizadas en la superficie de la gota lipídica, permiten que la HSL pueda catalizar la hidrólisis de los TG. Las perilipinas no fosforiladas crean una barrera entre la HSL y los lípidos, inhibiendo la lipólisis, mientras que la fosforilación de las perilipinas por la proteína quinasa A (PKA) permite a la HSL acceder a la superficie de la gota lipídica (56). Las catecolaminas (norepinefrina y la epinefrina) son hormonas que regulan la actividad HSL ya que son compuestos responsables de la estimulación del metabolismo de las grasas, a través de tres subtipos de receptores beta-adrenérgicos situados en la superficie celular que activan las cascadas de fosforilación asociadas a la formación del AMPc.

La insulina inhibe la lipólisis a través de los efectos mediados por la fosfodiesterasa-3, una enzima que causa la inactivación del AMPc por conversión directa a 5-AMP. También inhibe a la adenilato ciclasa y es capaz de internalizar los

receptores beta-3-adrenérgicos generando una resistencia a la regulación mediada por las catecolaminas.

La cantidad y la composición de la dieta son importantes moduladores fisiológicos de la lipólisis (57).

Genes implicados en el proceso de lipólisis.

ATGL (Adipo triglicérido lipasa)

La ATGL es una lipasa que cataliza el paso inicial en la lipólisis al hidrolizar los TG a diglicéridos en las gotas lipídicas de los adipocitos, siendo la ATGL la proveedora del sustrato de diglicéridos para la HSL. Los mecanismos involucrados en la regulación de la ATGL no se conocen en detalle, pero se ha demostrado que la expresión de esta enzima puede ser inducida por PPAR γ (receptor de proliferador de peroxisoma activado gamma) (58).

La ATGL se induce en respuesta al ayuno (59) ya que interviene en la movilización de grasa, y se ha observado que la leptina y un estado de resistencia a la insulina aumentan su expresión en tejido adiposo, con el subsecuente incremento de AGL circulantes (60).

HSL (Lipasa sensible a hormonas)

La HSL se activa por fosforilación controlada por la proteína quinasa A la cual, está asimismo activada por la vía del AMPc. La HSL cataliza la conversión de los TG a diglicéridos junto con la ATGL, y la de los diglicéridos a monoglicéridos. La activación de la HSL causa el incremento de la concentración de AGL y glicerol en el plasma durante el ayuno. En un estudio realizado por Magré., et al (61)., se encontró una relación entre un polimorfismo en la HSL con la obesidad y la DMT2. Además, se ha observado que en sujetos obesos existe una reducción en los niveles de expresión de HSL (62) y que tiene una menor actividad lipolítica en los adipocitos localizados en la grasa abdominal, lo que justificaría su relación con la obesidad (63).

MGL (Monoglicerol lipasa)

Esta enzima, cataliza la tercera etapa del proceso de hidrólisis de los TG, se expresa en tejido adiposo y es necesaria para completar la lipólisis. Los estudios referentes a la relación de la expresión de MGL con la obesidad no son del todo contundentes ya que se ha observado que la expresión de MGL en tejido adiposo subcutáneo es menor en sujetos obesos, cuando se comparan con sujetos sanos (64), sin embargo en otro estudio se observó que la activación de MGL no muestra relación con el IMC o con otros índices de adiposidad (65).

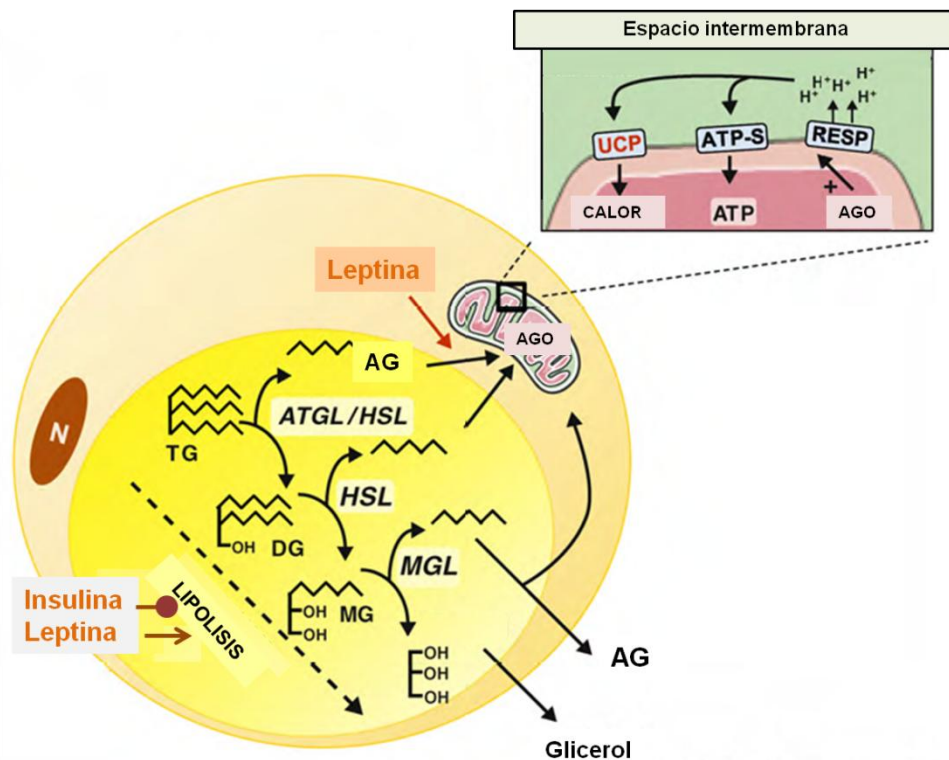


Figura 3. Lipólisis.

La hidrólisis de triglicéridos dentro del adipocito da lugar a una molécula de glicerol y 3 de AGL. La formación de triglicéridos a diglicéridos es catalizada por las enzimas HSL y ATGL. Los diglicéridos son hidrolizados por la HSL a monoglicéridos, quedando dos AGL y un ácido graso unido a la molécula de glicerol. El monoglicérido remanente es entonces hidrolizado por la enzima MGL. La insulina tiene efecto inhibitorio sobre la lipólisis. El ácido graso y el glicerol pueden ser liberados a la circulación o el ácido graso puede ser oxidado en la mitocondria. La oxidación de AG forma sustrato para la cadena respiratoria. ATP o producción de calor que se originan por la descarga del gradiente de protones en el espacio intermembranal de la mitocondria por la vía de la ATP sintasa o UCP respectivamente. Abreviaturas: AG (ácido graso), TG (triglicéridos), DG (diglicérido), MG (monoglicérido) N: núcleo; ATGL:adipo triglicérido lipasa; HSL: lipasa sensible a hormonas; MGL: monoglicérido lipasa; AGO (oxidación ácido graso), UCP: Proteína desacoplante; y ATP-S: ATP sintasa. *Adaptada de Genevieve M y Streamson Ch,2010 (40).*

1.3.5 Almacenamiento de lípidos en el adipocito.

FABP4 (Proteína 4 de unión a ácidos grasos)

FABP4 se expresa en el tejido adiposo y en macrófagos (66) y representa el 5% del total de proteínas intracelulares del adipocito maduro (67). En un estudio con roedores deficientes de FABP4, se ha observado que existe una reducción en el proceso de lipólisis, sugiriendo una relación de FABP4 en éste proceso, tal vez mediante una interacción con HSL (68). Otros estudios demuestran que FABP4 también es sobreexpresada en macrófagos durante el proceso de diferenciación a células espumosas, de manera que en modelos *knock-out* de FABP4 hay una reducción del desarrollo de placas de ateroma (69). Por otra parte, la concentración de FABP4 plasmática se ha relacionado con la distribución de grasa corporal, obesidad, SMet y DMT2 (70-72), y se ha asociado con un estado de resistencia a la insulina (72, 73).

Perilipina

Existen tres isoformas de perilipina. Las isoformas A y B se expresan en adipocitos mientras que la C se expresa principalmente en células esteroidogénicas (74). La perilipina se localiza en la superficie de las gotas lipídicas, y juega un importante papel en la regulación de la lipólisis, debido a que en condiciones basales, actúa protegiendo a las gotas lipídicas de la acción de las lipasas, pero cuando se estimula la lipólisis es fosforilada, permitiendo a las enzimas HSL y ATGL acceder a la superficie de las gotas e hidrolizar los TG localizados en su interior (75).

Vimentina

La vimentina es una proteína estructural del adipocito considerada un marcador temprano de adipogénesis, ya que tiene un efecto regulador del contenido de la gota lipídica (76). La vimentina fue identificada en membranas enriquecidas con GLUT-4, sugiriendo un rol en el transporte de glucosa (77). Se ha observado que la alteración de filamentos intermedios y microtúbulos en adipocitos 3T3-L1 mediante la

microinyección de vimentina derivada de péptidos, provoca la dispersión de GLUT de la región perinuclear a regiones periféricas de las células, lo que sugiere que el aumento de vimentina puede contribuir a una alteración de los transportadores de la glucosa **(78)**.

Caveolina

Las caveolinas son proteínas integrales de la membrana plasmática presentes en estructuras celulares denominadas caveolas, las cuales son invaginaciones de la membrana plasmática. La caveolina-1 es una proteína que tiene una función importante en las membranas de las células, ya que participa en la distribución intracelular de los lípidos, así como en el almacenamiento de los mismos en la gota lipídica. Las caveolinas están relacionadas con la formación de la gota lipídica en el adipocito y se han asociado con resistencia a la insulina, cardiopatías, y distrofia muscular, entre otras **(79, 80)**.

1.4. Disfunción de tejido adiposo.

La obesidad se caracteriza por un exceso de tejido adiposo corporal. No obstante, es la alteración funcional del tejido adiposo y no sólo su acumulación la que juega un papel relevante en esta patología, ya que el aumento de grasa corporal se debe principalmente a la hipertrofia, lo que provoca que las funciones normales de regulación metabólica de dicho tejido se modifiquen, provocando efectos o alteraciones en diversos órganos.

Recientemente, se ha propuesto la hipótesis de la “capacidad de expansión limitada del tejido adiposo”, la cual propone que la relación entre la obesidad, la inflamación y las complicaciones metabólicas, no está directamente relacionada con la masa grasa total, si no con la falta de capacidad del tejido adiposo para expandirse y satisfacer las demandas de almacenamiento de TG **(81)**.

La hipertrofia del adipocito es evidente en pacientes con obesidad y DMT2 **(82)**. Estudios *in vitro* sugieren que factores liberados localmente por los adipocitos hipertrofiados, como TNF α y el factor de crecimiento insulinoide (IGF)-1, estimulan la hiperplasia de manera paracrina **(83)**. Varios factores de transcripción influyen en la diferenciación de preadipocitos; por ejemplo PPAR γ es uno de los receptores nucleares más importantes que estimula la hiperplasia del adipocito y puede actuar en una redistribución (disminución) del tamaño del adipocito **(8)**.

Recientemente se ha demostrado que la disfunción del tejido adiposo en la obesidad es uno de los eventos más importantes, que pueden iniciar y desencadenar un fenómeno de inflamación celular **(84)**. Varias vías de señalización inflamatoria celular (tales como c-jun N-terminal Quinasa (JNK) y NF-kB) se encuentran sobreexpresadas y activadas en el tejido de adiposo de los pacientes obesos, desencadenando un aumento de la expresión de citoquinas tales como TNF- α , interleuquina-6 (IL-6) y de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), entre otras. Varios de estos mediadores inflamatorios inducen efectos deletéreos sobre las vías de señalización a la insulina, mientras que la inhibición de este proceso inflamatorio asociado a la obesidad puede inducir una mejoría en la sensibilidad periférica de la insulina **(85, 86)**.

El tejido adiposo disfuncional está sometido a otras agresiones o alteraciones tales como la hipoxia y el estrés oxidativo y al estrés mecánico atribuible a la hipertrofia

del adipocito (87). Estos procesos fisiopatológicos (inflamación y estrés oxidativo) están altamente integrados y es muy probable que constituyan ambos un círculo vicioso, como consecuencia de un defecto en la capacidad adaptativa de la célula y en particular del adipocito para enfrentarse con el exceso a largo plazo de nutrientes y de las repuestas metabólicas que ello conlleva en la obesidad. Todas estas alteraciones originan una disfunción de las organelas del adipocito y de forma particular de la mitocondria y del retículo endoplásmico (RE) originando un fenómeno de estrés del RE. Como consecuencia del estrés del RE se produce una activación de las proteínas relacionadas con el estrés del RE en el tejido adiposo, fenómeno que se asocia con la activación de las vías inflamatorias reguladas por JNK-1 y la producción de citoquinas inflamatorias, así como con el desarrollo de la resistencia a la insulina (88, 89).

La activación de la respuesta inflamatoria y la sobreproducción de citoquinas inflamatorias inhiben la acción de la insulina a través de la transfosforilación de serina del substrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) (90, 91). En el citoplasma JNK1 actúa como inhibidor de la señalización de la insulina a través de la fosforilación del receptor de insulina IRS-1, y en casos de estrés prolongado puede degradarlo. En el núcleo, JNK fosforila el factor de transcripción de PPAR γ , el mayor regulador de la homeostasis de glucosa y lípidos en el adipocito y el mayor modulador de sensibilidad a la insulina. Esta fosforilación puede inhibir la actividad de PPAR γ y afectar negativamente a la sensibilidad a la insulina en la célula (88). De esta manera el tejido adiposo es considerado el sitio donde inicia localmente la resistencia a la insulina inducida por la obesidad, antes de volverse sistémica.

1.4.1 Estrés del retículo endoplásmico en tejido adiposo.

El RE es un importante sensor de la sobrecarga metabólica en el adipocito, de esta manera el exceso de energía proveniente de los alimentos y el incremento en el almacenamiento de lípidos en el adipocito causa alteraciones funcionales del RE y la mitocondria, ocasionando los efectos fisiopatológicos de la obesidad.

En tejido adiposo, la hipoxia o el exceso de lípidos, entre otros factores, pueden alterar la homeostasis del RE, provocando una actividad errónea en el plegamiento de proteínas, causando que estas proteínas mal plegadas se acumulen en gran cantidad en el lumen del RE, teniendo como consecuencia un estado de estrés o congestión proteica.

Para disminuir esta sobrecarga, el RE inicia la respuesta a las proteínas mal plegadas (**UPR:unfolding protein response**), esta respuesta consiste en un programa transcripcional cuya función es disminuir o detener la síntesis de proteínas a través de promover su rápida degradación y prevenir la acumulación y disrupción de la homeostasis en el RE (**92**).

El sistema de respuesta al estrés del RE está regulado por varias proteínas transmembrana: la proteína IRE-1 (inositol requiring 1), PERK (KR-like endoplasmic reticulum kinase/pancreatic) y ATF6 (activating transcription factor 6). El mecanismo de señalización ocurre de la siguiente manera: en ausencia de estrés la chaperona BiP se une desde la cara interna del RE a los sensores de estrés IRE1, PERK y ATF6, manteniéndolas en la cara externa del RE y en un estado inactivo. Durante una situación de estrés en el RE, BiP se une a las proteínas mal ensambladas, y se separa de los sensores activándolos. ATF6 una vez liberado, se dirige al aparato de Golgi y migra al núcleo para activar la transcripción de genes de respuesta a estrés de RE, principalmente el gen que expresa la proteína XBP-1 (X-boxbinding- protein), que modula la UPR y la hace más efectiva. En paralelo, IRE-1 se dimeriza de manera que se activa su actividad endorribonucleasa, llevando a cabo un corte y empalme del mRNA de XBP-1, eliminándole un pequeño intrón, que cambia el marco de lectura traduccional del XBP-1, lo que provoca que se traduzca su forma activa. Al mismo tiempo, PERK es activado y fosforila a F2 α . La dimerización y autofosforilación de PERK, junto con la fosforilación de eIF2 α resulta en la inhibición generalizada de la traducción.

Simultáneamente, la región citosólica de ATF6 se translocará al núcleo y actuará como un factor de transcripción que activará la expresión de las chaperonas residentes en el RE (BiP (glucose-regulated protein, 78kDa), CNX (calnexina), CRT (calreticulina), PDIA-3 (protein disulfide isomerase family A, member 3)) que se hacen cargo de los agregados proteicos que se han acumulado. Estas chaperonas trabajan conjuntamente con un aparato o sistema interno específico del RE para degradar las proteínas desnaturalizadas. Esta respuesta coordinada detiene la síntesis y acumulación de proteínas y da tiempo para la eliminación de las proteínas mal plegadas, restableciendo la homeostasis celular (**93**).

Cuando la situación de sobrecarga es constante en el RE, debido a una continua situación de estrés como es la obesidad o el exceso de nutrientes, NF-kB desencadena

las principales rutas inflamatorias como JNK, y PKC- θ , y por consiguiente la alteración de las vías de señalización de la insulina **(89)**. En modelos animales se ha demostrado, que la eliminación del gen que codifica para XBP-1 ocasiona un aumento en la susceptibilidad de desarrollar diabetes, la cual fue asociada con la sobrecarga crónica del RE, hiperactivación de JNK y alteración en la señalización de la insulina en el hígado **(89)**. Además se ha demostrado que la disminución de estrés del RE por medio de chaperonas químicas, incrementaron la respuesta al plegamiento de proteínas, y la sensibilidad a la insulina, teniendo un efecto reversor de la DMT2 **(94)**.

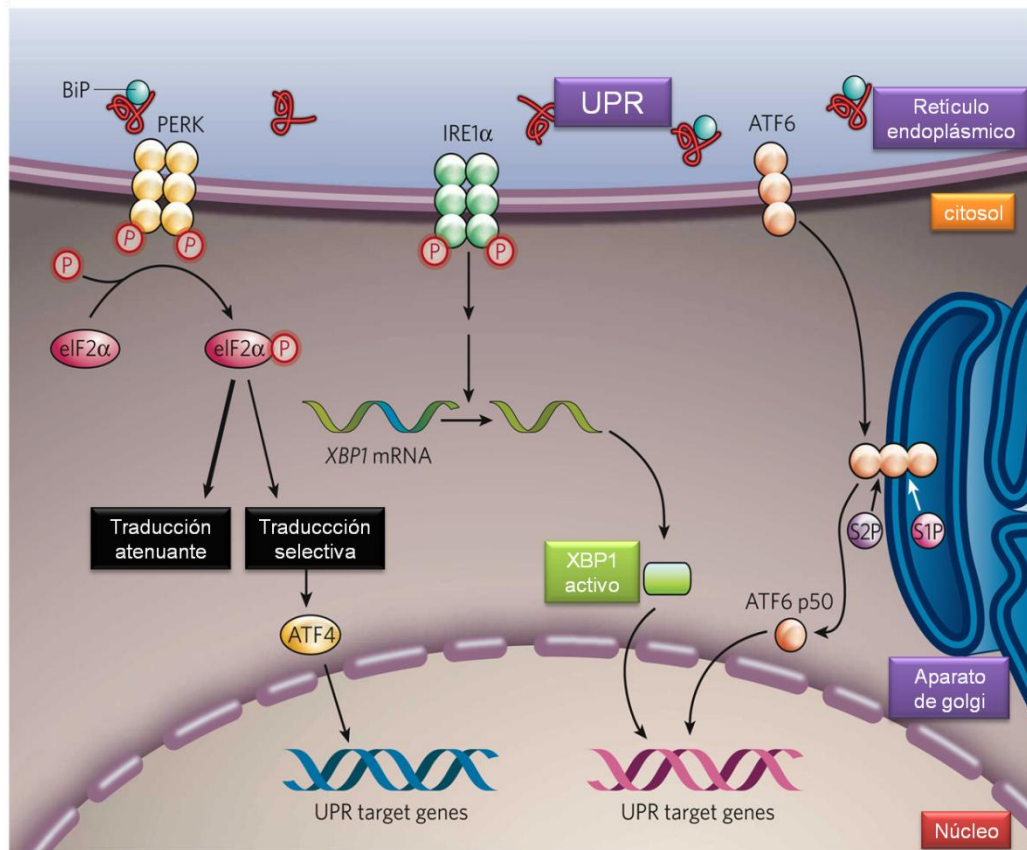


Figura 4. Respuesta a mal ensamblaje proteico (unfolded protein response o UPR).

En ausencia de estrés la chaperona del RE BiP se une a los sensores de estrés IRE1 α , PERK y ATF6, manteniéndolas en un estado inactivo. Durante una situación de estrés en el RE, BiP se une a las proteínas mal ensambladas, y se separa de los sensores. La liberación de BiP resulta en la activación de PERK, a través de la homodimerización y transautofosforilación. PERK activado se encarga de fosforilar el factor de transcripción eIF2 α , reduciendo la traducción de RNA mensajero. ATF4 mRNA, se traduce en presencia de eIF2 α fosforilado. ATF4 activa la transcripción de genes-diana que codifican factores de la UPR, implicados en la biosíntesis de aminoácidos, respuesta al estrés oxidativo y apoptosis. La liberación de BiP también permite que IRE1 α remueva un a 26-base intron de XBP-1 mRNA. XBP-1 mRNA codifica un potente factor de transcripción que trasloca al núcleo, activando la expresión de los genes diana de UPR. La liberación de BiP de ATF6 permite que ATF6 transloque al aparato de golgi, donde este es escindido por e las proteasas S1P y S2P, produciendo un activo fragmento de ATF (ATF6 p50). Este fragmento migra al núcleo, activando la transcripción de genes diana de UPRs. S1P, site-1 protease; S2P, site-2 protease; XBP-1, X-box-binding protein 1. *Adaptado de Kezhong Zhang, and Randal J. Kaufman, 2008 (92).*

1.4.2. Proceso inflamatorio en tejido adiposo.

La obesidad está asociada a un estado de inflamación de bajo grado **(14)**. Uno de los primeros estudios que relacionaron la obesidad con un estado inflamatorio, fue el llevado a cabo por Hotamisligil., et al **(95)**, en el cual demostró que en el tejido adiposo de individuos obesos se produce un aumento en la producción de TNF α . Posteriormente, diversos estudios confirmaron este hallazgo, al observar que los niveles plasmáticos de varios mediadores inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), IL-6, y PAI-1, así como la actividad de varios activadores de la inflamación como I κ B α quinasa β (IKK β) y c-Jun N-terminal quinasa 1 (JNK1) son más altos en condiciones de obesidad **(96, 97)**.

La obesidad es el resultado de la respuesta del organismo a un balance positivo de energía. Esto además conduce a la disfunción del tejido adiposo y la activación de la ruta inflamatoria, en parte debida al estrés de RE generado. Además, la pérdida de la capacidad de almacenamiento de TG, deriva en muerte del adipocito y subsecuente derrame de lípidos y del contenido intracelular, situación que activa la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, promoviendo un estado inflamatorio **(81)**. Por otro lado, el tejido adiposo es la mayor fuente de citoquinas proinflamatorias circulantes, debido a que los macrófagos presentes en el tejido adiposo son las principales células en la producción de citoquinas inflamatorias en la obesidad **(17)**.

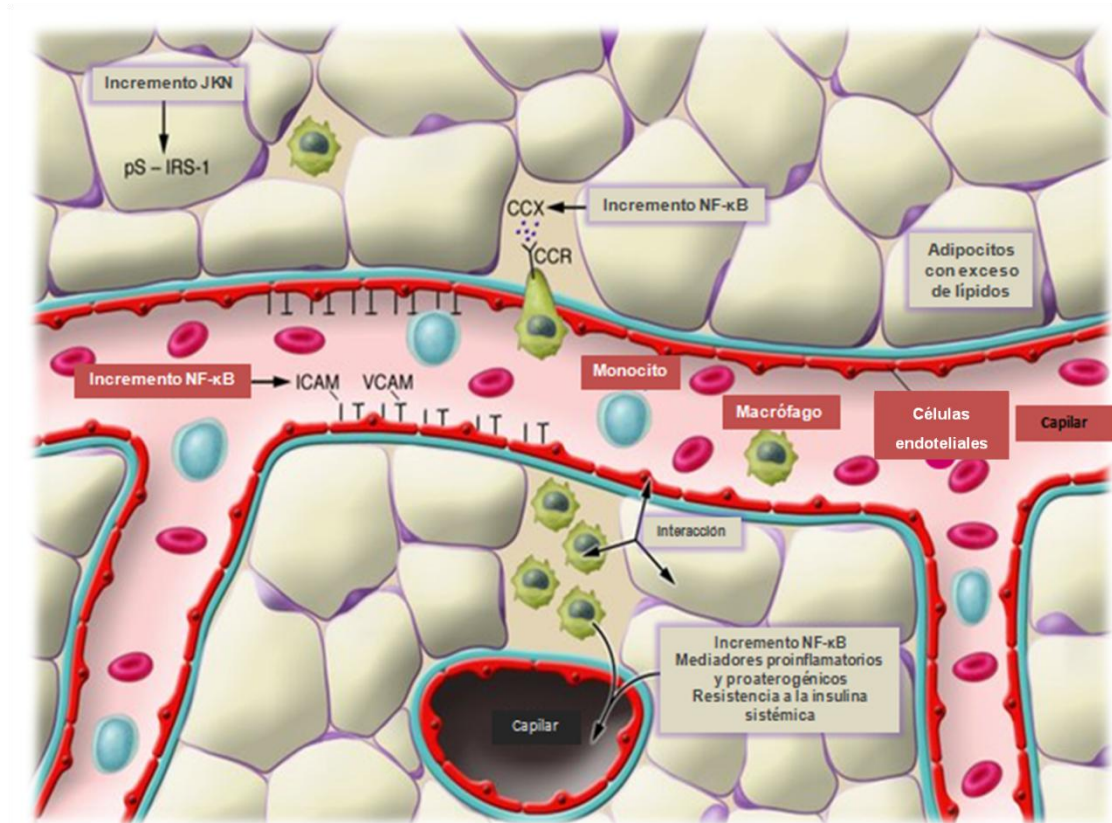


Figura 5. Mecanismos potenciales de la activación del proceso inflamatorio en tejido adiposo.

Exceso en el consumo energético por medio de la dieta y la obesidad causan acumulación de lípidos en adipocitos, iniciando un estado de estrés celular y la activación de JNK y NF-κB. Estas vías de señalización inflamatoria regulan la fosforilación de proteínas y eventos celulares de transcripción, lo que conduce a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6, leptina y resistina, quimiocinas como MCP-1, y otros mediadores pro-aterogénicos, por ejemplo, PAI-1. Moléculas de adhesión endotelial (por ejemplo, ICAM-1 y VCAM-1) y moléculas quimiotácticas (designado CCX) se unen las integrinas y los receptores de quimioquinas (CCR), respectivamente, en la superficie de los monocitos para ser reclutados en tejido adiposo. Los monocitos que se diferencian en macrófagos incrementan la producción de citoquinas y quimiocinas. *Adaptado de Shoelson., et al.,2006 (86).*

Genes relacionados con la inflamación en tejido adiposo.

Factor transcripcional NF-κB

La forma activada de NF-κB es un heterodímero, que generalmente se compone de dos proteínas, las subunidades p65 y p50. En situación basal se mantiene inactivo por una proteína inhibidora que lo retiene en el citoplasma celular; el inhibidor de κB (IκB),

del que su principal isoforma es I κ B α . La activación de NF- κ B puede ser iniciada por varios estímulos, entre los que se incluyen agentes inmunológicos, factores de crecimiento, procesos relacionados con el estrés oxidativo y diversas citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6) que están implicadas en el desarrollo de aterosclerosis **(98)**.

El proceso de activación de NF- κ B está mediado por el complejo IKK que está compuesto por tres subunidades, dos de ellas catalíticas, con actividad quinasa, que son IKK1 (IKK α) e IKK2 (IKK β), y una reguladora, conocida como el modulador esencial de NF- κ B (NEMO/IKK γ) sin actividad quinasa. El complejo IKK fosforila al inhibidor I κ B, y activa NF- κ B que migra al núcleo, y se une a secuencias específicas en regiones promotoras de los genes diana activando su transcripción **(99, 100)**.

La expresión de NF- κ B en tejido adiposo está relacionado con la activación de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL1 β , TNF α y las consecuencias metabólicas como son la alteración de la sensibilidad a la insulina, y desarrollo de ECV **(85)**.

El incremento en la actividad de NF- κ B y la expresión de p65 en células mononucleares se han relacionado con la obesidad y resistencia a la insulina, además su activación conduce a la expresión coordinada de varios genes que codifican proteínas, citoquinas, moléculas de adhesión y enzimas, así como otras muchas implicadas en las lesiones cardiovasculares y desarrollo de aterosclerosis **(101)**.

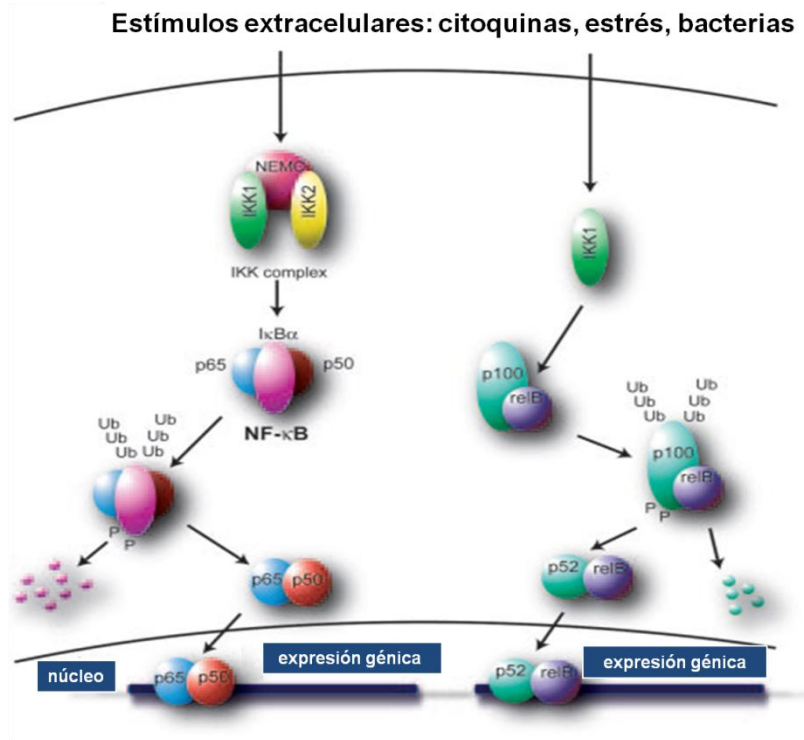


Figura 6. Activación de NF-κB. La ruta de activación clásica de NF-κB (izquierda) implica la activación del complejo IKK con la subsecuente degradación de IκBα y la translocación al núcleo del dímero de NF-κB. La activación alternativa de NF-κB (derecha) es mediada a través de IKK1 y el resultado del procesamiento de p100 a p52, resultando en la transferencia al núcleo del dímero relB-p52. Ub indica ubiquitinización. *Adaptada de De Winther, M. P.et, al (100).*

Interleuquina 6 (IL-6)

IL-6 es una citoquina de 185 aminoácidos. La expresión de IL-6 se ha propuesto como nexo de unión entre obesidad, inflamación y enfermedad coronaria (102). Los efectos de IL-6 a nivel patológico son diversos, entre ellos se ha descrito que altera el metabolismo de la glucosa, al reducir la capacidad de la insulina para suprimir la producción hepática de glucosa y disminuye la captación de glucosa inducida por la insulina en el músculo esquelético (103). El tejido adiposo, en especial el visceral, es una fuente importante de IL-6 (104) y existe una intensa asociación entre el grado de expresión de IL-6 en el tejido adiposo y los niveles circulantes de IL-6 y proteína C-reactiva (105).

Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)

MCP-1 consta de 76 aminoácidos y es una de las principales proteínas que intervienen en los procesos de quimiotaxis y reclutamiento de macrófagos. Se secreta sobre todo por los propios macrófagos, las células endoteliales y los adipocitos (20). Se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos de MCP-1 en personas obesas comparadas con delgadas. Además los niveles plasmáticos de MCP-1 correlacionan positivamente con la expresión de MCP-1 en tejido adiposo y con el IMC (106). La liberación de MCP-1 en el tejido adiposo se asocia con un aumento del reclutamiento de macrófagos debido a que la acumulación de lípidos en el adipocito lleva a un incremento de necrosis celular, y derrame de contenido celular en el tejido, lo que contribuye a la infiltración de macrófagos en tejido. La infiltración de macrófagos en el tejido promueve la respuesta inflamatoria y el desarrollo de aterosclerosis (107). La expresión de MCP-1 ha sido relacionada con la prevalencia de resistencia a la insulina y DMT2 (108).

Interleuquina 1 β (IL1 β)

IL1 β es una citoquina que juega un papel central en la regulación de una variedad de mediadores de la inflamación que han sido implicados en el proceso aterosclerótico, y su circulación se ha asociado con factores de riesgo para desarrollar obesidad, dislipemia y resistencia a la insulina (109).

En un estudio de caso control, sujetos con elevados niveles circulantes de IL1 β tenían mayor riesgo de desarrollar DMT2 (110). Además su concentración plasmática correlaciona con el desarrollo de SMet (111) y con la obesidad visceral (112). El mecanismo por el que IL1 β altera la función metabólica en los adipocitos no está claro. No obstante, se ha observado que IL1 β inhibe el transporte de glucosa por la insulina al disminuir la expresión de IRS-1, además se observó que la activación de ERK (extracelullar signal-regulated kinase) está involucrado en la acción inhibitoria de IL1 β en la señalización de la insulina (113).

1.4.3. Disfunción del tejido adiposo y resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina consiste en una respuesta defectuosa o anormal a la acción de la insulina, tanto endógena como exógena, de los tejidos periféricos insulino-sensibles sobre todo el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo **(114)**.

La resistencia a la insulina es considerada actualmente el proceso clave para el desarrollo de las patologías asociadas a la obesidad, debido a los trastornos en el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos, defectos de la coagulación y una serie de cambios metabólicos que conducen a la hiperglucemia, DMT2, dislipemia, hipertensión arterial, aterosclerosis y ECV **(85, 115)**.

El flujo de citoquinas y lípidos derivados del tejido adiposo disfuncional alcanza la circulación portal y contribuye a la inflamación hepática y a la resistencia a la insulina en el hepatocito. Este incremento de lípidos como sustrato, es secundario al aumento de adiposidad corporal, y a su vez activa la respuesta inflamatoria en el hígado, de manera que el hepatocito produce mediadores proinflamatorios y proaterogénicos. Al mismo tiempo, células inmunes asociadas, incluyendo monocitos y macrófagos, son reclutados y activados, y en conjunto causan resistencia local a la insulina y esteatosis en el hepatocito. Este proceso se une a la inflamación sistémica que ocurre desde el tejido adiposo y promueve resistencia a la insulina en el músculo esquelético y otros tejidos, además de aterogénesis en la pared vascular **(116)**.

Una consecuencia adicional de la disfunción del tejido adiposo, radica en el hecho de que los adipocitos presentan una menor densidad de receptores de insulina y una mayor de receptores beta-3 adrenérgicos, incrementando la tasa de lipólisis con una mayor liberación de AGL, situación que genera diversas consecuencias metabólicas, como son el aumento en la producción de radicales libre de oxígeno, la inducción de insulino resistencia, el sinergismo en la acción de la IL-6 y el TNF- α y la inducción de apoptosis en la célula beta pancreática, efectos todos categorizados como de lipotoxicidad **(7)**.

2. SÍNDROME METABÓLICO.

2.1. Definición.

El SMet se define como múltiples factores de riesgo de origen metabólico interrelacionados entre sí que parecen promover directamente el desarrollo de enfermedad cardiovascular (117). Los principales componentes del SMet son obesidad abdominal, dislipemia aterogénica, hipertensión arterial, y resistencia a la insulina, de manera que los pacientes presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa, hipercoagulabilidad y un estado inflamatorio crónico de bajo grado (118).

El SMet además de disminuir la calidad de vida de los pacientes, supone un importante impacto económico en los gastos de salud pública a causa de la morbimortalidad generada, ya que este síndrome está asociado con un aumento del riesgo de desarrollar DMT2 y con el aumento en más del 30% de la probabilidad de padecer ECV, las cuales constituyen actualmente la principal causa de mortalidad a nivel mundial (119-121).

Obesidad Abdominal

La obesidad abdominal (circunferencia abdominal ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres), supone la principal alteración metabólica y cardiovascular que forman parte del SMet, y que además de forma independiente supone un marcador de resistencia a la insulina y de tejido adiposo disfuncional (122).

Se ha propuesto la hipótesis, de que el tejido adiposo tiene una capacidad limitada de expansión en cada individuo, condicionada por factores genéticos y ambientales, y que cuando se excede esta capacidad, y el tejido adiposo no puede almacenar más lípidos, éstos se depositan de manera ectópica en otros órganos como hígado, músculo y tejido adiposo visceral, lo cual causa las consecuencias metabólicas perjudiciales de la obesidad (123). En estas circunstancias, cuando la capacidad oxidativa y la capacidad de almacenamiento de lípidos de estos órganos se saturan, se produce una respuesta tóxica. Este proceso lipotóxico deriva en la acumulación de TG y otros metabolitos lipídicos específicos, como ceramidas y diglicéridos, que producen un efecto de resistencia a la acción de la insulina, inflamación y apoptosis (46).

El término “lipotoxicidad” se refiere al efecto perjudicial de la acumulación de lípidos sobre el metabolismo de la glucosa. Los metabolitos tóxicos intracelulares que suponen los ácidos grasos no esterificados y de los TG causan insulinoresistencia al alterar la señalización de la insulina y los pasos intracelulares del metabolismo de la glucosa (124). Los mecanismos implicados son diversos, entre ellos, la acumulación de lípidos intracelulares es el evento más relacionado con la resistencia a la insulina en músculo esquelético y disfunción de células β (125).

En el músculo esquelético, la acumulación intracelular de AGL reduce los sustratos del receptor de insulina, lo que reduce la transducción de la señal de la insulina (125). Estos procesos conducen a un ciclo de disfunción: mayor circulación de AGL induce acumulación intracelular de lípidos y resistencia periférica a la insulina, propiciando el aumento en la secreción de insulina (126), mientras que la resistencia periférica a la insulina resulta en una lipólisis atenuada de quilomicrones y TG, incrementado las concentraciones de AGL circulantes (127). Además, se ha descrito que el exceso de AGL circulantes, puede conducir a la disminución de la función, e incluso la apoptosis de células β pancreáticas de islotes humanos *in vitro* (128). Así, el exceso de AGL circulantes puede actuar disminuyendo la respuesta de los tejidos periféricos a la insulina y, a largo plazo, con una disminución en el suministro de insulina.

Dislipemia Aterogénica

La dislipemia aterogénica está caracterizada por el aumento en los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas, disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y aumento de TG en sangre (129, 130)

El concepto de dislipemia aterogénica radica en que las alteraciones en el metabolismo de lípidos da inicio al proceso aterosclerótico, principalmente en el estado postprandial, en el cual el aumento en la circulación de las LDL y disminución en las HDL, contribuyen a un perfil favorable para desarrollo de aterosclerosis (131).

La relación entre las concentraciones de las lipoproteínas y el riesgo cardiovascular es diversa. La alta concentración de HDL está asociada con una protección contra las ECV, debido a que las HDL participan en el transporte reverso de colesterol, al eliminar el colesterol de los tejidos. Alternativamente, las concentraciones

bajas de colesterol de HDL pueden ser un índice de algún defecto del metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG. Una implicación de este hecho radica en que las partículas remanentes permanecen más tiempo en la circulación. Diferentes estudios han revelado que los remanentes del quilomicrosomas son altamente aterogénicos, y que en presencia de disfunción endotelial, es decir, en presencia de factores de riesgo, son rápidamente captados por las células endoteliales y macrófagos, dando origen a las células espumosas, la más temprana lesión de la placa aterosclerótica (**132, 133**).

Presión Arterial

La hipertensión arterial es una de las causas de la enfermedad coronaria prematura, y es un importante factor de riesgo para el desarrollo de ECV (**134**). Al igual que los demás componentes del SMet, está estrechamente relacionada con la resistencia a la insulina.

La insulina estimula el sistema nervioso simpático, produce retención renal de Na⁺ y modifica de forma directa mecanismos vasculares (contrayentes y relajantes); estos efectos pueden justificar que la insulina influye en el aumento o disminución de la presión arterial. La reducción de la excreción renal de sodio tiene como consecuencia expansión del volumen extracelular y volemia, factores que aumentan el gasto cardíaco y la resistencia periférica, considerados los principales componentes reguladores de la presión arterial (**135, 136**).

La hipertensión arterial contribuye también al desarrollo aterosclerótico, ya que se ha demostrado que la acumulación de LDL-c en las paredes arteriales depende de los diferentes niveles de presión arterial sistólica, y que a mayor presión arterial sistólica, mayor entrada de LDL-c en la íntima (**137**). En el estudio clínico CAMELOT, se demostró que los cambios que se producían en el volumen de ateroma, medidos por ecografía intracoronaria, se relacionaban significativamente con los cambios ocurridos en la presión arterial sistólica (**138**).

Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina genera, para compensar la disminución en la respuesta tisular a su acción, un aumento en los niveles plasmáticos de insulina,

situación denominada hiperinsulinemia, que durante un tiempo consigue mantener el metabolismo glucídico en rangos normales, pero posteriormente, desencadena un fallo en las células β del páncreas, situación que altera el metabolismo de la glucosa, derivando en hiperglucemia postprandial y posteriormente hiperglucemia en ayuno, situaciones que influyen en el desarrollo de DM2. En un estudio previo se ha demostrado que el 82,4% de los individuos que desarrollaron diabetes eran previamente insulino-resistentes (139).

La hiperglucemia y los productos glicosilados terminales también son responsables de la progresión de la enfermedad aterosclerótica (140). La formación de los productos glicosilados promueve la proliferación celular, estos actúan como toxinas a nivel vascular uniéndose a proteoglicanos en la superficie endotelial, alteran las uniones de colágeno, incrementan la formación de radicales libres y de esta manera potencian la cascada inflamatoria y el desarrollo de aterosclerosis (141).

Estado Proinflamatorio

El SMet y la obesidad se caracterizan por un estado inflamatorio crónico de bajo grado, resultado de un estímulo perjudicial persistente, y a diferencia de la inflamación aguda, este tipo de inflamación es silenciosa, es decir, carece de síntomas y puede permanecer por meses o años.

van Oostrom., et al (142)., demostró que la trigliceridemia postprandial puede estar relacionada con el estado pro-inflamatorio caracterizado por un incremento en la expresión de marcadores de activación de monocitos. En este sentido, los pacientes con SMet muestran una elevada trigliceridemia (143) y anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas en el postprandio (132). De hecho, hay evidencia que la concentración plasmática de citoquinas postprandiales es mayor en obesos que en sujetos delgados, y que un exceso de tejido adiposo se puede relacionar con los altos niveles circulantes de citoquinas en plasma (144).

En pacientes con SMet se han descrito altas concentraciones plasmáticas de IL-6, TNF- α , resistina y de PCR en plasma, así como de otros marcadores de respuesta inflamatoria (145).

Estado Protrombótico

El estado protrombótico en el SMet, está caracterizado una elevación del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y aumento en los niveles plasmáticos del fibrinógeno (146). El plasminógeno inicia la fibrinólisis, por tanto, un incremento en la concentración de su principal inhibidor (PAI-1) puede aumentar el riesgo de ECV de origen trombótico (147).

El tejido adiposo visceral, contribuye de manera importante a la elevación de los niveles de PAI-1, de manera que se observado un aumento del 40% en los niveles de fibrinógeno en obesos comparados con no obesos. La alteración en los niveles de estos factores en el SMet puede deberse a la obesidad abdominal, ya que se ha descrito una relación significativa entre la grasa visceral y la expresión de PAI-1 (148).

El estado protrombótico está asociado al desarrollo de ECV. Aunque el mecanismo de este vínculo se desconoce, se ha considerado que es producto de la disfunción endotelial. La trombosis de la placa de ateroma es un elemento clave en determinar la severidad del síndrome. Una hipótesis interesante es que la disrupción de la placa es común pero únicamente cuando el trombo es grande por un desequilibrio entre los factores procoagulantes y anticoagulantes fisiológicos, hay un síndrome coronario agudo. En condiciones patológicas tales como la arteriosclerosis, la formación del trombo arterial puede limitar el flujo sanguíneo causando isquemia local y progresión de la arteriosclerosis (149).

2.2. Etiología.

La etiología del SMet es el resultado de la interacción entre factores genéticos, metabólicos y ambientales entre los que destaca la dieta y un estilo de vida sedentario, siendo la obesidad el principal factor etiológico que predispone al SMet y al desarrollo de aterosclerosis (119, 150).

El SMet está influenciado por un fuerte componente genético, presentando una gran variabilidad entre diferentes grupos étnicos. El componente genético se pone de manifiesto, además en estudios realizados en familiares de primer grado de pacientes con DMT2, donde el 45% de los cuales incluso con niveles de glucosa normales, presentan resistencia a la insulina (151, 152). También se ha observado que la variación

del IMC y la obesidad visceral, considerados factores claves en el desarrollo del SMet, pueden tener un impacto genético **(153)**.

El componente genético, sin embargo, está fuertemente modulado por factores ambientales relacionados con el estilo de vida, como son la actividad física, la ingesta calórica, el tipo de grasa y la cantidad de fibra de la dieta, así como el consumo de alcohol y tabaco **(118, 150)**. Se considera que el efecto de la interacción entre factores genéticos y ambientales es mayor que el de estos dos componentes de manera aislada **(154)**.

Con respecto a la dieta, son varios los nutrientes que se han relacionado con el riesgo de desarrollar SMet. En este sentido, tanto la cantidad como el tipo de grasa en la dieta se ha considerado el factor más relevante, ya que se ha observado que una alta ingesta de grasa saturada (SFA) **(155)** y una baja ingesta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) **(156)**, está relacionado con el desarrollo del SMet, tal y como se ha descrito en estudios observacionales **(157, 158)**.

La relación del tipo de grasa en la dieta con el desarrollo de SMet puede radicar en el efecto del tipo de ácido graso con el grado de sensibilidad periférica a la insulina, un factor clave en la patología del SMet **(159, 160)**. En este sentido, se ha descrito que el consumo de dietas ricas en grasa monoinsaturada (MUFA) mejora la sensibilidad periférica a la insulina mientras que el consumo de SFA la disminuye **(155, 161, 162)**.

2.3. Prevalencia.

Múltiples estudios han analizado la prevalencia del SMet empleando diferentes criterios, diseño de estudio, edad y poblaciones por lo que es difícil contar con cifras unificadas (163). En este sentido Cameron y colaboradores han publicado una revisión de prevalencia de SMet en varios países y observaron que en poblaciones urbanas con una edad comprendida entre 20-70 años las cifras van de 8% a 24% en hombres y de 7% a 43 % en mujeres.(164). La prevalencia en Estados Unidos es del 23,7%, incrementando de manera significativa con la edad a partir de los 60 años (165). En España, los datos existentes reflejan de forma similar los resultados de estudios internacionales, como los obtenidos en el estudio epidemiológico transversal (Registro MESYAS) que se observa una prevalencia de SMet del 10% para trabajadores activos de ambos sexos (166). Sholze., et al (167), describe que en España, el 22% del total de la población hipertensa presenta los criterios suficientes para el diagnóstico del SMet, cifras que irán aumentando constantemente hasta duplicar las cifras en el año 2020 y con ello el incremento del gasto sanitario derivado.

Es necesario realizar más estudios para determinar la prevalencia en los demás sectores de la población española ya que es un dato epidemiológico de gran relevancia, al asociarse de manera directa el aumento en la prevalencia del SMet con el incremento de ECV (168).

2.4. Diagnóstico.

Han sido propuestos varios criterios para diagnosticar el SMet, de los cuales los más utilizados son los sugeridos por el Programa Nacional de Educación en Colesterol. Panel III de Tratamiento del Adulto (NCEP-ATP III) (168) y el de la Organización Mundial de la salud (OMS) (169) (Tabla 1). El diagnóstico de SMet para NCEP-ATP III se basa en la presencia de 3 de los 5 criterios descritos, y para la OMS en la presencia de intolerancia a la glucosa, DMT2, o resistencia a la insulina junto a 2 o más de los criterios descritos. Debido a la variación de criterios para el diagnóstico del SMet, en 2005 se realizó un consenso por la AHA/NHLBI (American Heart and National Heart Lung and blood Institute) para unificar criterios. Esta actualización difiere con el presentado inicialmente por NCEP-ATP III, en ser más específico para el

criterio de circunferencia de cintura tomando en cuenta el grupo étnico, que describe de manera detallada Alberti., et al (170)., en el documento del consenso.

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de SMet.

	NCEP-ATP III	OMS
I. Obesidad Abdominal		
	Circunferencia de Cintura	Índice Cintura/Cadera
Hombres	≥ 102 cm	> 0.90
Mujeres	≥ 88 cm	> 0.85
II. TG elevados	≥ 150 mg/dl	≥ 150 mg/dl
III. Niveles de HDL		
Hombres	< 40 mg/dl	< 35mg/dl
Mujeres	< 50 mg/dl	< 39 mg/dl
IV. Presión arterial elevada		
Sistólica (mmHg)	≥ 130	≥ 140
Diastólica	≥ 85	≥ 90
V. Niveles de glucosa ayuno	≥ 100 mg/dl	
VI. Microalbuminuria cociente albúmina/creatinina		≥ 20µg/min > 30 mg/g)

En cuanto al tratamiento, el grupo de consenso de la Federación Internacional de Diabetes (FID) recomienda seguir pautas específicas para tratar cada uno de los componentes del SMet (171), sin embargo es preciso alcanzar mejoría en todos los componentes y detectar los factores de riesgo principales.

Se ha descrito que la modificación en el estilo de vida ha mostrado ofrecer beneficios sobre la homeostasis general del SMet. Datos recientes indican que la disminución de peso reduce la incidencia de SMet en un 41 % (121), y que la modificación de un estilo de vida sedentario y modificación en la dieta está asociada a un descenso en la prevalencia e incidencia de SMet (172, 173).

Es importante diagnosticar oportunamente las poblaciones de riesgo de padecer SMet como son pacientes con obesidad y sobrepeso, además de contribuir con acciones preventivas en la población a través del fomento de un estilo de vida saludable.

3. DIETA.

3.1. Importancia del estado postprandial.

El estado postprandial constituye el estado metabólico habitual en el que se encuentra el ser humano a lo largo del día, donde se superponen los productos absorbidos en las comidas ingeridas a lo largo del día.

La lipemia postprandial es definida como la extensión y la duración del aumento de los TG plasmáticos en respuesta a una comida enriquecida en grasa (174). Se ha observado que el valor máximo de TG aparece entre las 3 y 4 horas tras la ingesta y los niveles no vuelven al estado basal hasta las 8-12 horas (175, 176). Son diversos los factores que pueden influir en el metabolismo de los lípidos en el estado postprandial, incluyendo la edad, factores genéticos, condiciones patológicas y la composición de la dieta (177).

La importancia del estudio de la lipemia postprandial radica en la relación de los cambios fisiológicos ocurridos después de la ingesta de una carga grasa (aumento en las concentraciones de TG, LDL, disminución en las concentraciones de HDL y descenso de la aclaramiento de VLDL, y de los remanentes de quilomicrones) con un riesgo aterogénico y subsecuente desarrollo de ECV (178-180). El incremento de TG en el postprandio, es considerado el principal mecanismo proaterogénico ya que está asociado con el aumento en la expresión de marcadores de activación de leucocitos, así como con la inducción de genes pro-inflamatorios en células endoteliales (178).

El SMet se considera una enfermedad postprandial, ya que los pacientes presentan un exagerado incremento de TG (143) y anormalidades en el metabolismo de lipoproteínas en el postprandio (132, 181). Se ha descrito que la trigliceridemia postprandial también puede estar relacionada con el estado pro-inflamatorio del tejido adiposo disfuncional (142), debido a la alteración en el metabolismo de los lípidos por los adipocitos en el postprandio, de manera que el exceso de TG se acumula en el tejido adiposo, facilitando el reclutamiento y la activación de macrófagos y la subsecuente respuesta inflamatoria (182). Debido a esto, los sujetos con SMet se vuelven más susceptibles al riesgo aterogénico.

3.2. Dieta y estado postprandial.

La hiperlipemia postprandial es definida como la elevación de las concentraciones plasmáticas de TG totales tras la ingestión de grasa y tiene una importante relevancia a nivel clínico ya que genera un incremento del estrés oxidativo, marcadores inflamatorios y disfunción vascular **(183)**.

Se ha observado que en los países occidentales se consumen al menos tres comidas diarias con unos 20-70 g de grasa en cada comida, lo que supone una situación de estrés metabólico en el metabolismo postprandial, y un mayor riesgo cardiovascular **(184)**. El estudio del efecto del tipo de grasa de la dieta sobre el metabolismo de lípidos en el postprandio ha sido prioritario en las últimas décadas, debido a que la acumulación de lípidos que se produce en la circulación después de una ingesta de grasa muestra la capacidad metabólica del individuo **(185)**.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales componentes aterogénicos en el postprandio son los remanentes de quilomicron, por lo que la influencia de la dieta sobre el metabolismo de las lipoproteínas, y optimización de la eliminación o aclaramiento de los remanentes de quilomicron, puede jugar un importante papel en la prevención de ECV. En este sentido, se ha observado que el tipo de grasa de la dieta, en particular el longitud de los ácidos grasos que conforman los TG ingeridos, influyen considerablemente en el proceso de eliminación o aclaramiento de los remanentes de quilomicrones, el cual es óptimo cuando los ácidos grasos son monoinsaturados **(186)**.

En sujetos sanos se ha demostrado que la ingesta de un desayuno rico en MUFA, basado en aceite de oliva, se relaciona con la reducción de número y aumento de tamaño de las lipoproteínas ricas en TG (TRL), en comparación con desayunos ricos en SFA y en PUFA **(187)**. Por otra parte, la ingesta de grasa rica en MUFA también se ha asociado con un mejor perfil lipídico en el postprandio (reducción de los niveles de colesterol, LDL, VLDL, TG, y aumento de las concentraciones de HDL), con respecto a modelos de dieta ricos en hidratos de carbono **(188)**.

En pacientes con SMet se ha demostrado que el consumo de una dieta rica en MUFA produce un aclaramiento más rápido de TG en plasma y concentraciones menores de TRL en el estado postprandial, al compararse con dietas isocalóricas ricas

en hidratos de carbono y SFA **(189)**; estos resultados han sido reproducidos en sujetos sanos por Silva, K.D., et al **(190)**., el cual observó que después de un periodo de consumo de una dieta rica en MUFA, aumenta la velocidad de digestión, absorción y secreción de quilomicrones y un procesamiento más rápido de TRL en el postprandio, en comparación con una dieta con bajo contenido de MUFA. En este sentido, un estudio realizado por nuestro grupo en sujetos sanos demostró que después de la ingesta de un desayuno rico en ácido oleico, disminuyó la concentración y aclaramiento de TG en comparación con desayunos altos en SFA y PUFA **(191)**.

Estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que la grasa saturada de la dieta y los altos niveles en plasma de SFA están relacionados con varias características asociadas a la dislipemia en el SMet **(160, 192)**.

Por otro lado, diversos estudios han asociado la ingesta de DHA (ácido docosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico) con la reducción de los niveles postprandiales de TG, tanto en sujetos sanos como hiperlipidémicos **(193, 194)**. Además, en un modelo animal de obesidad y SMet se observó que el consumo de una dieta equilibrada suplementada con n-3 PUFA procedente de aceite de pescado durante 3 semanas, reduce los niveles de TG y apoB48 **(195)**. En sujetos con SMet se ha demostrado que cuando la suplementación de PUFA n-3 se realiza a una dieta rica en SFA no se observan cambios en los niveles de TG en estado postprandial, lo que puede sugerir que el efecto de los PUFA n-3 desaparece cuando va combinado con SFA **(196)**.

Otro componente de la dieta que influye en la lipemia postprandial es el tipo de hidrato de carbono **(184)** en cuanto a su índice glucémico y el contenido de fibra. En sujetos con resistencia a insulina y obesidad central, se ha observado que el consumo de cereales con un alto índice glucémico aumenta la acumulación de apoB100 y apoB48 **(197)**. En sujetos sanos se ha demostrado que la suplementación en fibra de una ingesta grasa mediante cereales integrales mejora el perfil lipídico al reducir los niveles de TG y CT en el estado postprandial **(198)**.

Diversos estudios sugieren que las dietas ricas en hidratos de carbono tienen efectos adversos en el metabolismo de TG **(184, 187, 199)**, debido a que un alto aporte de hidratos de carbono en el hígado aumenta la lipogénesis hepática **(200)** y pueden disminuir la síntesis de LPL **(201)**. No obstante, se ha demostrado que los efectos adversos que causan pueden ser atenuados con la suplementación de PUFA n3 en individuos sanos normolipémicos **(202)** y en pacientes con SMet **(189)**.

Los estudios anteriores confirman que la dieta y en especial el tipo de grasa de la dieta es un factor que puede modular la respuesta lipémica postprandial y por consiguiente prevenir el riesgo cardiovascular.

Tabla 2. Estudios del efecto de la grasa sobre el metabolismo postprandial

Autor	Población-Diseño	Intervención	Resultados en estado postprandial
Pérez-Martínez., et al (187).	20 hombres sanos Estudio aleatorizado cruzado	Desayuno 1 g grasa/kg peso A:35% grasa SFA de mantequilla B: 36% MUFA de aceite de oliva C: 16 % PUFA de nueces. Antes de los desayunos tuvieron un periodo de intervención dietética de 4 semanas A: 47 %HCO, 15 % prot, 38 % grasa (22%SFA) B: 47%HCO, 15 % Prot, 38 % grasa (24%MUFA) C: 55 HCO, 15 % Prot, <30% grasa (8%PUFA)	Desayuno B: alto en MUFA ↓ Número TRL ↑Tamaño de las TRL
Roche., et al (203).	23 hombres sanos Estudio aleatorizado cruzado	8 semanas con dieta alta en MUFA proveniente del aceite de oliva (18% E) y 8 semanas con una dieta alta en SFA (17 %E). Test Postprandio: Desayuno que incluía 40 g de aceite de oliva	Después del consumo a largo plazo de la dieta alta en MUFA ↓ : LDL-c ↓ TG ↓ CT
van Oostrom., et al (204).	40 pacientes con SMet y 70 sujetos sanos Estudio comparativo	Carga grasa 50 g de grasa m ² superficie corporal, radio 0.10 (PUFA-SFA)	En pacientes con SMet ↑TG y AGL
Khoury., et al (143).	10 pacientes con SMet 10 sujetos sanos como control Estudio aleatorizado cruzado	Desayunos altos en grasa (HF), en proteína (HP) o en hidratos de carbono (HC). HF:50 % E HP: 50 % E HC: 60 % E	En pacientes con SMet después de la ingesta de HF y HP ↑TG ↓ HDL ↑ VLDL
Kolovou.,et al (183).	33 pacientes con SMet 17 pacientes con hipertensión 14 sujetos sanos Estudio comparativo	Carga grasa con 83.5 % grasa, 14 % HCO, 2.5 Prot Grasa 350 g 2/m ² de superficie	En pacientes con SMet ↑ TG ↓ HDL

Autor	Población-Diseño	Intervención	Resultados en estado postprandial
Paniagua., et al (205).	11 pacientes obesos con resistencia a la insulina. Diseño aleatorizado cruzado	3 dietas por 28 días A: Dieta baja en grasa, alta en HCO (65% HCO y 20% grasa) (6% SAT, 8% MUFA, 6% PUFA), B: Dieta Mediterránea (47% HCO y 38% de grasa (9% SFA, 23% MUFA, 75% en forma de aceite de olive extra virgen y 6% PUFA), C: Dieta alta en grasa saturada: (47% HCO, 15% PROT y 38% grasa de la cual 23% SAT, 9% MUFA, 6% PUFA) Test postprandial: Desayuno con composición similar a la intervención (443 kcal).	Después del consumo a largo plazo de la dieta Mediterránea (B): ↓ Insulina ↓ Glucosa ↑ HDL
Marín., et al (191).	21 sujetos sanos Diseño aleatorizado cruzado	3 sobrecargas grasas con 1 g de grasa/kg de peso (65 % grasa). Sobrecargas A: Rica en MUFA (22% SFA, 38% MUFA, 4% PUFA y un 0,7% de ácido *-linolénico) B: Rica en SFA (38% SFA, 22% MUFA, 4% PUFA y un 0,7% de ácido linolénico) C: Rica en PUFA n-3 de origen vegetal (20% SFA, 24% MUFA, 16% PUFA y un 4% de ácido linolénico).	Después de la carga grasa rica en SFA (B): ↑TG en el tiempo 2 h ↓TG en tiempo 8 h

3.3. Dieta y estado inflamatorio.

Durante los últimos años, se ha propuesto que la obesidad implica un estado inflamatorio de bajo grado, el cual ha sido considerado como el nexo de unión entre la obesidad y desórdenes asociados, como son la resistencia a la insulina, las ECV y el SMet (206, 207).

La investigación actual ha demostrado que la composición de la dieta es un importante factor modulador de la respuesta inflamatoria (182, 208-212) y el tipo de grasa de la dieta es considerado uno de los principales componentes que influyen en la modulación de este proceso. En este sentido se ha relacionado el consumo de MUFA con propiedades antiinflamatorias (213, 214). En nuestro grupo de investigación se ha demostrado mediante estudios de intervención en sujetos sanos, que la ingesta de dietas ricas en MUFA a base de aceite de oliva pueden disminuir los marcadores inflamatorios como es el factor NF-kB y citoquinas inflamatorias en células mononucleares (211, 215, 216) y que los compuestos fenólicos del aceite de oliva parecen tener un efecto antiinflamatorio, en pacientes con SMet (217).

El consumo de PUFA n-3 también ha sido asociado con la disminución de la respuesta inflamatoria. Un estudio transversal ha mostrado una asociación inversa entre el consumo de PUFA n-3 y la concentración plasmática de TNF α (218), y en estudios experimentales se ha demostrado que PUFA n-3 disminuye los niveles de TNF- α y IL-6 en hepatocitos (219). Además se ha descrito que el consumo de una dieta rica en hidratos de carbono complejos suplementada con PUFA n-3, mejora el perfil lipídico en el postprandio en pacientes con SMet (189), lo que influye en la respuesta inflamatoria postprandial. El efecto antiinflamatorio de los PUFA n-3 puede deberse a que modifican el contenido en fosfolípidos de la membrana celular, lo que está relacionado con la fluidez de ésta, y que puede influir en los procesos de señalización celular en la respuesta inflamatoria (209).

Con respecto al consumo de SFA, se ha relacionado el consumo de dietas ricas en este tipo de ácidos grasos con el desarrollo del SMet (220), y con el incremento de la respuesta inflamatoria y del riesgo cardiovascular (221, 222). Los mecanismos involucrados en los efectos observados tras el consumo de SFA pueden ser diversos. Entre ellos se ha propuesto que los SFA, específicamente el ácido palmítico, disminuye la oxidación de los ácidos grasos y disminuye el gasto energético diario en comparación

con el ácido oleico, situación que influye con el desarrollo de obesidad (223). El hecho de que los SFA sean menos susceptibles a la oxidación en comparación con los MUFA puede influir en la acumulación de intermediarios de lípidos en el músculo esquelético y afectar la sensibilidad a la insulina. En modelos animales se ha demostrado que una alimentación rica en SFA induce una mayor exposición de estos ácidos grasos en los macrófagos residentes en ganglios linfáticos mesentéricos, induciendo la formación de células espumosas y la respuesta inflamatoria (224). Por otra parte, se ha observado que los SFA pueden disminuir la expresión de los proliferadores de peroxisomas (PPARs), los cuales tienen un importante papel en la regulación de la homeostasis de lípidos y glucosa y su disminución propicia la expresión de genes inflamatorios en tejido adiposo (225). Otro mecanismo implicado en la respuesta inflamatoria de los SFA, es la activación de la señalización de toll-like receptor (TLR) en adipocitos (226) y macrófagos (227), activando NF- κ B y JNK. Por otra parte, en modelos animales se ha observado que los SFA reducen la expresión de adiponectina en adipocitos y disminuyen la sensibilidad a la insulina (228).

Otro componente de la dieta que se ha relacionado con la respuesta inflamatoria son los hidratos de carbono, principalmente el índice glucémico y contenido de fibra. En este sentido, se ha observado una relación inversa entre el consumo de fibra dietética y las concentraciones en plasma de PCR (208), así como en mujeres con DMT2, se ha demostrado que la fibra y el bajo índice glucémico de los hidratos de carbono están relacionados con la concentración de adiponectina en plasma, lo que puede influir en un subsecuente estado antiinflamatorio (229).

3.4. Efecto de la dieta sobre la función del tejido adiposo.

En la obesidad existe un estado inflamatorio en el tejido adiposo. En este sentido, se ha considerado que la hipoxia juega un rol importante en esta respuesta inflamatoria. En modelos animales, se ha demostrado que la expresión y secreción de IL-6 y leptina son estimuladas por un estado de hipoxia, así como la disminución en la expresión de adiponectina. La hipoxia también estimula el transporte de glucosa por los adipocitos y puede tener un efecto en la función celular dentro del tejido adiposo. Actualmente no está muy claro el mecanismo en el que la hipoxia influye en el estado

inflamatorio en el tejido adiposo, sin embargo, se ha propuesto que los bajos niveles de oxígeno en el tejido adiposo activa a HIF-1 α que es un sensor de hipoxia, y que éste influye en la producción y liberación de citoquinas inflamatorias, quimioquinas y factores angiogénicos **(230)**.

El estado de hipoxia, así como la disfuncionalidad para almacenar lípidos causa alteraciones funcionales del RE y la mitocondria, lo que provoca efectos fisiopatológicos de la obesidad. El RE también regula activamente el almacenamiento de lípidos, incluyendo la modulación de la absorción de ácidos grasos, almacenaje de ácidos grasos como TG, y la agrupación de TG en gotas de lípidos que sirven como almacén de energía para la síntesis de fosfolípidos.

La cantidad y principalmente el tipo de grasa de la dieta están relacionados con la homeostasis y funcionalidad tejido adiposo, así como con el fenómeno de inflamación celular. En modelos animales se ha demostrado que la administración de una dieta rica en grasa en general **(231)** y rica en SFA en particular **(232)** induce la activación de las proteínas reguladoras JNK1 provocando el desarrollo de un síndrome de resistencia a la insulina a través de un aumento en la producción de IL-6 en el tejido adiposo, así como la ingesta de una carga grasa provoca una respuesta inflamatoria con un incremento de la expresión de la sub unidad p65 de NF-kB y de IL-6 en tejido adiposo visceral **(233)**.

Con respecto al consumo de PUFA, se ha descrito que la ingesta de dietas ricas en EPA y DHA, produce un aumento en la expresión de adiponectina en tejido adiposo **(234)** y en células adiposas 3T3-L1. En humanos, van Dijk, S.J., et al **(235)**., estudió el efecto del tipo de grasa de la dieta en la expresión de genes relacionados con la inflamación en tejido adiposo de pacientes con obesidad, y observó que el consumo a largo plazo de una dieta rica en SFA aumenta la expresión de genes inflamatorios, comparado con el consumo de una dieta rica en MUFA. Adicionalmente en pacientes con SMet, se ha descrito que la ingesta de hidratos de carbono con diferente índice glucémico puede tener un efecto modulador en la expresión de genes inflamatorios en tejido adiposo **(236)**, así como en pacientes con resistencia a la insulina, se comprobó que una dieta mediterránea rica en MUFA induce un aumento en la expresión postprandial de adiponectina en el tejido adiposo periférico, comparado con una dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono **(237)**.

Los estudios que muestren el efecto de la dieta sobre la funcionalidad del tejido adiposo en humanos son escasos, y en base es esta premisa es necesario ampliar el conocimiento de las medidas terapéuticas específicas que mejoren o corrijan las alteraciones celulares y moleculares que están asociadas al desarrollo de la disfunción adipocitaria y las patologías que de ello derivan.

Tabla 3. Estudios del efecto de la dieta sobre expresión génica en tejido adiposo

Autor	Población	Intervención	Resultados en tejido adiposo	Resultados complementarios
Lu, J., et al (238).	Modelo de ratas JCR-LA con SMet Control :si	Dieta isonérgica, suplementada con 5% n-3 PUFA (aceite de pescado) por 16 semanas	↓ Expresión de enzimas lipogénicas (ACC, FAS, SREBP1)	Mejora del perfil lipídico (TG, CT, apoB48) en estado crónico y postprandial. ↓ Actividad de JNK en enterocitos ↓ Frecuencia de lesiones en el miocardio
Magné., et al (233).	24 Ratas sanas Control: Si	Carga grasa con aceite de palma (60%grasa, 20%prot, 20%HCO)	Activación postprandial ↑ NFKB(p65) ↑ Expresión IL-6 en tejido adiposo visceral	En estado postprandial ↑ 6h TG ↑ 2 h IL-6 y PAI-1
van Dijk, S.J., et al (235)	20 pacientes con obesidad Ensayo clínico controlado	8 semanas de intervención dietética 4 semanas con dieta alta en SFA (19%SFA, 11% MUFA) y 4 semanas con dieta alta en MUFA (20 % MUFA y 11% SFA)	Con la dieta alta en SFA ↓ Adiponectina ↓ PPARg ↑ Expresión de genes inflamatorios	Con la dieta alta en MUFA ↓ CT ↓ LDL-C
Kallio., et al (236).	47 pacientes con SMet de los cuales a 19 se les realizó el estudio postprandial. Estudio aleatorizado	12 semanas: Dieta A: Basada en alimentos con alta respuesta insulínica postprandial (pan avena, pan de trigo y patata) Dieta B: Basada en alimentos con baja respuesta insulínica postprandial (pan centeno y pasta) Estudio postprandial: 50 g HCO (provenientes del pan de la intervención dietética)	Dieta B: Estado crónico ↓ IL-10 TNFα	En plasma: Dieta B: Estado crónico: ↓ IL1β, IL-6 ↓ Postprandio: ↓ AGL

ACC: Acyl-CoA carboxilase

FAS: Fatty acid sintasa

SREBP1: sterol regulatory element binding protein 1

JNK: Jun N Terminal kinase

III. HIPÓTESIS

Una de las características más comunes en los pacientes que presentan síndrome metabólico (SMet) es obesidad abdominal. El aumento y expansión que experimenta el tejido adiposo en personas obesas provoca una serie de alteraciones fisiopatológicas entre las que destaca la disfunción del tejido adiposo **(150)**. La exposición a un balance positivo de energía durante un largo periodo de tiempo produce fenómenos de hiperplasia (incrementa el número de adipocitos) e hipertrofia (incrementa el tamaño de los adipocitos) en el tejido adiposo que desemboca en una disfunción de éste, así como en la infiltración de macrófagos en el mismo. De esta manera, la disfunción del tejido adiposo ha sido relacionada con la disfunción de varias organelas del adipocito, provocando el estrés del retículo endoplásmico y estrés oxidativo (disfunción de la mitocondria), fenómenos que han sido asociados con la activación de las vías inflamatorias y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, y que contribuyen al estado inflamatorio de bajo grado característico en obesidad y SMet, lo que a su vez influye en el fenómeno de resistencia a insulina y desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) **(88, 239)**.

La dieta podría modular estos procesos, de hecho se ha observado un efecto diferencial del tipo de grasa en la dieta en la expresión de genes inflamatorios en tejido adiposo, de manera que la ingesta a largo plazo de una dieta alta en ácidos grasos saturados (SFA) aumenta y la dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) reduce la expresión de estos genes en estado de ayunas **(235)**. Además, el consumo de una dieta mediterránea rica en MUFA reduce la resistencia a la insulina, proceso que fue asociado a un aumento en la expresión postprandial de adiponectina en tejido adiposo periférico **(237)**. Por otro lado, estudios en células mononucleares han mostrado los efectos anti-inflamatorios de la ingesta de dietas ricas en MUFA sobre la activación de NF-kB **(211, 215)**.

Sin embargo, en tejido adiposo no se ha estudiado si en estado postprandial, situación en la que se encuentra el ser humano la mayor parte del día, la cantidad y tipo de grasa en la dieta modula en pacientes con SMet la función endocrina, así como la expresión de genes asociados a la disfunción adipocitaria y con una importancia fisiopatológica en el desarrollo de SMet, como son los implicados en el metabolismo

lipídico, en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico y en la respuesta inflamatoria.

La disfunción del tejido adiposo es un importante factor en el desarrollo de los componentes del SMet, por lo que desde el punto de vista terapéutico, los avances en el conocimiento del efecto de la cantidad y tipo de grasa en la dieta sobre la disfunción del tejido adiposo contribuyen al desarrollo de medidas para mejorar el tratamiento y prevención del SMet y las ECV asociadas.

Hipótesis: La cantidad y tipo de grasa en la dieta puede modular la función endocrina y el metabolismo lipídico, así como procesos relacionados con enfermedad cardiovascular en el tejido adiposo de pacientes con SMet.

III. HYPOTHESIS

One of the most common components of the metabolic syndrome (MetS) is the abdominal obesity. The growth and expansion of adipose tissue in obesity leads to several pathophysiological changes, being the most important the adipose tissue dysfunction (150). A positive energy balance over a long period of time produces phenomena of hyperplasia (increased number of fat cells) and hypertrophy (increased size of adipocytes) in adipose tissue, which lead to its dysfunction, as well as to the macrophage infiltration. Thus, adipose tissue dysfunction has been linked to the dysfunction of several adipocyte organelles, causing both reticulum endoplasmic (RE) stress and oxidative stress (mitochondrial dysfunction), phenomena that have been associated with the activation of inflammatory pathways and the production of proinflammatory cytokines, which contribute to low-grade inflammatory state characteristic of obesity and MetS, and which in turn influences on the phenomenon of insulin resistance and development of cardiovascular disease (CVD) (88, 239).

The diet could modulate these processes, in fact it has been shown a differential effect of type of fat in the diet on the expression of inflammatory genes in adipose tissue, thereby the long-term intake of high saturated fatty acids diet (SFA) increases, and the high monounsaturated fatty acids diet (MUFA) decreases the expression of these genes in the fasting state (235). Additionally, the consumption of a MUFA-rich Mediterranean diet reduces insulin resistance, which was associated with increased postprandial adiponectin expression in peripheral adipose tissue (237). On the other hand, studies analyzing mononuclear cells have shown the anti-inflammatory effects of the intake of high MUFA diets on the activation of NF-kB (211, 215).

However, it has not been studied whether in the postprandial state, condition in which humans spend most of the time, the quantity and quality of dietary fat affect the endocrine function, as well as on the expression of genes involved in adipocyte dysfunction and related with pathophysiological processes involved in the development of MetS, such as those involved in lipid metabolism, endoplasmic reticulum stress and the inflammatory response.

Adipose tissue dysfunction is an important factor in the development of the MetS, and therefore, from a therapeutic point of view, advances in the knowledge of the effect of the quantity and quality of dietary fat on adipose tissue dysfunction can

Hypothesis

contribute to the development of diet-based treatment in the prevention of MetS and its associated pathologies.

Hypothesis: The quantity and the quality of dietary fat can modulate the endocrine function and the lipid metabolism and cardiovascular disease-related processes in the adipose tissue of patients with MetS.

IV. OBJETIVOS

1. Principal.

Evaluar si el consumo de cuatro modelos dietéticos con diferente cantidad y tipo de grasa (**A.** Modelo de dieta occidental, rica en grasa saturada (HSFA), 38% energía proveniente de la grasa; **B.** Dieta rica en grasa monoinsaturada (HMUFA), 38% energía proveniente de la grasa; **C.** Dieta pobre en grasa (28% energía), rica en hidratos de carbono complejos (LFHCC); **D.** Dieta pobre en grasa (28% energía), rica en hidratos de carbono complejos suplementada con 1.24 g/d n-3 PUFA. (LFHCC n-3) modula a largo plazo en ayunas y durante el estado postprandial la función endocrina del tejido adiposo, modificando la expresión génica de adiponectina, resistina, leptina, PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1), RBP4 (proteína transportadora de retinol tipo 4) en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes con SMet.

2. Objetivos secundarios.

2.1 Investigar el efecto a largo plazo en ayunas y en estado postprandial del consumo de cuatro modelos dietéticos con diferente cantidad y tipo de grasa sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico como son los involucrados en la captación de lípidos de la dieta por el tejido adiposo (LPL (lipoproteína lipasa); lipogénesis; lipogénesis de novo (SREBP1 (proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1), FASN (Acido graso sintasa), SCD1 (Esteroil-CoA desaturasa-1)); lipólisis (HSL (lipasa sensible a hormonas), ATGL (adipo triglicérido lipasa), MGL (monoglicerol lipasa)) y genes relacionados con el almacenamiento de lípidos en los adipocitos (perilipina, vimentina, caveolina y FABP4 (Proteína 4 de unión a ácidos grasos)) en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes con SMet.

2.2 Investigar el efecto a largo plazo en ayunas y en estado postprandial del consumo de cuatro modelos dietéticos con diferente cantidad y tipo de grasa sobre la expresión de genes relacionados con el estrés de retículo endoplásmico (XBP-1 (proteína ligadora de la caja X), CNX (calnexina), CRT (calreticulina), PDIA-3 (proteína disulfuro isomerasa

del miembro 3), BiP (Proteína reguladora de glucosa, 78kDa), GSTP1 (glutación S-transferasa p 1)).en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes con SMet.

2.3 Investigar el efecto a largo plazo en ayunas y en estado postprandial del consumo de cuatro modelos dietéticos con diferente cantidad y tipo de grasa sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (subunidad p65 de NF-kB y la subunidad alfa y β de su inhibidor (IkB α , IkB β 2), así como la expresión de las citoquinas proinflamatorias (IL-6, MCP-1 y IL1 β)) en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes con SMet.

2.4 Analizar la relación de la expresión en tejido adiposo de los genes involucrados en la diferentes rutas metabólicas estudiadas tanto en estado de ayunas antes y después de la intervención dietética, así como en estado postprandial.

2.5 Analizar la relación entre la expresión génica en tejido adiposo de los procesos estudiados y los indicadores de riesgo metabólico como son sensibilidad a la insulina, valores de lipemia postprandial e índice de masa corporal.

IV. OBJECTIVES

1. Main objective.

To evaluate whether the consumption of four dietary models with different quantity and quality of fat (**A** Western diet model: rich in saturated fat (HSFA), 38% energy from fat; **B**. Diet rich in monounsaturated fat (HMUFA), 38% energy from fat, **C**. Low-fat diet (28% energy), rich in complex carbohydrates (LFHCC) **D**. Low-fat diet (28% energy), rich in complex carbohydrates supplemented with 1.24 g / d n-3 PUFA. (LFHCC n-3)) modulates, after a long-term consumption in fasting and at the postprandial state, the endocrine function of adipose tissue by modifying the gene expression of adiponectin, resistin, leptin, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), RBP4 (retinol binding protein type 4) in the subcutaneous adipose tissue of patients with MetS.

2. Secondary objectives.

2.1 To investigate the effect of the long-term consumption in fasting state and at the postprandial state of four dietary models with different quantity and quality of fat on the expression of genes related to the lipid metabolism such as those involved in the uptake of dietary lipids by the adipose tissue (LPL (lipoprotein lipase), lipogenesis, de novo lipogenesis (SREBP1 (sterol Regulatory element binding protein 1), FASN (Fatty acid synthase), SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase-1)), lipolysis (HSL (sensitive lipase hormone), ATGL (adipose triglyceride lipase), MGL (monoacylglycerol lipase)) and genes related to lipid storage in adipocytes (perilipin, vimentin, caveolin and FABP4 (fatty acid binding protein 4)) in subcutaneous adipose tissue of patients with MetS.

2.2 To investigate the effect of the long-term consumption in fasting state and at the postprandial state of four dietary models with different quantity and quality of fat on the expression of genes related to endoplasmic reticulum stress (XBP-1 (X-box binding protein 1) , CNX (calnexin), CRT (calreticulin), PDIA-3 (protein disulfide isomerase family A, member 3), BiP (glucose-regulated protein, 78kDa), GSTP1 (glutathione S-transferase pi 1)) in subcutaneous adipose tissue of patients with MetS.

2.3 To investigate the effect of the long-term consumption in fasting state and at the postprandial state of four dietary models with different quantity and quality of fat on the expression of genes related to inflammatory response (p65 subunit of NF-kB and the alpha subunit and β of its inhibitor (IkB α , IkB β 2) and the expression of proinflammatory cytokines (IL-6, MCP-1 and IL1 β)) in the subcutaneous adipose tissue of patients with MetS.

2.4 To analyze the relationship between the different metabolic pathways studied each other by comparing the adipose tissue gene expression of genes involved in different metabolic pathways studied in the fasting state before and after the dietary intervention and at the postprandial state.

2.5 To analyze the relationship between adipose tissue gene expression and metabolic risk indicators such as sensitivity to insulin, postprandial lipemia values and body mass index.

V. Materials and Methods.

1. Participants and recruitment.

This study was conducted within the framework of the LIPGENE study (Diet, genomics and metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis), a Framework 6 Integrated Project funded by the European Union. A total of 39 patients with MetS (25 females and 14 males) from the LIPGENE cohort were accepted to participate in the postprandial study and successfully concluded the dietary intervention and the post intervention studies. All participants gave written informed consent and underwent a comprehensive medical history, physical examination, and clinical chemistry analysis before enrolment. Clinical Trial Registration Number: NCT00429195. This study was carried out in the Lipid and Atherosclerosis Unit at the Reina Sofia University Hospital, from February 2005 to April 2006. The experimental protocol was approved by the local ethic committee according to the Helsinki Declaration.

1.1. Sample size calculation.

The sample size calculation was performed using the software C-4 Study Design Pack, Module. CTM (sample size calculation) version 1.0, Glaxo Wellcome ®.

The calculation was made based on the following premises:

Primary endpoint of the study: Expression of adiponectin (mRNA levels)

X1=100.00 (Basal adiponectin mRNA levels)

X2=120.00 (Postintervention adiponectin mRNA levels)

Difference in minimum expected: 20 %

Alpha error = 0.05 (Confidence level: 95%)

Beta error = 0.20 (Power: 80%)

Hypothesis Contrast: Bilateral.

Based on these premises are required 9 patients per group.

2. Design.

Subject eligibility was determined by using a modified version of the National Cholesterol Education Program (NCEP) criteria for MetS (**240**), and subjects were required to fulfill ≥ 3 of the following 5 criteria: waist circumference >102 cm (men) or >88 cm (women), fasting glucose 5.5–7.0 mmol/L, triacylglycerol ≥ 1.5 mmol/L, HDL cholesterol, <1.0 mmol/L (men) or <1.3 mmol/L (women), and blood pressure $\geq 130/85$ mm Hg or treatment of previously diagnosed hypertension.

Patients were randomly stratified to one of four dietary interventions for 12 wk., which conformed to the LIPGENE inclusion and exclusion criteria (**Table 1**). Post intervention high fat meal was administered providing the same amount of fat (0.7 g/kg body weight), wherein the fatty acid composition reflected that consumed within the intervention period. The intervention study design and intervention protocol, which also provides information about pre-, mid-, and post intervention food consumption and dietary compliance have been described in detail by Shaw., et al (**241**). Briefly, dietary intake and compliance was assessed by a 3-d (2 weekdays and 1 weekend day) weighed food intake assessments at baseline, wk 6, and wk 12. Dietary analysis program reflective of the food choices were used (Dietsource version 2.0).

Table 1. Inclusion and exclusion criteria of the LIPGENE study.**Inclusion criteria**

- Age: 35–70 years.
- Gender: males and females (not pregnant or lactating).
- Body mass index (BMI) 20–40 kg/m².
- Total cholesterol concentration equal to or <8.0 mmol/L.
- Medications/nutritional supplements allowed, on condition that the subjects adhere to the same regimen during the intervention: Anti-hypertensive medication (including beta-blockers), oral contraceptives, hormone replacement therapy, multi-vitamin supplements, other non-fatty acid based nutritional supplements (e.g. garlic, antioxidants, etc.).
- Smokers and non-smokers.
- Regular consumers of alcohol, which is not excessive as defined by elevated liver enzymes (AST and ALT).
- Ethnicity: intention to include white Europeans.

Exclusion criteria

- Age: <35 or >70 years.
- Diabetes or other endocrine disorders.
- Chronic inflammatory conditions.
- Kidney or liver dysfunction.
- Iron deficiency anemia (hemoglobin < 12 g/dL men, <11 g/dL women).
- Prescribed hypolipidaemic medication.
- Prescribed anti-inflammatory medication.
- Fatty acid supplements including fish oils, evening primrose oil, etc.
- Consumers of high doses of antioxidant vitamins (A, C, E, β -carotene).
- Red rice yeast (*Monascus purpureus*) supplement usage.
- High consumers of oily fish (>2 serving of oily fish per week of herring, mackerel, kippers, pilchards, sardines, salmon, trout, tuna (fresh), crabmeat or marlin). One portion is defined as a small herring or mackerel, one can of salmon or sardines or one salmon or tuna steak. Tinned tuna is permitted as it contains only minor amounts of long chain n-3 PUFAs.
- Highly trained or endurance athletes or those who participate in more than three periods of intense exercise per week.
- Volunteers planning to start a special diet or lose weight (e.g. the Slimfast Plan, Atkins Diet, etc.).
- Weight change equal or >3 kg within the last 3 months.
- Alcohol or drug abuse (based on clinical judgment).
- Pregnant/lactating females/women planning a pregnancy in the next 12 months. Women who become pregnant during the dietary intervention period should be removed from the study.

3. Randomization and intervention diet.

Randomization was completed centrally according to age, gender, and fasting plasma glucose concentration using the Minimization Program for Allocating Patients to Clinical Trials (Department of Clinical Epidemiology, London Hospital Medical College, UK) randomization program. The diets differed in fat quantity and quality while remaining isoenergetic (**Table 2**).

- A. High-fat, saturated fatty acid-rich diet (HSFA):** Designed to provide 38% energy (E) from fat (16% de SFA, 12 % MUFA and 6% PUFA), 15% E from protein, 47% E from CHO.
- B. High monounsaturated fatty acid-rich diet (HMUFA)** Designed to provide 38% energy E from fat (20% E from MUFA, 8% SFA, 6% PUFA), 15% E from protein, 47% E from CHO.
- C. Low fat, high complex carbohydrates-rich diet (LFHCC):** Designed to provide 57% E from CHO, 15% E from protein, 28 % E from fat (8% SFA, 11% MUFA, 6% PUFA). This diet included a 1.2- g/d supplement of control high-oleic sunflower seed oil capsules (placebo).
- D. Low fat, high complex carbohydrates-rich diet included a 1.24-g/d supplement of long chain (n-3) PUFA (LFHCC n-3):** Designed to provide 57% E from CHO, 15% E from protein, 28 % E from fat (8% SFA, 11% MUFA, 6% PUFA). This diet included 1.24-g/d supplement of long chain (n-3) PUFA [ratio of 1.4 eicosapentaenoic acid (EPA):1 docosahexaenoic acid (DHA)] from capsules (Marinol™ C-38) (**Table 3**)

Table 2. Composition of intervention period diet

	HSFA	HMUFA	LFHCC	LFHCC n-3
%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/d)				1.24
%E from CHO	47	47	57	57
%E from protein	15	15	15	15

Table 3. Composition capsules of LFHCC diets

	Marinol TM C-38	Placebo
Fatty acids	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	-
Tocopherol	3.0 mg	3.0 mg

3.1 Postprandial study.

The intervention center performed a post intervention (wk 12) postprandial challenge reflecting the fatty acid composition as that consumed on the assigned dietary period. Patients arrived at the clinical center 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 d. In the laboratory and after cannulation, a fasting blood sample was taken before the test meal, which then was ingested within 20 min under supervision. The test meal, which represents a fat overload providing the same amount of fat (65%), allowed us to study the postprandial responses after a fat challenge that may be influenced by the previous dietary intervention because adaptive effect after a long-term dietary intervention (**185**). These test meals were prepared in the center, reflected fatty acid composition of each subject's chronic dietary intervention (**Table 4**). Subsequent blood samples were drawn at 4 h. Test meals provided an equal amount of fat (0.7 g/kg body weight), E content (40.2 kJ/kg body weight), cholesterol (5 mg/ kg of body weight), fiber, and vitamin A [62.9 mmol vitamin A (retinol)/m² body surface area]. The test meal provided 65% of E as fat, 10% as protein, and 25% as carbohydrates. During the postprandial assessment, participants rested and did not consume any other food but were allowed to drink water. The composition of the breakfasts was as follows:

- A. High-fat, saturated fatty acid-rich meal (HSFA): The test meal provided 65% of E as fat (38% SFA, 21% MUFA, 6% PUFA), 10% E as protein, and 25% E as carbohydrates. HSFA meal was based on butter, whole milk, white bread and eggs intake
- B. High monounsaturated fatty acid-rich meal (HMFUFA) The test meal provided 65% of E as fat (12% SFA, 43% MUFA, 10% PUFA), 10% E as protein, and 25% E as carbohydrates. HMFUFA meal based on olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, yolk eggs and tomatoes intake
- C. Low fat, high complex carbohydrates-rich meal (LFHCC): The test meal provided 65% of E as fat (21% SFA, 28% MUFA, 16% PUFA), 10% as protein, and 25% as carbohydrates.
- D. Low fat, high complex carbohydrates-rich meal included a 1.24-g/d supplement of long chain (n-3) PUFA (LFHCC n-3): The test meal provided 65% of E as fat (21% SFA, 28% MUFA, 16% PUFA [1.24 g/d of LC (n-3) PUFA (ratio 1.4

EPA:1 DHA)], 10% as protein, and 25% as carbohydrates. LFHCC meals were based on butter, olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, yolk eggs and walnuts.

The study design is shown in **figure 1**.

Table 4. Meal composition of the fat challenge conducted post intervention

	HSFA meal	HMUFA meal	LFHCC meal	LFHCCn-3 meal
% E from fat	65	65	65	65
% E from SFA	38	12	21	21
% E from MUFA	21	43	28	28
% E from PUFA	6	10	16	16
% E from CHO	25	25	25	25
% E from complex CHO	25	25	25	25
% E from protein	10	10	10	10
Energy (kJ/Kg body weight)	40.2	40.2	40.2	40.2

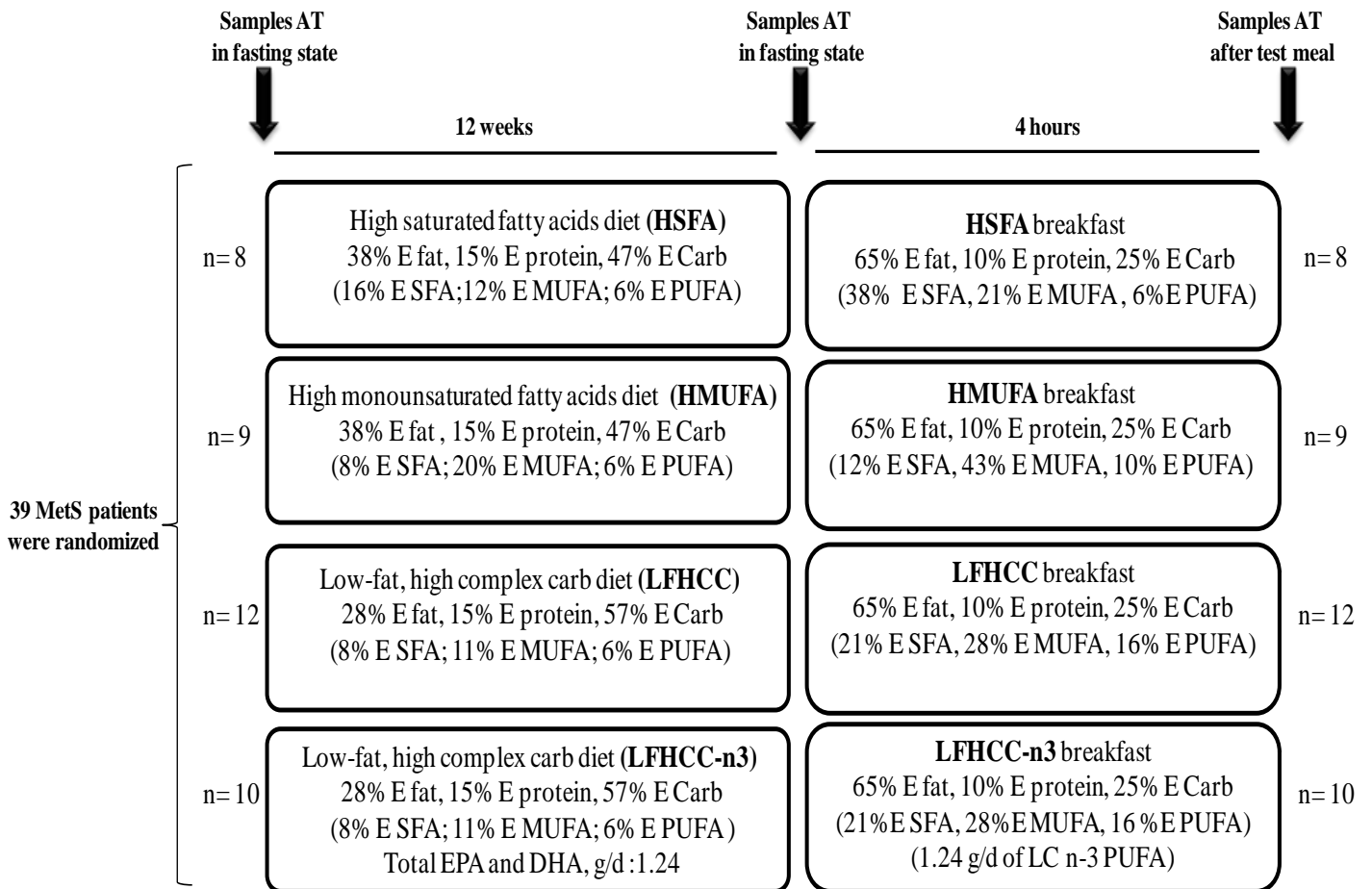


Figure 1. Diagram of the study design.

4. Measurements.

Blood was collected in tubes containing EDTA to give a final concentration of 0.1% EDTA. Plasma was separated from red cells by centrifugation at 1500 X g for 15 min at 4° C. Analytes determined in frozen samples were analyzed centrally by laboratory investigators of the Lipid and Atherosclerosis Unit at the Reina Sofia University Hospital who were unaware of the interventions. Lipid variables were assessed with a DDPII Hitachi modular analyzer (*Roche, Basel, Switzerland*) using specific reagents (*Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany*). Plasma TG and cholesterol concentrations were assayed by enzymatic procedures (**242, 243**). HDL-c was measured by precipitation of a plasma aliquot with dextran sulphate-Mg²⁺, as described by Warnick et al (**244**). LDL-c was calculated by using the following formula; plasma cholesterol – (HDL-c + large TRL-C+ small TRL-C). Plasma glucose concentrations were measured with an Architect-CG16000 analyzer (*Abbott Diagnostics, Tokio, Japan*) by the exoquinase method. Plasma insulin concentrations were measured by microparticle enzyme immunoassay (*Abbott Diagnostics, Matsudo-shi, Japan*) (CV 2.5– 6%).

Monitoring for adverse effects. Volunteers were visited each 2 wk for study. Clinical investigators assessed adverse events by using physical examinations and administering a checklist with diet-related symptoms and gave advice on how to remediate them.

Subcutaneous adipose tissue sample collection.

Subcutaneous adipose tissue samples were obtained from the superficial abdominal subcutaneous adipose tissue lateral to the umbilicus with instrument Bard® Magnum (MG1522), needles Bard® Magnum Core (MN1410) (*M & I Medical Sales, Inc., Miami, Florida, USA*). Adipose tissue samples were collected in the fasting state before the dietary intervention. For the study of postprandial adipocyte function, samples were collected in the fasting state after 12 wk of dietary intervention and 4 hours after administration of the fatty meal and stored at -80°C.

RNA isolation from adipose tissue.

Adipose tissue was homogenized by Ultra-Turrax T25 (*IKA Labortechnik*). After removal of lipids from the top of the tube, RNA was isolated with a commercial RiboPure kit (*Ambion, Applied Biosystem, Austin, TX, USA*) that is designed for rapid purification of RNA and high quality. RNA is collected from the aqueous phase by binding to a glass fiber filter. The quantification of RNA is made using the spectrophotometer v3.5.2 Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (*Nanodrop Technology*®, *Cambridge, UK*).

Reverse transcription polymerase chain reaction

The reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) was performed using the commercial kit Message BOOSTER cDNA Synthesis Kit for qPCR (*Epicentre, USA*), according to the manufacturer instructions. Briefly, it was amplified 500 pg of total RNA and then converted to cDNA. We adjusted the amount of reaction to 20 µL. The incubation conditions used in the thermal cycler MJ Thermal Cycler Personal mini™ closure (*BioRad Inc., Hercules, CA, USA*) were:

25 ° C for 5 min.

42 ° C for 30 min.

85 ° C for 5 min.

The cDNA ready for quantitative PCR, was stored at -20 °C until real time PCR performing

Gene expression by real Time PCR (RT-PCR)

The PCR reactions were carried out using the iQ SYBR Green kit (*Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA*) and the Mx3005 (Stratagene) / iQ5 iCycler (BIO-RAD thermal cycler system). Each reaction was performed on 1 µl of 1:20 (v/v) dilution of the first cDNA strand, synthesized in the previous step. The reaction was incubated at 96° C for 3 min, followed by 40 cycles of 30 s at 96 ° C, 30 s at 62 ° C, 20 s at 72 ° C and 10 s at 80 ° C where fluorescence was measured to avoid primer-dimer and background signals.

Primers used were commercial kit in a final volume of 20 µl with 10 pmol of each primer. Primers used are shown in **table 5**.

In order to select suitable housekeeping genes for the accurate calibration of experimental variations in a qRT-PCR analysis, we evaluated several reference genes usually used in our group in other tissues (β -actin and RPL13a) and two more found in expression studies of human adipose tissue (CLN3 and COBRA1) (**245**). We analyzed the expression of these 4 potential housekeeping genes on 24 subjects (6 subjects per diet) in the fasting and postprandial states. geNorm analysis showed a M value of 0.071 for RPL13a, 0.062 for CLN3, 0.08 for COBRA1 and 0.076 to β -actin. We selected CLN3 as a housekeeping gene to carry out our gene expression study on the basis of its lower M value (**246**).

Specificity of PCR amplifications was verified by a melting curve program (60-95°C with a heating rate of 0.5 °C/s and a continuous fluorescence measurement). Expression values were obtained as relative expression of the target gene versus the constitutively expressed CLN3 gene (relative expression = $2^{-(Ct, \text{Target gene}-Ct, \text{Reference gene})}$).

RT-PCR by Open Array

We analyzed gene expression by RT-PCR reactions using the OpenArray™ NT Cycler system (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*) for the genes showed in **table 6**, according to the manufacturer's instructions. The gene expression analysis was performed in samples by duplicated Primer pairs were selected from the database TaqMan Gene Expression assays (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*).

<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>. The data set was analyzed by OpenArray® Real-Time qPCR Analysis Software (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*).

Transcription Factor Analysis

We used Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Transcription Factor Analysis software (**247**) to identify the transcription factors that may be responsible for gene expression changes observed in our experimental dataset. Briefly, IPA Transcription Factor Analysis software predicts which transcription factors are activated or inhibited

to explain the up-regulated and down-regulated genes observed in the dataset. First of all, IPA Transcription Factor Analysis returns a list of transcription factors predicted to regulate the genes in the dataset. P-value of overlap indicates the statistical significance of genes in the dataset that are downstream of the transcription factor. In addition, a z-score value is generated in order to make predictions about activation (≥ 2) and inhibition (≤ -2) of a transcription factor. Predictions where both the z-score is significant (absolute value >2) and the p-value is significant ($<10E-3$) are probably the most reliable predictions.

We performed the analysis for each diet separately by using the fold change expression for each gene post-intervention at fasting state / pre-intervention at fasting state and postprandial state post-intervention/ fasting state post-intervention, as input dataset. Thus, we got a list of transcription factor predicted to regulate our list of genes (this analysis is independent of the diet but it depends of the list of genes, a p-value of overlap is generated for each transcription factor) and, in addition we got a z-score for each transcription factor and diet/meal, which shows the grade of activation or inhibition for each transcription factor when is ingested a specific diet/meal.

5. Statistical analysis.

Statistical analysis was performed using PASW Statistics, Version 18. (*Chicago, IL, USA*). The normal distribution of variables to characterize the postprandial response was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. We performed ANOVA for repeated measurements to determine the postprandial effect of the fat meal composition, with dietary intervention as the inter-subject factor. The global p-values indicate: P1: the effect of the diet and fat meal composition ingested (between-subject effect); P2: the time effect (within-subject effect) and P3: the interaction of both factors (diet by time interaction). Post hoc statistical analysis was completed using Bonferroni's multiple comparisons test, as previously published (248). In the case of IL-6 and PAI-1 (only one time point), we performed a one-way ANOVA in order to analyze statistical differences between diets, with a probability of less than 0.05 being considered significant. A study of the relationship among parameters was also carried out using Pearson's linear correlation coefficient. All the data presented are expressed as mean \pm S.E.M.

Table 5. Primers used in gene expression measurements.

Gene		Sequence	Amplicon	Efficiency %
Adiponectin	For	TATGTAATGTCCTTCTTTATCTG	207 pb	95
	Rev	AGAACGAGAGTCTGTCAAAAAA		
Resistin	For	GGGGCTGTTGGTGTCTAGCAAG	226 pb	110
	Rev	GGTCTCGGCGGCACAT		
PAI-1	For	CTCTCTCTGCCCTCACCAACATT	176 pb	93
	Rev	AGCCTGAAACTGTCTGAACATGTCG		
RBP4	For	TACTCCTGCCGCCTCCTGAA	118 pb	111
	Rev	CCTGCCGCTGCCTTACAATC		
Vimentina	For	CGCCAGGCAAAGCAGGAGT	249 pb	92
	Rev	GGCCATCTTAACATTGAGCAGGTC		
Perilipina	For	CAGATTCTGCCTCTGCGGATAAA	257 pb	99
	Rev	GAAGCGGCGGGTACTCAGAAAG		
XBP-1	For	CCTTGTAGTTGAGAACCAGGAGTTAAG	132 pb	93
	Rev	CCTGCACCTGCTGCGGACT		
CALR	For	GCAAGTTCTACGGTGACGAGGAGA	154 pb	110
	Rev	CAGTCGATGTTCTGCTCATGTTCA		
CANX	For	TATATTTTGCTGATTCTTTTGACAGA	160 pb	92
	Rev	AACACAAGTCCTTTATCACCTGGA		
PDIA-3	For	CCAAGAAGAAGAAGAAGGCACAGG	280 pb	95
	Rev	CCCACAACATTTCCCCCAACA		
BiP	For	ACAAATGAAGAAGCTGGGGATGG	187 pb	96
	Rev	CTTCAGGGGTGGTCACAGGTTTAG		
GSTP1	For	CCTGTACCAGTCCAATACCATCCT	114 pb	97
	Rev	AGGTCCCTCCACGCCGTCATT		
p65	For	CCGGGATGGCTTCTATGAGG	136 pb	93
	Rev	GGGGTTGTTGTTGGTCTGGATG		
IkB α	For	CACTCCATCCTGAAGGCTACCAAC	202 pb	87
	Rev	CACACTTCAACAGGAGTGACACCAG		
IkB β 2	For	GCCAGGAGCAGGGGAACCTTG	190 pb	111
	Rev	GCGGCTGCTGTGAACCACAA		
IL-6	For	CACCTCTTCAGAACGAATTGACAAAC	184 pb	112
	Rev	CTCATTGAATCCAGATTGGAAGC		
IL1 β	For	CAGGGACAGGATATGGAGCAA	251 pb	96
	Rev	GCAGACTCAAATTCAGCTTGTTA		
MCP-1	For	CAGCAGCAAGTGTCCCAAAGAAG	193 pb	94
	Rev	GGGGAAAGCTAGGGGAAAATAAGT		
CLN3	For	CGGCCACCTGCATCTCTGA	163 pb	101
	Rev	GGGGTGGGCCTGGGTGTCT		

Table 6. Genes measured by RT-PCR Open Array system

Gene	Name	ID TaqMan
LPL	Lipoprotein lipase	Hs00173425_m1
ATGL	Adipose triglyceride lipase	Hs00386101_m1
HSL	Lipase, hormone-sensitive	Hs00943410_m1
MGL	Monoglyceride lipase	Hs00200752_m1
SREBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	Hs00854675_gH
SCD-1	Stearoyl-CoA desaturase D9-desaturase	Hs01682761_m1
FASN	Fatty acid synthase	Hs01005622_m1
FABP4	Fatty acid binding protein 4	Hs01086177_m1
CAV1	Caveolin 1	Hs00971716_m1
LEP	Leptin	Hs00174877_m1

VI. RESULTS

A subgroup of 39 subjects with MetS from the Lipgene cohort (241) (14 men and 25 women) completed the long-term dietary intervention and postprandial post-intervention study.

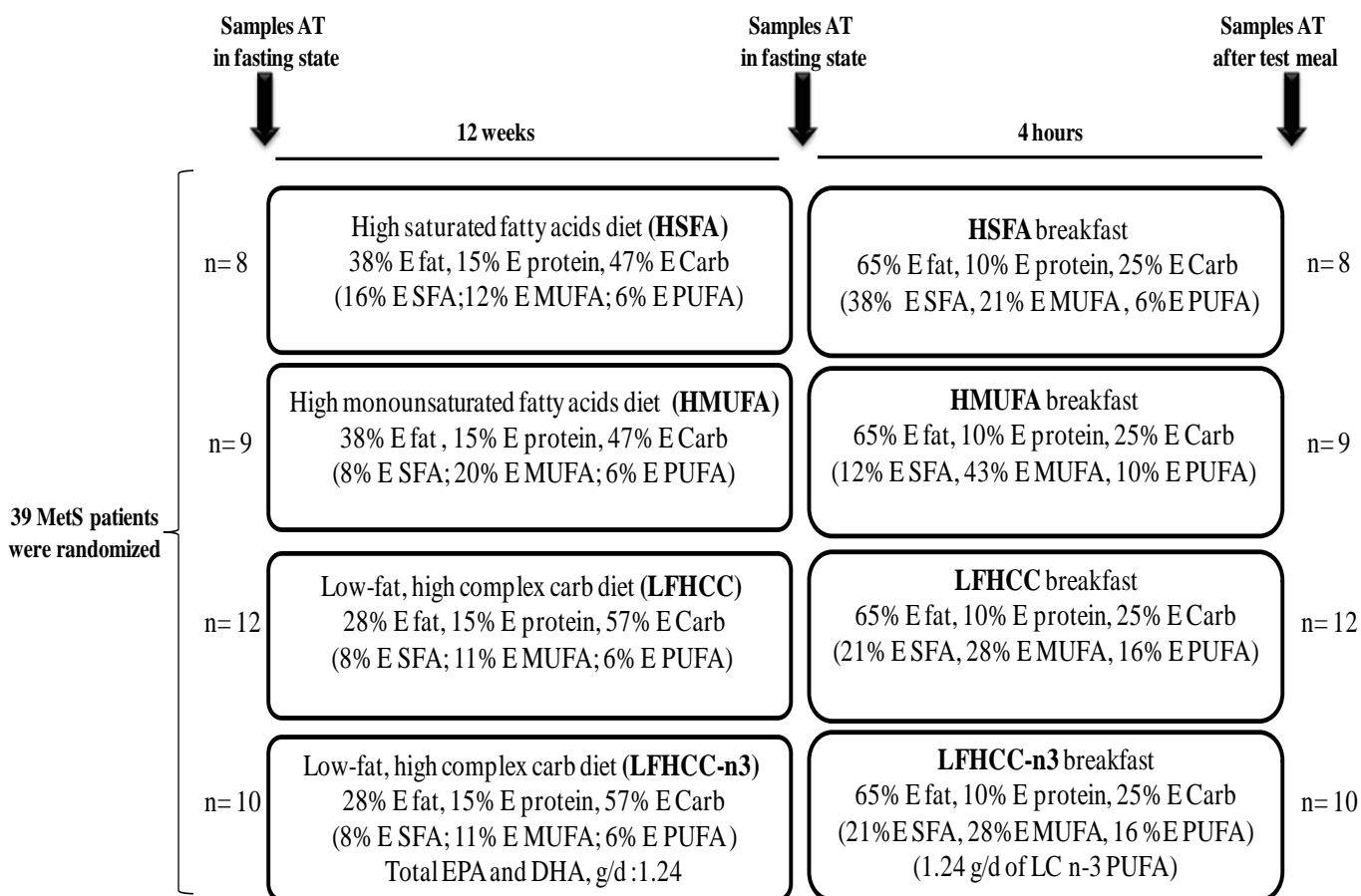


Figure 1. Design of the study

1. Baseline characteristics.

No significant differences were observed in the baseline characteristics of the 39 subjects participating in the dietary intervention. Baseline characteristics of the volunteers are shown in **Table 1**.

Table 1. Baseline characteristics of subjects with the MetS assigned to each diet.

	HSFA (n = 8)	HMUFA (n = 9)	LFHCC (n = 12)	LFHCC n-3 (n = 10)	P
Age (years)	57.8 ± 3.1	57.1 ± 2.3	56.5 ± 2	54.8 ± 2.1	0.839
BMI (kg/m ²)	36 ± 1.2	34.5 ± 1.2	35.7 ± 1	35 ± 1.2	0.817
Waist circumference	111.7 ± 3.1	104 ± 2	109 ± 3.1	108.3 ± 3.3	0.420
TC (mg/dl)	204 ± 19	192.2 ± 11.1	206.8 ± 14.9	196.9 ± 10	0.877
TG total (mg/dl)	226.7 ± 65.2	159.1 ± 20.9	161.5 ± 17.5	158.1 ± 20.3	0.422
LDL-c (mg/dl)	129.7 ± 13	135.9 ± 9.6	148.2 ± 12.1	140.4 ± 8.8	0.693
HDL-c (mg/dl)	41 ± 4.5	44.4 ± 3.3	43.4 ± 3.6	41.4 ± 2.9	0.906
Glucose (mg/dl)	117.7 ± 6.2	120.3 ± 7.1	106.1 ± 3.2	125.1 ± 13.5	0.371
Insulin (mU/ml)	15.3 ± 1.3	11.5 ± 1.3	12.6 ± 1.4	13.3 ± 1.7	0.400

Values presented are the mean ± S.E.M of each diet group. Abbreviations: HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, Low fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC n-3, Low fat, high-complex carbohydrate diet with 1.24 g/d long chain n-3 PUFA diet; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; LDL-c, low density lipoprotein-cholesterol; HDL-c, high density lipoprotein-cholesterol . P value corresponds to ANOVA statistical analysis.

2. Achievement of dietary targets.

In order to study the **long-term consumption effect** of different diets on the adipose tissue gene expression, 39 MetS patients were assigned to one of four diets, differing in fat quantity and quality while remaining isoenergetic (**Table 2**). Two diets were designed to provide 38% energy (E) from fat: a high-fat, SFA-rich diet (HSFA), which was designed to provide 16%E as SFA, and a high-fat, HMUFA diet designed to provide 20% E from MUFA. The other 2 diets were low in fat, high in complex carbohydrates (LFHCC and LFHCC (n-3); 28%E from fat); the LFHCC (n-3) diet included a 1.24-g/d supplement of LC (n-3) PUFA [ratio of 1.4 eicosapentaenoic acid (EPA):1 docosahexaenoic acid (DHA)] and the LFHCC diet included a 1.2- g/d supplement of control high-oleic sunflower seed oil capsules (placebo). With regards to the diet compliance, at the end of the intervention period, as expected %E from fat was significantly higher in the HSFA and HMUFA diet groups than in the LFHCC and LFHCC (n-3) groups. In addition, %E from SFA and MUFA was significantly higher in the HSFA and HMUFA diet groups, respectively, as compared with the other diet groups, and %E from PUFA was significantly greater in patients who consumed the HSFA diet than the LFHCC diets. The intake of EPA and DHA was significantly higher in the LFHCC (n-3) diet group than in the other groups

Postprandial state is relevant due to the increase in oxidative stress, inflammation, and vascular dysfunction that take place every time we ingest food, and because all these processes are related with MetS and insulin resistance and associated with risk of cardiovascular disease. In order to study the postprandial state, we administered after the dietary intervention period a fat challenge providing 65% of E as fat, 10% as protein, and 25% as carbohydrates and reflecting the fatty acid composition of the original diet. The composition of the breakfasts was the following: HSFA, 38% E from SFA; HMUFA, 43% E from MUFA; LFHCC with placebo capsules, 16% E as PUFA; LFHCC with LC (n-3) PUFA, 16%E as PUFA [1.24 g/d of LC (n-3) PUFA (ratio 1.4 EPA:1 DHA)] (**Table 3**).

Table 2. Composition of diet at the end of the intervention period, alongside dietary targets

	HSFA Mean±SEM	HMUFA Mean±SEM	LFHCC Mean±SEM	LFHCC n-3 Mean±SEM
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/d)				1.24
Post-intervention				
N	8	9	12	10
Energy (MJ/d)	8.33 ± 0.57	7.19 ± 0.61	7.57 ± 0.49	9.95 ± 0.94
%E from fat	40.99 ± 0.91*	40.80 ± 1.14*	26.72 ± 0.69 [†]	26.15 ± 0.75 [†]
%E from SFA	17.69 ± 0.46*	9.37 ± 0.68 [†]	6.62 ± 0.35 [‡]	6.87 ± 0.25 [‡]
%E from MUFA	13.27 ± 0.63 [‡]	21.26 ± 0.56 [†]	11.12 ± 0.26*	10.43 ± 0.34*
%E from PUFA	6.70 ± 0.39*	5.71 ± 0.28* [‡]	5.21 ± 0.31 ^{†‡}	4.71 ± 0.34 ^{†‡}
%E from CHO	37.21 ± 1.77*	40.07 ± 1.38*	49.94 ± 1.26 [†]	53.95 ± 1.54 [†]
%E from complex CHO	36.11 ± 0.49*	38.91 ± 0.82*	48.15 ± 0.94 [†]	52.79 ± 0.52 [†]
%E from protein	20.03 ± 1.28	19.12 ± 0.81	22.74 ± 1.10	19.08 ± 0.97
Total EPA and DHA (g/d)	0.38 ± 0.12*	0.47 ± 0.22*	0.58 ± 0.08*	2.08 ± 0.16 [‡]

HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, Low fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC n-3, Low fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with 1.24 g/d long chain n-3 PUFA; %E, percentage energy; CHO, carbohydrate. Differences between diets groups were assessed by ANOVA for repeated measures. Values are means ± S.E.M. Means in a row with superscripts without a common sign differ, P<0.05.

Table 3. Meal composition of the fat challenge conducted post intervention

	HSFA meal	HMUFA meal	LFHCC meal	LFHCCn-3 meal
Objective				
% E from fat	65	65	65	65
% E from SFA	38	12	21	21
% E from MUFA	21	43	28	28
% E from PUFA	6	10	16	16
% E from CHO	25	25	25	25
% E from complex CHO	25	25	25	25
% E from protein	10	10	10	10
Energy (kJ/Kg body weight)	40.2	40.2	40.2	40.2
Meal composition of the fat challenge conducted post intervention				
N	8	9	12	10
% E from fat	66.13	64.83	66.44	66.49
% E from SFA	40.31	12.83	18.79	18.79
% E from MUFA	21.86	43.72	28.47	26.77
% E from Oleic Acid (18:1)	19.85	42.60	27.37 [‡]	25.67
% E from PUFA	4.46	8.28	19.18	20.93
% E from LA (18:2)	3.27	7.53	16.35	16.35
% E from ALA (18:3)	1.01	0.48	2.62	2.62
% E from EPA	0.02	0.00	0.01	1.15*
% E from DHA	0.00	0.00	0.00	0.61*
% E from CHO	24.20	24.07	22.76	22.76
% E from complex CHO	24.20	24.07	22.76	22.76
% E from protein	9.64	11.06	12.32	12.32
Energy (kJ/Kg body weight)	42.27	42.72	42.67	42.69

%E, percentage energy; CHO, carbohydrate; ALA. α -linolenic acid; LA. linoleic acid.; EPA. eicosapentaenoic acid; DHA. docosahexaenoic acid. *These values include the amount of EPA and DHA administered as diet supplement [1.24 g/d of LC (n-3) PUFA (ratio 1.4 EPA:1 DHA)]. [‡] This value include the amount of oleic acid administered as placebo (1.2 g of high-oleic sunflower seed oil).

3. Postprandial lipemia.

At the end of the dietary intervention period and 4 hours after the fat challenge we analyzed the lipid parameters, glucose and insulin concentrations in plasma. We observed a postprandial increase of TC, TG, HDL-c and glucose plasma concentrations independently of the meal ingested (**Table 4**).

Table 4. Plasma lipids, glucose and insulin concentrations in postprandial state

0h	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Insulin (mU/ml)
HSFA	198.66±15.65	182.01±45.00	41.28±3.94	126.92±7.70	108.96±4.26	13.33±2.23
HMUFA	188.71±10.24	135.00±14.37	43.28±2.93	126.83±8.70	113.40±4.64	12.42±1.07
LFHCC	185.92±12.16	128.56±17.55	41.28±3.01	127.96±10.17	106.06±4.52	12.13±1.85
LFHCC-n3	188.88±9.96	145.96±13.48	39.08±2.21	130.80±9.17	109.96±4.50	14.52±1.81
4 h	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Insulin (mU/ml)
HSFA	203.08±12.40	349.61±79.14	41.31±3.87	123.26±6.41	98.90±2.90	14.70±1.77
HMUFA	190.20±11.15	259.64±44.63	41.52±2.55	123.71±9.83	91.46±3.11	15.41±2.89
LFHCC	193.34±15.03	236.13±31.134	39.85±3.12	132.05±12.54	91.07±7.45	14.63±2.85
LFHCC-n3	194.09±11.82	235.14±26.14	37.60±2.75	130.75±9.83	87.20±3.14	12.73±2.24
Global analysis P values						
Diet effect	0.860	0.259	0.816	0.970	0.715	0.996
Time effect	0.003*	<0.001*	0.007*	0.976	<0.001*	0.196
Diet by Time effect	0.175	0.112	0.835	0.156	0.412	0.288

The values presented are the mean ± S.E.M of each diet group. Abbreviations: HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, Low fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC n-3, Low fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with 1.24 g/d long chain n-3 PUFA; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL-c, high density lipoprotein-cholesterol; LDL-c, low density lipoprotein-cholesterol. P value correspond to ANOVA for repeated measures. *P < 0.05.

4. Gene expression of adipokines.

Adipose tissue is now recognized as a highly active metabolic and endocrine organ controlling energy homeostasis. Adipose tissue has a potential importance in relation to the inflammatory burden in CVD, the expression and secretion of both pro-inflammatory and protective factors, collectively termed adipokines which act as paracrine, autocrine and endocrine effectors (249). Adiponectin exhibits both insulin sensitizing, anti-inflammatory and anti-atherogenic properties, and its plasma levels are reduced in both type 2 diabetes mellitus (T2DM) and coronary artery disease (250, 251). Resistin has been proposed as a potential link between obesity and inflammation and has also been linked to CVD risk (252, 253). Leptin is a cytokine-like hormone characterized by pleiotropic propriety. It is involved in satiety signal with direct effects on the hypothalamus; stimulates lipolysis; inhibits lipogenesis; increases glucose metabolism; and stimulates fatty acid oxidation (17). Adipose tissue also releases PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), which is important in the fibrinolytic and thrombotic pathways (254, 255). Plasminogen is an inert enzyme that requires t-PA (tissue plasmin activator), to activate the plasmin which breaks blood clots. PAI-1 reduces the ability of t-PA to change plasminogen into plasmin and promotes blood clot formation and prevents blood clots from dissolving (256). RBP4 (Retinol-binding protein 4) has recently been described as an adipokine that contributes to insulin resistance. It is secreted by both liver and adipose tissue. In humans, some studies have shown associations between RBP4 and visceral adiposity (257), as well as insulin resistance and type 2 diabetes (34).

Gene expression in the fasting state after the dietary intervention as compared to baseline: To evaluate whether the intake of the four diets differing in fat quantity and quality regulate the endocrine function of AT, we analyzed the gene expression of adiponectin, resistin, leptin, RBP4 and PAI-1 after 12 wks of dietary intervention.

We observed that the long-term consumption of a HSFA, LFHCC and LFHCC n-3 diets induced a significant decrease in adiponectin gene expression in adipose tissue ($p=0.021$, $p=0.023$, $p=0.046$ respectively) while it remained unchanged after MUFA diet. When we analyzed the changes in RBP4 expression, we found a significant decrease on the gene expression changes after the consumption of LFHCC ($p=0.039$) and LFHCC n-3 ($p=0.027$) diets. In contrast, no changes were observed in resistin and

leptin mRNA levels in the fasting state after the dietary intervention for any of the diets tested. PAI-1 transcripts were not detectable in the fasting state (**Figure 2**).

Postprandial gene expression: After the dietary intervention period, we administered a meal with the same fat composition as the finished diet. We observed that HMUFA meal induced a postprandial decrease in adiponectin gene expression in AT ($p=0.008$). In the postprandial state we did not notice any changes in resistin and leptin mRNA levels. Likewise, no significant postprandial expression changes were found for RBP-4. Interestingly, PAI-1 transcripts were only detectable in the postprandial state for all the 4 groups, 4 h after the meal ingestion, although no significant differences were found between diets (**Figure 3**).

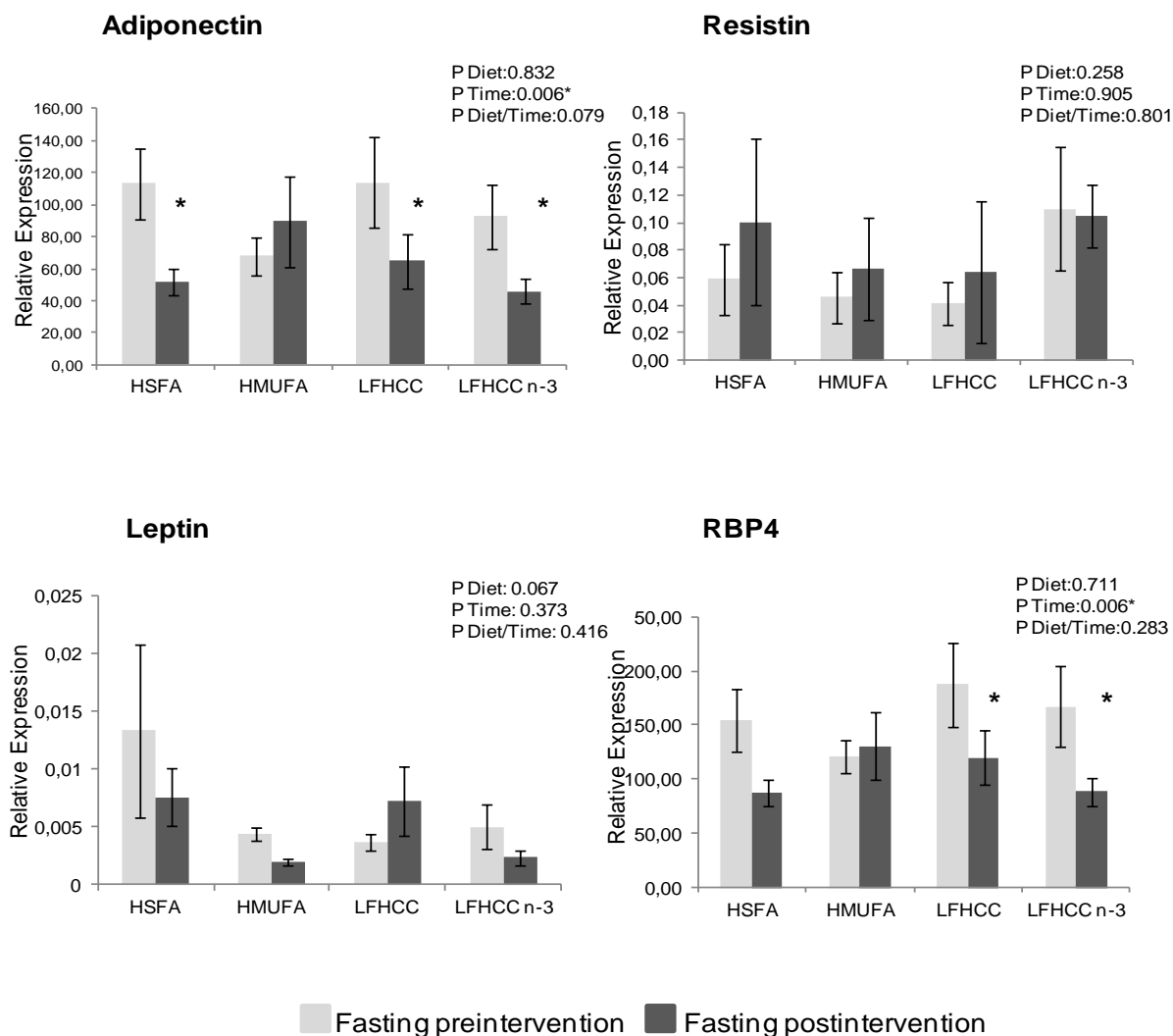


Figure 2. Adiponectin, Resistin, Leptin and RBP4 gene expression changes in adipose tissue after long-term dietary intervention. **Fasting preintervention:** 12-h fasting before dietary intervention. **Fasting postintervention:** 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention with the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test.

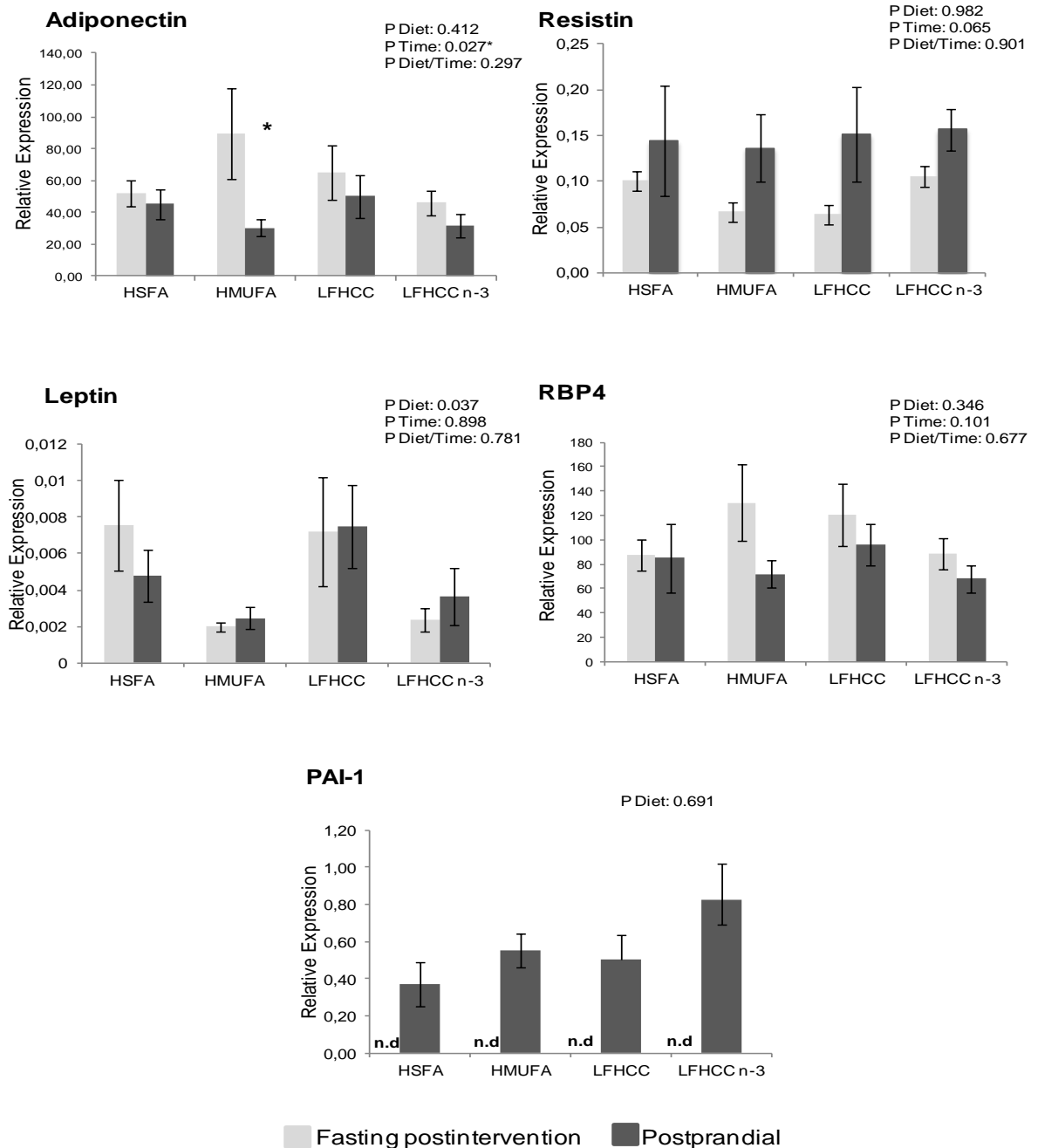


Figure 3. Postprandial Adiponectin, Resistin, Leptin, RBP4 and PAI-1 gene expression changes in adipose tissue. **Fasting postintervention:** 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention. **Postprandial:** Post-intervention, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test.

5. Expression of lipid metabolism related genes in adipose tissue.

In the current work, we have studied the gene expression of proteins related to lipid metabolism in the following metabolic pathways:

Uptake of dietary fat by adipose tissue: LPL (lipoprotein lipase).

Lipogenesis de novo: SREBP1 (SERPINE1 mRNA binding protein 1), FASN (Fatty acid synthase), SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase D9-desaturase).

Lipolysis: HSL (Lipase- hormone sensitive), ATGL (Adipose triglyceride lipase), MGL (Monoglyceride lipase).

Proteins related with fat storage: Perilipin, Vimentin, Caveolin, FABP4 (fatty acid binding protein 4).

Uptake of dietary fat by adipose tissue.

Dietary fatty acids uptake by adipose tissue involves several metabolic steps: after dietary fatty acid absorption in the small intestine or released from the liver, TG are delivered by the blood stream into chylomicron or VLDL respectively, and the triacylglycerol hydrolyzed by adipose tissue lipoprotein lipase (LPL). Thus, fatty acids are uptaken into and re-esterificated within adipocytes (258).

We have analyzed the effect of quality and quantity of dietary fat on adipose tissue LPL gene expression after the dietary intervention period and 4 hours after the intake of four meals reflecting the fatty acid composition of the previous dietary intervention.

Gene expression in the fasting state after the dietary intervention as compared to baseline: No significant changes were observed on adipose tissue LPL mRNA levels after the dietary intervention period (**Figure 4a**).

Postprandial gene expression: We observed that LPL expression tended to decrease at the postprandial state independently of the meal ingested (**Figure 4b**).

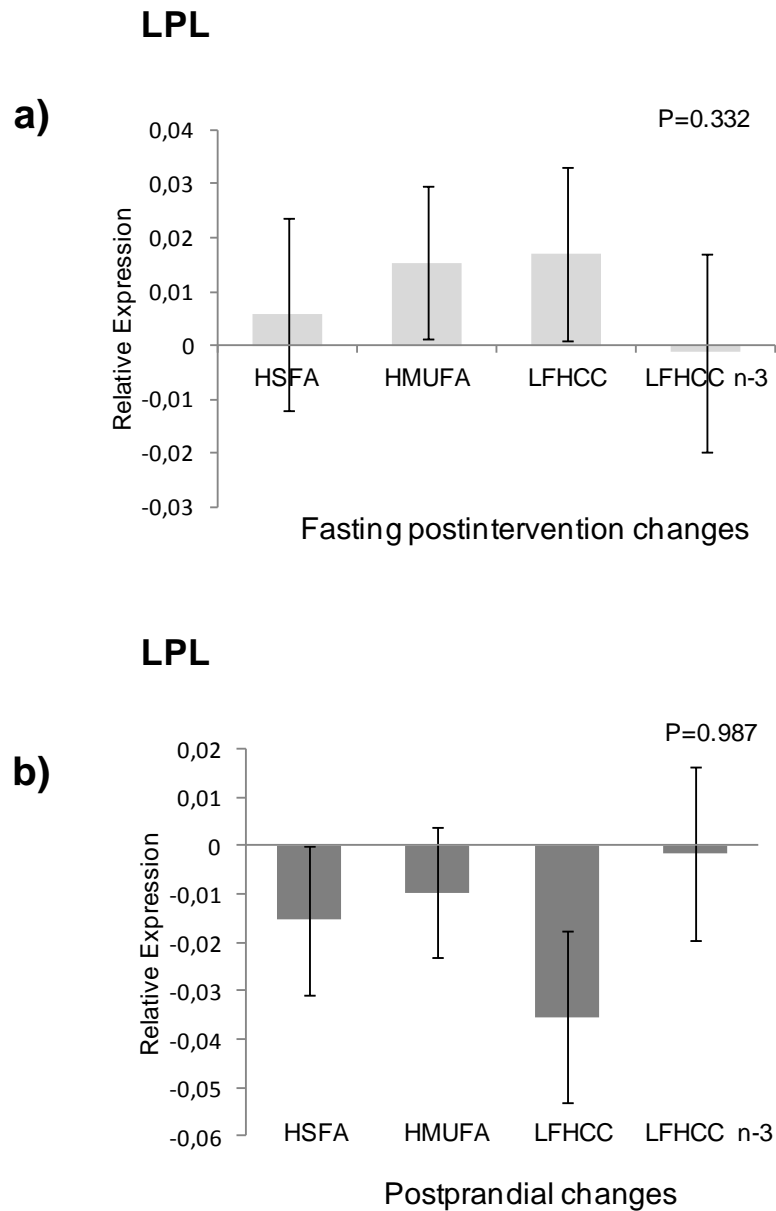


Figure 4. a) Fasting postintervention changes: LPL gene expression changes in adipose tissue after long-term dietary intervention (12-h fasting after 12 wk of dietary intervention with the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets). **b) Postprandial changes:** Postprandial LPL gene expression changes in adipose tissue (4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets). Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. One-way ANOVA to analyze statistical differences between diets, with a probability of $P < 0.05$ being considered significant.

Lipogenesis de novo.

The fatty acid biosynthesis from acetyl-CoA precursors and the following TG assembly is known as “de novo” lipogenesis (DNL). This process is carried out in the liver and adipose tissue, and plays an important role in the regulation of fat storage (259).

Enzymes involved in DNL are transcriptionally regulated by SREBP1, a member of SREBP transcription factor family. SREBP2, the other member, is required for cholesterol biosynthesis (260). The first step of DNL is catalyzed by FASN, a multi-protein enzyme. Its main function is to catalyze the synthesis of palmitate from acetyl-CoA and malonyl-CoA (49). SCD-1 gene is involved in the synthesis and regulation of unsaturated fatty acids and is regulated at the same time as the lipogenesis de novo pathway. SCD-1 is responsible for desaturating palmitic acid (16:0) and mainly stearic acid (18:0) to palmitoleic (16:1 n-7) and oleic acid (18:1 n-9), respectively. We have analyzed the effect of the quality and quantity of fat in DNL by studying the expression of the genes involved in this pathway: SREBP1, FASN and SCD-1.

Gene expression in fasting state after the dietary intervention as compared to baseline: When we analyzed the SREBP1 gene expression changes after the dietary intervention period, we found a statistically significant difference between diets ($p=0.010$). *Posthoc* Bonferroni’s multiple comparison tests showed that SREBP1 mRNA levels decreased after LFHCC n-3 diet consumption as compared to LFHCC diet ($p=0.007$). We have also studied the gene expression of SCD-1 and we also observed a statistically significant diet effect ($p=0.032$). *Posthoc* Bonferroni’s multiple comparison tests showed that SCD-1 mRNA levels decreased after consumption of LFHCC n-3 diet as compared with LFHCC diet ($p=0.043$), which provoked an increase of SCD-1 gene expression (**Figure 5**). Furthermore we analyzed FASN gene expression but transcripts were not detected under our experimental conditions.

Postprandial gene expression: We did not observe any significant SREBP1 gene expression changes on postprandial state. Additionally we observed a significant difference on postprandial SCD-1 gene expression between meals ($p=0.047$). *Posthoc* Bonferroni’s multiple comparison tests showed that LFHCC n-3 meal intake induced an increase in SCD-1 gene expression whereas decreased after the consumption of HMUFA meal ($p=0.029$) (**Figure 6**).

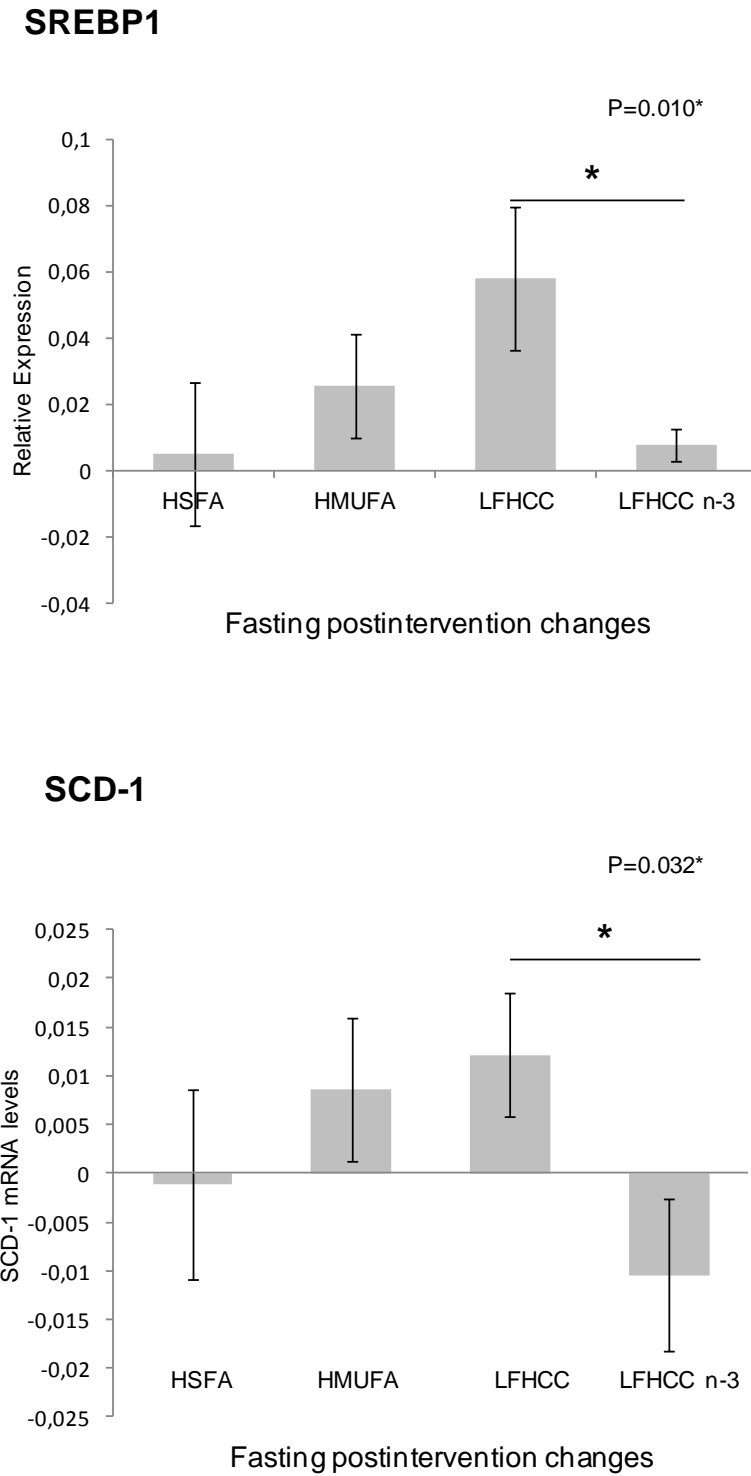


Figure 5. Fasting postintervention changes: SREBP1, and SCD-1 gene expression changes in adipose tissue after long-term dietary intervention (12-h fasting after 12 wk of dietary intervention with the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets.) Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. One-way ANOVA to analyze statistical differences between diets, with a probability of $P < 0.05$ being considered significant.

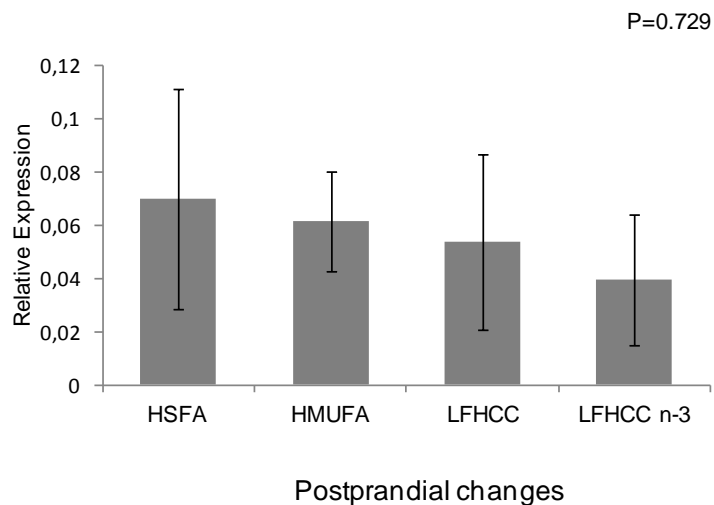
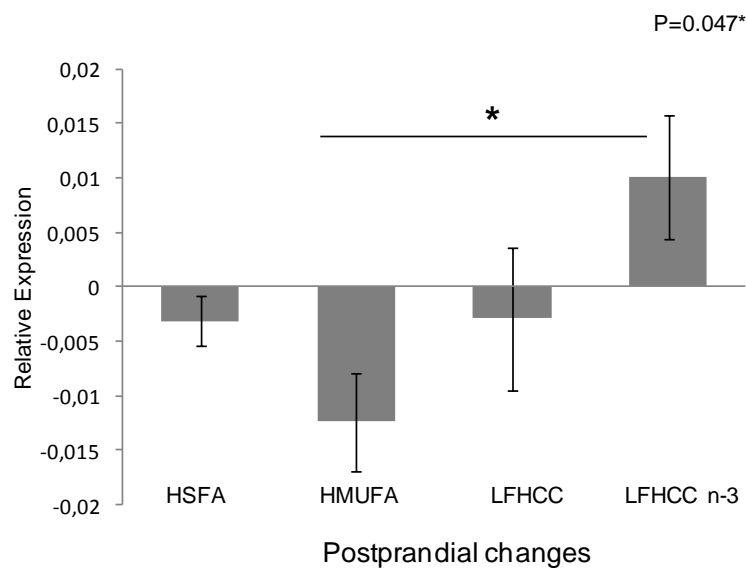
SREBP1**SCD-1**

Figure 6. Postprandial changes: Postprandial SREBP1 and SCD-1 gene expression changes in adipose tissue (4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets). Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. One-way ANOVA to analyze statistical differences between diets, with a probability of $P < 0.05$ being considered significant.

Lipolysis.

Lipolysis is a catabolic process leading to the breakdown of TG stored in fat cells, which causes the further release of fatty acids and glycerol into the blood stream (261).

ATGL (Adipose triglyceride lipase) is the enzyme responsible of the first step in TG hydrolysis, and its action leads to the release of one fatty acid from the glycerol backbone. This first step is also catalyzed by HSL (Lipase- hormone sensitive). However, the resulting diacylglycerol in turn appears to be the main substrate of the HSL. Thus, HSL acts in the first and the second step of TG hydrolysis; it hydrolyzes the first fatty acid from a triacylglycerol molecule, freeing a fatty acid and diglyceride, and hydrolyzing diacylglycerols into monoacylglycerols. In addition, the third enzyme in the TG hydrolytic cascade is the MGL (Monoglyceride lipase) which is required to complete the lipolysis process by hydrolyzing monoacylglycerols into fatty acid and glycerol (262).

We have analyzed the effect of quality and quantity of dietary fat on the expression of the genes involved in the lipolysis pathway: ATGL, HSL and MGL.

Gene expression in fasting state after the dietary intervention as compared to baseline: We found an interaction between the quantity and quality of dietary fat and the fasting gene expression of ATGL. *Posthoc* Bonferroni's multiple comparison tests showed that ATGL gene expression increased after HSFA diet consumption as compared with the consumption of HMUFA, LFHCC and LFHCC n-3 diets (all $p=0.001$), which did not induce any change on the gene expression of this enzyme. We also observed that MGL gene expression decreased after the dietary intervention ($p<0.001$). *Posthoc* Bonferroni's multiple comparison tests showed that MGL gene expression decrease after the consumption of HSFA ($p=0.003$), LFHCC ($p=0.005$) and LFHCC n-3 ($p=0.003$) diets (**Figure 7**). No statistically significant changes were observed in HSL mRNA levels after consumption of 4 diets.

Postprandial gene expression: We found a postprandial increase on ATGL gene expression after the consumption of the HSFA meal ($p=0.006$). We also observed that HSL was differentially expressed at the postprandial state ($p=0.026$). *Posthoc* statistical analysis showed that the HSL mRNA levels decreased after the intake of LFHCC meal ($p=0.001$) whereas remain unchanged after the consumption of the other diets. No

significant changes were observed in MGL mRNA levels in the postprandial state as compared to the fasting state (**Figure 8**).

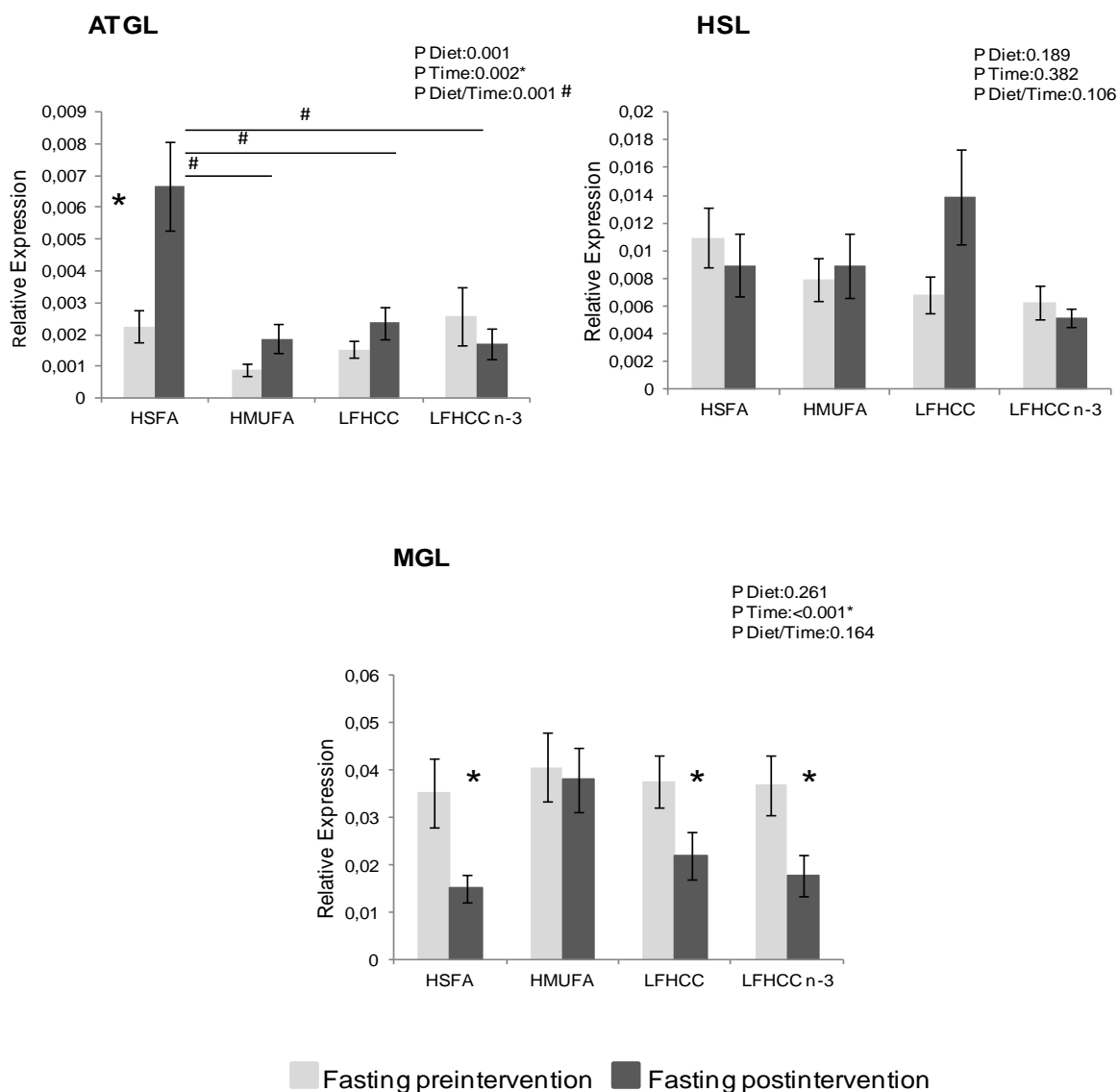


Figure 7. ATGL, HSL, MGL gene expression changes in adipose tissue after long-term dietary intervention. **Fasting preintervention:** 12-h fasting before dietary intervention. **Fasting postintervention:** 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention with the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test.

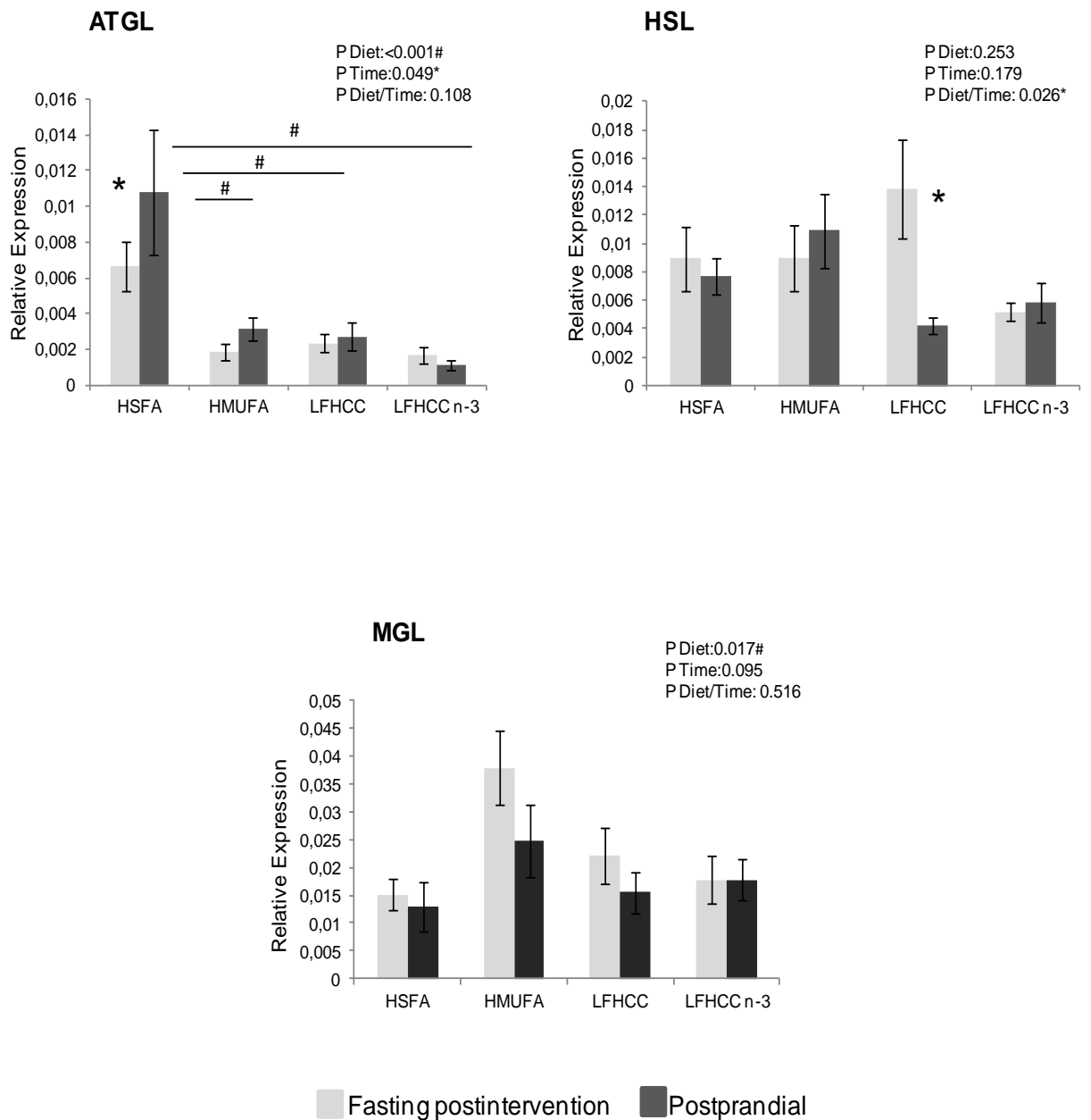


Figure 8. Postprandial ATGL, HSL, MGL expression changes in adipose tissue. **Fasting postintervention**, 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention. **Postprandial**: Post-intervention, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test

Expression of genes related with lipid storage.

Adipocytes hold the body's major energy reserve as triacylglycerols packaged in large lipid droplets. Adipocyte lipid droplets contain specific structural proteins as well as lipid metabolic enzymes. Perilipin is the most abundant protein on the adipose tissue lipid droplets. It plays a critical role in regulating both triacylglycerol storage and hydrolysis, and acts as a protective coating from the lipases, when lipid mobilization is not being stimulated. Perilipin is hyperphosphorylated by PKA following β -adrenergic receptor activation, which allows the hormone-sensitive lipase-mediated lipolysis. Although PKA also phosphorylates hormone-sensitive lipase, which can increase its activity more than 50-fold, the increase in fat mobilization (triggered by epinephrine) is primarily due to perilipin phosphorylation (263). Structural proteins identified in lipid droplets also include vimentin and caveolin. Vimentin might participate in lipolysis through direct interactions with HSL, in addition to its interaction with β -adrenergic receptors and the ERK signaling cascade (264). Caveolin-1 acts between perilipin and the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase to facilitate the phosphorylation of perilipin and is also associated with the promotion of the synthesis of triacylglycerol and its storage in lipid droplets (265).

Another important protein related to lipid storage is FABP4 (fatty acid binding protein 4). This protein encodes the fatty acid binding protein found in adipocytes. Fatty acid binding proteins are a family of small, cytoplasmic proteins that bind long-chain fatty acids and other hydrophobic ligands. It is thought that the functions of FABPs include fatty acid uptake, transport, and metabolism. Its principal function is to transport lipids in adipocytes (266).

We have studied the effect of the quality and quantity of fat on the expression of the genes related to lipid storage: Perilipin, Vimentin, Caveolin, and FABP4.

Gene expression in fasting state after the dietary intervention as compared to baseline: We found that the long-term consumption of HSFA, LFHCC and LFHCC n-3 diets induced a decrease in perilipin mRNA levels in adipose tissue ($p=0.010$), ($p=0.002$) and ($p=0.002$) respectively while it remained unchanged after MUFA diet. We also found that caveolin 1 gene expression decreased after the intake of HMUFA ($p=0.012$) and LFHCC n-3 diets ($p=0.004$) and tended to decrease after the consumption of HSFA diet ($p=0.057$). In the case of FABP4 gene expression, we observed a

difference between diets ($p=0.035$) and an effect of diet by time interaction ($p=0.019$). FABP4 is more expressed after the consumption of HSFA and LFHCC diets than after the consumption of LFHCC n-3 diet ($p=0.010$ and $p=0.030$, respectively). We also observed an increase in FABP4 gene expression after the consumption of LFHCC diet ($p=0.030$) and a decrease after the consumption of LFHCC n-3 diet ($p=0.048$). No significant mRNA level changes were found in vimentin gene expression. **(Figure 9)**.

Postprandial gene expression: We found that HMUFA meal induced a postprandial decrease in AT perilipin gene expression ($p=0.014$). We also observed that caveolin mRNA levels decreased after the intake of LFHCC meal ($p=0.032$) and it increased after the intake of LFHCC n-3 meal ($p=0.045$), whereas it remained unchanged after the intake of the others diets. No significant changes were observed in FABP4 and vimentin mRNA levels in the postprandial state as compared to the fasting state **(Figure 10)**.

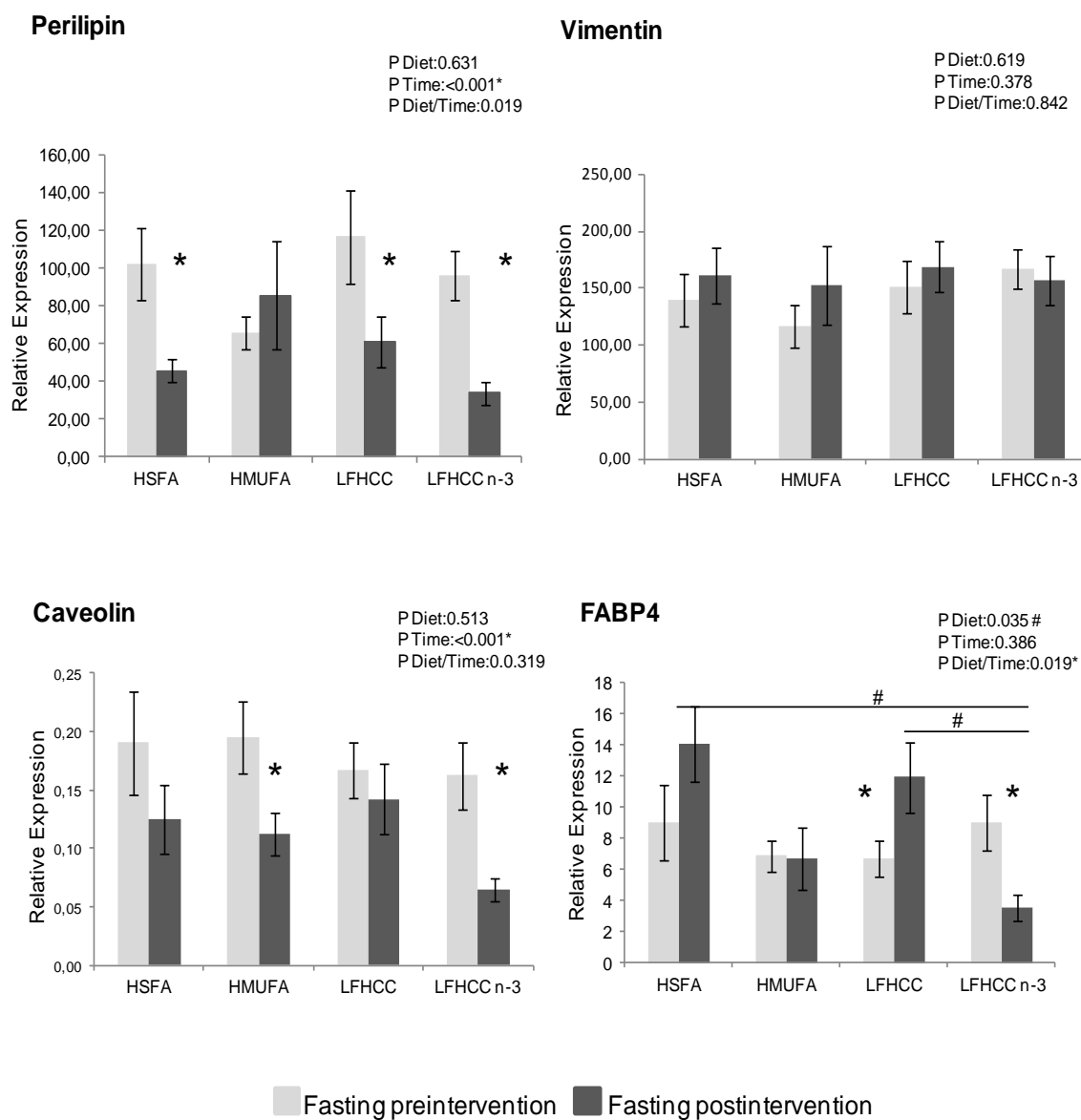


Figure 9. Perilipin, Vimentin, Caveolin1 and FABP4 gene expression changes in adipose tissue after long-term dietary intervention. **Fasting preintervention:** 12-h fasting before dietary intervention. **Fasting postintervention:** 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention with the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test

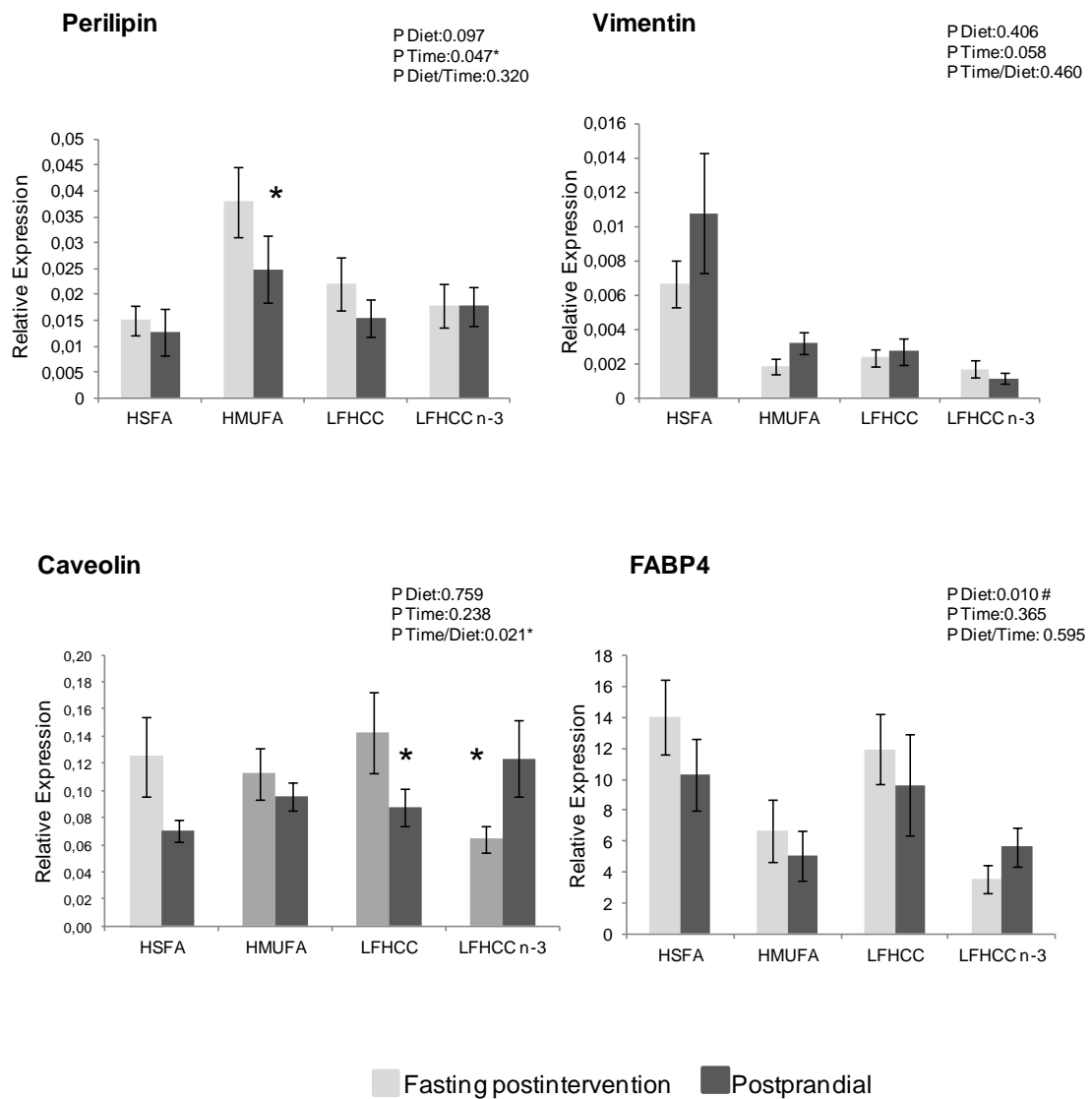


Figure 10. Postprandial Perilipin, Vimentin, Caveolin1 and FABP4 gene expression changes in adipose tissue. **Fasting postintervention**, 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention. **Postprandial**: Post-intervention, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test

6. Expression of endoplasmic reticulum stress-related genes.

Endoplasmic reticulum is a highly dynamic organelle with a central role in lipid and protein biosynthesis and it is sensitive to alterations in homeostasis. Proteins formed in the ER may fail to attain correct structural conformation during pathological excess of nutrients (89). Accumulation of misfolded proteins as a consequence of ER stress and the activation of unfolded protein response (UPR), which under normal circumstances alleviates ER stress, restores ER homeostasis and prevents cell death (92). ER stress is linked to the major inflammatory and stress-signaling networks, including the activation of JNK and IKK-NF κ B pathways and the production of reactive oxygen species (ROS). Intriguingly, these are also the pathways and mechanisms that play a central role in obesity-induced inflammation and metabolic abnormalities. The UPR is known to signal through three ER transmembrane sensors: PKR-like ER-regulated kinase (PERK), inositol requiring enzyme1 α (IRE1 α) and activating transcription factor6 (ATF6). Furthermore, these activate an adaptive response that results in the inhibition of protein translation and an increase in the transcription of protein-folding chaperones and ER-associated degradation genes. ATF6 induces X-box binding protein 1 (XBP-1) transcription and IRE1 α upon activation initiates splicing of XBP-1 (XBP-1s) mRNA which encodes a transcriptional activator that modulates the UPR through the regulation of transcription of ER chaperones. PERK phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α). Furthermore, phosphor-eIF2 α (p-eIF2 α) attenuates protein synthesis and reduces ER protein overload (267). This also results in an increased alternative translation of activation transcription factor 4 (ATF4), which induces the expression of many genes, including those involved in apoptosis, C/EBP homologous protein (CHOP). Upon activation during UPR, the cytoplasmic domain of ATF6 is cleaved and the N-terminal fragment translocates to the nucleus and activates the transcription of ER chaperones such as glucose regulated protein (Grp)78/BiP, protein disulfide isomerase (PDI), Ero1-L α and calnexin to augment the ER protein folding capacity.

We have analyzed the effect of the quality and quantity of fat on the expression of endoplasmic reticulum stress-related genes: XBP-1 (X-box binding protein 1), and the chaperones CNX (calnexin), CRT (calreticulin), PDIA-3 (protein disulfide

isomerase family A, member 3), BiP (glucose-regulated protein, 78kDa), GSTP1 (glutathione S-transferase pi 1).

Gene expression in fasting state after the dietary intervention as compared to baseline: No significant changes were found in XBP-1, BiP, CNX, CRT and GSTP1 mRNA levels after the dietary intervention period. However, we observed a decrease in PDIA-3 gene expression after the consumption of HSFA diet ($p=0.020$). (**Figure 11**).

Postprandial gene expression: Our study showed that the adipose tissue gene expression of XBP-1 was induced at the postprandial state ($p<0.001$) irrespective of the meal consumed. We also observed a postprandial increase in the expression of BiP independently of the meal consumed ($p<0.001$). *Posthoc* statistical analysis showed that BiP gene expression increased after the intake of HMUFA ($p=0.006$), LFHCC ($p=0.028$), and LFHCC n-3 meals ($p=0.028$) and tended to increase after the intake of HSFA meal ($p=0.062$) (**Figure 12**). No significant changes were observed in the postprandial expression of CRT, CNX, PDIA-3 and GSTP1 (**Figure 12**).

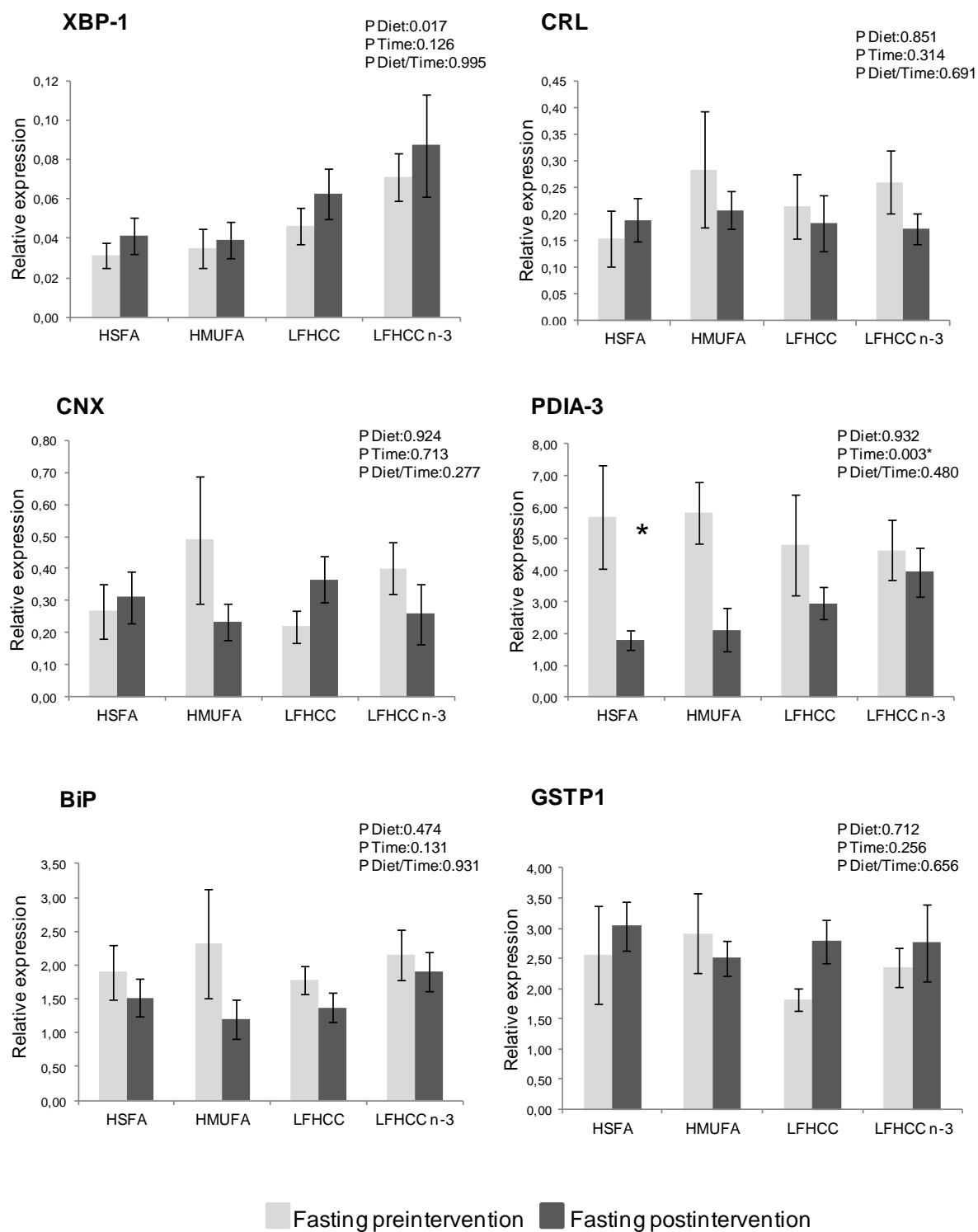


Figure 11. XBP-1, CRL, CNX, PDIA-3, BiP, and GSTP1 gene expression changes in adipose tissue after long-term dietary intervention. **Fasting preintervention:** 12-h fasting before dietary intervention. **Fasting postintervention:** 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention with the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test

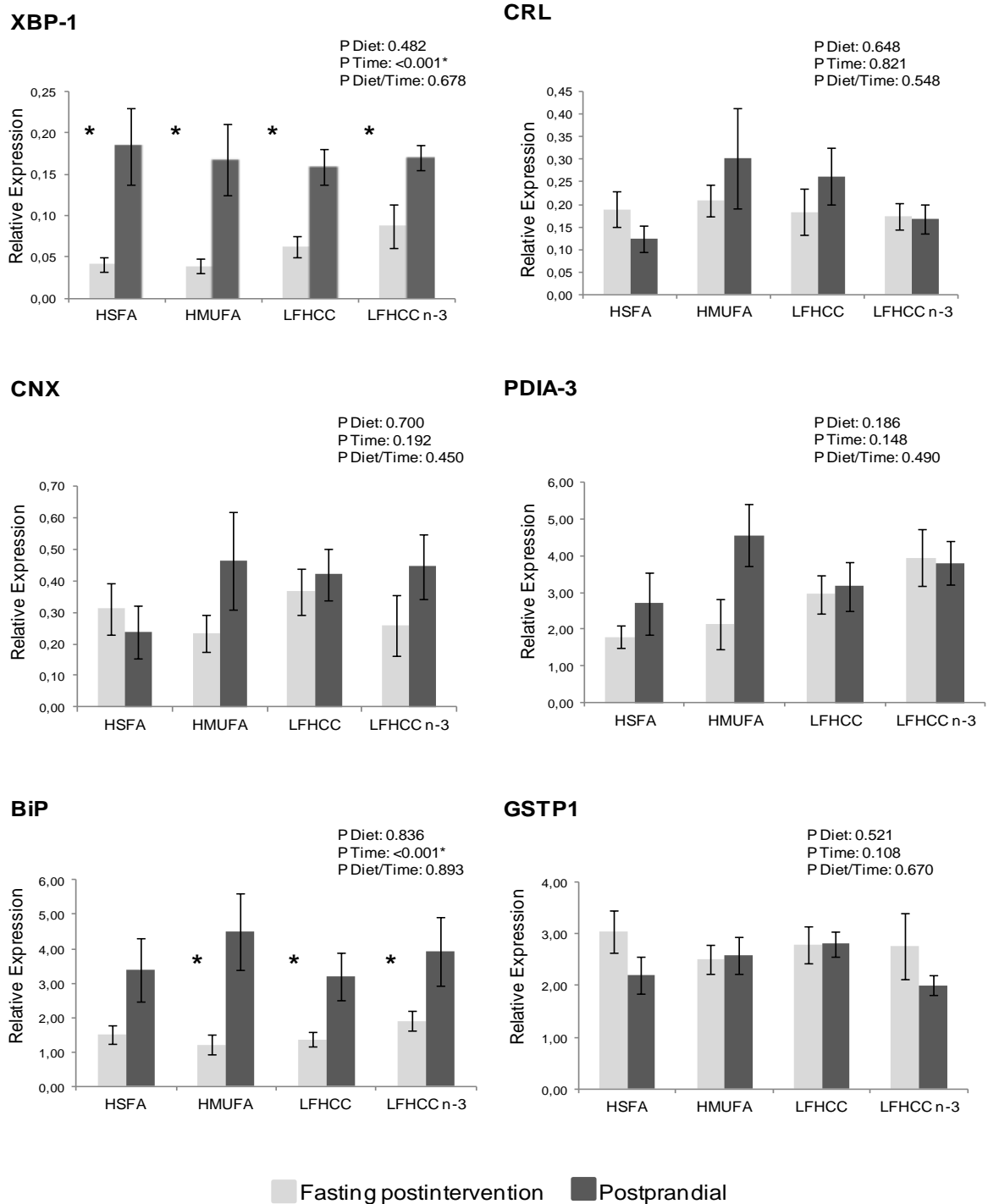


Figure 12. Postprandial XBP-1, CRL, CNX, PDIA-3, BiP, and GSTP1 gene expression changes in adipose tissue. **Fasting postintervention**, 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention. **Postprandial**: Post-intervention, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. *P*: p-values from Bonferroni's multiple comparison test.

7. Expression of genes related with inflammatory response.

MetS is associated with a dysfunction of the adipose tissue, as a consequence of adipocyte enlargement and malfunction which, in turn, causes the infiltration of macrophages. The proinflammatory state in the adipose tissue leads to a local insulin resistance including an impaired inhibitory effect of insulin on FFA release. However, the increased concentration of FFA associated with adipocyte enlargement might generate a condition of ER stress, thereby activating the inflammatory pathway mediated by JNK and NF- κ B, which leads to a proinflammatory state with an increased secretion of several cytokines and chemokines including interleukin IL-6, IL-1 β , and MCP-1 (85).

Gene expression in fasting state after the dietary intervention as compared to baseline: We have studied the expression of the inflammation regulatory gene, p65 (sub-unit of the NF- κ B transcription factor), and two sub-units of the NF- κ B inhibitor (IkB α and IkB β 2 genes) in the fasting state after 12 wks of dietary intervention. No significant changes were observed in p65, IkB α and IkB β 2 mRNA levels after the dietary intervention (**Figure 13**).

We have also studied the gene expression of three pro-inflammatory cytokines (interleukin [IL]-6, MCP-1 [monocyte chemoattractant protein-1], and IL1 β). MCP-1 plays a critical role at multiple stages in atherosclerosis, and is associated with the initiation of the fatty streak and the promotion of plaque instability. Likewise, IL-6 and IL1 β have also been implicated in the atherosclerotic process and other CVD risk factors, such as obesity, dyslipidemia, and insulin resistance (85, 109). In our study, no significant differences among diets were found in MCP-1 and IL1 β gene expression in adipose tissue and IL-6 transcripts were not detected in the fasting state at pre and post intervention (**Figure 13**).

Postprandial gene expression: We have also studied the expression of the inflammation regulatory genes in the postprandial state. We found that p65 gene expression is induced in the postprandial state ($p=0.003$). However, we found that the increase did not differ as a function of the meal. *Posthoc* statistical analysis showed that p65 gene expression increased statistically after the intake of the low-fat high-carbohydrate LFHCC ($p=0.044$) and LFHCC n-3 ($p=0.038$) meals, and tended to increase after the intake of a HMUFA meal ($p=0.072$).

When we analyzed the postprandial gene expression of the NF- κ B inhibitors, we observed that I κ B α gene expression was induced in the postprandial state ($p < 0.001$), independently of the meal consumed. In contrast, no significant changes were observed in I κ B β 2 mRNA levels in the postprandial state, although it tended towards a postprandial increase after consumption of the four meals (**Figure 14**).

We have also studied the postprandial gene expression of IL-6, MCP-1, and IL1 β . In our study, the gene expression of MCP-1 and IL1 β was induced (both $p < 0.001$), irrespective of the meal consumed. In the case of IL-6, transcripts were only detected in the postprandial period and no significant differences among diets were found. Likewise, MCP-1 and IL1 β gene expression was extremely low in the fasting compared to the postprandial state (**Figure 14**).

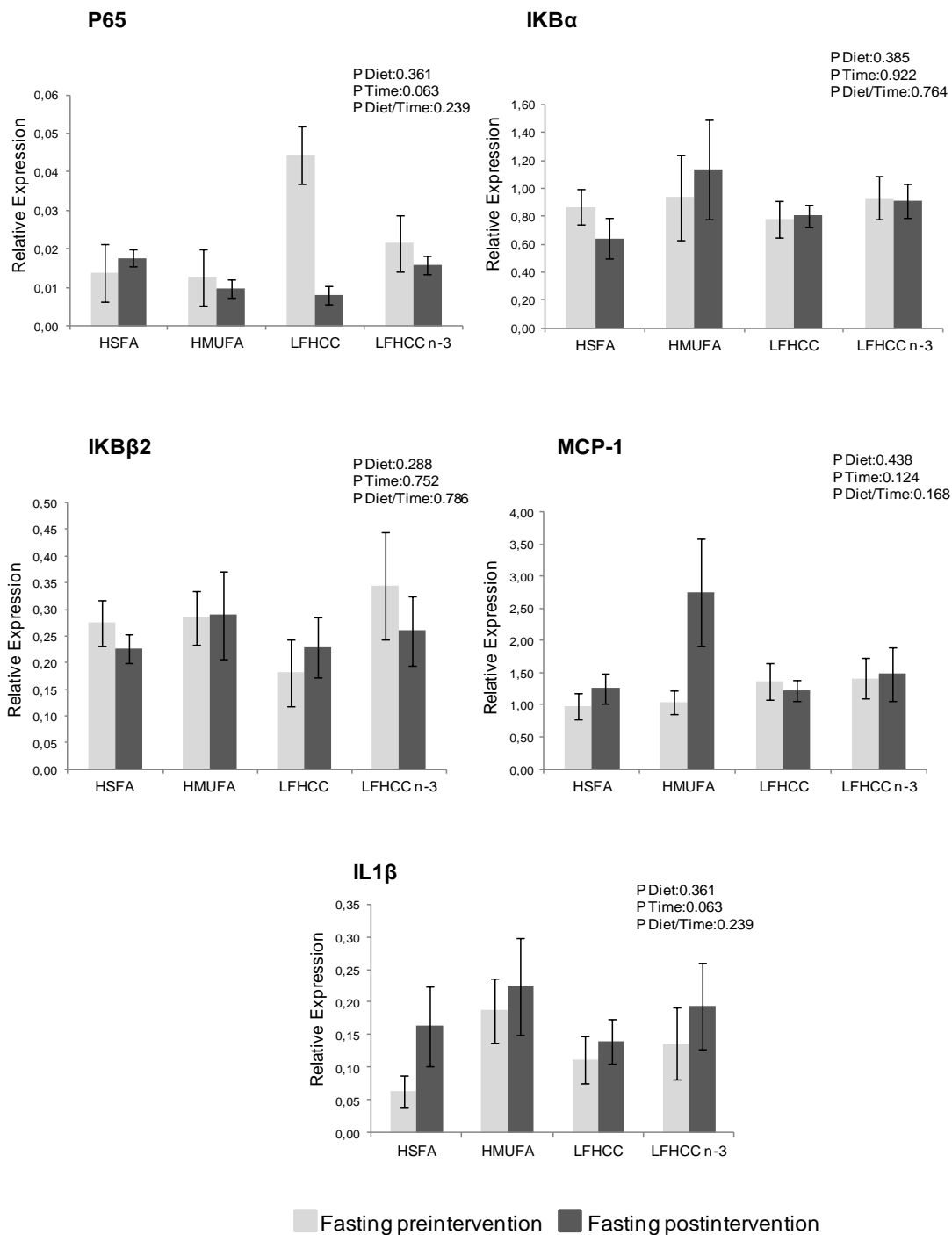


Figure 13. p65, IKB α , IKB β 2, MCP-1 and IL1 β gene expression changes in adipose tissue after long-term dietary intervention. **Fasting preintervention:** 12-h fasting before dietary intervention. **Fasting postintervention:** 12-h fasting after 12 wk of dietary intervention with the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test.

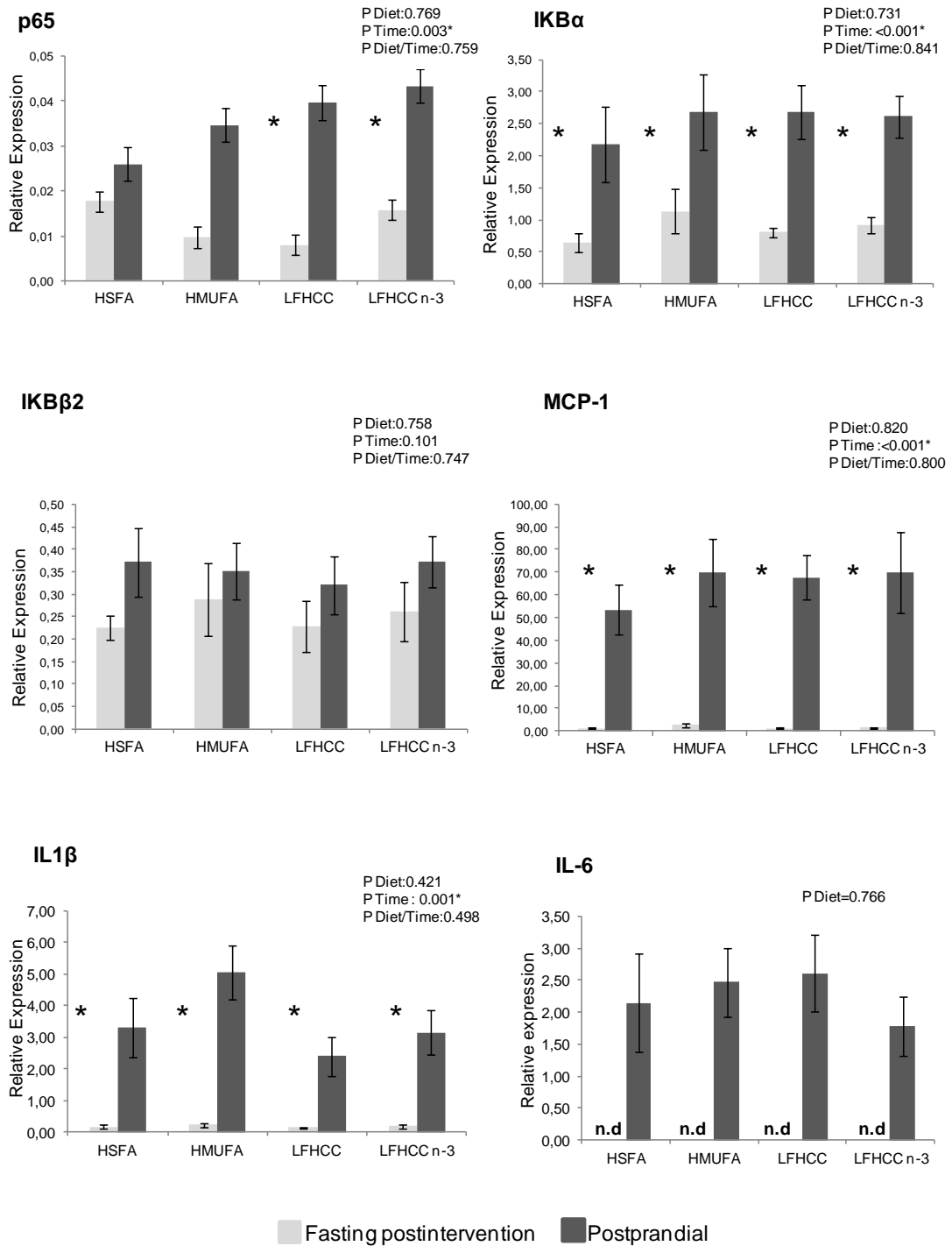


Figure 14. Postprandial p65, IKB α , IKB β 2, MCP-1, IL1 β and IL-6 gene expression changes in adipose tissue. **Fasting postintervention**, 12-h fasting after 12 wk dietary intervention. **Postprandial**: Post-intervention, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n-3) diets. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression in AT, n=39. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Diet*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Diet/Time*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test.

8. Relationship between gene expression of the pathways studied.

We analyzed the relationship between the expression of genes involved in the lipid metabolism, inflammatory response, endoplasmic reticulum stress as well as endocrine function in adipose tissue at the fasting state before and after the dietary intervention period and at the postprandial state postintervention.

The main relationship was found between the expression of inflammatory genes and endoplasmic reticulum stress-related genes (**Table 5**). We observed that XBP-1, CRL, CNX, BiP and GSTP1 mRNA levels positively correlated with I κ B α mRNA levels at the fasting state before the dietary intervention period and at the postprandial state. We also observed that PDIA-3 gene expression positively correlated with I κ B α mRNA levels, but only in the postprandial state.

Table 5. Correlations between genes related with inflammatory response and endoplasmic reticulum stress.

		p65 Pre0	IkBα Pre0	IkBβ2 Pre0	IL1b Pre0	MCP-1 Pre0
XBP-1 Pre0	Pearson's Correlation	0,408(**)	0,364(*)	-0,041	-0,156	0,365(*)
	Sig. (bilateral)	0,010	0,023	0,802	0,344	0,022
CRL Pre0	Pearson's Correlation	0,253	0,371(*)	-0,047	-0,133	0,356(*)
	Sig. (bilateral)	0,121	0,020	0,777	0,418	0,026
CNX Pre0	Pearson's Correlation	0,011	0,373(*)	-0,026	0,027	0,271
	Sig. (bilateral)	0,945	0,019	0,874	0,871	0,095
BiP Pre0	Pearson's Correlation	0,052	0,706(**)	-0,044	0,117	0,287
	Sig. (bilateral)	0,752	0,000	0,792	0,478	0,076
GSTP1 Pre0	Pearson's Correlation	0,100	0,599(**)	0,022	0,210	0,160
	Sig. (bilateral)	0,545	0,000	0,894	0,199	0,330

		p65 Post4	IkBα Post4	IkBβ2 Post4	IL1β Post4	IL6 Post4	MCP-1 Post4
XBP-1 Post4	Pearson's Correlation	-0,127	0,688(**)	0,306	0,465(**)	0,624(**)	0,378(*)
	Sig. (bilateral)	0,442	0,000	0,058	0,003	0,000	0,018
CRL Post4	Pearson's Correlation	0,282	0,540(**)	0,186	0,243	0,047	0,018
	Sig. (bilateral)	0,082	0,000	0,256	0,135	0,775	0,911
CNX Post4	Pearson's Correlation	0,352(*)	0,614(**)	0,440(**)	0,418(**)	0,233	0,359(*)
	Sig. (bilateral)	0,028	0,000	0,005	0,008	0,153	0,025
PDIA-3 Post4	Pearson's Correlation	0,298	0,507(**)	0,477(**)	0,291	0,247	0,413(**)
	Sig. (bilateral)	0,065	0,001	0,002	0,072	0,129	0,009
BiP Post4	Pearson's Correlation	0,079	0,758(**)	0,589(**)	0,648(**)	0,277	0,428(**)
	Sig. (bilateral)	0,634	0,000	0,000	0,000	0,088	0,007
GSTP1 Post4	Pearson's Correlation	0,089	0,428(**)	0,262	-0,031	0,144	0,240
	Sig. (bilateral)	0,592	0,007	0,107	0,850	0,382	0,141

9. Relationship between the gene expression in adipose tissue and the indicators of metabolic risk in patients with metabolic syndrome.

We have analyzed the relationships between the gene expression in adipose tissue and the indicators of metabolic risk, such as insulin sensitivity and postprandial lipemia parameters, which have previously been reported to be abnormal in patients with MetS (204).

We studied the relationship between gene expression in adipose tissue and postprandial glucose and insulin concentration as well as HOMA index, and with postprandial lipemia parameters (TG, CT, HDL-c, LDL-c, Apo A and Apo B).

9.1 Relationships between the expression of adipokines in adipose tissue and the indicators of metabolic risk.

Relationships between adipokines in adipose tissue and insulin sensitivity.

In this study we did not find any relationship between the gene expression of adipokines in adipose tissue and postprandial glucose and insulin concentration and HOMA index.

Relationships between adipokines in adipose tissue and postprandial lipemia.

Independently of the consumed diet, we sorted patients by gene expression tercils (ascendant) to each adipokine. After that, we studied the relationship between adipokine gene expression levels and postprandial lipemia parameters (TG, CT, HDL-c, LDL-c, Apo A and Apo B). We observed that patients with higher leptin mRNA levels (3rd tercil of gene expression) in the fasting state after the dietary intervention period had higher TC levels ($p=0.028$) (**Figure 15a**). In the postprandial state, we observed a relationship between postprandial leptin mRNA levels and postprandial TG levels, patients with higher leptin expression tended to have higher TG levels ($p=0.071$). In fact, we observed an interaction between leptin mRNA levels and plasma TG levels ($p=0.026$). Post hoc statistical analysis showed that postprandial TG levels were higher in patients sorted in the 3rd tercil (high postprandial leptin mRNA levels) as compared to

patients sorted in the 2nd tercil (intermediated postprandial CNX mRNA levels ($p=0.039$)) (**Figure 15b**). We also observed that patients with higher postprandial expression of adiponectin had higher postprandial HDL-c concentration ($p=0.038$) (**Figure 15c**).

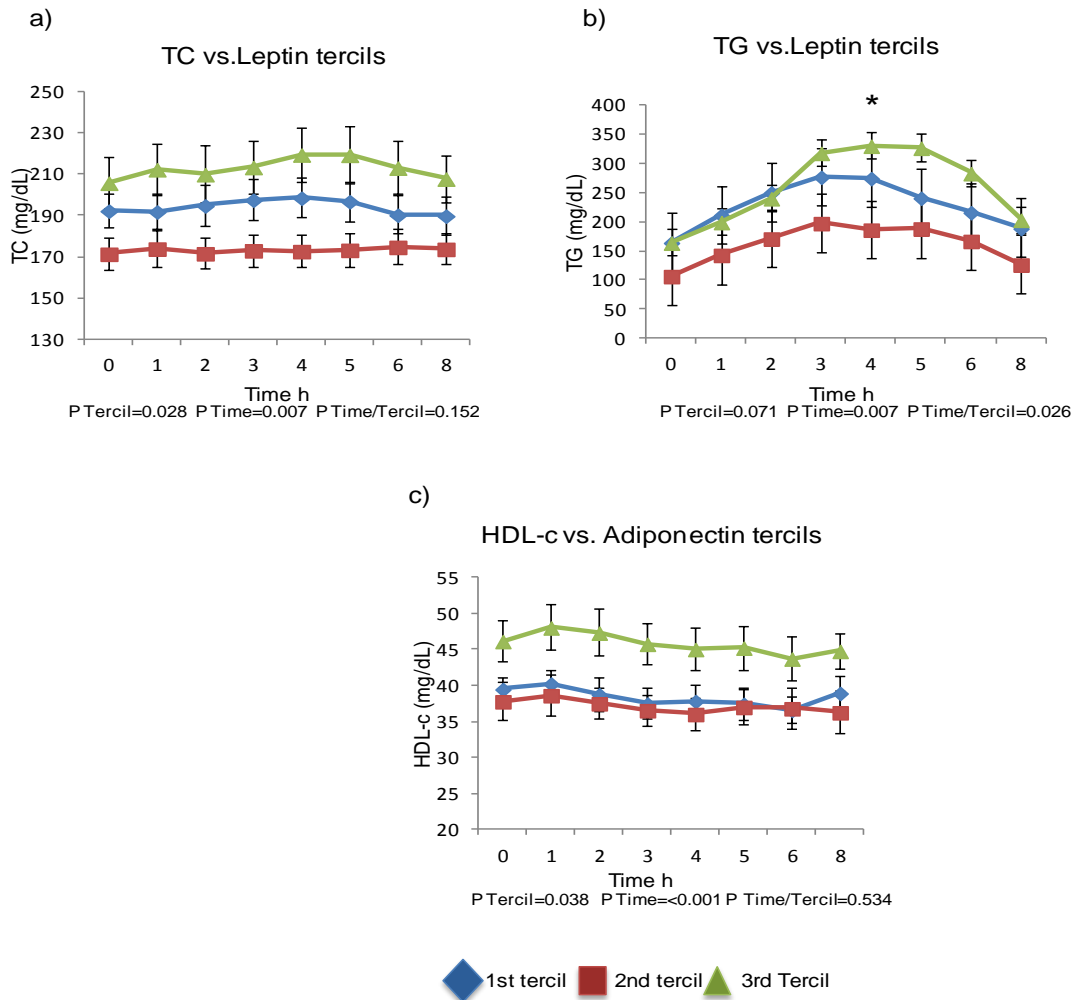


Figure 15. Relationship between gene expression levels in adipose tissue and postprandial lipemia. **a)** Leptin expression in the fasting state after the dietary intervention and postprandial TC levels **b)** Postprandial leptin expression and postprandial TG levels **c)** Postprandial adiponectin expression and postprandial HDL-c levels 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n-3$) diets. ANOVA for repeated measures, global p -values: P_{tercil} : tercil effect; P_{Time} : time effect; $P_{Time/Tercil}$: tercil by time interaction. P : p -values from Bonferroni's multiple comparison test

9.2 Relationships between lipid metabolism related genes in adipose tissue and indicators of metabolic risk.

Relationships between lipid metabolism related genes in adipose tissue and insulin sensitivity.

In this study we did not find any relationship between lipid metabolism related gene expression in adipose tissue and postprandial glucose and insulin concentration and HOMA index.

Relationships between lipid metabolism related genes in adipose tissue and postprandial lipemia.

We observed that, in the fasting state after the dietary intervention period, vimentin gene expression correlated negatively with HDL-c plasma levels ($r:-0.492$; $P=0.001$) (**Figure 16a**) and Apo A plasma levels ($r:-0.427$; $p=0.007$) (**Figure 16b**), we also observed that it correlated with TG plasma levels ($r:0.394$; $p=0.013$) (**Figure 16c**). In the postprandial state, we observed a positive correlation between postprandial perilipin mRNA levels and HDL-c values 4 hrs after meal intake ($r:0.358$; $p=0.025$) (**Figure 16d**). We also observed an interaction between postprandial perilipin mRNA levels and postprandial plasma HDL-c levels ($p=0.026$) (**Figure 17e**).

In addition, we studied the relationship between lipid metabolism related genes expression levels and postprandial lipemia parameters (TG, CT, HDL-c, LDL-c, Apo A and Apo B). We found that patients with high vimentin mRNA levels in the fasting state after the dietary intervention period had lower postprandial HDL-c ($p=0.001$) (**Figure 17a**) and Apo A levels ($p=0.021$) (**Figure 17b**) as well higher TG ($p=0.048$) (**Figure 17c**) and Apo B ($p=0.034$) (**Figure 17d**) levels.

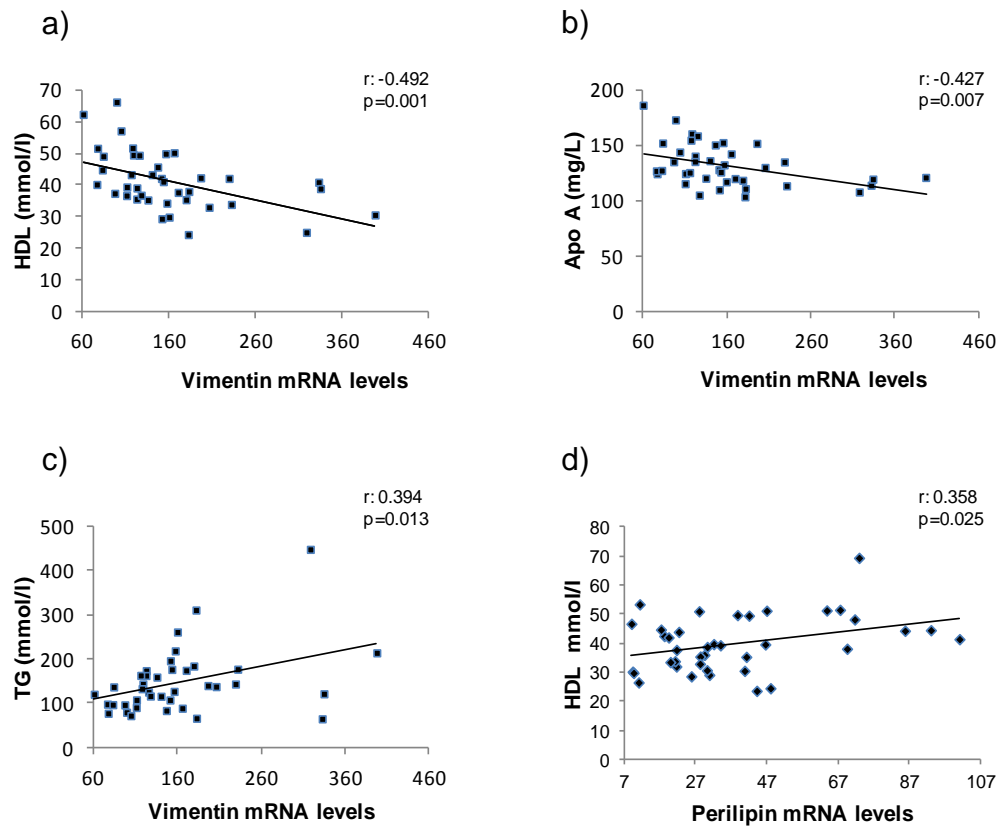


Figure 16. Correlations between **a)** Vimentin mRNA levels and HDL-c (mmol/l) ($r:-0.492$, $p:0.001$) in the fasting state after the dietary intervention **b)** Vimentin mRNA levels and Apo A (mg/dL) ($r:-0.427$, $p:0.007$) in the fasting state after the dietary intervention **c)** Vimentin mRNA levels and TG (mmol/l) ($r:0.394$, $p:0.013$) in the fasting state after the dietary intervention **d)** Postprandial perilipin mRNA levels and postprandial HDL-c (mmol/l) ($r:0.358$, $p:0.025$), 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n=3$) diets.

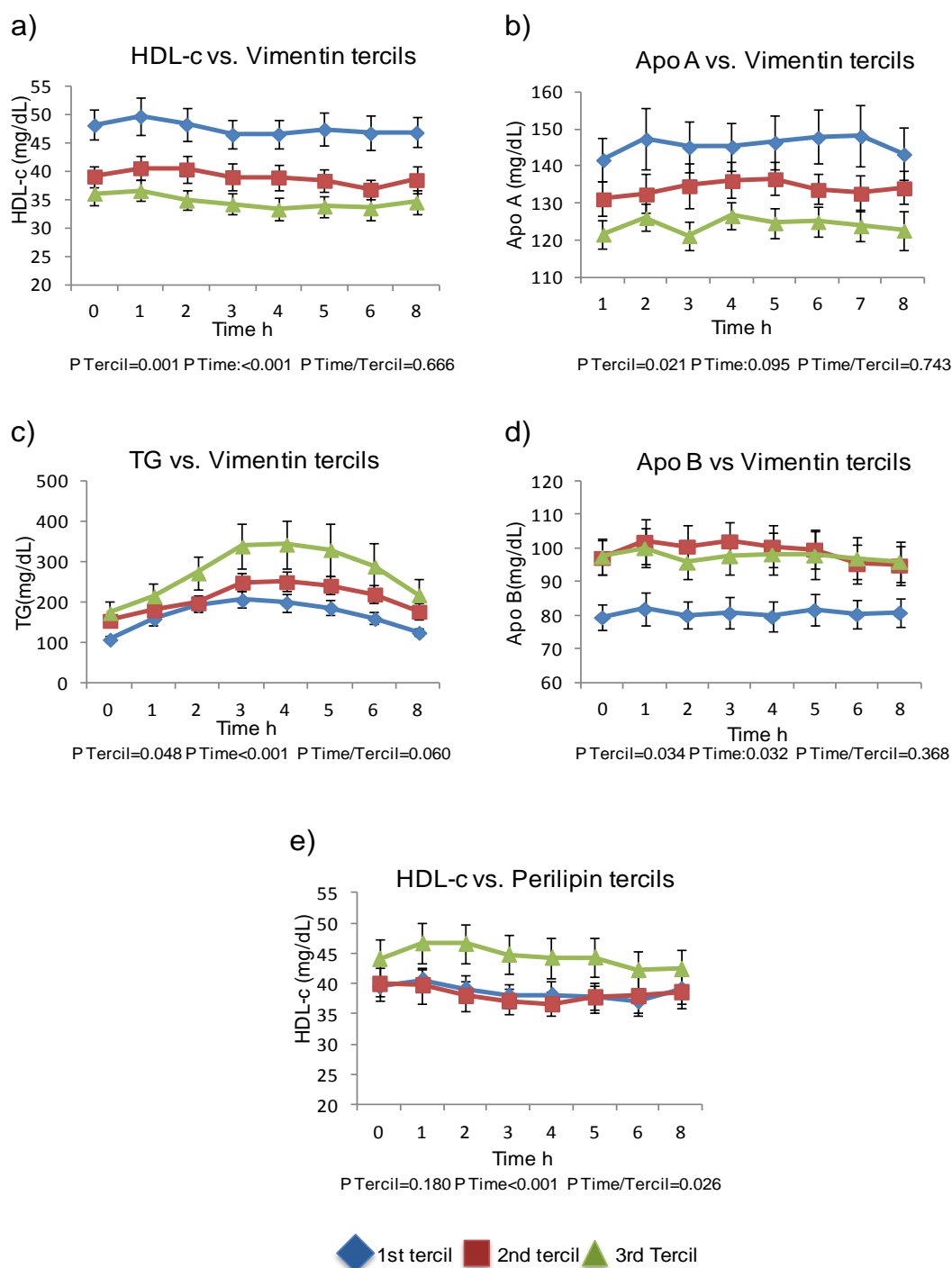


Figure 17. Relationship between gene expression levels in adipose tissue and postprandial lipemia. **a)** Vimentin expression in the fasting state after the dietary intervention and postprandial HDL-c levels **b)** Vimentin expression in the fasting state after the dietary intervention and postprandial Apo A levels **c)** Vimentin expression in the fasting state after the dietary intervention and postprandial TG levels **d)** Vimentin expression in the fasting state after the dietary intervention and postprandial ApoB levels **e)** Postprandial perilipin expression and postprandial HDL-c levels 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n=3$) diets. ANOVA for repeated measures, global p-values: P_{tercil} : tertcil effect; P_{Time} : time effect; $P_{Time/Tercil}$: tertcil by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test.

9.3 Relationships between endoplasmic reticulum stress-related genes in adipose tissue and indicators of metabolic risk.

Relationships between endoplasmic reticulum stress-related genes in adipose tissue and insulin sensitivity.

We observed a negative relationship between GSTP1 mRNA levels and insulin concentration in the fasting state after the dietary intervention period ($r:-0.338$; $p=0.036$) (**Figure 18a**) and a negative relationship between postprandial CRL and CNX mRNA levels and postprandial glucose levels ($r:-0.364$, $p=0.023$) ($r:-0.404$, $p=0.011$) respectively (**Figure 18b**) (**Figure 18c**).

Relationships between endoplasmic reticulum stress-related genes in adipose tissue and postprandial lipemia.

We found a negative relationship between postintervention postprandial CRL mRNA levels and postprandial TC plasma levels ($r:-0.368$; $p=0.021$) (**Figure 18d**). On the other hand, when we sorted patients by gene expression tercils (ascendant) to each endoplasmic reticulum stress-related gene, we observed that patients with higher postprandial XBP-1 mRNA levels after the dietary intervention period had lower postprandial LDL-C levels ($p=0.043$) (**Figure 19a**). Additionally, we observed that patients with lower postprandial CNX mRNA levels have higher CT levels ($p=0.012$) (**Figure 19b**). Moreover, patients with lower postprandial CNX mRNA levels have also higher TG levels ($p=0.006$) (**Figure 19c**). In fact, we observed an interaction between CNX mRNA levels and plasma TG levels ($p=0.022$). Post hoc statistical analysis showed that postprandial TG levels were higher in patients sorted in the 1st tercil (low postprandial CNX mRNA levels) as compared to patients sorted in the 2nd tercil (intermediated postprandial CNX mRNA levels ($p=0.005$)) and with patients sorted in the 3rd tercil (high postprandial CNX mRNA levels ($p=0.047$)).

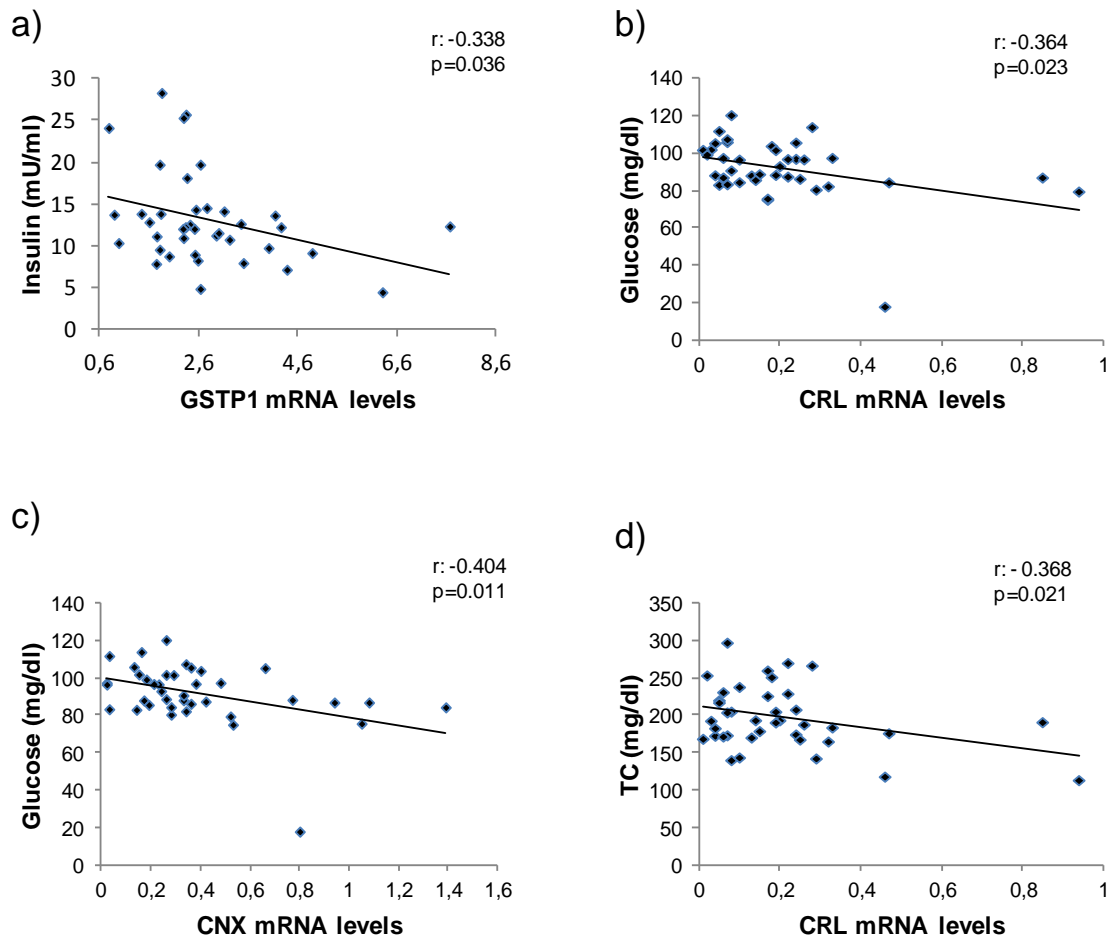


Figure 18. Correlations between **a)** GSTP1 mRNA levels and Insulin (mU/ml) ($r: -0.338$, $p: 0.036$) in the fasting state after the dietary intervention **b)** Postprandial CRL mRNA levels and postprandial glucose (mg/dl) ($r: -0.364$, $p: 0.023$) **c)** Postprandial CNX mRNA levels and postprandial glucose (mg/dl) ($r: -0.404$, $p: 0.011$). **d)** Postprandial CRL mRNA levels and postprandial TC (mg/dl) ($r: -0.368$, $p: 0.021$) 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n=3$) diets. Pearson's linear correlation coefficient.

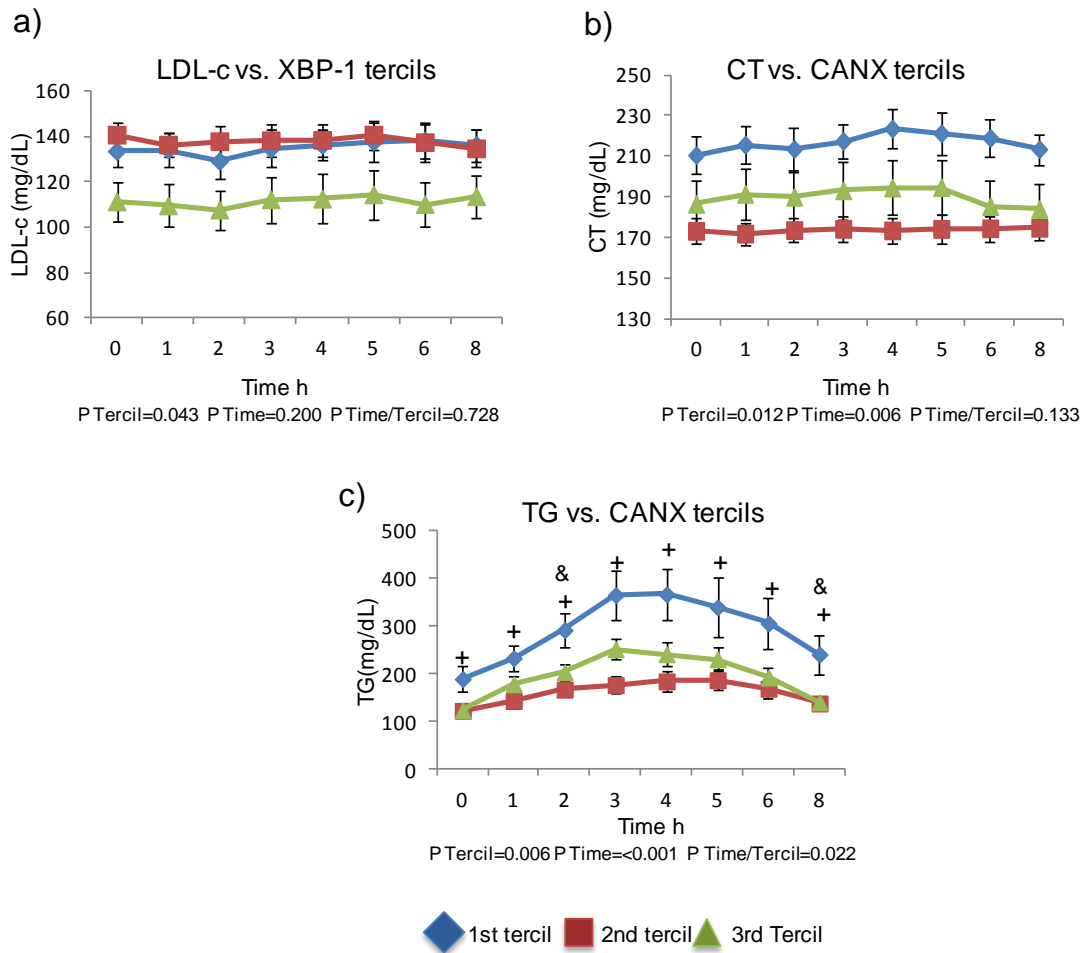


Figure 19. Relationship between gene expression levels in adipose tissue and postprandial lipemia. **a)** Postprandial XBP-1 expression and postprandial LDL-c levels **b)** Postprandial CNX expression and postprandial CT levels **c)** Postprandial CNX expression and postprandial TG levels 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (*n*-3) diets. ANOVA for repeated measures, global p-values: *P Tercil*: diet effect; *P Time*: time effect; *P Time/Tercil*: diet by time interaction. P: p-values from Bonferroni's multiple comparison test. + Statistical difference between 1st tercil and 2nd tercil $p < 0.05$. & Statistical difference between 1st tercil and 3rd tercil $p < 0.05$.

9.4 Relationships between inflammation-related genes in adipose tissue and indicators of metabolic risk.

Relationships between inflammation-related genes in adipose tissue and insulin sensitivity.

We analyzed the relationship between the gene expression of inflammation related genes in adipose tissue and HOMA index, and plasma glucose and insulin concentrations. We did not find any relationship in fasting state. In the postintervention postprandial state, after the intake of the fat challenge, we observed a positive correlation between postprandial p65 mRNA levels and HOMA index ($r:0.353$; $p=0.028$) (**Figure 20a**). We also observed that postprandial I κ B β 2 mRNA levels correlated negatively with postprandial insulin concentration ($r:-0.354$; $p=0.027$) (**Figure 20b**).

We also studied the relationship between the expression of inflammation related genes in adipose tissue and postprandial plasma glucose and insulin concentration by level of expression. To do that, we sorted patients by gene expression tercils (ascendant) to each inflammation related gene. We observed that patients with higher postprandial IL1 β mRNA levels (3rd tercil) had higher postprandial glucose levels ($p=0.037$). Additionally, we observed an interaction between IL1 β mRNA levels and plasma glucose levels ($p=0.036$). Post hoc statistical analysis showed that postprandial glucose levels were higher in patients sorted in the 3rd tercil (high postprandial IL1 β mRNA levels) as compared to patients sorted in the 2nd tercil (intermediated postprandial IL1 β mRNA levels ($p=0.014$)) and with patients sorted in the 1st tercil (low postprandial IL1 β mRNA levels ($p=0.024$)) (**Figure 21a**).

Relationships between inflammation-related genes in adipose tissue and postprandial lipemia.

When we studied the relationship between the expression of inflammatory genes and postprandial lipemia, we found a positive correlation between the postprandial p65 mRNA levels with postprandial TG ($r:0.406$; $p=0.010$) (**Figure 20c**) and postprandial Apo B concentration 4 h after the meal intake ($r:0.341$; $p=0.034$) (**Figure 20d**). We also found a negative correlation between postprandial p65 mRNA levels and postprandial

HDL-c ($r:0.377$; $p=0.018$) (**Figure 20e**). Additionally we observed that the patients with higher postprandial p65 mRNA levels (3rd tercil) had higher TG levels throughout the whole postprandial lipemia ($p=0.044$) (**Figure 21b**).

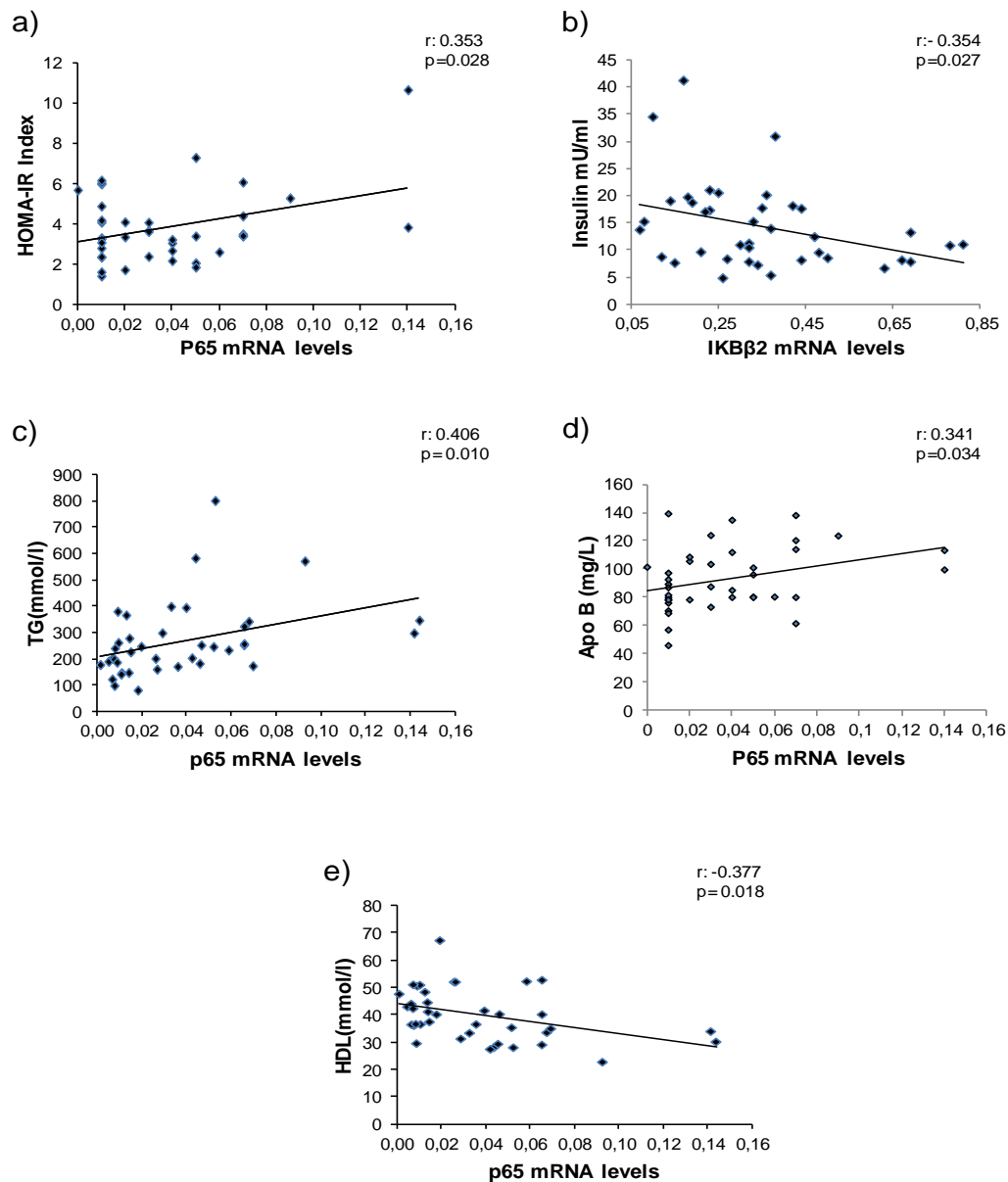


Figure 20 Correlations between **a)** Postprandial p65 mRNA levels and HOMA index ($r:0.353$, $p:0.028$) **b)** Postprandial IKB β 2 mRNA levels and postprandial insulin (mU/ml) ($r:0.354$, $p:0.027$) **c)** Postprandial p65 mRNA levels and postprandial TG (mmol/l) ($r:0.406$, $p:0.010$) **d)** Postprandial p65 mRNA levels and postprandial ApoB (mg/ml) ($r:0.341$, $p:0.034$) **e)** Postprandial p65 mRNA levels and postprandial HDL-c (mmol/l) ($r:0.377$, $p:0.018$) 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n-3$) diets. Pearson's linear correlation coefficient.

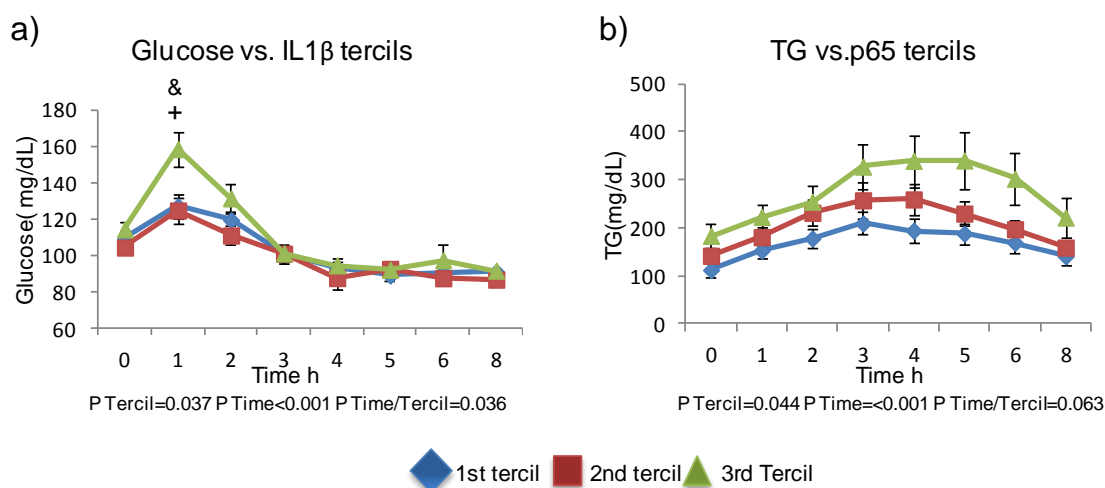


Figure 21. Relationship between gene expression levels in adipose tissue and postprandial lipemia **a)** Postprandial IL1 β expression and postprandial glucose (mg/dl) (r : -0.404, p : 0.011) **b)** Postprandial p65 expression and postprandial TG levels 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC (n -3) diets. ANOVA for repeated measured, global p -values: P Tertile: diet effect; P Time: time effect; P Time/Tertile: diet by time interaction. P : p -values from Bonferroni's multiple comparison test. + Statistical difference between 3rd tertile and 2nd tertile p <0.05. & Statistical difference between 3rd tertile and 1st tertile p <0.05.

10. Relationships between gene expression in adipose tissue and body mass index (BMI).

The evidence shown suggests that the genes related to body fatness are expressed more aggressively under the influence of an obesity-promoting environment (268). In this study we have analyzed the relationship between the expression of the genes studied and the BMI. In the fasting state after the dietary intervention period we found a negative correlation between adiponectin mRNA levels and BMI (r : -0.343; p =0.033) (Figure 22a) and a positive correlation between leptin mRNA levels with BMI (r : 0.335; p =0.040) (Figure 22b). Additionally we also found a relationship between ATGL mRNA levels in the fasting state after the dietary intervention and BMI (r : 0.341; p =0.036) (Figure 22c).

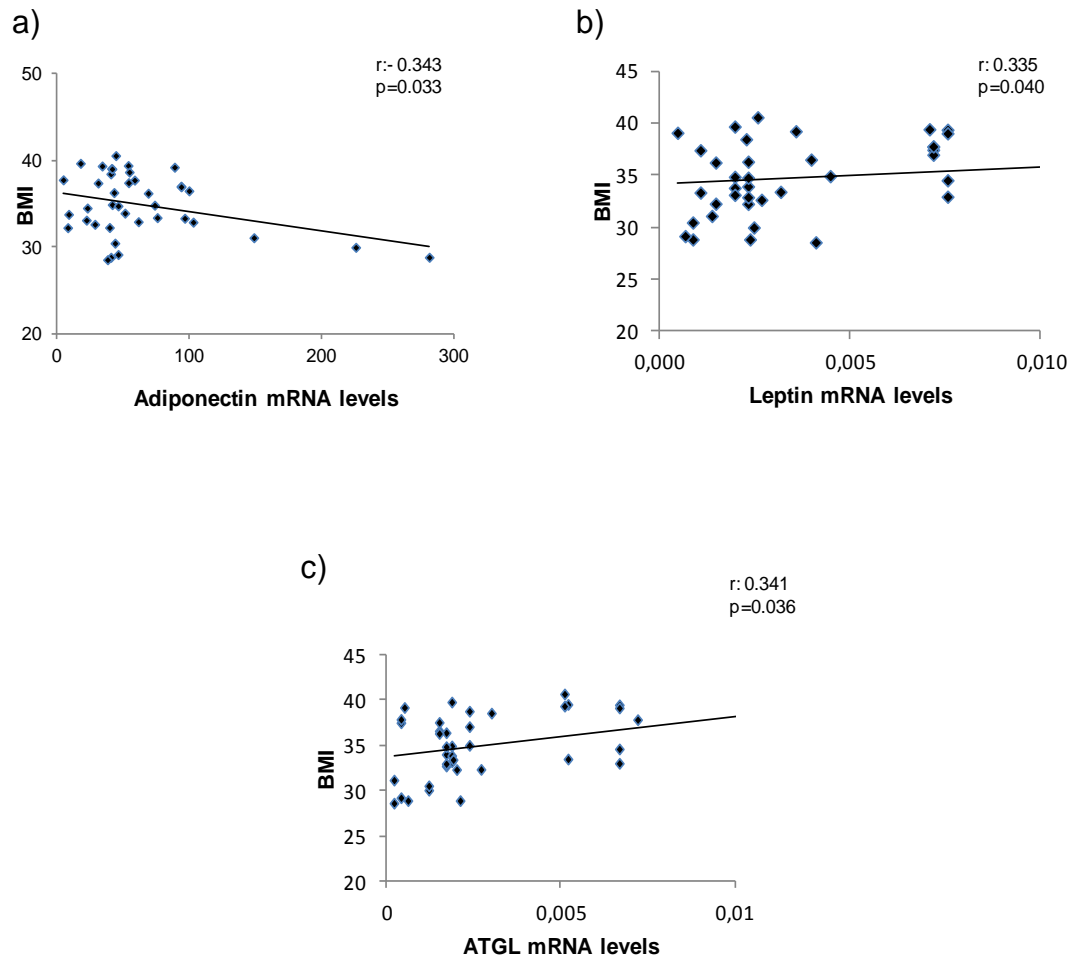


Figure 22. Correlations between **a)** Adiponectin mRNA levels and BMI ($r:-0.343$, $p:0.033$) **b)** Leptin mRNA levels and BMI ($r:0.335$, $p:0.040$) **c)** ATGL mRNA levels and BMI ($r:0.341$, $p:0.036$) in the MetS patients in the fasting state after the dietary intervention with the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n=3$) diets. Pearson's linear correlation coefficient

VII. DISCUSIÓN

Grasa de la dieta, función endocrina y almacenamiento de lípidos en tejido adiposo.

Aunque en un principio el tejido adiposo fue considerado un mero almacén de energía, en los últimos años se ha demostrado que actúa como un importante órgano endocrino. Como tal, secreta numerosas proteínas llamadas adipoquinas, que participan en la regulación autócrina y parácrina del propio tejido, pero que además tienen efectos endocrinos en órganos distantes, tales como el músculo, páncreas, hígado y cerebro (269).

Las adipoquinas controlan funciones fisiológicas de gran importancia como la regulación del peso corporal, la función vascular, y la respuesta inflamatoria. Además, la desregulación en la síntesis y expresión de algunas de ellas como adiponectina, resistina, leptina, RBP4 y PAI-1 se ha relacionado con algunas patologías como el desarrollo de la resistencia a la insulina (15). En nuestro estudio hemos analizado si la cantidad y tipo de grasa de la dieta puede tener un efecto modulador en la función endocrina del tejido adiposo de pacientes con SMet.

La adiponectina es considerada un factor clave en la regulación de la sensibilidad a la insulina y el metabolismo [3] y sus niveles en plasma están relacionados de forma inversa con los componentes del SMet (18). Nuestro estudio mostró que el consumo a largo plazo de la dieta HSFA y las dietas LFHCC y LFHCC n-3 disminuye la expresión de adiponectina en tejido adiposo, mientras que el consumo de la dieta HMUFA no afecta la expresión de esta adipoquina.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en un estudio realizado en pacientes obesos que demostró que el consumo de una dieta rica en SFA (ácidos grasos saturados) disminuye la expresión en tejido adiposo de adiponectina en comparación con una dieta rica en MUFA (ácidos grasos monoinsaturados) (235). El descenso en la expresión de adiponectina observado tras el consumo de la dieta HSFA, podría ser el factor que explica el hecho de que tanto estudios epidemiológicos como de intervención dietética han asociado el consumo de grasa saturada con el desarrollo de resistencia a la insulina (159, 192), condición a su vez, asociada a una disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina (19). No obstante, fue sorprendente que el consumo de la dieta LFHCC, un modelo de dieta bajo en grasa que se ha propuesto para mejorar la

sensibilidad a la insulina (**159, 160**), también disminuye la expresión de adiponectina en tejido adiposo. De hecho, tampoco se observó ningún efecto al suplementar la dieta LFHCC con ácidos grasos omega 3 (PUFA n-3).

Cuando estudiamos el efecto postprandial de los cuatro modelos de dieta estudiados en este trabajo, observamos que los niveles de expresión de esta adipocina disminuyen tras la ingesta de la comida HMUFA mientras que no cambia tras la ingesta de las otras comidas.

Nuestro estudio mostró que los cambios ocasionados por la cantidad y tipo de grasa de la dieta en la expresión génica de adiponectina ocurrieron en paralelo a los observados en el gen que codifica para la perilipina, una proteína relacionada con el almacenamiento de lípidos en la gota lipídica, el proceso de lipólisis, y tamaño del adipocito (**270**). El hecho de que, al igual que en el caso de la adiponectina, la expresión génica de perilipina disminuye tras el consumo a largo plazo de las dietas HSFA, LFHCC y LFHCC n-3 sugiere que una disminución de la capacidad de almacenamiento de lípidos en tejido adiposo tiene lugar tras el consumo de estas dietas, lo que podría estar relacionado con un deterioro de la sensibilidad a la insulina como recientemente se ha propuesto (**123**). Así pues, nuestros resultados sugieren que una reducción de la liberación de adiponectina en tejido adiposo puede ocurrir en paralelo a la reducción en la capacidad de almacenamiento de lípidos en este tejido tras el consumo a largo plazo de las dietas HSFA, LFHCC and LFHCC n-3, lo que puede determinar una reducción en la capacidad “buffering” del tejido adiposo y que a su vez provocaría una afluencia excesiva de lípidos a otros tejidos, y al depósito ectópico de grasa y en último término al desarrollo de la resistencia a la insulina en situaciones en las que la ingesta energética supera el gasto energético (**271**).

El paralelismo observado en los cambios de expresión génica de adiponectina y perilipina tras el consumo de las dietas HSFA, LFHCC y LFHCC n-3 podría deberse a la activación/inhibición de factores de transcripción que regulan la expresión de ambos genes. De hecho, en la misma población donde se ha realizado este estudio, se ha demostrado que 5 factores de transcripción (PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha), FOXC2 (forkhead box C2) y CTNFB1 (catenin (cadherin-associated protein), beta 1)) controlan la expresión génica de adiponectina y perilipina (**referencia manuscrito 3**). Este análisis mostró que la

activación del factor de transcripción FOXC2, el cual reprime la expresión de adiponectina y perilipina (272), parece ser el principal responsable de la disminución de los niveles de expresión de estos genes después del consumo a largo plazo de las dietas HSFA, LFHCC y LFHCC n-3, en contraste con el consumo de la dieta HMUFA que causa la inhibición de FOXC2. Además, en la disminución de la expresión de adiponectina después del consumo de la dieta LFHCC n-3 también parece estar involucrado el factor de transcripción CTNNB1, el cual reprime la expresión de este gen cuando es activado (273), hecho que ocurre después del consumo de la dieta LFHCC n-3. Por otro lado, los cambios postprandiales observados en la expresión de adiponectina y perilipina podrían ser explicados, al menos parcialmente, debido al efecto de la dieta en la modulación de la actividad de los factores de transcripción PPARg, PPARA, y CTNNB1. De esta manera, la reducción en la expresión de adiponectina y perilipina después del consumo de la comida HMUFA, parece ser provocado por la inhibición de los factores de transcripción PPARg y PPARA, que actúan como activadores de la transcripción de adiponectina y perilipina, y que por tanto, al ser inhibidos dejan de activar la transcripción de ambos genes, conlleva una disminución de sus niveles de mRNA. Además, la activación de CTNNB1, que actúa como represor de la transcripción de adiponectina puede ser también responsable de la disminución postprandial de la expresión de esta adipoquina después del consumo de la dieta HMUFA (273), ya que este factor transcripcional es activado tras la ingesta de esta comida.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la expresión de adiponectina y perilipina está relacionada con la lipemia postprandial. Los pacientes con mayor expresión postprandial de adiponectina muestran mayor concentración postprandial de HDL-c en plasma. Igualmente, los pacientes con mayor expresión postprandial de perilipina tienen niveles postprandiales más altos de HDL-c en plasma. En este sentido, estudios previos en humanos han demostrado que los niveles de adiponectina tienen una relación directa con el colesterol HDL (274, 275), lo que pone en evidencia la relación mediada por la adiponectina entre la sensibilidad a la insulina y el metabolismo hepático de lipoproteínas (275). Además, la relación entre la expresión de ambos genes, adiponectina y perilipina, con los valores de lipemia postprandial podría ser mediada por PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), los cuales, además de tener un

efecto regulador en la expresión de ambos genes (276, 277), han mostrado tener efectos genéticos pleiotrópicos sobre las concentraciones de HDL-c (278).

En nuestro estudio observamos una relación inversa entre la expresión de adiponectina en ayunas tras el periodo de intervención dietética e independientemente de la dieta consumida y el IMC. De acuerdo con nuestros resultados, ha sido previamente descrito que los niveles de adiponectina en plasma son menores en personas con obesidad (18). Aunque la base molecular de esta relación no está del todo clara, se ha observado que TNF α es un fuerte inhibidor de la actividad del promotor de la adiponectina, por lo que el estado inflamatorio observado en pacientes con obesidad y SMet puede influir en la relación inversa entre la expresión génica de adiponectina en tejido adiposo y el IMC encontrada en nuestra investigación (279).

Nuestros resultados, además, mostraron que el consumo a largo plazo de las dietas LFHCC y LFHCC n-3 disminuye la expresión de RBP4 en tejido adiposo de pacientes con SMet en comparación con las dietas HSFA y HMUFA, cuyo consumo no afecta a la expresión génica de esta adipoquina. RBP4 es una adipoquina que ha sido relacionada con la resistencia a la insulina, DMT2, dislipidemia y obesidad, de manera que sus niveles plasmáticos son elevados en estas condiciones patológicas (31, 32, 280). En este sentido, no se observó ningún efecto de la suplementación con PUFA n-3 en la dieta LFHCC n-3 con respecto a la dieta LFHCC en la expresión génica en tejido adiposo de RBP4. Por otro lado, cuando analizamos la expresión de genes relacionados con el almacenamiento de lípidos en tejido adiposo, observamos que la expresión génica de FABP4, una proteína involucrada en el metabolismo de ácidos grasos (281, 282), y de caveolina 1, un componente de las gotas lipídicas en células estimuladas lipolíticamente en estudios *in vitro* (80, 265), cambia como consecuencia de la suplementación de la dieta LFHCC con PUFA n-3 cuando se compara con la dieta LFHCC. El principal efecto observado fue la disminución de la expresión de FABP4 y CAV1 en estado de ayuno, lo que sugiere una reducción de la capacidad de almacenamiento de lípidos en tejido adiposo después del consumo a largo plazo de PUFA n-3.

No obstante, en nuestro estudio no hemos observado ningún efecto de la dieta sobre la expresión génica de vimentina, proteína estructural del adipocito que regula el contenido de lípidos, aunque observamos que la expresión de esta proteína está relacionada con los valores circulantes de lípidos, tanto en estado de ayuno como en

estado postprandial. La expresión génica de vimentina muestra una relación negativa con los niveles de HDL-c y apoA, así como una relación positiva con los niveles de TG en estado de ayuno después de la intervención dietética. A su vez observamos que los pacientes con mayor expresión de vimentina tienen niveles postprandiales de TG y de Apo B más altos que los pacientes que menos expresan este gen, los cuales son los que presentan niveles postprandiales de HDL-c y Apo A más altos. La relación entre la expresión de vimentina con los valores de lípidos en estado de ayuno puede estar asociado a la relación directa que ejerce la expresión de vimentina sobre el proceso de lipólisis y regulación de HSL (264), aunque el mecanismo concreto no se conoce.

PAI-1 es una glicoproteína que inactiva al activador del plasminógeno y tiene un importante rol en la inhibición de la fibrinólisis, de manera que el incremento en la concentración de PAI-1 en plasma es considerado como un factor de riesgo de enfermedad trombótica (283). Nuestro estudio mostró que los transcritos de PAI-1 solo fueron detectables en el estado postprandial, y que las diferentes dietas testadas en nuestro estudio no ejercen un efecto alguno sobre los niveles postprandiales de mRNA de PAI-1. En este sentido, la exacerbada respuesta postprandial de los niveles de TG observada en pacientes con SMet (143) podría ser un factor clave en el incremento postprandial de la expresión de PAI-1(284). De hecho, estudios *in vitro* han demostrado que varias lipoproteínas ricas en TG como las VLDL (285) y LDL-c oxidadas incrementan la producción de PAI-1 (286). Además, ya ha sido previamente asociada la lipemia postprandial con un estado pro coagulante en pacientes hipertensivos (287) y pacientes con SMet (288).

En nuestro estudio no observamos ningún efecto de la cantidad y tipo de grasa en la dieta sobre la expresión de leptina, tanto en estado de ayuno tras la intervención dietética como en estado postprandial. No obstante, hemos observado una relación entre la expresión de leptina en tejido adiposo con los valores de lipemia postprandial. Los pacientes que más expresan el gen de la leptina presentan mayores niveles postprandiales de TG, lo que concuerda con los estudios realizados en modelos animales, donde se ha observado una relación positiva entre los niveles de TG con la expresión de leptina en tejido adiposo (289). Además, hemos observado una relación entre la expresión de leptina en estado de ayuno tras la intervención dietética y el IMC, lo que ya ha sido descrito previamente (290), de manera que en obesidad existe una

desregulación en el transporte y un aumento en los niveles de esta adipoquina como consecuencia de un estado de resistencia a la leptina **(28)**.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la cantidad y la calidad de la grasa de la dieta parecen modular la función endocrina del tejido adiposo en pacientes con SMet y que la grasa de la dieta ejerce un efecto diferencial sobre la expresión de adipoquinas a través de la interacción con mecanismos comunes con los genes relacionados con el almacenamiento de lípidos. Además, esta interacción parece ser opuesta en condiciones metabólicas diferentes en que la grasa es movilizada o almacenada.

Grasa de la dieta y metabolismo lipídico en tejido adiposo.

Lipogénesis

La lipogénesis (LGN) es la ruta bioquímica por la cual son sintetizados los ácidos grasos a partir de acetyl-CoA y esterificados o unidos con el glicerol para formar TG y ser almacenados en tejido adiposo. El acetyl-CoA utilizado como sustrato en el proceso LGN puede provenir de dos vías: la primera, a partir de los lípidos provenientes de la dieta, que después del proceso digestivo en el intestino, los TG se segregan a la linfa en quilomicrones para alcanzar el plasma a través del conducto torácico, y así llegar a los tejidos periféricos, en donde los TG son hidrolizados principalmente en el tejido adiposo a través de la acción de la LPL hasta AGL y glicerol. Una vez en el interior de la célula, los ácidos grasos son re-esterificados mediante el proceso de LGN con glicerol para formar TG y ser almacenados dentro de la gota lipídica **(40)**. La segunda vía es la obtención de acetyl-CoA a partir de la glucosa en situaciones de una ingesta excesiva de energía proveniente de los hidratos de carbono. En estas condiciones, la conversión de los hidratos de carbono de la dieta en lípidos o la síntesis de ácidos grasos a partir de acetyl-CoA proveniente de la glucosa para formar TG y ser almacenados en tejido adiposo se lleva a cabo por una ruta enzimática y este proceso es denominado LGN *de novo* **(45)**.

El proceso de LGN tiene un papel relevante en la regulación del almacenamiento de lípidos en tejido adiposo. En pacientes con SMet hay una alteración de este proceso,

lo que podría estar relacionado con el estado de resistencia a la insulina característico de esta patología (291). En condiciones de resistencia a la insulina existe una baja actividad de la LPL y disminuye la captación de los TG en tejido adiposo provocando un aumento de los niveles de TG circulantes. Además, la baja respuesta antilipolítica de la insulina aumenta el flujo de AGL en la circulación hacia otros tejidos como músculo esquelético, hígado y páncreas, contribuyendo de esta manera al efecto de lipotoxicidad (46). Además, en condiciones de obesidad, componente causal del SMet, el exceso de lípidos almacenados en el tejido adiposo ha sido relacionado con el aumento en la expresión de los genes involucrados en la actividad lipogénica, lo que a su vez está asociado con el desarrollo de hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo, así como con resistencia a la insulina (8, 292), y el desarrollo de DMT2 (293, 294). De hecho, en modelos animales de resistencia a insulina y obesidad, ha sido descrito que existe una sobreexpresión de SREBP1c, factor de transcripción que activa la expresión de varios genes involucrados en el proceso de LGN (295, 296), lo que a su vez, está relacionado con el aumento en la síntesis de ácidos grasos y un aumento del depósito de lípidos. (297).

Pocos estudios han abordado el efecto de la dieta en el proceso de LGN en pacientes con SMet, por lo que la importancia de nuestro estudio radica en esclarecer si un factor ambiental manipulable como es la dieta puede ser una herramienta en la modulación del proceso de LGN en tejido adiposo de pacientes con SMet y aumentar el conocimiento sobre el tratamiento y la prevención de los factores de riesgo asociados a este proceso.

En nuestro estudio hemos observado que existe una interacción entre la dieta y la expresión de los genes lipogénicos en tejido adiposo. Nuestro estudio demostró que el consumo a largo plazo de la dieta LFHCC aumenta la expresión de los genes SREBP1 y SCD-1. En este sentido, de acuerdo con nuestros resultados, se ha observado que las dietas ricas en hidratos de carbono aumentan la expresión de las principales enzimas lipogénicas en tejido adiposo de personas sanas y con sobrepeso (298). Además, hemos observado que la inducción en la expresión de éstos genes después del consumo de la dieta LFHCC se suprime con la suplementación de PUFA n-3. El efecto de los PUFA n-3 ya ha sido descrito previamente en estudios con modelos animales (299, 300). La capacidad reguladora de la homeostasis lipídica por parte de los PUFA n-3 ha sido relacionada con el control que ejercen sobre el procesamiento proteolítico de los

precursores de SREBP (301), y mediante la modificación en la maduración y estabilidad del mRNA de enzimas lipogénicas (302, 303). Además, los PUFA n-3 procedentes de la dieta pueden estimular la diferenciación del adipocito y disminuir el proceso de LGN a través de la inhibición de SREBP1 (304-306). SREBP1 es un factor de transcripción clave en la regulación del metabolismo y la homeostasis de los lípidos, debido a que controla la síntesis endógena de colesterol, ácidos grasos, TG y fosfolípidos (307, 308). Así, la suplementación con PUFA-3 modifica favorablemente las alteraciones de lípidos tanto en suero como en otros tejidos relacionadas con el SMet (309), además de tener un efecto positivo al prevenir la hipertrofia del adipocito (310).

El hecho de que el consumo de la dieta LFHCC-n3 disminuya la expresión del gen SCD-1 en comparación con el consumo de la dieta LFHCC podría estar relacionado con la inhibición de las vías internas de síntesis de ácidos grasos que ejercen los PUFA n-3. Esta enzima es la responsable de la desaturación del ácido palmítico (16:0) y ácido esteárico (18:0) para convertirlos en palmitoleico (16:1 n-7) y ácido oleico (18:1 n-9), respectivamente, de hecho SCD-1 está bajo control transcripcional de SREBP1, de manera que el efecto de los PUFA n-3 sobre la expresión de esta enzima podría estar relacionada con el hecho de que se están añadiendo ácidos grasos con un alto grado de insaturación, lo que ha sido relacionado con una disminución de la síntesis de ácidos grasos, y por tanto con el proceso de LGN (311). De acuerdo con nuestros resultados, en modelos animales se ha demostrado que la disminución de la forma madura de SREBP1 después de la administración de aceite de pescado rico en PUFA n-3, se traduce en la disminución de la expresión de enzimas lipogénicas incluyendo SCD-1 (312).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el proceso de LGN en tejido adiposo de pacientes con SMet es susceptible de modulación por la dieta. De hecho nuestro estudio mostró que la dieta LFHCC parece inducir el proceso y que al añadir PUFA n-3 a esta dieta el proceso se inhibe.

Lipólisis

La integridad de los procesos que regulan el metabolismo de lípidos en tejido adiposo (lipogénesis y lipólisis) es esencial para mantener la homeostasis del contenido

de masa grasa corporal, de manera que la alteración de los mismos, juega un importante papel en las patologías asociadas a la obesidad **(313)**.

El proceso de lipólisis implica la movilización de los TG almacenados en el tejido adiposo en forma de AGL y glicerol, que son liberados al plasma unidos de una forma no covalente a la albúmina sérica para ser transportados posteriormente a otros tejidos como hígado y músculo **(314)**. Este proceso se lleva a cabo en etapas sucesivas por las enzimas adipo-triglicérido-lipasa (ATGL), lipasa sensible a hormonas (HSL) y la monoglicerol lipasa (MGL). La ATGL es la enzima responsable de la primera etapa del proceso de lipólisis. Esta enzima hidroliza los TG en el tejido adiposo, obteniendo como producto de la hidrólisis los diglicéridos. La HSL también actúa en el primer paso de la hidrólisis al igual que ATGL, y en la segunda etapa del proceso de hidrólisis de TG catalizando la reacción de hidrólisis de los diglicéridos en monoglicéridos. La enzima MGL actúa en la última etapa del proceso, hidroliza los monoglicéridos para obtener AGL y glicerol **(315)**. El tejido adiposo es considerado el mayor proveedor de AGL en el organismo **(316)** y el proceso de lipólisis tiene gran relevancia en cuanto a problemas de salud pública, debido a que el aumento en el almacenamiento de TG en tejido adiposo acompañado de una baja tasa de lipólisis se ha relacionado con un estado de hipertrofia e hiperplasia en la obesidad, así como el aumento de lipólisis en tejido adiposo se asocia con dislipidemia y resistencia a la insulina debido al exceso de AGL circulantes **(317)**.

La dieta es un factor clave en la etiología del SMet **(150)**, pero el efecto de la cantidad y tipo de grasa en la dieta sobre la modulación del proceso de lipólisis en estos pacientes ha sido poco estudiada. En nuestro estudio hemos observado que el consumo a largo plazo de la dieta HSFA aumenta la expresión génica de ATGL en comparación con las dietas HMUFA; LFHCC y LFHCC n-3, cuyo consumo no afecta la expresión de esta enzima. A su vez, en el estudio postprandial, observamos un perfil similar al obtenido en el efecto del consumo a largo plazo en ayunas, de manera que se observa un aumento en la expresión de ATGL después del consumo de la comida HSFA, a diferencia de las comidas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3 que no provocaron cambios en la expresión génica de la enzima. Elevados niveles de expresión de ATGL han sido relacionados con un incremento de los niveles en plasma de AGL **(262)**, y con diversas consecuencias patológicas en el organismo, entre ellas el aumento de flujo de ácidos grasos a los tejidos que son susceptibles de almacenar grasa de forma ectópica, como

son el hígado y músculo, proceso que contribuye al fenómeno de lipotoxicidad y resistencia a la insulina (318, 319). Además, en tejido adiposo, los diglicéridos (subproductos de la acción de la ATGL) han sido implicados en la acción de la insulina (222), mediante el efecto inhibitorio que ejercen sobre la cascada de la señalización de la insulina vía activación de las isoformas de la proteína quinasa C (320). Por otra parte, el aumento de AGL en suero puede contribuir además a un estado de hiperglucemia reduciendo la captación de glucosa en el músculo (321), aumentando la producción de glucosa hepática y perjudicando la función de las células β (322). En este sentido, el consumo de SFA ha sido relacionado con el desarrollo del SMet (323, 324), que a su vez produce un aumento de AGL en plasma (325). Nuestros resultados sugieren que el consumo de una dieta HSFA contribuye al desarrollo de SMet mediante el aumento del proceso de lipólisis así como a las consecuencias patológicas que de ello derivan.

El consumo de HSFA podría contribuir al aumento de AGL en pacientes con SMet posiblemente a través del efecto negativo que ejercen sobre la acción de la insulina y la secreción de citoquinas y adipoquinas en tejido adiposo (222, 235), todos ellos, factores reguladores de la lipólisis en este tejido (271, 326). Además, ha sido demostrado que la inflamación aumenta la tasa de lipólisis (62, 327, 328), y que TNF- α induce este proceso, ya que aumenta la expresión de ATGL (329), de manera que el aumento en la expresión génica de ATGL causado por el consumo de la dieta HSFA apoya la asociación descrita entre el aumento en el estado inflamatorio y el consumo de grasa saturada (233, 235, 330).

El incremento en la expresión génica de ATGL por el consumo de la dieta HSFA, tanto en estado de ayuno como en estado postprandial, tiene una especial relevancia clínica ya que muestra un efecto negativo del consumo de una dieta alta en grasa saturada sobre el proceso de lipólisis en tejido adiposo, lo cual ha sido relacionado con el aumento en la presión arterial y en los niveles de TG y LDL-c, así como la disminución en la sensibilidad a la insulina, todos ellos factores que incrementan el riesgo cardiovascular (327).

Por otro lado, nuestro estudio mostró una relación positiva entre la expresión génica en ayunas de ATGL, después de las 12 semanas de intervención dietética, y el IMC. Estos resultados están de acuerdo con el estudio realizado por De Naeyer, H., et al, (331) quienes demostraron que los niveles de mRNA de ATGL en tejido adiposo visceral son más altos en obesos mórbidos que en sujetos sanos. Nuestros resultados

muestran que esto también es así en caso de tejido adiposo subcutáneo. Además, otros estudios han confirmado esta relación al mostrar que la pérdida de peso en pacientes obesos contribuye a la disminución en la expresión de esta enzima (332, 333).

Nuestros resultados sugieren que el consumo de grasa saturada aumenta el proceso de lipólisis en tejido adiposo de pacientes con SMet tanto en estado de ayuno como en estado postprandial.

Grasa de la dieta y estrés de retículo endoplásmico en tejido adiposo.

El retículo endoplásmico (RE) es una organela celular clave en el procesamiento y plegamiento de las proteínas. El RE rugoso presenta en su superficie ribosomas que sintetizan proteínas cuyo destino puede ser la membrana plasmática, el exterior de la célula o los lisosomas y endosomas. En el RE rugoso las proteínas que están siendo sintetizadas por los ribosomas se pliegan y sufren también algunas modificaciones post-traduccionales. Tras su paso por el RE las proteínas pasan mediante vesículas a la cara cis del aparato de Golgi de donde seguirán hacia su localización definitiva pero las proteínas residentes del RE son recuperadas del aparato de Golgi mediante vesículas que proceden de la cara cis del mismo y regresan al retículo (93). En ciertas situaciones, tales como infecciones, hipoxia, o el exceso de nutrientes se puede alterar la homeostasis del RE, y causar estrés en esta organela celular, lo que provoca una acumulación de proteínas mal plegadas (334). Esto da lugar a la activación de una respuesta adaptativa coordinada de la célula, denominada respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (unfolded protein response). La UPR provoca un aumento de las chaperonas involucradas en el plegamiento correcto de proteínas (chaperonas de la familia de las proteínas “heat-shock” (HSP), que incluye a BiP (GRP78), chaperonas tipo lectinas como calnexina (CNX) y, calreticulina (CRT), además de chaperonas de la familia de las PDI) y por otro lado disminuye la tasa de traducción o síntesis de proteínas para evitar que continúe la acumulación de proteínas mal plegadas en el interior del RE (335).

Tres proteínas actúan como sensores del estrés del RE (PERK, ATF6, e IRE1). En condiciones normales, la chaperona BiP en el interior del RE, retiene a PERK, ATF6 e IRE1 en la cara externa de la membrana del RE. No obstante, cuando se acumulan

proteínas mal plegadas, BiP se une a éstas y libera a PERK, ATF6, e IRE1, los cuales llevan a cabo la activación de la UPR.

En condiciones de estrés, ATF6 es transportada al aparato de Golgi, donde es procesada por proteasas, y enviada al núcleo de la célula donde actúa como activador transcripcional de los genes que codifican para las proteínas chaperonas.

La activación de IRE1- α permite un corte y empalme alternativo del ARN mensajero de XBP-1 de manera que la eliminación de un intrón permite la traducción de la forma activa de XBP-1, la cual activa la transcripción de varios genes implicados en la UPR (336), principalmente genes involucrados en su propia autorregulación y los genes que codifican para las chaperonas BiP, PDI, CNX, CRT, así como los que codifican para los componentes del sistema de degradación asociada al retículo (ERAD) (337). A su vez, PERK, una kinasa que fosforila al factor de inicio de la traducción eIF2 α , provoca la inhibición en la síntesis de proteínas, lo que evita que se sigan acumulando proteínas en el RE (338).

No obstante, hasta la fecha, no existían estudios que abordaran el estrés de RE en tejido adiposo en humanos tras la ingesta de alimentos. Nuestro estudio mostró que, al contrario que estudios *in vitro* y en modelos animales que han descrito que los SFA aumentan y los MUFA reducen la expresión de genes relacionados con el estrés de RE en hígado (339-341), el consumo a largo plazo de dietas con diferente cantidad y tipo de grasa, parece no ejercer ningún efecto sobre la expresión de genes relacionados con el estrés de RE en tejido adiposo de pacientes con SMet. De hecho, ha sido descrito que la expresión de genes relacionados con el estrés de RE es específica de cada tejido (342), por lo que aunque los genes relacionados con el estrés de RE en órganos como el hígado parecen responder a la grasa de la dieta, el tejido adiposo parece no responder a este estímulo. No obstante, es necesario aumentar el conocimiento mediante más estudios del efecto de la dieta sobre la expresión de genes relacionados con el estrés de RE. En este sentido, se ha demostrado en humanos que la reducción de peso reduce la expresión de genes relacionados con el estrés de RE en tejido adiposo (343). El hecho de que en nuestro estudio los pacientes consumieron dietas isocalóricas, permite descartar el efecto modulador del peso, o la restricción calórica (344-346), de manera que no han enmascarado un hipotético efecto de la dieta en el estrés del RE.

Por otro lado, nuestro estudio mostró un incremento postprandial de dos genes de respuesta al estrés de RE, BiP y XBP-1, si bien este aumento postprandial fue

independiente de la dieta consumida. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en estudios en modelos animales, donde se ha mostrado una rápida inducción de la expresión de BiP en hígado después de 1.5 h de la ingesta de una comida hipercalórica y alta en proteína (347), y a las 4 h tras una infusión intravenosa tanto de lípidos como de glucosa, lo que sugiere un papel fisiológico de este tipo de estrés y que estaría asociado a la ingesta normal de alimentos (348). Nuestro estudio sugiere que después de una carga grasa tiene lugar una inducción aguda de estrés de RE y que el tipo de grasa no tiene un efecto modulador en esta respuesta celular.

Nuestro estudio mostró una relación positiva entre la expresión postprandial de los genes estudiados (XBP-1, CRL, CNX, BiP, PDIA-3, GSTP1) y la expresión postprandial de I κ B α . Cuando el factor de transcripción NF- κ B es activado, migra al núcleo y activa la transcripción de los genes inflamatorios así como la de su inhibidor I κ B α , lo que supone un mecanismo de autorregulación negativa para bloquear la cascada molecular que perpetuaría la síntesis de mediadores en la respuesta inflamatoria sistémica. Nuestros resultados apoyan la relación previamente descrita entre la respuesta inflamatoria y el estrés de RE (334, 349).

Nuestro estudio además mostró que la inducción postprandial de chaperonas podría estar relacionada con la glucemia postprandial, de manera que existe una relación inversa entre los niveles de glucosa postprandiales y la expresión postprandial de chaperonas en tejido adiposo. De hecho, en modelos animales de obesidad y DMT2, se ha mostrado que la administración de chaperonas químicas involucradas en el correcto plegamiento de proteínas en el RE, está relacionada con la disminución de los niveles de glucosa y mejora en la acción de la insulina en el hígado, músculo y tejido adiposo (94). Además, también observamos una relación entre la expresión postprandial de genes relacionados con el estrés de RE y la lipemia postprandial, de manera que los pacientes que menos expresan las chaperonas involucradas en la UPR en tejido adiposo presentan mayores niveles postprandiales de TG, CT y LDL-c .

En conjunto, nuestros resultados sugieren que tras la ingesta de alimentos tiene lugar un aumento del estrés de RE en tejido adiposo de pacientes con SMet, independiente de la dieta, y que una adecuada respuesta postprandial al estrés de RE reduce la glucemia y lipemia postprandial.

Grasa de la dieta y respuesta inflamatoria en tejido adiposo.

La obesidad está asociada a la disfunción del tejido adiposo y a un estado de inflamación de bajo grado, caracterizado por la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo (7). La disfunción del RE y de la mitocondria (estrés oxidativo) que tiene lugar en el adipocito en condiciones de obesidad han sido asociadas con la activación de las vías inflamatorias, lo que a su vez influye en el fenómeno de resistencia a la insulina y en el desarrollo de ECV (88, 239).

Aunque se ha descrito que en personas obesas el tipo de grasa de la dieta puede influir en el estado inflamatorio del tejido adiposo (235), en nuestro estudio, desarrollado en pacientes con SMet, no observamos ningún efecto de la dieta sobre la respuesta inflamatoria en tejido adiposo en estado de ayunas, lo que sugiere que en etapas avanzadas de la patología de la obesidad, es decir, una vez desarrollado el SMet, la dieta parece no ejercer ningún efecto en el estatus inflamatorio del tejido adiposo (85). Por otra parte, diversos estudios han descrito que la restricción calórica y la pérdida de peso pueden modular el estado inflamatorio (345, 350-352). En base a lo anterior, cambios en el peso de los pacientes incluidos en nuestro estudio podrían haber interferido en la observación de un efecto neto de la dieta, lo cual puede ser descartado ya que los pacientes de nuestro estudio consumieron dietas isocalóricas, y por tanto no se produjeron diferencias en el peso durante el periodo de intervención dietética.

La principal aportación de nuestro estudio fue la demostración de que, en tejido adiposo, existe una inducción de genes inflamatorios tras la ingesta de alimentos, independientemente del tipo de grasa consumida. No obstante, en esta misma población se ha descrito que la dieta rica en MUFA reduce la respuesta inflamatoria postprandial en células mononucleares en comparación con la dieta rica en SFA (353), lo que sugiere que aunque a nivel de tejido adiposo la dieta no ejerce ningún efecto en el estatus inflamatorio, a nivel sistémico, representado por el grado de activación de las células mononucleares (354), el efecto anti-inflamatorio de las dietas ricas en MUFA sí que es observable.

La importancia de nuestros resultados en el contexto clínico radica en el hecho de que el estado postprandial es el estado metabólico en el que el ser humano se encuentra la mayor parte del día, y por lo tanto la inducción de la respuesta inflamatoria en este estado indica un estado inflamatorio continuo del tejido adiposo a lo largo del

día y un aumento en el riesgo cardiometabólico de los pacientes con SMet **(84-86)**. Además, la activación de la respuesta inflamatoria observada es importante desde el punto de vista fisiopatológico, debido a que la liberación postprandial de MCP-1 en el tejido adiposo puede facilitar el reclutamiento de macrófagos y la activación de la respuesta inflamatoria **(107)**, lo cual a su vez aumenta la resistencia a la insulina **(355)** y por tanto, el estado postprandial podría considerarse un factor de riesgo frente a las ECV.

En nuestro estudio, además observamos una relación entre la expresión postprandial de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B y el índice HOMA, lo que apoya la relación previamente descrita entre inflamación y resistencia a insulina **(86, 356, 357)**. La activación de la respuesta inflamatoria inhibe la acción de la insulina a través de la acción de JNK1 que en el citoplasma actúa como inhibidor de la señalización de la insulina a través de la fosforilación del receptor de insulina IRS-1 y en casos de estrés prolongado puede degradarlo. En el núcleo, JNK fosforila el factor de transcripción de PPAR γ , el mayor regulador de la homeostasis de glucosa y lípidos en el adipocito y el mayor modulador de sensibilidad a la insulina. Esta fosforilación puede inhibir la actividad de PPAR γ y afectar negativamente a la sensibilidad a la insulina en la célula **(88)**. Por otra parte, observamos que los pacientes que presentan una mayor expresión del inhibidor IKB β 2 de NF- κ B, lo que puede asociarse a un menor estado de inflamación, tienen menores niveles postprandiales de insulina, y los pacientes que más expresan IL1B, una citoquina inflamatoria, presentan mayores niveles de glucosa durante el postprandio. Estos resultados ponen de manifiesto la relación entre inflamación y resistencia a insulina previamente descrita, pacientes con resistencia a la insulina tienen un estado inflamatorio sistémico de bajo grado **(358)**, así como la relación entre la hiperglucemia con la inflamación en respuesta a la activación de NF- κ B **(359)**.

En nuestro estudio observamos una relación positiva entre la expresión postprandial de genes inflamatorios y los valores de lipemia postprandial. Así, observamos una correlación positiva entre la expresión postprandial de p65 y la concentración postprandial de TG y Apo B en plasma, lo que sugiere que ambos procesos parecen estar relacionados. En este sentido, se ha descrito la relación entre el incremento de TG en el postprandio con el aumento en la expresión de marcadores de activación de leucocitos, así como con la inducción de genes pro-inflamatorios en

células endoteliales (178). El SMet se considera una enfermedad postprandial, los pacientes presentan un exagerado incremento de TG (143) y otras anormalidades en el metabolismo de lipoproteínas en el postprandio (132, 181), hecho que puede estar relacionado con la respuesta inflamatoria observada en nuestro estudio. Por otra parte, también observamos una relación inversa entre la expresión postprandial de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B y la concentración en plasma de HDL-c. Se ha demostrado que HDL-c inhibe la adhesión y quimiotaxis de monocitos, así como reduce el contenido vascular de macrófagos en condiciones inflamatorias (360). La correlación negativa entre HDL-c y NF- κ B observada en este estudio apoya la idea de que el incremento de la respuesta inflamatoria en tejido adiposo se produce cuando el efecto protector de HDL-c disminuye, hecho que ha sido demostrado *in vitro* al observar que HDL-c tiene un efecto mediador en la supresión de la actividad de NF- κ B en células endoteliales (361).

Nuestros resultados sugieren que en estado postprandial hay una exacerbada respuesta inflamatoria en tejido adiposo de pacientes con SMet, que parece ser independiente de la calidad de la grasa de la dieta.

VIII CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRINCIPAL

Nuestros resultados sugieren que el consumo de una dieta rica en grasa saturada y el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono disminuyen la expresión génica de adiponectina, así como que el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono disminuyen la expresión de RBP4 a largo plazo en ayunas. Además, el consumo de una dieta rica en grasa monoinsaturada disminuye la expresión de adiponectina en estado postprandial en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes con SMet. Así pues, la cantidad y tipo de grasa de la dieta modula tanto a largo plazo en ayunas como durante el estado postprandial la función endocrina del tejido adiposo de pacientes con SMet, proceso que parece ocurrir a través de la interacción con mecanismos de regulación comunes que controlan la expresión de adipoquinas y de genes involucrados en el almacenamiento de lípidos.

CONCLUSIONES SECUNDARIAS

1. La cantidad y tipo de grasa de la dieta modula tanto a largo plazo en ayunas como durante el estado postprandial el metabolismo lipídico en el tejido adiposo de pacientes con SMet. Nuestros resultados sugieren que el consumo de grasa saturada contribuye al desarrollo de SMet mediante el aumento del proceso de la lipólisis. Además, nuestro estudio demostró que el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono induce el proceso de lipogénesis en tejido adiposo y que la suplementación de esta dieta con ácidos grasos omega 3 inhibe esa inducción.
2. La cantidad y tipo de grasa de la dieta no ejerce ningún efecto a largo plazo en ayunas sobre el estrés de retículo endoplásmico en el tejido adiposo de pacientes con SMet. Además, nuestro estudio mostró que el estrés de retículo endoplásmico parece aumentar en el estado postprandial, independientemente del tipo de grasa ingerida.
3. La cantidad y tipo de grasa de la dieta no ejerce ningún efecto a largo plazo en ayunas sobre la inflamación del tejido adiposo de pacientes con SMet. Sin

embargo, en estado postprandial hay una exacerbada respuesta inflamatoria en tejido adiposo de estos pacientes, que parece ser independiente de la dieta.

4. Nuestros resultados mostraron que el aumento del estrés del retículo endoplásmico y la inducción de una respuesta inflamatoria en el estado postprandial en tejido adiposo de pacientes con SMet son procesos relacionados.
5. Existe una relación entre la expresión génica de las rutas estudiadas en tejido adiposo subcutáneo de pacientes con SMet y los indicadores de riesgo cardiometabólico:
 - a) La función endocrina en tejido adiposo de pacientes con SMet está asociada con los valores de lipemia postprandial, de manera que los pacientes con mayor expresión postprandial de adiponectina tienen mayores niveles postprandiales de HDL-c. Por otra parte, los pacientes que más expresan el gen de la leptina presentan mayores niveles postprandiales de TG.
 - b) Una respuesta adecuada al estrés de retículo endoplásmico en tejido adiposo de pacientes con SMet en estado postprandial parece estar asociada a mejores niveles de glucemia y lipemia postprandial, de manera que los pacientes que expresan más los genes de respuesta al estrés de retículo endoplásmico mostraron menores niveles de glucosa y TG postprandiales.
 - c) La inflamación en tejido adiposo de pacientes con SMet en estado postprandial está asociada con la resistencia a la insulina. Además, en nuestro estudio observamos una relación positiva entre la expresión postprandial de genes inflamatorios y los valores de lipemia postprandial, por lo que nuestro estudio sugiere que las anomalías en el metabolismo de lipoproteínas en el postprandio, están relacionadas con la respuesta inflamatoria.
 - d) La obesidad, en términos de índice de masa corporal, determina el grado de expresión de varios genes (adiponectina, leptina, ATGL) en tejido adiposo de

pacientes con SMet. Los pacientes con mayor índice de masa corporal tienen menor expresión de adiponectina y mayor expresión de leptina y ATGL.

VIII CONCLUSIONS

MAIN CONCLUSION

Our results suggest that the long term consumption of saturated fat decrease adiponectin gene expression and the long term consumption of low fat high carbohydrates diets decrease the expression of adiponectin and RBP4 in fasting state. Furthermore, the consumption of monounsaturated fat decreases the postprandial adiponectin gene expression in the subcutaneous adipose tissue of patients with MetS. Therefore, the quantity and quality of dietary fat modulates, in the fasting and at the postprandial state, the endocrine function of the adipose tissue of patients with metabolic syndrome, through interaction with common regulatory mechanisms that control the expression of adipokines and genes involved in lipid storage.

SECONDARY CONCLUSIONS

1. The quantity and quality of dietary fat modulates in the fasting and at the postprandial state, the lipid metabolism in adipose tissue of patients with metabolic syndrome. Our results suggest that consumption of saturated fat contributes to the development of metabolic syndrome by increasing lipolysis process. Additionally, our study showed that the consumption of diets rich in carbohydrates induces the process of lipogenesis in adipose tissue and the supplementation of this diet with omega 3 fatty acids avoids this induction.
2. The quantity and quality of dietary fat has no effect on the endoplasmic reticulum stress in adipose tissue of patients with metabolic syndrome. Furthermore, our study showed that the endoplasmic reticulum stress seems to increase in the postprandial state, regardless of quality of fat ingested.
3. The quantity and quality of dietary fat has no effect on the adipose tissue inflammation in patients with MetS. However, in postprandial state, it take place

an exaggerated inflammatory response in adipose tissue of metabolic syndrome patients, which appears to be independent of the diet.

4. Our results showed that the increase of both endoplasmic reticulum stress and inflammatory response in the postprandial state in adipose tissue of patients with metabolic syndrome are related processes.
5. We found a relationship between the gene expression of the pathways studied in subcutaneous adipose tissue of patients with metabolic syndrome and cardiometabolic risk indicators.
 - a) The endocrine function of adipose tissue in patients with metabolic syndrome is associated with postprandial lipemia values, thereby the patients with higher expression of adiponectin have higher postprandial levels of HDL-c. Moreover, the patients with higher leptin gene expression have higher postprandial levels of triglycerides.
 - b) In the postprandial state, an appropriate response to endoplasmic reticulum stress in adipose tissue of patients with metabolic syndrome seems to be associated with reduction in the postprandial glycemia and lipemia, and so patients with higher UPR gene expression in response to endoplasmic reticulum stress have lower glucose and triglyceride levels.
 - c) Postprandial adipose tissue inflammation in metabolic syndrome patients is associated with the insulin resistance. Furthermore, we observed a positive relationship between the postprandial expression of inflammatory genes and postprandial lipemia, so that our study suggests that abnormalities in the metabolism of postprandial lipoproteins are related to the inflammatory response.
 - d) Obesity, in terms of body mass index, determines the expression of several genes (adiponectin, leptin, ATGL) in adipose tissue of patients with metabolic syndrome. Patients with higher body mass index have lower expression of adiponectin and higher expression of leptin and ATGL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Gnacinska M, Malgorzewicz S, Guzek M, Lysiak-Szydłowska W, Sworczak K** 2010 Adipose tissue activity in relation to overweight or obesity. *Endokrynologia Polska* 61:160-168
2. **Zick Y** 2003 Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S56-60
3. **Cinti S** 2005 The adipose organ. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 73:9-15
4. **Valverde AM, Benito M** 2005 The brown adipose cell: a unique model for understanding the molecular mechanism of insulin resistance. *Mini reviews in medicinal chemistry* 5:269-278
5. **Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR** 2009 Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* 360:1509-1517
6. **Hauer H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF** 1989 Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *The Journal of clinical investigation* 84:1663-1670
7. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.** 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112:1796-1808
8. **Hirsch J, Fried SK, Edens NK, Leibel RL** 1989 The fat cell. *The Medical clinics of North America* 73:83-96
9. **de Ferranti S, Mozaffarian D** 2008 The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical chemistry* 54:945-955
10. **Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P** 2008 Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-787
11. **Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, Imielinska C, Ross R, Heymsfield SB** 2003 Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obesity research* 11:5-16
12. **Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ** 2001 The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2:239-254
13. **Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH** 2000 Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E941-948
14. **Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE** 2006 Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444:875-880
15. **Trayhurn P** 2005 Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta physiologica Scandinavica* 184:285-293
16. **Cannon JG** 2000 Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News Physiol Sci* 15:298-303
17. **Rasouli N, Kern PA** 2008 Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93:S64-73
18. **Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I** 2004 Adiponectin and metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24:29-33
19. **Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA** 2002 Plasma adiponectin

- concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 51:1884-1888
20. **Tilg H, Moschen AR** 2006 Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6:772-783
 21. **Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N, Kobayashi H, Hiraoka H, Matsuzawa Y** 2003 Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 107:671-674
 22. **Boden G, Shulman GI** 2002 Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *European journal of clinical investigation* 32 Suppl 3:14-23
 23. **Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T, Matsuzawa Y** 2003 Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 42:231-234
 24. **Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ** 2004 Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochemical and biophysical research communications* 315:264-271
 25. **Santos MJ, Fonseca JE** 2009 Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis - the role of adipokines in health and in systemic inflammatory rheumatic diseases. *Acta reumatologica portuguesa* 34:590-598
 26. **Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ** 2005 Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 334:1092-1101
 27. **Palanivel R, Maida A, Liu Y, Sweeney G** 2006 Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia* 49:183-190
 28. **Dhillon H, Kalra SP, Kalra PS** 2001 Dose-dependent effects of central leptin gene therapy on genes that regulate body weight and appetite in the hypothalamus. *Mol Ther* 4:139-145
 29. **Balistreri CR, Caruso C, Candore G** The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of inflammation* 2010:802078
 30. **Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, L'Allemand D, Spinass GA, Zimmermann MB** 2007 Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:4359-4365
 31. **Balagopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D** 2007 Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:1971-1974
 32. **Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB** 2005 Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362
 33. **Lee JW, Im JA, Lee HR, Shim JY, Youn BS, Lee DC** 2007 Visceral adiposity is associated with serum retinol binding protein-4 levels in healthy women. *Obesity (Silver Spring, Md)* 15:2225-2232

34. **Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB** 2006 Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *The New England journal of medicine* 354:2552-2563
35. **Skurk T, Hauner H** 2004 Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:1357-1364
36. **Samad F, Uysal KT, Wiesbrock SM, Pandey M, Hotamisligil GS, Loskutoff DJ** 1999 Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6902-6907
37. **Lopez-Segura F, Velasco F, Lopez-Miranda J, Castro P, Lopez-Pedrerera R, Blanco A, Jimenez-Pereperez J, Torres A, Trujillo J, Ordovas JM, Perez-Jimenez F** 1996 Monounsaturated fatty acid-enriched diet decreases plasma plasminogen activator inhibitor type 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16:82-88
38. **Mavri A, Alessi MC, Bastelica D, Geel-Georgelin O, Fina F, Sentocnik JT, Stegnar M, Juhan-Vague I** 2001 Subcutaneous abdominal, but not femoral fat expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is related to plasma PAI-1 levels and insulin resistance and decreases after weight loss. *Diabetologia* 44:2025-2031
39. **Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS** 2007 Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual review of nutrition* 27:79-101
40. **Marcelin G, Chua S, Jr.** 2010 Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. *Current opinion in pharmacology* 10:588-593
41. **Mead JR, Irvine SA, Ramji DP** 2002 Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 80:753-769
42. **De Pergola G** 2000 The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S59-63
43. **Fried SK, Russell CD, Grauso NL, Brolin RE** 1993 Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *The Journal of clinical investigation* 92:2191-2198
44. **Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG** 1990 The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *The Journal of biological chemistry* 265:4570-4577
45. **Hellerstein MK** 1999 De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *European journal of clinical nutrition* 53 Suppl 1:S53-65
46. **Lelliott C, Vidal-Puig AJ** 2004 Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4:S22-28
47. **Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL** 1999 Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13656-13661
48. **Weber LW, Boll M, Stampfl A** 2004 Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* 10:3081-3087
49. **Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, Kloting N, Fasshauer M, Schon MR, Korner A, Stumvoll M, Bluher M** 2007 Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50:1472-1480
50. **Miyazaki M, Ntambi JM** 2003 Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 68:113-121
51. **Dobrzyn A, Dobrzyn P** 2006 Stearoyl-CoA desaturase--a new player in skeletal muscle metabolism regulation. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 10:31-42

52. **Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, Miyazaki M, Ntambi JM, Hoffman EP, Thyfault JP, Stevens R, Dohm GL, Houmard JA, Muoio DM** 2005 Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell metabolism* 2:251-261
53. **Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzioriski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD** 2002 Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11482-11486
54. **Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P** 1990 In situ studies of catecholamine-induced lipolysis in human adipose tissue using microdialysis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 254:284-288
55. **Lafontan M, Berlan M** 1995 Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocrine reviews* 16:716-738
56. **Londos C, Gruia-Gray J, Brasaemle DL, Rondinone CM, Takeda T, Dwyer NK, Barber T, Kimmel AR, Blanchette-Mackie EJ** 1996 Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20 Suppl 3:S97-101
57. **Kather H, Wieland E, Scheurer A, Vogel G, Wildenberg U, Joost C** 1987 Influences of variation in total energy intake and dietary composition on regulation of fat cell lipolysis in ideal-weight subjects. *The Journal of clinical investigation* 80:566-572
58. **Kim JY, Tillison K, Lee JH, Rearick DA, Smas CM** 2006 The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E115-127
59. **Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS** 2004 Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *The Journal of biological chemistry* 279:47066-47075
60. **Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, Peroni O, Katic M, Flier JS** 2006 Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 55:148-157
61. **Magre J, Laurell H, Fizames C, Antoine PJ, Dib C, Vigouroux C, Bourut C, Capeau J, Weissenbach J, Langin D** 1998 Human hormone-sensitive lipase: genetic mapping, identification of a new dinucleotide repeat, and association with obesity and NIDDM. *Diabetes* 47:284-286
62. **Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van Harmelen V, Gross RW, Holm C, Arner P** 2005 Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54:3190-3197
63. **Hoffstedt J, Arner P, Schalling M, Pedersen NL, Sengul S, Ahlberg S, Iliadou A, Lavebratt C** 2001 A common hormone-sensitive lipase i6 gene polymorphism is associated with decreased human adipocyte lipolytic function. *Diabetes* 50:2410-2413
64. **Lofgren P, Sjolín E, Wahlen K, Hoffstedt J** 2007 Human adipose tissue cannabinoid receptor 1 gene expression is not related to fat cell function or adiponectin level. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:1555-1559
65. **Cable JC, Tan GD, Alexander SP, O'Sullivan SE** 2011 The activity of the endocannabinoid metabolising enzyme fatty acid amide hydrolase in subcutaneous adipocytes correlates with BMI in metabolically healthy humans. *Lipids in health and disease* 10:129

66. **Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thorne A, Ryden M, Hamsten A, Arner P** 2001 Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia* 44:1268-1273
67. **Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS** 2006 Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clinical chemistry* 52:405-413
68. **Hertzel AV, Bennaars-Eiden A, Bernlohr DA** 2002 Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *Journal of lipid research* 43:2105-2111
69. **Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS** 2002 Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22:1686-1691
70. **Cabre A, Lazaro I, Cofan M, Jarauta E, Plana N, Garcia-Otin AL, Ascaso JF, Ferre R, Civeira F, Ros E, Masana L** 2010 FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *Journal of lipid research* 51:1173-1178
71. **Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L** 2007 Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 195:e150-158
72. **Stejskal D, Karpisek M** 2006 Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *European journal of clinical investigation* 36:621-625
73. **Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, Yeung DC, Janus ED, Sham PC, Lam KS** 2007 Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 115:1537-1543
74. **Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y** 2008 Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and cell biology* 130:263-279
75. **Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, Londos C** 2003 Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *The Journal of cell biology* 161:1093-1103
76. **Lieber JG, Evans RM** 1996 Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation. *Journal of cell science* 109 (Pt 13):3047-3058
77. **Guilherme A, Emoto M, Buxton JM, Bose S, Sabini R, Theurkauf WE, Leszyk J, Czech MP** 2000 Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 275:38151-38159
78. **Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR** 2002 Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Developmental cell* 3:25-38
79. **Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP** 2004 Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological reviews* 84:1341-1379
80. **Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, Brasaemle DL, Scherer PE, Lisanti MP** 2004 Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53:1261-1270
81. **Slawik M, Vidal-Puig AJ** 2007 Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes & nutrition* 2:41-45
82. **Bahceci M, Gokalp D, Bahceci S, Tuzcu A, Atmaca S, Arikan S** 2007 The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and

- high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *Journal of endocrinological investigation* 30:210-214
83. **Avram MM, Avram AS, James WD** 2007 Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *Journal of the American Academy of Dermatology* 56:472-492
84. **Hotamisligil GS** 2006 Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867
85. **Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U** 2007 Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:2276-2283
86. **Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB** 2006 Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116:1793-1801
87. **Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I** 2004 Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 114:1752-1761
88. **Gregor MG, Hotamisligil GS** 2007 Adipocyte stress: The endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of lipid research* 48:1905-1914
89. **Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS** 2004 Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (New York, NY)* 306:457-461
90. **Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H** 2007 Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:1023-1033
91. **Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM** 1996 IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science (New York, NY)* 271:665-668
92. **Zhang K, Kaufman RJ** 2008 From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454:455-462
93. **Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D** 2002 Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology* 18:575-599
94. **Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS** 2006 Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science (New York, NY)* 313:1137-1140
95. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM** 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, NY)* 259:87-91
96. **Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS** 2002 A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336
97. **Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE** 2001 Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ B β . *Science (New York, NY)* 293:1673-1677
98. **Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T** 2005 NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic acids research* 33:5308-5319
99. **Barma P, Bhattacharya S, Bhattacharya A, Kundu R, Dasgupta S, Biswas A, Bhattacharya S, Roy SS, Bhattacharya S** 2009 Lipid induced overexpression of NF- κ B in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1792:190-200

100. **de Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH** 2005 Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:904-914
101. **Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P** 2004 Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 110:1564-1571
102. **Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V** 2000 Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148:209-214
103. **Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK** 2004 Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53:1060-1067
104. **Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S** 2007 Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56:1010-1013
105. **Maachi M, Pieroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, Capeau J, Bastard JP** 2004 Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFalpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:993-997
106. **Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM** 2005 Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *International journal of obesity (2005)* 29:146-150
107. **Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B** 2005 Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:2282-2289
108. **Simeoni E, Hoffmann MM, Winkelmann BR, Ruiz J, Fleury S, Boehm BO, Marz W, Vassalli G** 2004 Association between the A-2518G polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47:1574-1580
109. **Shen J, Arnett DK, Peacock JM, Parnell LD, Kraja A, Hixson JE, Tsai MY, Lai CQ, Kabagambe EK, Straka RJ, Ordovas JM** 2007 Interleukin1beta genetic polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of the metabolic syndrome. *The Journal of nutrition* 137:1846-1851
110. **Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF** 2003 Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812-817
111. **Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamaki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K, Vanninen E, Laakso M** 2004 Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation* 110:3842-3848
112. **Juge-Aubry CE, Somm E, Chicheportiche R, Burger D, Pernin A, Cuenod-Pittet B, Quinodoz P, Giusti V, Dayer JM, Meier CA** 2004 Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:2652-2658
113. **Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF** 2007 Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148:241-251
114. **Lebovitz HE** 2001 Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2:S135-148

115. **Subramanian S, Han CY, Chiba T, McMillen TS, Wang SA, Haw A, 3rd, Kirk EA, O'Brien KD, Chait A** 2008 Dietary cholesterol worsens adipose tissue macrophage accumulation and atherosclerosis in obese LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28:685-691
116. **Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE** 2005 Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature medicine* 11:183-190
117. **Grundey SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C** 2004 Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24:e13-18
118. **Grundey SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Jr., Spertus JA, Costa F** 2005 Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112:2735-2752
119. **Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT** 2002 The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama* 288:2709-2716
120. **Palomo I, Alarcon M, Moore-Carrasco R, Argiles JM** 2006 Hemostasis alterations in metabolic syndrome (review). *Int J Mol Med* 18:969-974
121. **Reynolds K, He J** 2005 Epidemiology of the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 330:273-279
122. **Revenge-Frauca J, Gonzalez-Gil EM, Bueno-Lozano G, De Miguel-Etayo P, Velasco-Martinez P, Rey-Lopez JP, Bueno-Lozano O, Moreno LA** 2009 Abdominal fat and metabolic risk in obese children and adolescents. *Journal of physiology and biochemistry* 65:415-420
123. **Virtue S, Vidal-Puig A** 2010 Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochimica et biophysica acta* 1801:338-349
124. **McGarry JD** 2002 Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:7-18
125. **Schaffer JE** 2003 Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current opinion in lipidology* 14:281-287
126. **Campbell PJ, Carlson MG, Nurjhan N** 1994 Fat metabolism in human obesity. *The American journal of physiology* 266:E600-605
127. **Yu YH, Ginsberg HN** 2005 Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circulation research* 96:1042-1052
128. **Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P** 2002 Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51:1437-1442
129. **Grundey SM** 1995 Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *The American journal of cardiology* 75:45B-52B
130. **Musunuru K** 2010 Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids* 45:907-914
131. **Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Moreno JA, Gomez P, Perez-Jimenez F** 2006 Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 17:132-138

132. **Ruotolo G, Howard BV** 2002 Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Current cardiology reports* 4:494-500
133. **Grundey SM** 2006 Atherogenic dyslipidemia associated with metabolic syndrome and insulin resistance. *Clinical cornerstone* 8 Suppl 1:S21-27
134. **Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB, Levy D** 2002 Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *Jama* 287:1003-1010
135. **Davignon J, Ganz P** 2004 Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109:III27-32
136. **Roberts CK, Vaziri ND, Barnard RJ** 2002 Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation* 106:2530-2532
137. **Meyer G, Merval R, Tedgui A** 1996 Effects of pressure-induced stretch and convection on low-density lipoprotein and albumin uptake in the rabbit aortic wall. *Circulation research* 79:532-540
138. **Nissen SE, Tuzcu EM, Libby P, Thompson PD, Ghali M, Garza D, Berman L, Shi H, Buebendorf E, Topol EJ** 2004 Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomized controlled trial. *Jama* 292:2217-2225
139. **Haffner SM, Mykkanen L, Festa A, Burke JP, Stern MP** 2000 Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state. *Circulation* 101:975-980
140. **Garattini L, Chiaffarino F, Cornago D, Coscelli C, Parazzini F** 2004 Direct medical costs unequivocally related to diabetes in Italian specialized centers. *Eur J Health Econ* 5:15-21
141. **Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R** 2002 Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 105:816-822
142. **van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C, Sijmonsma TP, Plokker HW, De Jaegere PP, Cabezas MC** 2004 Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 177:175-182
143. **Khoury DE, Hwalla N, Frochot V, Lacorte JM, Chabert M, Kalopissis AD** 2009 Postprandial metabolic and hormonal responses of obese dyslipidemic subjects with metabolic syndrome to test meals, rich in carbohydrate, fat or protein. *Atherosclerosis* 210:307-313
144. **Manning PJ, Sutherland WH, McGrath MM, de Jong SA, Walker RJ, Williams MJ** 2008 Postprandial cytokine concentrations and meal composition in obese and lean women. *Obesity (Silver Spring, Md)* 16:2046-2052
145. **Das UN** 2004 Metabolic syndrome X: an inflammatory condition? *Current hypertension reports* 6:66-73
146. **Sahli D, Eriksson JW, Boman K, Svensson MK** 2009 Tissue plasminogen activator (tPA) activity is a novel and early marker of asymptomatic LEAD in type 2 diabetes. *Thrombosis research* 123:701-706
147. **Al-Hamodi Z, Ismail IS, Saif-Ali R, Ahmed KA, Muniandy S** 2012 Association of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator with type 2 diabetes and metabolic syndrome in Malaysian subjects. In: *Cardiovascular diabetology*; 23

148. **Mertens I, Van Gaal LF** 2005 Visceral fat as a determinant of fibrinolysis and hemostasis. *Seminars in vascular medicine* 5:48-55
149. **Reaven GM, Scott EM, Grant PJ, Lowe GD, Rumley A, Wannamethee SG, Stratmann B, Tschoepe D, Blann A, Juhan-Vague I, Alessi MC, Bailey C** 2005 Hemostatic abnormalities associated with obesity and the metabolic syndrome. *J Thromb Haemost* 3:1074-1085
150. **Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM** 2006 Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol* 21:185-193
151. **Beck-Nielsen H, Groop LC** 1994 Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 94:1714-1721
152. **Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissen M, Ehrnstrom BO, Forsen B, Isomaa B, Snickars B, Taskinen MR** 1996 Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes* 45:1585-1593
153. **Bouchard C, Rice T, Lemieux S, Despres JP, Perusse L, Rao DC** 1996 Major gene for abdominal visceral fat area in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20:420-427
154. **Stephens JW, Humphries SE** 2003 The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *Journal of internal medicine* 253:120-127
155. **Vessby B** 2000 Dietary fat and insulin action in humans. *The British journal of nutrition* 83 Suppl 1:S91-96
156. **Connor WE** 2000 Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American journal of clinical nutrition* 71:171S-175S
157. **McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PW, Jacques PF** 2004 Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes care* 27:538-546
158. **Pereira MA, Jacobs DR, Jr., Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS** 2002 Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study. *Jama* 287:2081-2089
159. **Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Fuentes F, Delgado J, Perez-Jimenez F** 2007 Dietary fat, genes and insulin sensitivity. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 85:213-226
160. **Vessby B** 2003 Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology* 14:15-19
161. **Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D** 2004 Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *Jama* 292:1440-1446
162. **Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Pinillos MD, Gomez P, Paz-Rojas E, Montilla P, Marin C, Velasco MJ, Blanco-Molina A, Jimenez Pereperez JA, Ordovas JM** 2001 A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons. *Diabetologia* 44:2038-2043
163. **Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ** 2005 The metabolic syndrome. *Lancet* 365:1415-1428
164. **Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ** 2004 The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33:351-375, table of contents
165. **Ford ES, Giles WH, Dietz WH** 2002 Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 287:356-359

166. **Alegria E, Cordero A, Laclaustra M, Grima A, Leon M, Casasnovas JA, Luengo E, del Rio A, Ferreira I** 2005 [Prevalence of metabolic syndrome in the Spanish working population: MESYAS registry]. *Rev Esp Cardiol* 58:797-806
167. **Scholze J, Alegria E, Ferri C, Langham S, Stevens W, Jeffries D, Uhl-Hochgraeber K** 2010 Epidemiological and economic burden of metabolic syndrome and its consequences in patients with hypertension in Germany, Spain and Italy; a prevalence-based model. *BMC public health* 10:529
168. 2002 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* 106:3143-3421
169. **Organization. WH** 1999 Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Geneva: World health Organization. In:
170. **Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr.** 2009 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* 120:1640-1645
171. **Alberti KG, Zimmet P, Shaw J** 2006 Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23:469-480
172. **Mujica V, Urzua A, Leiva E, Diaz N, Moore-Carrasco R, Vasquez M, Rojas E, Icaza G, Toro C, Orrego R, Palomo I** 2010 Intervention with education and exercise reverses the metabolic syndrome in adults. *J Am Soc Hypertens* 4:148-153
173. **Tortosa A, Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A, Basterra-Gortari FJ, Nunez-Cordoba JM, Martinez-Gonzalez MA** 2007 Mediterranean diet inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: the SUN prospective cohort. *Diabetes care* 30:2957-2959
174. **Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ordovas JM** 2008 Influence of genetic factors in the modulation of postprandial lipemia. *Atheroscler Suppl* 9:49-55
175. **Cohn JS** 2006 Postprandial lipemia and remnant lipoproteins. *Clinics in laboratory medicine* 26:773-786
176. **Cohn JS** 2008 Are we ready for a prospective study to investigate the role of chylomicrons in cardiovascular disease? *Atheroscler Suppl* 9:15-18
177. **Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D** 2007 Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *The British journal of nutrition* 98:458-473
178. **Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Castro Cabezas M** 2008 Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atheroscler Suppl* 9:39-44
179. **Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM** 2005 Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 24:16-31
180. **Glazer NL, Smith NL, Heckbert SR, Doggen CJ, Lemaitre RN, Psaty BM** 2005 Risk of myocardial infarction attributable to elevated levels of total cholesterol among hypertensives. *American journal of hypertension* 18:759-766
181. **Tushuizen ME, Pouwels PJ, Bontemps S, Rustemeijer C, Matikainen N, Heine RJ, Taskinen MR, Diamant M** 2010 Postprandial lipid and apolipoprotein responses following three consecutive meals associate with liver fat content in type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 211:308-314

182. **Subramanian S, Chait A** 2009 The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 20:39-44
183. **Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Pavlidis AN, Salpea KD, Iraklianiou SA, Tsarpalis K, Damaskos DS, Manolis A, Cokkinos DV** 2005 Postprandial lipemia in men with metabolic syndrome, hypertensives and healthy subjects. *Lipids in health and disease* 4:21
184. **Lairon D** 2008 Macronutrient intake and modulation on chylomicron production and clearance. *Atheroscler Suppl* 9:45-48
185. **Lairon D, Lopez-Miranda J, Williams C** 2007 Methodology for studying postprandial lipid metabolism. *European journal of clinical nutrition* 61:1145-1161
186. **Redgrave TG** 2008 Chylomicrons in disease-future challenges Invited keynote address. *Atheroscler Suppl* 9:3-6
187. **Perez-Martinez P, Ordovas JM, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Delgado-Casado N, Cruz-Teno C, Camargo A, Yubero-Serrano EM, Rodriguez F, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J** 2009 Consumption of diets with different type of fat influences triacylglycerols-rich lipoproteins particle number and size during the postprandial state. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*
188. **Moreno JJ, Mitjavila MT** 2003 The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *The Journal of nutritional biochemistry* 14:182-195
189. **Jimenez-Gomez Y, Marin C, Peerez-Martinez P, Hartwich J, Malczewska-Malec M, Golabek I, Kiec-Wilk B, Cruz-Teno C, Rodriguez F, Gomez P, Gomez-Luna MJ, Defoort C, Gibney MJ, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J** 2010 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. *The Journal of nutrition* 140:1595-1601
190. **Silva KD, Kelly CN, Jones AE, Smith RD, Wootton SA, Miller GJ, Williams CM** 2003 Chylomicron particle size and number, factor VII activation and dietary monounsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 166:73-84
191. **Marín CLM, J; Delgado-Lista, J; Gómez, P; Moreno, J; Fuentes, F; Bellido, C; Pérez-Jiménez, F** 2005 Efecto de la alimentación mediterránea en la respuesta lipémica posprandial. *Clin Invest Arterioscl* 17
192. **Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA** 2004 Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 23:447-456
193. **Layne KS, Goh YK, Jumpsen JA, Ryan EA, Chow P, Clandinin MT** 1996 Normal subjects consuming physiological levels of 18:3(n-3) and 20:5(n-3) from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. *The Journal of nutrition* 126:2130-2140
194. **Visioli F, Rise P, Plasmati E, Pazzucconi F, Sirtori CR, Galli C** 2000 Very low intakes of N-3 fatty acids incorporated into bovine milk reduce plasma triacylglycerol and increase HDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Pharmacol Res* 41:571-576
195. **Hassanali Z, Ametaj B, Field CJ, Proctor SD, Vine DF** 2009 Dietary supplementation of n-3 PUFA reduces weight gain and improves postprandial lipaemia and the associated inflammatory response in the obese JCR:LA-cp rat. *Diabetes, obesity & metabolism*
196. **Tulk HM, Robinson LE** 2009 Modifying the n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio of a high-saturated fat challenge does not acutely attenuate postprandial changes in inflammatory markers in men with metabolic syndrome. *Metabolism: clinical and experimental* 58:1709-1716

197. **Harbis A, Perdreau S, Vincent-Baudry S, Charbonnier M, Bernard MC, Raccah D, Senft M, Lorec AM, Defoort C, Portugal H, Vinoy S, Lang V, Lairon D** 2004 Glycemic and insulinemic meal responses modulate postprandial hepatic and intestinal lipoprotein accumulation in obese, insulin-resistant subjects. *The American journal of clinical nutrition* 80:896-902
198. **Cara L, Dubois C, Borel P, Armand M, Senft M, Portugal H, Pauli AM, Bernard PM, Lairon D** 1992 Effects of oat bran, rice bran, wheat fiber, and wheat germ on postprandial lipemia in healthy adults. *The American journal of clinical nutrition* 55:81-88
199. **Chen YD, Coulston AM, Zhou MY, Hollenbeck CB, Reaven GM** 1995 Why do low-fat high-carbohydrate diets accentuate postprandial lipemia in patients with NIDDM? *Diabetes care* 18:10-16
200. **Aarsland A, Chinkes D, Wolfe RR** 1997 Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *The American journal of clinical nutrition* 65:1774-1782
201. **McNeel RL, Mersmann HJ** 2005 Low- and high-carbohydrate diets: body composition differences in rats. *Obesity research* 13:1651-1660
202. **Roche HM, Gibney MJ** 1996 Postprandial triacylglycerolaemia: the effect of low-fat dietary treatment with and without fish oil supplementation. *European journal of clinical nutrition* 50:617-624
203. **Roche HM, Zampelas A, Knapper JM, Webb D, Brooks C, Jackson KG, Wright JW, Gould BJ, Kafatos A, Gibney MJ, Williams CM** 1998 Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism. *The American journal of clinical nutrition* 68:552-560
204. **van Oostrom AJ, Alipour A, Plokker TW, Sniderman AD, Cabezas MC** 2007 The metabolic syndrome in relation to complement component 3 and postprandial lipemia in patients from an outpatient lipid clinic and healthy volunteers. *Atherosclerosis* 190:167-173
205. **Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sanchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, Escribano A, Moyano MJ, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F** 2007 A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *Journal of the American College of Nutrition* 26:434-444
206. **Das UN** 2001 Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 17:953-966
207. **Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A** 2004 Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in immunology* 25:4-7
208. **Ajani UA, Ford ES, Mokdad AH** 2004 Dietary fiber and C-reactive protein: findings from national health and nutrition examination survey data. *The Journal of nutrition* 134:1181-1185
209. **Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE, Meigs JB, Albert CM, Rifai N, Willett WC, Hu FB** 2004 Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *The Journal of nutrition* 134:1806-1811
210. **Miles EA, Zoubouli P, Calder PC** 2005 Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 21:389-394
211. **Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio L, Bellido C, Jimenez Y, Moreno JA, Delgado-Lista J, Egido J, Perez-Jimenez F** 2007 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* 194:e141-146
212. **Schulze MB, Hoffmann K, Manson JE, Willett WC, Meigs JB, Weikert C, Heidemann C, Colditz GA, Hu FB** 2005 Dietary pattern, inflammation, and incidence of type 2 diabetes in women. *The American journal of clinical nutrition* 82:675-684; quiz 714-675
213. **Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, Bonanome A, Colomer R, Corella-Piquer D, Covas I, Chamorro-Quiros J, Escrich E, Gaforio JJ, Garcia Luna PP, Hidalgo L, Kafatos A, Kris-Etherton PM, Lairon D, Lamuela-Raventos R, Lopez-Miranda J, Lopez-Segura F, Martinez-Gonzalez MA, Mata P, Mataix J, Ordovas J, Osada J, Pacheco-Reyes R, Perucho M, Pineda-Priego M, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Ruiz-Gutierrez V, Sanchez-Rovira P, Solfrizzi V, Soriguer-Escofet F, de la Torre-Fornell R, Trichopoulos A, Villalba-Montoro JM, Villar-Ortiz JR, Visioli F** 2005 International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European journal of clinical investigation* 35:421-424
214. **Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J** 2011 Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Current pharmaceutical design* 17:769-777
215. **Bellido C, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Perez-Martinez P, Muriana FJ, Martin-Ventura JL, Marin C, Gomez P, Fuentes F, Egido J, Perez-Jimenez F** 2004 Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *The American journal of clinical nutrition* 80:1487-1491
216. **Jimenez-Gomez Y, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Marin C, Perez-Martinez P, Ruano J, Paniagua JA, Rodriguez F, Egido J, Perez-Jimenez F** 2009 Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 204:e70-76
217. **Camargo A, Ruano J, Fernandez JM, Parnell LD, Jimenez A, Santos-Gonzalez M, Marin C, Perez-Martinez P, Uceda M, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F** 2010 Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC genomics* 11:253
218. **Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Willett WC, Rimm EB** 2003 Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation* 108:155-160
219. **Hao W, Wong OY, Liu X, Lee P, Chen Y, Wong KK** 2010 omega-3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes. *Journal of pediatric surgery* 45:2412-2418
220. **Galgani JE, Uauy RD, Aguirre CA, Diaz EO** 2008 Effect of the dietary fat quality on insulin sensitivity. *The British journal of nutrition* 100:471-479
221. **Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, Hu FB** 2001 Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *The American journal of clinical nutrition* 73:61-67
222. **Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K, McIntosh M** 2009 Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *The Journal of nutrition* 139:1-4
223. **Kien CL, Bunn JY, Ugrasbul F** 2005 Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *The American journal of clinical nutrition* 82:320-326
224. **Lichtenstein L, Mattijssen F, de Wit NJ, Georgiadi A, Hooiveld GJ, van der Meer R, He Y, Qi L, Koster A, Tamsma JT, Tan NS, Muller M, Kersten S** 2010 Angptl4 protects

- against severe proinflammatory effects of saturated fat by inhibiting fatty acid uptake into mesenteric lymph node macrophages. *Cell metabolism* 12:580-592
225. **Sharma AM, Staels B** 2007 Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:386-395
226. **Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, Ogawa Y** 2007 Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochemical and biophysical research communications* 354:45-49
227. **Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y** 2007 Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:84-91
228. **Xi L, Qian Z, Xu G, Zhou C, Sun S** 2007 Crocetin attenuates palmitate-induced insulin insensitivity and disordered tumor necrosis factor-alpha and adiponectin expression in rat adipocytes. *British journal of pharmacology* 151:610-617
229. **Qi L, Meigs JB, Liu S, Manson JE, Mantzoros C, Hu FB** 2006 Dietary fibers and glycemic load, obesity, and plasma adiponectin levels in women with type 2 diabetes. *Diabetes care* 29:1501-1505
230. **Trayhurn P, Wang B, Wood IS** 2008 HIF-1alpha protein rather than mRNA as a marker of hypoxia in adipose tissue in obesity: focus on "inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women," by Poulain-Godefroy et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1097; author reply R1098
231. **Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ** 2008 A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science (New York, NY)* 322:1539-1543
232. **Jaeschke A, Davis RJ** 2007 Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases. *Molecular cell* 27:498-508
233. **Magne J, Mariotti F, Fischer R, Mathe V, Tome D, Huneau JF** 2009 Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue. *The Journal of nutritional biochemistry* 21:550-555
234. **Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J** 2006 Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 49:394-397
235. **van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB, Hoelen DW, Heijligenberg R, Bromhaar MG, de Groot LC, de Vries JH, Muller M, Afman LA** 2009 A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *The American journal of clinical nutrition* 90:1656-1664
236. **Kallio P, Kolehmainen M, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Atalay M, Mykkanen H, Uusitupa M, Poutanen K, Niskanen L** 2008 Inflammation markers are modulated by responses to diets differing in postprandial insulin responses in individuals with the metabolic syndrome. *The American journal of clinical nutrition* 87:1497-1503
237. **Paniagua JA, Gallego de la Sacristana A, Romero I, Vidal-Puig A, Latre JM, Sanchez E, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F** 2007 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* 30:1717-1723
238. **Lu J, Borthwick F, Hassanali Z, Wang Y, Mangat R, Ruth M, Shi D, Jaeschke A, Russell JC, Field CJ, Proctor SD, Vine DF** 2011 Chronic dietary n-3 PUFA intervention improves

- dyslipidaemia and subsequent cardiovascular complications in the JCR:LA- cp rat model of the metabolic syndrome. *The British journal of nutrition* 105:1572-1582
239. **Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M** 2008 The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine reviews* 29:42-61
240. 2001 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* 285:2486-2497
241. **Shaw DI, Tierney AC, McCarthy S, Upritchard J, Vermunt S, Gulseth HL, Drevon CA, Blaak EE, Saris WH, Karlstrom B, Helal O, Defoort C, Gallego R, Lopez-Miranda J, Siedlecka D, Malczewska-Malec M, Roche HM, Lovegrove JA** 2009 LIPGENE food-exchange model for alteration of dietary fat quantity and quality in free-living participants from eight European countries. *The British journal of nutrition* 101:750-759
242. **Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC** 1974 Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry* 20:470-475
243. **Bucolo G, David H** 1973 Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical chemistry* 19:476-482
244. **Warnick GR, Benderson J, Albers JJ** 1982 Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clinical chemistry* 28:1379-1388
245. **Gabrielsson BG, Olofsson LE, Sjogren A, Jernas M, Elander A, Lonn M, Rudemo M, Carlsson LM** 2005 Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obesity research* 13:649-652
246. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** 2002 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3:RESEARCH0034
247. **Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF** 2005 A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 437:1032-1037
248. **Gutierrez-Mariscal FM, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Camargo A, Delgado-Casado N, Cruz-Teno C, Santos-Gonzalez M, Rodriguez-Cantalejo F, Castano JP, Villalba-Montoro JM, Fuentes F, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J** 2012 Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 induces postprandial changes in p53 in response to oxidative DNA damage in elderly subjects. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 34:389-403
249. **Ahima RS, Flier JS** 2000 Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11:327-332
250. **Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y** 2000 Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-1599
251. **Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB** 2004 Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama* 291:1730-1737
252. **Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA** 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312
253. **Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ** 2005 Resistin Is an Inflammatory Marker of Atherosclerosis in Humans. *Circulation* 111:932-939

254. **Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE** 1993 Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 87:1969-1973
255. **Linz W, Wiemer G, Scholkens BA** 1997 Beneficial effects of bradykinin on myocardial energy metabolism and infarct size. *Am J Cardiol* 80:118A-123A
256. **Maury E, Brichard SM** 2010 Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314:1-16
257. **Jia W, Wu H, Bao Y, Wang C, Lu J, Zhu J, Xiang K** 2007 Association of serum retinol-binding protein 4 and visceral adiposity in Chinese subjects with and without type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:3224-3229
258. **Bickerton AS, Roberts R, Fielding BA, Hodson L, Blaak EE, Wagenmakers AJ, Gilbert M, Karpe F, Frayn KN** 2007 Preferential uptake of dietary Fatty acids in adipose tissue and muscle in the postprandial period. *Diabetes* 56:168-176
259. **Acheson KJ, Schutz Y, Bessard T, Ravussin E, Jequier E, Flatt JP** 1984 Nutritional influences on lipogenesis and thermogenesis after a carbohydrate meal. *The American journal of physiology* 246:E62-70
260. **Koo SH, Dutcher AK, Towle HC** 2001 Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *The Journal of biological chemistry* 276:9437-9445
261. **Langin D** 2010 Adipose tissue lipolysis revisited (again!): lactate involvement in insulin antilipolytic action. *Cell metabolism* 11:242-243
262. **Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R** 2004 Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (New York, NY)* 306:1383-1386
263. **Moore HP, Silver RB, Mottillo EP, Bernlohr DA, Granneman JG** 2005 Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase. *The Journal of biological chemistry* 280:43109-43120
264. **Shen WJ, Patel S, Eriksson JE, Kraemer FB** 2010 Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis. *Journal of proteome research* 9:1786-1794
265. **Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R** 2004 Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 279:46835-46842
266. **Sjogren P, Sierra-Johnson J, Gertow K, Rosell M, Vessby B, de Faire U, Hamsten A, Hellenius ML, Fisher RM** 2008 Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance. *Diabetologia* 51:328-335
267. **Harding HP, Ron D** 2002 Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 51 Suppl 3:S455-461
268. **Rokholm B, Silventoinen K, Angquist L, Skytthe A, Kyvik KO, Sorensen TI** 2011 Increased genetic variance of BMI with a higher prevalence of obesity. *PLoS one* 6:e20816
269. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:2548-2556
270. **Ray H, Pinteur C, Frering V, Beylot M, Large V** 2009 Depot-specific differences in perilipin and hormone-sensitive lipase expression in lean and obese. *Lipids in health and disease* 8:58
271. **Frayn KN** 2002 Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45:1201-1210

272. **Davis KE, Moldes M, Farmer SR** 2004 The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* 279:42453-42461
273. **Renou JP, Bierie B, Miyoshi K, Cui Y, Djiane J, Reichenstein M, Shani M, Hennighausen L** 2003 Identification of genes differentially expressed in mouse mammary epithelium transformed by an activated beta-catenin. *Oncogene* 22:4594-4610
274. **Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE** 2003 Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46:459-469
275. **Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, Haap M, Shirkavand F, Rahe S, Staiger H, Maerker E, Haring H, Stumvoll M** 2003 Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 52:239-243
276. **Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R** 2004 The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 279:10070-10076
277. **Kita A, Yamasaki H, Kuwahara H, Moriuchi A, Fukushima K, Kobayashi M, Fukushima T, Takahashi R, Abiru N, Uotani S, Kawasaki E, Eguchi K** 2005 Identification of the promoter region required for human adiponectin gene transcription: Association with CCAAT/enhancer binding protein-beta and tumor necrosis factor-alpha. *Biochemical and biophysical research communications* 331:484-490
278. **Drevon CA** 2005 Fatty acids and expression of adipokines. *Biochimica et biophysica acta* 1740:287-292
279. **Degawa-Yamauchi M, Moss KA, Bovenkerk JE, Shankar SS, Morrison CL, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Jones R, Considine RV** 2005 Regulation of adiponectin expression in human adipocytes: effects of adiposity, glucocorticoids, and tumor necrosis factor alpha. *Obesity research* 13:662-669
280. **Kloting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, Fasshauer M, Schon MR, Stumvoll M, Bluher M, Kahn BB** 2007 Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell metabolism* 6:79-87
281. **Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS** 2007 Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447:959-965
282. **Suhre K, Romisch-Margl W, de Angelis MH, Adamski J, Luippold G, Augustin R** 2011 Identification of a potential biomarker for FABP4 inhibition: the power of lipidomics in preclinical drug testing. *Journal of biomolecular screening* 16:467-475
283. **Segarra A, Chacon P, Martinez-Eyarre C, Argelaguer X, Vila J, Ruiz P, Fort J, Bartolome J, Camps J, Moliner E, Pelegri A, Marco F, Olmos A, Piera L** 2001 Circulating levels of plasminogen activator inhibitor type-1, tissue plasminogen activator, and thrombomodulin in hemodialysis patients: biochemical correlations and role as independent predictors of coronary artery stenosis. *J Am Soc Nephrol* 12:1255-1263
284. **Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A** 1998 Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18:20-26
285. **Kaneko T, Wada H, Wakita Y, Minamikawa K, Nakase T, Mori Y, Deguchi K, Shirakawa S** 1994 Enhanced tissue factor activity and plasminogen activator inhibitor-1 antigen in

- human umbilical vein endothelial cells incubated with lipoproteins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5:385-392
286. **Allison BA, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A, Eriksson P** 1999 Effects of native, triglyceride-enriched, and oxidatively modified LDL on plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19:1354-1360
287. **Liu L, Zhao SP, Wen T, Zhou HN, Hu M, Li JX** 2008 Postprandial hypertriglyceridemia associated with inflammatory response and procoagulant state after a high-fat meal in hypertensive patients. *Coronary artery disease* 19:145-151
288. **Montegaard C, Tulk HM, Lauritzen L, Tholstrup T, Robinson LE** 2010 Acute ingestion of long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids decreases fibrinolysis in men with metabolic syndrome. *The Journal of nutrition* 140:38-43
289. **Ukropec J, Reseland JE, Gasperikova D, Demcakova E, Madsen L, Berge RK, Rustan AC, Klimes I, Drevon CA, Sebokova E** 2003 The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. *Lipids* 38:1023-1029
290. **Wilding JP** 2001 Leptin and the control of obesity. *Current opinion in pharmacology* 1:656-661
291. **Wajchenberg BL** 2000 Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine reviews* 21:697-738
292. **Salans LB, Knittle JL, Hirsch J** 1968 The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *The Journal of clinical investigation* 47:153-165
293. **Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE** 2000 Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 43:1498-1506
294. **Weyer C, Wolford JK, Hanson RL, Foley JE, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE** 2001 Subcutaneous abdominal adipocyte size, a predictor of type 2 diabetes, is linked to chromosome 1q21--q23 and is associated with a common polymorphism in LMNA in Pima Indians. *Molecular genetics and metabolism* 72:231-238
295. **Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH** 2000 Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:8536-8541
296. **Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL** 2000 Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular cell* 6:77-86
297. **Schmitz-Peiffer C** 2000 Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cellular signalling* 12:583-594
298. **Minehira K, Vega N, Vidal H, Acheson K, Tappy L** 2004 Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:1291-1298
299. **Ikeda I, Cha JY, Yanagita T, Nakatani N, Oogami K, Imaizumi K, Yazawa K** 1998 Effects of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 62:675-680
300. **Kabir Y, Ide T** 1996 Activity of hepatic fatty acid oxidation enzymes in rats fed alpha-linolenic acid. *Biochimica et biophysica acta* 1304:105-119

301. **Pegorier JP, Le May C, Girard J** 2004 Control of gene expression by fatty acids. *The Journal of nutrition* 134:2444S-2449S
302. **Jump DB** 2002 Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Current opinion in lipidology* 13:155-164
303. **Jump DB, Clarke SD** 1999 Regulation of gene expression by dietary fat. *Annual review of nutrition* 19:63-90
304. **Festuccia WT, Laplante M, Berthiaume M, Gelinás Y, Deshaies Y** 2006 PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* 49:2427-2436
305. **Kershaw EE, Schupp M, Guan HP, Gardner NP, Lazar MA, Flier JS** 2007 PPARgamma regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1736-1745
306. **Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K** 2005 Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et biophysica acta* 1740:266-286
307. **Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F** 2004 SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839-848
308. **Sewter C, Berger D, Considine RV, Medina G, Rochford J, Ciaraldi T, Henry R, Dohm L, Flier JS, O'Rahilly S, Vidal-Puig AJ** 2002 Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes* 51:1035-1041
309. **Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ** 2006 n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *The American journal of clinical nutrition* 83:1499S-1504S
310. **Kuda O, Jelenik T, Jilkova Z, Flachs P, Rossmeisl M, Hensler M, Kazdova L, Ogston N, Baranowski M, Gorski J, Janovska P, Kus V, Polak J, Mohamed-Ali V, Burcelin R, Cinti S, Bryhn M, Kopecky J** 2009 n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 52:941-951
311. **Chilliard Y, Ferlay A** 2004 Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction, nutrition, development* 44:467-492
312. **Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD** 1999 Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *The Journal of biological chemistry* 274:23577-23583
313. **Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphreys SM** 1995 Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Advances in enzyme regulation* 35:163-178
314. **Frayn KN, Arner P, Yki-Jarvinen H** 2006 Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays in biochemistry* 42:89-103
315. **Wu JW, Wang SP, Casavant S, Moreau A, Yang GS, Mitchell GA** 2012 Fasting Energy Homeostasis in Mice with Adipose Deficiency of Desnutrin/Adipose Triglyceride Lipase. *Endocrinology* 153:2198-2207
316. **Frayn KN, Humphreys SM** 2012 Metabolic characteristics of human subcutaneous abdominal adipose tissue after overnight fast. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E468-475
317. **Arner P, Bernard S, Salehpour M, Possnert G, Liebl J, Steier P, Buchholz BA, Eriksson M, Arner E, Hauner H, Skurk T, Ryden M, Frayn KN, Spalding KL** 2011 Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* 478:110-113

318. **Fielding B** 2011 Tracing the fate of dietary fatty acids: metabolic studies of postprandial lipaemia in human subjects. *The Proceedings of the Nutrition Society* 70:342-350
319. **Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, Higa M, Zhou YT, Unger RH** 2001 Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *The Journal of biological chemistry* 276:5629-5635
320. **Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G** 2002 Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51:2005-2011
321. **Bevilacqua S, Buzzigoli G, Bonadonna R, Brandi LS, Oleggini M, Boni C, Geloni M, Ferrannini E** 1990 Operation of Randle's cycle in patients with NIDDM. *Diabetes* 39:383-389
322. **Zhou YP, Grill V** 1995 Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80:1584-1590
323. **Phinney SD** 2005 Fatty acids, inflammation, and the metabolic syndrome. *The American journal of clinical nutrition* 82:1151-1152
324. **Phillips CM, Kesse-Guyot E, McManus R, Hercberg S, Lairon D, Planells R, Roche HM** 2012 High dietary saturated fat intake accentuates obesity risk associated with the fat mass and obesity-associated gene in adults. *The Journal of nutrition* 142:824-831
325. **Watt MJ, Steinberg GR** 2008 Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *The Biochemical journal* 414:313-325
326. **Arner P** 2005 Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best practice & research* 19:471-482
327. **Andersson DP, Lofgren P, Thorell A, Arner P, Hoffstedt J** 2011 Visceral fat cell lipolysis and cardiovascular risk factors in obesity. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 43:809-815
328. **Cawthorn WP, Sethi JK** 2008 TNF- α and adipocyte biology. *FEBS letters* 582:117-131
329. **Yang X, Zhang X, Heckmann BL, Lu X, Liu J** 2011 Relative contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced lipolysis in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 286:40477-40485
330. **Peairs AD, Rankin JW, Lee YW** 2011 Effects of acute ingestion of different fats on oxidative stress and inflammation in overweight and obese adults. *Nutrition journal* 10:122
331. **De Naeyer H, Ouwens DM, Van Nieuwenhove Y, Pattyn P, t Hart LM, Kaufman JM, Sell H, Eckel J, Cuvelier C, Taes YE, Ruige JB** 2011 Combined gene and protein expression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase, mitochondrial content, and adipocyte size in subcutaneous and visceral adipose tissue of morbidly obese men. *Obesity facts* 4:407-416
332. **Jocken JW, Langin D, Smit E, Saris WH, Valle C, Hul GB, Holm C, Arner P, Blaak EE** 2007 Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:2292-2299
333. **Viguerie N, Vidal H, Arner P, Holst C, Verdich C, Avizou S, Astrup A, Saris WH, Macdonald IA, Klimcakova E, Clement K, Martinez A, Hoffstedt J, Sorensen TI, Langin D** 2005 Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. *Diabetologia* 48:123-131

334. **Hotamisligil GS** 2008 Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *International journal of obesity* (2005) 32 Suppl 7:S52-54
335. **Ni M, Lee AS** 2007 ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS letters* 581:3641-3651
336. **Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH** 2003 XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* 23:7448-7459
337. **Ron D, Walter P** 2007 Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519-529
338. **Jiao P, Ma J, Feng B, Zhang H, Alan Diehl J, Eugene Chin Y, Yan W, Xu H** 2011 FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKKbeta pathways. *Obesity* (Silver Spring, Md 19:483-491
339. **Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ** 2006 Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E275-281
340. **Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J** 2011 Effect of alpha-linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. *Lipids in health and disease* 10:122
341. **Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ** 2006 Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 147:943-951
342. **Dhahbi JM, Mote PL, Tillman JB, Walford RL, Spindler SR** 1997 Dietary energy tissue-specifically regulates endoplasmic reticulum chaperone gene expression in the liver of mice. *The Journal of nutrition* 127:1758-1764
343. **Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, Klein S** 2009 Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58:693-700
344. **Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E** 2011 Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochemical and biophysical research communications* 404:339-344
345. **Kalupahana NS, Voy BH, Saxton AM, Moustaid-Moussa N** 2011 Energy-restricted high-fat diets only partially improve markers of systemic and adipose tissue inflammation. *Obesity* (Silver Spring, Md 19:245-254
346. **Spindler SR, Crew MD, Mote PL, Grizzle JM, Walford RL** 1990 Dietary energy restriction in mice reduces hepatic expression of glucose-regulated protein 78 (BiP) and 94 mRNA. *The Journal of nutrition* 120:1412-1417
347. **Dhahbi JM, Cao SX, Mote PL, Rowley BC, Wingo JE, Spindler SR** 2002 Postprandial induction of chaperone gene expression is rapid in mice. *The Journal of nutrition* 132:31-37
348. **Boden G, Song W, Duan X, Cheung P, Kresge K, Barrero C, Merali S** 2011 Infusion of glucose and lipids at physiological rates causes acute endoplasmic reticulum stress in rat liver. *Obesity* (Silver Spring, Md 19:1366-1373
349. **Boden G** 2009 Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation? *Diabetes* 58:518-519
350. **Roberts CK, Ng C, Hama S, Eliseo AJ, Barnard RJ** 2006 Effect of a short-term diet and exercise intervention on inflammatory/anti-inflammatory properties of HDL in overweight/obese men with cardiovascular risk factors. *J Appl Physiol* 101:1727-1732

351. **Ryan AS, Nicklas BJ** 2004 Reductions in plasma cytokine levels with weight loss improve insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes care* 27:1699-1705
352. **Shoelson SE, Herrero L, Naaz A** 2007 Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132:2169-2180
353. **Cruz-Teno C, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Garcia-Rios A, Marin C, Gomez P, Jimenez-Gomez Y, Camargo A, Rodriguez-Cantalejo F, Malagon MM, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J** 2012 Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study. *Molecular nutrition & food research* 56:854-865
354. **Caimari A, Oliver P, Keijer J, Palou A** 2010 Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. *Omic* 14:129-141
355. **Permana PA, Menge C, Reaven PD** 2006 Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochemical and biophysical research communications* 341:507-514
356. **Kim F, Pham M, Maloney E, Rizzo NO, Morton GJ, Wisse BE, Kirk EA, Chait A, Schwartz MW** 2008 Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28:1982-1988
357. **Bastarrachea RA, Lopez-Alvarenga JC, Bolado-Garcia VE, Tellez-Mendoza J, Laviada-Molina H, Comuzzie AG** 2007 [Macrophages, inflammation, adipose tissue, obesity and insulin resistance]. *Gac Med Mex* 143:505-512
358. **Festa A, D'Agostino R, Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM** 2000 Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 102:42-47
359. **Spitaler MM, Graier WF** 2002 Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45:476-494
360. **Smythies LE, White CR, Maheshwari A, Palgunachari MN, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Kurundkar AR, Datta G** 2010 The apolipoprotein A-I mimetic, 4F, alters the function of human monocyte-derived macrophages. *American journal of physiology*
361. **McGrath KC, Li XH, Puranik R, Liong EC, Tan JT, Dy VM, DiBartolo BA, Barter PJ, Rye KA, Heather AK** 2009 Role of 3beta-hydroxysteroid-delta 24 reductase in mediating antiinflammatory effects of high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29:877-882

IX. ANEXOS

Publicaciones derivadas de la tesis:

Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after the intake of different dietary models.

María E. Meneses, Antonio Camargo, Pablo Perez-Martinez, Javier Delgado-Lista, Cristina Cruz-Teno, Yolanda Jimenez-Gomez, Juan A. Paniagua, Francisco M. Gutierrez-Mariscal, Francisco J. Tinahones, Antonio Vidal-Puig, Helen M. Roche, Francisco Perez-Jimenez, Maria M. Malagon and Jose Lopez-Miranda.

Molecular Nutrition and Food Research, Nutr. Food Res. 2011, 55, 1759–1770 DOI 10.1002/mnfr.201100200

Dietary fat differentially influences adipokines gene expression in adipose tissue in metabolic syndrome patients: from the lipgene study”.

Meneses María Eugenia, Camargo Antonio, Pérez-Martínez Pablo, Delgado-Lista Javier, Jiménez-Gómez Yolanda, Cruz-Teno Cristina, Paniagua Juan Antonio, Roche Helen, Pérez-Jiménez Francisco, Malagón Maria M, López-Miranda José.

Presentado en el VII Congreso Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética, Madrid, España, 30, 31 de Marzo y 1 de Abril de 2011, y publicado en la revista “**Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria**”, 2011; 31 (supl.1), pág 101. ISSN: 0211-6057.

Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome.

Meneses-Álvarez M, Camargo-García A, Cruz-Teno C, Jiménez-Gómez Y, Pérez Martínez P, Delgado-Lista J, Malagón-Poyato MM, Pérez-Jiménez F, Roche H, López Miranda J.

Presentado en el 18th European Congress on Obesity (ECO2011), Istanbul, Turkey, May 25-28, 2011, y publicado en “The International Association for the Study of Obesity”. **Obesity Reviews** 12(Suppl. 1) (2011) 63-279. ISSN: 1467-7881

RESEARCH ARTICLE

Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after the intake of different dietary models

María E. Meneses^{1}, Antonio Camargo^{1*}, Pablo Perez-Martinez¹, Javier Delgado-Lista¹, Cristina Cruz-Teno¹, Yolanda Jimenez-Gomez², Juan A. Paniagua¹, Francisco M. Gutierrez-Mariscal³, Francisco J. Tinahones³, Antonio Vidal-Puig⁴, Helen M. Roche⁵, Francisco Perez-Jimenez¹, Maria M. Malagon^{2**} and Jose Lopez-Miranda^{1**}*

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

² Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Cordoba, Spain

³ Hospital Virgen de la Victoria, Malaga, CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Spain

⁴ Metabolic Research Laboratories, Institute of Metabolic Science, University of Cambridge, Cambridge, UK

⁵ Nutrigenomics Research Group, School of Public Health, UCD Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland

Scope: Dysfunctional adipose tissue may be an important trigger of molecular inflammatory pathways that cause cardiovascular diseases. Our aim was to determine whether the specific quality and quantity of dietary fat produce differential postprandial inflammatory responses in adipose tissue from metabolic syndrome (MetS) patients.

Methods and results: A randomized, controlled trial conducted within the LIPGENE study assigned MetS patients to 1 of 4 diets: (i) high-saturated fatty acid (HSFA), (ii) high-mono-unsaturated fatty acid (HMUFA), (iii) low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) (LFHCC *n*-3), and (iv) low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with placebo (LFHCC), for 12 wk each. A fat challenge reflecting the fatty acid composition as the original diets was conducted post-intervention. We found that p65 gene expression is induced in adipose tissue ($p = 0.003$) at the postprandial state. In addition, I κ B α ($p < 0.001$), MCP-1 ($p < 0.001$) and IL-1 β ($p < 0.001$) gene expression was equally induced in the postprandial state, regardless of the quality and quantity of the dietary fat. Notably, IL-6 transcripts were only detected in the postprandial state.

Conclusions: Our results indicate that individuals with MetS typically exhibit exacerbated adipose tissue postprandial inflammatory responses, which seem to be independent of the quality and quantity of dietary fat.

Keywords:

Adipose tissue / Diet / Inflammation / Metabolic syndrome / Postprandial state

Received: March 21, 2011

Revised: August 6, 2011

Accepted: August 15, 2011

Correspondence: Professor Jose Lopez-Miranda, Lipids and Atherosclerosis Unit at Reina Sofia University Hospital, Avda. Menendez Pidal, s/n. 14004-Córdoba, Spain

E-mail: jlopezmir@uco.es

Fax: +34-957218250

Abbreviations: CVD, cardiovascular diseases; HMUFA, high-mono-unsaturated fatty acid; HSFA, high-saturated fatty acid; LFHCC, low-fat, high-complex carbohydrate diet; MetS, metabolic syndrome; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; PUFA, *n*-3 polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids

*These authors contributed equally to this work.

**These authors contributed equally to this work

1 Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a multi-component disorder characterized by abdominal obesity, dyslipidaemia, hypertension, and impaired insulin sensitivity, which is associated with an increased risk of type 2 diabetes (T2DM) and cardiovascular diseases (CVD) [1]. The etiology of MetS is the result of a complex interaction between genetic, metabolic, and environmental factors, including dietary habits and, probably, the quality of dietary fat [2].

It has been suggested that the harmful effects associated with obesity depend on the dysfunctionality and failure of the adipose tissue. In fact, adipose tissue's expansion and enlargement of adipocytes, typically associated with obesity, has been shown to cause, or at least be associated with, hypoxia, oxidative stress, and even mechanical damage, due to hypertrophy of the adipocyte [3]. In fact, the excess of nutrients has been associated with toxic cellular reactions resulting in stress of the endoplasmic reticulum (ER) and activation of the unfolded protein response (UPR), a process which is linked to the activation of major inflammatory signaling pathways, such as I κ B kinase-nuclear factor κ B (I κ B-NF κ B) pathways, increased production of reactive oxygen species (ROS), and qualitative and quantitative altered adipose secretome, including insulin resistance-promoting cytokines [4, 5].

A low-grade systemic chronic inflammation with an abnormal cytokine production from adipose tissue, increased acute-phase reactants and the activation of inflammatory signaling pathways, often acting over a period of many years constitutes a potential link to the development of atherosclerosis in obese people [6]. This state of low-grade inflammation is also a feature of the complex proatherogenic phenotype occurring during the postprandial state [7], which represents a stressful situation of the homeostasis by its increase in lipid pro-inflammatory particles, a rise in oxidative stress and a transient increase in pro-inflammatory molecules released by human white blood cells and endothelial cells [8]. It is important to note that patients with MetS maintain a postprandial-like state during long periods of the day.

Diet can modulate the postprandial inflammatory response [9–11]. In addition, van Oostrom et al. [8] provided evidence that postprandial triglyceridemia may be related to the pro-inflammatory state of the dysfunctional adipose tissue, typically characterized by an increased expression of activated monocyte markers. MetS patients are particularly vulnerable, since they show an exacerbated hypertriglyceridemia response [12] and abnormalities in the postprandial metabolism of lipoproteins [13]. In fact, there is evidence that postprandial plasma cytokine concentration is higher in obese than lean subjects, and that excessive adipose tissue mass may correlate with high circulating levels of plasma cytokines in obesity [14].

We and others have proposed that adipose tissue failure results in increased lipid leakage from the adipocytes, further facilitating the recruitment and activation of

macrophages, thus creating a vicious pro-inflammatory cycle. It is not clear whether this lipid-induced pro-inflammatory effect is dependent on the type of lipids, but there are several studies suggesting that saturated fatty acids (SFA) may exert a particularly strong effect, promoting the inflammatory response within the adipose tissue typically observed in patients affected by MetS [15, 16].

It has been shown that long-term dietary treatments modify the expression of inflammatory genes in adipose tissue in patients with MetS [10, 17], but there is no evidence that this beneficial effect can also affect the postprandial inflammatory activation typically observed in the adipose tissue of MetS patients. Since this postprandial state can be considered the normal metabolic state in which humans with MetS spend most of the day, it is important to know whether dietary treatment can reduce this inflammatory response, particularly given the implications of the postprandial inflammatory response in the development of MetS and CVD [18].

Few postprandial studies have been carried out in MetS subjects, and therefore, research needs to be carried out into the importance of fat quantity and quality as potential factors which modulate the inflammatory state in MetS patients. Thus, the aim of this study was to evaluate the postprandial inflammatory response in adipose tissue after the consumption of four diets with different quantities and qualities of fat, by analyzing the expression of the inflammatory genes p65, I κ B α , I κ B β 2, IL-6, MCP-1 and IL-1 β , in adipose tissue of patients with MetS.

2 Materials and methods

2.1 Participants and recruitment

This study was conducted within the framework of the LIPGENE study (Diet, genomics and MetS: an integrated nutrition, agro-food, social, and economic analysis), a Framework 6 Integrated Project funded by the European Union. A total of 39 patients with MetS (25 females and 14 males) from the LIPGENE cohort were accepted to participate in the postprandial study and successfully concluded the dietary intervention and the post-intervention studies. All participants gave written informed consent and underwent a comprehensive medical history, physical examination, and clinical chemistry analysis before enrollment. Clinical Trial Registration Number: NCT00429195. This study was carried out in the Lipid and Atherosclerosis Unit at the Reina Sofia University Hospital, from February 2005 to April 2006. The experimental protocol was approved by the local ethic committee according to the Helsinki Declaration.

2.1.1 Design

Patients were randomly stratified to 1 of 4 dietary interventions for 12 wk. MetS was defined by published criteria

[19], which conformed to the LIPGENE inclusion and exclusion criteria [20]. Post-intervention high-fat meal was administered providing the same amount of fat (0.7 g/kg body weight), wherein the fatty acid composition reflected that consumed within the intervention period. The intervention study design and intervention protocol, which also provides information about pre, mid, and post-intervention food consumption and dietary compliance have been described in detail by Shaw et al. [20]. Briefly, dietary intake and compliance was assessed by a 3-day (2 weekdays and 1 weekend day) weighed food intake assessments at baseline, wk 6, and wk 12. Dietary analysis program reflective of the food choices were used (Dietsource version 2.0).

2.1.2 Randomization and intervention

Randomization was completed centrally according to age, gender, and fasting plasma glucose concentration using the Minimization Program for Allocating Patients to Clinical Trials (Department of Clinical Epidemiology, London Hospital Medical College, UK) randomization program. The diets differed in the fat quantity and quality while remaining isoenergetic. Two diets were designed to provide 38% energy (E) from fat: a high-fat, saturated fatty acid-rich diet (HSFA), which was designed to provide 16% E as SFA, and a high monounsaturated fatty acid-rich diet (HMUFA) designed to provide 20% E from MUFA. The other 2 diets were low-fat, high-complex carbohydrate-rich diet (LFHCC and LFHCC ($n=3$); 28% E from fat); the LFHCC ($n=3$) diet included a 1.24 g/day supplement of long-chain ($n=3$)

polyunsaturated fatty acids (PUFA) (ratio of 1.4 eicosapentaenoic acid (EPA):1 docosahexaenoic acid (DHA)) and the LFHCC diet included a 1.2 g/day supplement of control high-oleic sunflower seed oil capsules (placebo) (Table 1). The intervention center performed a post-intervention (wk 12) postprandial challenge reflecting the fatty acid composition as that consumed on the assigned dietary period. Patients arrived at the clinical center 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 within 20 min under supervision. The test meal, which represents a fat overload providing the same amount of fat (65%), allowed us to study the postprandial responses after a fat challenge that may be influenced by the previous dietary intervention because adaptive effect after a long-term dietary intervention [21]. These test meals were prepared in the center, reflected fatty acid composition of each subject's chronic dietary intervention (Table 2). Subsequent blood samples were drawn at 4 h. Test meals provided an equal amount of fat (0.7 g/kg body weight), E content (40.2 kJ/kg body weight), cholesterol (5 mg/kg of body weight), fiber, and vitamin A (62.9 mmol vitamin A (retinol)/m² body surface area). The test meal provided 65% of E as fat, 10% as protein, and 25% as carbohydrates. During the postprandial assessment, participants rested and did not consume any other food but were allowed to drink water. The composition of the breakfasts was as follows: HSFA, 38% E from SFA, based on butter, whole milk, white bread, and egg intake; HMUFA, 43% E from MUFA, based on olive oil, skimmed

Table 1. Composition of diet at the end of intervention period, alongside dietary targets

	HSFA Mean ± SEM	HMUFA Mean ± SEM	LFHCC Mean ± SEM	LFHCC $n=3$ Mean ± SEM
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				
<i>N</i>	8	9	12	10
Energy (MJ/day)	8.33 ± 0.57	7.19 ± 0.61	9.95 ± 0.94	9.95 ± 0.91
% E from fat	40.99 ± 0.91 ^a	40.80 ± 1.14 ^a	26.72 ± 0.69 ^b	26.15 ± 0.75 ^b
% E from SFA	17.69 ± 0.46 ^a	9.37 ± 0.68 ^b	6.62 ± 0.35 ^c	6.87 ± 0.25 ^c
% E from MUFA	13.27 ± 0.63 ^c	21.26 ± 0.56 ^b	11.12 ± 0.26 ^a	10.43 ± 0.34 ^a
% E from PUFA	6.70 ± 0.39 ^a	5.71 ± 0.28 ^{abc}	5.21 ± 0.31 ^{bc}	4.71 ± 0.34 ^{bc}
% E from CHO	37.21 ± 1.77 ^a	40.07 ± 1.38 ^a	49.94 ± 1.26 ^b	53.95 ± 1.54 ^b
% E from complex CHO	36.11 ± 0.49 ^a	38.91 ± 0.82 ^a	48.15 ± 0.94 ^b	52.79 ± 0.52 ^b
% E from protein	20.03 ± 1.28	19.12 ± 0.81	22.74 ± 1.10	19.08 ± 0.97
Total EPA and DHA (g/day)	0.38 ± 0.12 ^a	0.47 ± 0.22 ^a	0.58 ± 0.08 ^a	2.08 ± 0.16 ^c

HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, Low fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC $n=3$, Low fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with 1.24 g/day long-chain $n=3$ PUFA; % E, percentage energy; CHO, carbohydrate. Differences between diets groups were assessed by ANOVA for repeated measured. Values are mean ± SEM. Mean in a row with superscripts without a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

Table 2. Meal composition of the fat challenge conducted post-intervention

	HSFA meal	HMUFA meal	LFHCC meal	LFHCC <i>n</i> -3 meal
Objective				
% E from fat	65	65	65	65
% E from SFA	38	12	21	21
% E from MUFA	21	43	28	28
% E from PUFA	6	10	16	16
% E from CHO	25	25	25	25
% E from complex CHO	25	25	25	25
% E from protein	10	10	10	10
Energy (kJ/kg body weight)	40.2	40.2	40.2	40.2
Meal composition of the fat challenge conducted post-intervention				
N	8	9	12	10
% E from fat	66.13	64.83	66.44	66.49
% E from SFA	40.31	12.83	18.79	18.79
% E from MUFA	21.86	43.72	28.47	26.77
% E from oleic acid (18:1)	19.85	42.60	27.37 ^{b)}	25.67
% E from PUFA	4.46	8.28	19.18	20.93
% E from LA (18:2)	3.27	7.53	16.35	16.35
% E from ALA (18:3)	1.01	0.48	2.62	2.62
% E from EPA	0.02	0.00	0.01	1.15 ^{a)}
% E from DHA	0.00	0.00	0.00	0.61 ^{a)}
% E from CHO	24.20	24.07	22.76	22.76
% E from complex CHO	24.20	24.07	22.76	22.76
% E from protein	9.64	11.06	12.32	12.32
Energy (kJ/kg body weight)	42.27	42.72	42.67	42.69

% E, percentage energy; CHO, carbohydrate; ALA, α -linolenic acid; LA, linoleic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid.

a) These values include the amount of EPA and DHA administered as diet supplement (1.24 g/day of LC (*n*-3) PUFA (ratio 1.4 EPA:1 DHA)).

b) This value include the amount of oleic acid administered as placebo (1.2 g of high-oleic sunflower seed oil).

milk, white bread, eggs, yolk eggs, and tomatoe intake; LFHCC with placebo capsules, 16% E as PUFA; LFHCC with LC (*n*-3) PUFA, 16% E as PUFA (1.24 g/day of LC (*n*-3) PUFA (ratio 1.4 EPA:1 DHA)). Meals after LFHCC diets were based on butter, olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, yolk eggs, and walnuts.

2.2 Measurements

Blood was collected in tubes containing EDTA to give a final concentration of 0.1% EDTA. In each center, plasma was separated from red cells by centrifugation at $1500 \times g$ for 15 min at 4°C. Analytes determined in frozen samples were analyzed centrally by laboratory investigators of the Lipid and Atherosclerosis Unit at the Reina Sofia University Hospital who were unaware of the interventions. Lipid variables were assessed with a DDPPII Hitachi modular analyzer (Roche) using specific reagents (Boehringer-Mannheim). Plasma TG and cholesterol concentrations were assayed by enzymatic procedures [22, 23]. HDL-c was measured by precipitation of a plasma aliquot with dextran sulphate-Mg²⁺, as described by Warnick et al. [24]. LDL-c was calculated by using the following formula; plasma cholesterol-(HDL-C+large TRL-C+small TRL-C). Plasma

glucose was measured by the glucose oxidase method. Plasma insulin concentrations were measured by micro-particle enzyme immunoassay (Abbott Diagnostics, Matsudo-shi, Japan) (CV: 2.5–6%).

Monitoring for adverse effects. Volunteers were visited each 2 wk for study. Clinical investigators assessed adverse events by using physical examinations and administering a checklist with diet-related symptoms and gave advice on how to remediate them.

2.3 Plasma molecule immunoassay

Plasma concentration of MCP-1 and IL-6 were determined in duplicate with commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (R&D Systems) according to the manufacturer's guidelines. The average values of intra-assay CV for these plasma molecular immunoassay were 0.079 for IL-6, and 0.057 for MCP-1.

2.4 Subcutaneous adipose tissue sample collection

Subcutaneous adipose tissue samples were obtained from the superficial abdominal subcutaneous adipose tissue

lateral to the navel with instrument Bard[®] Magnum (ref. MG1522), needles Bard[®] Magnum Core (ref. MN1410). To the study of postprandial adipocyte function the samples were timed at 0 and 4 h of administration of the fatty meal. Immediately after extraction, samples were stored in Eppendorf with RNA later until RNA extraction.

2.5 RNA isolation from adipose tissue

Adipose tissue was homogenized by Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik). After removal of lipids from the top of the tube, RNA was isolated with a commercial kit RiboPure kit (Ambion) that is designed for rapid purification of RNA and high quality. RNA is collected from the aqueous phase by binding to a glass fiber filter. The quantification of RNA is made using the spectrophotometer v3.5.2 Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technology[®], Cambridge, UK).

2.6 Gene expression by reverse transcription polymerase chain reaction

The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted in two steps. The reverse transcription was performed using the commercial kit Message BOOSTER cDNA Synthesis Kit for qPCR (Epicentre), according to the manufacturer's instructions. Briefly, it was amplified to 500 pg of total RNA and then converted into cDNA that is ready for quantitative PCR, which was stored at -20°C until real-time PCR performing. The PCR reactions were carried out using the iQ SYBR Green kit (BioRad) and the Mx3005 (Stratagene)/iQ5 iCycler (Bio-RAD thermal cycler system). Each reaction was performed on 1 μL of 1:20 v/v dilution of the first cDNA strand, synthesized in the previous step. The reaction was incubated at 96°C for 3 min, followed by 40 cycles of 30 s at 96°C , 30 s at 62°C , 20 s at 72°C and 10 s at 80°C where fluorescence was measured to avoid primer-dimer and background signals. Primers used were commercial kit in a final volume of 20 μL with 10 pmol of each primer. Primers used were:

P65-FWD (5'-CCGGGATGGCTTCTATGAGG-3'), P65-REV (5'-GGGGTTGTTGTTGGTCTGGATG-3'); I κ B α -FWD (5'-CACTCCATCCTGAAGGCTACCAAC-3'), I κ B α -REV (5'-ACACTTCAACAGGAGTGACACCAG-3'); I κ B β 2-FWD (5'-GCCAGGAGCAGGGGAACTTG-3'), I κ B β 2-REV (5'-GGCTGCTGTGAACCACAA-3'); IL-6-FWD (5'-CACCTC TTCAGAACGAATTGACAAAC-3'), IL-6-REV (5'-CTCATTGAATCCAGATTGAAAC-3'); MCP-1 FWD (5'-CAGCA GCAAGTGTCCCAAAGAAG-3'), MCP1-REV (5'-GGAAA GCTAGGGGAAAATAAGT-3'); IL1 β -FWD (5'-CAGGG ACAGGATATGGAGCAA-3'), IL1 β -REV (5'-GCAGACTC AAATCCAGCTTGTTA-3'); CLN3-FWD (5'-CGGCCACC TGCATCTCTGA-3'), CLN3-REV (5'-GGGGTGGGCTTG GTGCT-3').

In order to select suitable housekeeping genes for the accurate calibration of experimental variations in a qRT-PCR analysis, we evaluated several reference genes usually used in our group in other tissues (β -actin and RPL13a) and two more found in expression studies of human adipose tissue (CLN3 and COBRA1) [25]. We analyzed the expression of these four potential housekeeping genes on 24 subjects (6 subjects per diet) in the fasting and postprandial states. geNorm analysis showed an *M* value of 0.071 for RPL13a, 0.062 for CLN3, 0.08 for COBRA1 and 0.076 to β -actin. We selected CLN3 as a housekeeping gene to carry out our gene expression study on the basis of its lower *M* value [26].

Primer efficiencies were: P65 (93.2), I κ B α (87.1), I κ B β 2 (111.6), IL-6 (112.4), MCP-1 (93.8), IL-1 β (96.0), CLN3 (101.6). Specificity of PCR amplifications was verified by a melting curve program (60 – 95°C with a heating rate of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$ and a continuous fluorescence measurement). Expression values were obtained as relative expression of the target gene versus the constitutively expressed CLN3 gene (relative expression = $2^{-(C_t, \text{Target gene} - C_t, \text{Reference gene})}$).

2.7 Statistical analyses

SPSS statistical software, version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The normal distribution of variables to characterize the postprandial response was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. We performed ANOVA for repeated measurements to determine the postprandial effect of the fat meal composition, with dietary intervention as the inter-subject factor. The global *p*-values indicate: P1: the effect of the diet and fat meal composition ingested (between-subject effect); P2: the time effect (within-subject effect) and P3: the interaction of both factors (diet-by-time interaction). Posthoc statistical analysis was completed using Bonferroni's multiple comparisons test, as previously published [27]. In the case of IL-6 (only one time point), we performed a one-way ANOVA in order to analyze statistical differences between diets, with a probability of <0.05 being considered significant. Minimal effect of diet intervention on gene expression able to be detected was: p65, 0.055; I κ B α , 2.2; I κ B β 2, 0.3; IL-6, 2.9; MCP-1, 65; IL-1 β , 3.7. A study of the relationship among parameters was also carried out using Pearson's linear correlation coefficient. All the data presented are expressed as mean \pm SEM.

3 Results

3.1 Baseline characteristics

No significant differences were observed in the baseline characteristics of the 39 subjects with MetS participating in the dietary intervention (Table 3). However, the total

Table 3. Baseline characteristics of subjects with the MetS assigned to each diet

	HSFA (<i>n</i> = 8)	HMUFA (<i>n</i> = 9)	LFHCC (<i>n</i> = 12)	LFHCC <i>n</i> –3 (<i>n</i> = 10)	<i>p</i>
Age (years)	57.8 ± 3.1	57.1 ± 2.3	56.5 ± 2	54.8 ± 2.1	0.839
BMI (kg/m ²)	36 ± 1.2	34.5 ± 1.2	35.7 ± 1	35 ± 1.2	0.817
Waist circumference	111.7 ± 3.1	104 ± 2	109 ± 3.1	108.3 ± 3.3	0.420
TC (mg/dL)	204 ± 19	192.2 ± 11.1	206.8 ± 14.9	196.9 ± 10	0.877
TG total (mg/dL)	226.7 ± 65.2	159.1 ± 20.9	161.5 ± 17.5	158.1 ± 20.3	0.422
LDL-c (mg/dL)	129.7 ± 13	135.9 ± 9.6	148.2 ± 12.1	140.4 ± 8.8	0.693
HDL-c (mg/dL)	41 ± 4.5	44.4 ± 3.3	43.4 ± 3.6	41.4 ± 2.9	0.906
Glucose (mg/dL)	117.7 ± 6.2	120.3 ± 7.1	106.1 ± 3.2	125.1 ± 13.5	0.371
Insulin (mU/mL)	15.3 ± 1.3	11.5 ± 1.3	12.6 ± 1.4	13.3 ± 1.7	0.400

Values presented are the mean ± SEM of each diet group. Abbreviations: HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, Low fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC *n*–3, Low-fat, high-complex carbohydrate diet with 1.24 g/day long-chain *n*–3 PUFA diet; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; LDL-c, low-density lipoprotein-cholesterol; HDL-c, high-density lipoprotein-cholesterol. *p*-Values correspond to ANOVA statistical analyses.

Table 4. Preintervention (0 wk) and post-intervention (12 wk) gene expression of inflammatory genes at fasting state

		HSFA (<i>n</i> = 8)	HMUFA (<i>n</i> = 9)	LFHCC (<i>n</i> = 12)	LFHCC <i>n</i> –3 (<i>n</i> = 10)	P1	P2	P3
p65	0 wk	0.014 ± 0.005	0.013 ± 0.005	0.044 ± 0.017	0.022 ± 0.007	0.361	0.063	0.239
	12 wk	0.018 ± 0.009	0.010 ± 0.001	0.008 ± 0.002	0.016 ± 0.001			
IκBα	0 wk	0.866 ± 0.128	0.960 ± 0.301	0.777 ± 0.131	0.935 ± 0.153	0.385	0.922	0.964
	12 wk	0.643 ± 0.142	1.138 ± 0.354	0.806 ± 0.079	0.913 ± 0.124			
IκBβ2	0 wk	0.275 ± 0.043	0.284 ± 0.051	0.182 ± 0.063	0.345 ± 0.101	0.288	0.752	0.786
	12 wk	0.226 ± 0.027	0.289 ± 0.081	0.228 ± 0.056	0.260 ± 0.066			
MCP1	0 wk	0.977 ± 0.206	1.036 ± 0.185	1.361 ± 0.287	1.413 ± 0.320	0.438	0.124	0.168
	12 wk	1.262 ± 0.237	2.751 ± 0.833	1.228 ± 0.167	1.482 ± 0.423			
IL-1β	0 wk	0.063 ± 0.024	0.187 ± 0.049	0.111 ± 0.036	0.136 ± 0.055	0.036	0.045	0.855
	12 wk	0.163 ± 0.061	0.224 ± 0.074	0.140 ± 0.034	0.194 ± 0.067			

Mean ± SEM of relative expression in adipose tissue. HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, Low-fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC *n*–3, Low-fat, high-complex carbohydrate diet with 1.24 g/day long-chain *n*–3 PUFA diet. *p*-Value correspond to ANOVA for repeated measured: P1: diet effect; P2: time effect; P3: diet-by-time interaction. **P* < 0.05.

triglyceride level was higher in the HSFA group than the other three groups, although the difference did not reach statistical significance.

3.2 Diet intake and adipose tissue inflammation

To evaluate the postprandial inflammatory response in adipose tissue after the administration of the four diets (pre and post-intervention gene expression in the fasting state, is shown in Table 4), we administered a meal after the dietary intervention reflecting the fatty acid composition of the original diet to study the effect of the diet, as studied in the postprandial period.

We studied the expression of the inflammation regulatory gene, p65 (sub-unit of the NF-κB transcription factor), and two sub-units of the NF-κB inhibitor (IκBα and IκBβ2 genes) in the fasting state and 4 h after the meal. We found that p65 gene expression is induced in the postprandial state (*p* = 0.003). However, we also found that the increase did not differ as a function of the treatment. Posthoc statistical analysis showed that p65 gene expression statistically

increased after the intake of low-fat high-carbohydrate LFHCC (*p* = 0.044) and LFHCC *n*–3 (*p* = 0.038) diets, and tended to increase after the intake of an HMUFA diet (*p* = 0.072), as studied in the postprandial period.

When we analyzed the postprandial expression of the NF-κB inhibitors, we showed that IκBα gene expression was significantly induced in the postprandial state (*p* < 0.001), irrespective of the diet consumed. In contrast, no significant changes were observed in IκBβ2 mRNA levels in the postprandial state, although there was a trend towards a postprandial increase after consumption of the four diets (Fig. 1).

We have also studied the gene expression of three pro-inflammatory cytokines (interleukin (IL)-6, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), and IL-1β). MCP-1 plays a critical role at multiple stages in atherosclerosis, and is associated with the initiation of the fatty streak and the promotion of plaque instability. Similarly, IL-6 and IL-1β have also been implicated in the atherosclerotic process and other CVD risk factors, such as obesity, dyslipidemia, and insulin resistance [28, 29]. In our study, the gene expression of MCP-1 and IL1β in adipose tissue was induced

($p < 0.001$), irrespective of the diet consumed, as studied in the postprandial period.

In the case of IL-6, transcripts were only detected in the postprandial period and no significant differences among diets were found. Similarly, MCP-1 and IL1 β gene expression was extremely low in the fasting compared with the postprandial state.

We also measured IL-6 plasma levels before and after a meal. We found a significant postprandial increase in the plasma IL-6 level after consumption of the four meals

($p < 0.001$); this postprandial increase did not differ between diets. Posthoc statistical analysis showed that the circulating IL-6 levels increased after the intake of low-fat high-carbohydrate LFHCC ($p = 0.001$) and LFHCC $n-3$ ($p = 0.015$) diets, and tended to increase after the intake of HSFA ($p = 0.066$) and HMUFA ($p = 0.059$) diets, as studied in the postprandial period. However, no changes existed in MCP-1 plasma levels, despite the induction of MCP-1 gene expression observed in adipose tissue in the postprandial state (Fig. 2).

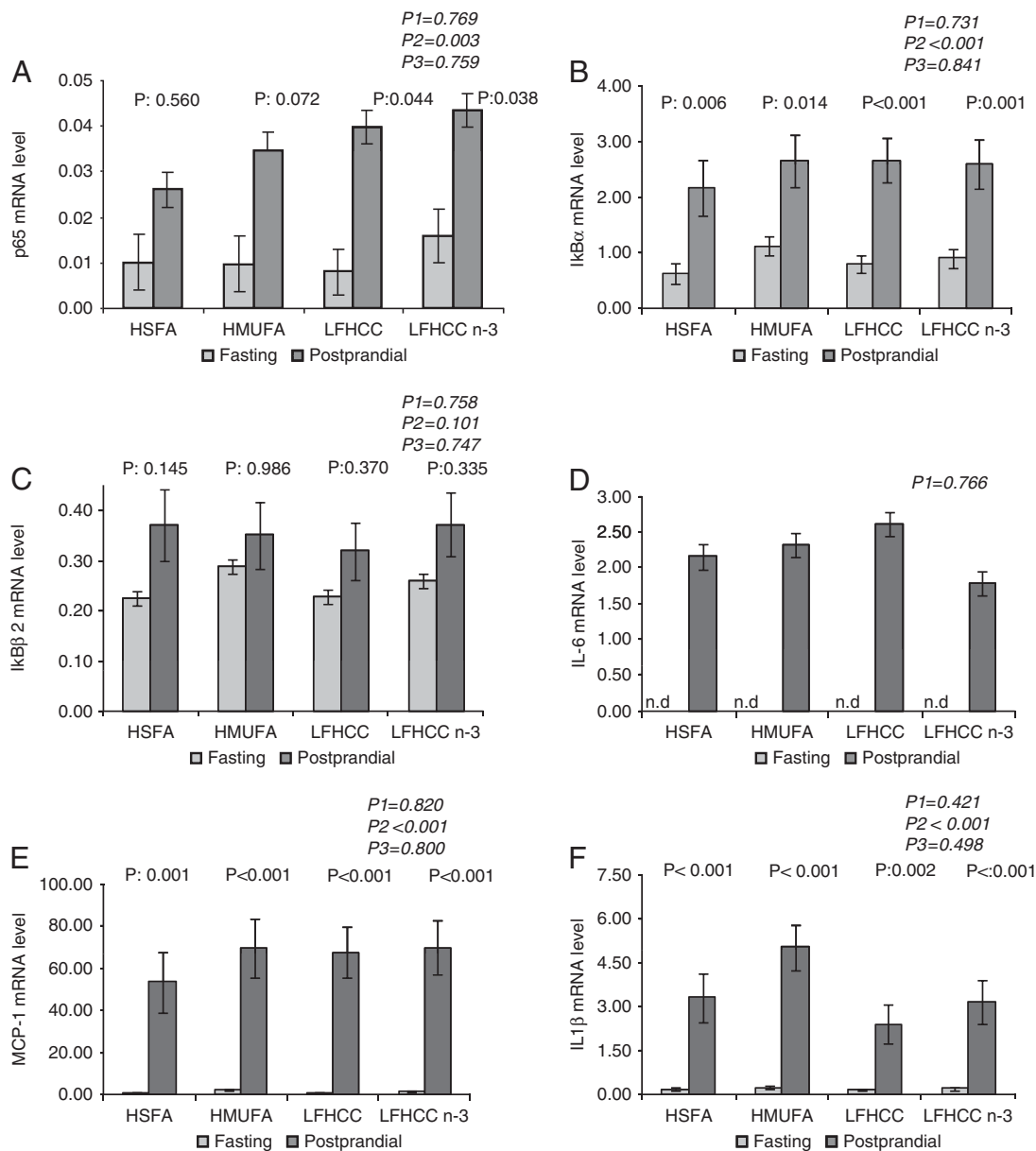


Figure 1. Postprandial p65 (A), IκBα (B), IκBβ2 (C), IL-6 (D), MCP-1 (E) and IL1β (F) gene expression changes in adipose tissue in MetS patients after dietary intervention. Mean (\pm SEM) of relative expression in AT, $n = 39$. Fasting: Post-intervention, 12-h fasting. Postprandial: Post-intervention, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n-3$) diets. ANOVA for repeated measured, global p -values: P1: diet effect; P2: time effect; P3: diet-by-time interaction. P: p -values from Bonferroni's multiple comparison test.

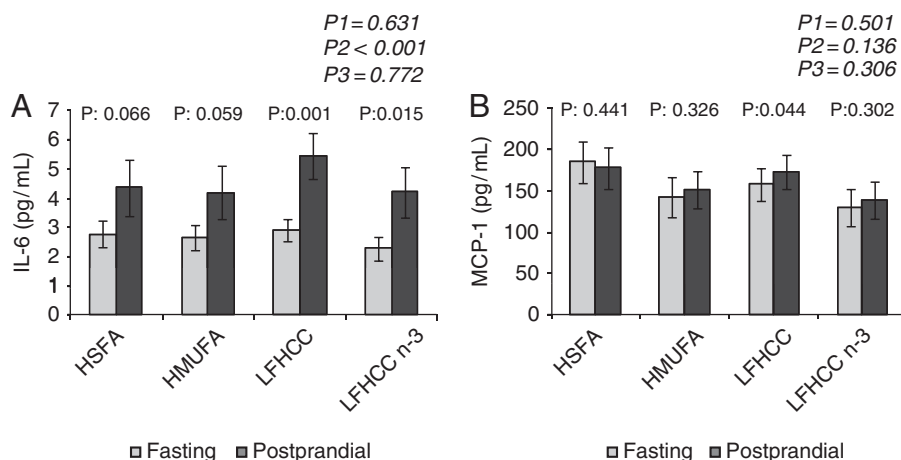


Figure 2. Postprandial (A) IL-6 and (B) MCP-1 plasma concentration changes in MetS patients after the dietary intervention. Mean (\pm SEM) of (A) IL-6 and (B) MCP-1 plasma levels, $n = 39$. Fasting: Post-intervention, 12-h fasting. Postprandial: Post-intervention, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n=3$) diets. ANOVA for repeated measured, global p -values: P1: diet effect; P2: time effect; P3: diet-by-time interaction. P: p -values from Bonferroni's multiple comparison test.

Table 5. Lipid concentrations in postprandial state

	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Insulin (mU/mL)
0 h						
HSFA	198.66 \pm 15.65	182.01 \pm 45.00	41.28 \pm 3.94	126.92 \pm 7.70	108.96 \pm 4.26	13.33 \pm 2.23
HMUFA	188.71 \pm 10.24	135.00 \pm 14.37	43.28 \pm 2.93	126.83 \pm 8.70	113.40 \pm 4.64	12.42 \pm 1.07
LFHCC	185.92 \pm 12.16	128.56 \pm 17.55	41.28 \pm 3.01	127.96 \pm 10.17	106.06 \pm 4.52	12.13 \pm 1.85
LFHCC- $n-3$	188.88 \pm 9.96	145.96 \pm 13.48	39.08 \pm 2.21	130.80 \pm 9.17	109.96 \pm 4.50	14.52 \pm 1.81
4 h						
HSFA	203.08 \pm 12.40	349.61 \pm 79.14	41.31 \pm 3.87	123.26 \pm 6.41	98.90 \pm 2.90	14.70 \pm 1.77
HMUFA	190.20 \pm 11.15	259.64 \pm 44.63	41.52 \pm 2.55	123.71 \pm 9.83	91.46 \pm 3.11	15.41 \pm 2.89
LFHCC	193.34 \pm 15.03	236.13 \pm 31.134	39.85 \pm 3.12	132.05 \pm 12.54	91.07 \pm 7.45	14.63 \pm 2.85
LFHCC- $n-3$	194.09 \pm 11.82	235.14 \pm 26.14	37.60 \pm 2.75	130.75 \pm 9.83	87.20 \pm 3.14	12.73 \pm 2.24
Global analysis p-values						
Diet effect	0.860	0.259	0.816	0.970	0.715	0.996
Time effect	0.003 ^{a)}	<0.001 ^{a)}	0.007 ^{a)}	0.976	<0.001 ^{a)}	0.196
Diet-by-time effect	0.175	0.112	0.835	0.156	0.412	0.288

Values presented are the mean \pm SEM of each diet group. HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, Low-fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC $n-3$, Low fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with 1.24 g/day long-chain $n-3$ PUFA; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL-c, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein-cholesterol. p -Value correspond to ANOVA for repeated measured.

a) $p < 0.05$.

3.3 Correlations between postprandial gene expression in adipose tissue and lipid, lipoprotein parameters, and the HOMA index

We analyzed the relationship between the expression of the inflammatory genes (mRNA levels for p65, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, $\text{I}\kappa\text{B}\beta$, IL-6, MCP-1, and IL-1 β), and lipid concentrations in the postprandial state and the HOMA index (Table 5). There was a negative correlation between the postprandial mRNA levels of p65 (4 h after a meal) with the plasma HDL-c concentration 4 h after a meal ($r = -0.377$; $p = 0.018$; $r^2 = 0.142$), and a positive correlation with the TG level 4 h after a meal ($r = 0.406$; $p = 0.010$; $r^2 = 0.164$) and the HOMA index ($r = 0.353$; $p = 0.028$; $r^2 = 0.125$; Fig. 3).

Additionally, there was a positive correlation between the p65 gene expression increment (postprandial value minus fasting value) with the HOMA index ($r = 0.327$; $p = 0.042$; $r^2 = 0.107$). There was also a positive correlation between the p65 gene expression AUC and the TG AUC ($r = 0.394$; $p = 0.013$; $r^2 = 0.155$), total cholesterol AUC ($r = 0.334$; $p = 0.038$; $r^2 = 0.111$), and LDL-c AUC ($r = 0.344$; $p = 0.034$; $r^2 = 0.118$).

4 Discussion

We did not observe any relevant dietary effect between the pre and post-intervention inflammatory status in the fasting

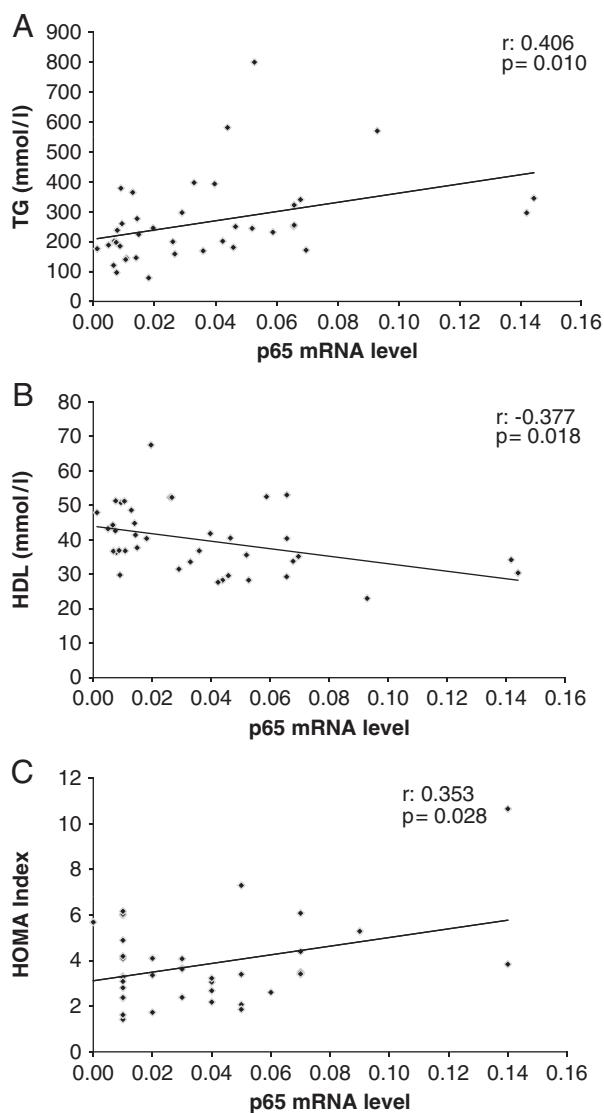


Figure 3. Correlations between postprandial p65 mRNA expression and (A) triglycerides (mmol/L) ($r = 0.406$, $p < 0.010$) and (B) HDL-c (mmol/L) ($r = -0.377$, $p < 0.018$) and (C) HOMA index ($r = 0.353$, $p < 0.028$) in the MetS patients, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC ($n = 3$) diets. $n = 39$, r , Pearson's linear correlation coefficient.

state. Post-intervention, we administered four high-fat meals providing the same amount of fat (65%); the fatty acid composition reflected that consumed within the intervention period in terms of fat quality. After a high-fat meal intake, which represents a fat challenge, we studied the postprandial responses on a model of the postprandial phase that may be influenced by the previous dietary intervention because of the adaptive effect after a long-term dietary intervention.

Our study showed that in the postprandial state there was an induction of adipose tissue inflammatory genes (p65,

MCP-1, IL-6, and IL-1 β) in patients with MetS and when this pattern was established, the induction of adipose tissue inflammatory genes was not affected by the quantity and quality of the fat included in the diet consumed, as studied during the postprandial period.

Obesity is associated with different degrees of adipose tissue dysfunction and chronic low-grade inflammation characterized by macrophage infiltration in adipose tissue and the expression of inflammatory genes [30]. However, this inflammatory state of the adipose tissue can be modulated by diet. More specifically, there is evidence that consumption of an SFA-rich diet induces a pro-inflammatory gene expression profile in obese people, whereas consumption of a HMUFA diet leads to an anti-inflammatory profile, which is evident in biological samples taken during the fasting state [17].

Several studies have shown differences between consumption of SFA- and MUFA-rich diets in terms of the activation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and the degree of low-grade inflammation in obesity [6]. In some studies, it has been shown that MUFA-rich diets reduce the postprandial inflammatory response when compared with SFA-rich diets [31–33].

However, our study did not document such an anti-inflammatory effect by an HMUFA diet in the expression of several inflammatory genes in adipose tissues during the postprandial period.

A HSFA diet tended to raise plasma IL-6 levels, and an HMUFA diet tended to raise both NF- κ B p65 sub-unit gene expression and plasma IL-6 levels, as studied during the postprandial period. In this same area, a previous study has shown a similar effect of fat-rich diets (HMUFA and SFA-rich diets) on adipose tissue gene expression of adiponectin when compared with a CHO-rich diet. That study showed that postprandial adiponectin gene expression was lower after a CHO-rich breakfast than an MUFA- or SFA-rich breakfast in insulin-resistant patients [34].

Blackburn et al. [35] showed that IL-6 plasma levels increased 8 h after the consumption of a high-fat meal in people with abdominal obesity. Other study have shown that IL-6 plasma levels increased 6 h after consuming a high-fat test meal containing a high or low ratio of saturated:unsaturated fatty acids in slim people [36]. Thus, the discrepancies between the IL-6 data observed between these studies and the current study could be explained by the timing of the blood sampling; specifically, the earlier sampling (4 h after the ingestion of a meal) may not have allowed sufficient time to observe the increase in the IL-6 level after the consumption of HSFA and HMUFA diets.

The current study has shown a postprandial increase in the expression of the inflammatory cytokines, MCP-1 and IL1 β , in adipose tissue irrespective of the quantity and quality of dietary fat. Moreover, the expression of the inflammatory cytokine, MCP-1 gene, increased during the postprandial phase in adipose tissue, but not in plasma.

This observation could be explained given that the synthesis and secretion processes do not occur concomitantly and/or to the occurrence of additional regulatory mechanisms acting on the secretory pathway [37]. This is relevant from a pathophysiologic point of view because postprandial MCP-1 release in adipose tissues may facilitate macrophage recruitment and activation, which promotes macrophage-dependent inflammatory responses and the development of atherosclerosis [38].

We observed an inverse relationship between the expression of the NF- κ B transcription factor, sub-unit p65, in adipose tissue and the HDL-c plasma concentration. Given that HDL-c has been shown to inhibit monocyte chemotaxis/adhesion, as well as to reduce vascular macrophage content in inflammatory conditions [39], the negative correlation found between HDL-c and NF- κ B observed in the current study strongly supports the view that an increase in the inflammatory response in adipose tissue occurs when the protective effect of HDL-c diminishes. In line with this notion, it has been shown *in vitro* that HDL-c mediates suppression of NF- κ B activity in endothelial cells [40]. Our study has also shown that the expression of NF- κ B transcription factor sub-unit p65 in adipose tissue is also related to other lipid parameters. Specifically, a positive correlation was found between the p65 and TG plasma concentration. Taken together, these findings suggest that NF- κ B transcription factor sub-unit p65 gene expression in adipose tissue is related to the lipid plasma composition.

Growing evidence links inflammation to the pathogenesis of insulin resistance [41] and there is evidence that the over-expression of NF- κ B is enough to impair insulin sensitivity in skeletal muscle cells [42]. Thus, the fact that our study showed a positive relationship between the gene expression of NF- κ B transcription factor sub-unit p65 in adipose tissue and the HOMA index supports the link between inflammation and insulin resistance.

One of the limitations of our study was that the proportion of fat between diet on dietary intervention and test meals was not the same. This mismatch is due to the fact that the percentage of fat is different between long-term diets, but the same in test meals. To study the postprandial state after the dietary intervention, we decided administer a fat challenge with the same amount of fat, which did not correspond to the previous diets (two high-fat and two low-fat diets). To perform postprandial studies requires a fat overload standardized among fat administered by body weight [21, 43]. Thus, we administered a high-fat meal enriched in SFA after a HSFA diet, a high-fat meal enriched in MUFA after an HMFUFA diet, and we administered a high-fat meal with the same fatty acid proportion consumed within the low-fat diet intervention period. In addition, different amounts of fat on the fat challenge could affect the results in the following two ways: fat amount determines the postprandial response and the possible differences observed could have been due to fat quantity, but not to fat quality;

and we were studying adipose tissue, an organ that functions as a fat store. However, the fat quantity effect (low-fat long-term dietary intervention) was studied comparing the pre and post-intervention inflammatory status in the fasting state, and this could have an effect on the postprandial response because of the adaptive effect after the long-term intervention. In addition, in future studies, it will be interesting to analyze the effect of meals with the same macronutrient composition to that consumed in the habitual diet on the postprandial adipose tissue response. Another limitation, concerning the sample size, is that our study was able to detect gene expression changes of double or one half, which is sufficient to discern a relevant biological effect, but a smaller effect, could not have been detected. Of note, our study represents the first approach to the diet effect on adipose tissue during the postprandial state in MetS patients and represents a starting point on elucidating diet interaction on adipocyte function.

In conclusion, our results suggest that an exacerbated adipose tissue postprandial inflammatory response occurs in individuals with MetS, which seems to be independent of the quality and quantity of the dietary fat. This finding is important because the postprandial state is probably the most common metabolic state that humans experience during the day, and thus makes a substantial contribution to the environmental factors which increases cardiometabolic risk.

Further research is needed to extend our knowledge about the effect of the type of diet on postprandial inflammatory events in adipose tissue, the specific cellular and molecular alterations, and the elucidation of nutritionally based therapeutic strategies for the MetS.

This work was supported in part by research grants from the European Union (LIPGENE European Integrated Project-505944), from the Ministerio de Ciencia e Innovacion (grant numbers AGL2004-07907, AGL2006-01979, AGL2009-12270 (to J. L.-M.)); CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (grant number CB06/03/0047); Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (grant number P06-CTS-01425 (to J. L.-M.) CTS-03039 (to MMM)); and Consejería de Salud, Junta de Andalucía (grant numbers 06/128, 07/43, PI-0193 (to J. L.-M.)); Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; MEM has a fellowship by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. (CONACYT). We thank to M^a Jose Gomez-Luna for technical support.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A. et al., Diagnosis and management of the metabolic

- syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005, *112*, 2735–2752.
- [2] Phillips, C., Lopez-Miranda, J., Perez-Jimenez, F., McManus, R., Roche, H. M., Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.* 2006, *21*, 185–193.
- [3] Gregor, M. G., Hotamisligil, G. S., Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J. Lipid Res.* 2007, *48*, 1905–1914.
- [4] Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., Cnop, M., The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr. Rev.* 2008, *29*, 42–61.
- [5] Zhang, K., Kaufman, R. J., From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008, *454*, 455–462.
- [6] Subramanian, S., Chait, A., The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2009, *20*, 39–44.
- [7] Magne, J., Mariotti, F., Fischer, R., Mathe, V. et al., Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.* 2010, *21*, 550–555.
- [8] van Oostrom, A. J., Rabelink, T. J., Verseyden, C., Sijmonsma, T. P. et al., Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2004, *177*, 175–182.
- [9] 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.
- [10] Kallio, P., Kolehmainen, M., Laaksonen, D. E., Pulkkinen, L. et al., Inflammation markers are modulated by responses to diets differing in postprandial insulin responses in individuals with the metabolic syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, *87*, 1497–1503.
- [11] Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Aljada, A. et al., Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, *75*, 767–772.
- [12] Khoury, D. E., Hwalla, N., Frochot, V., Lacorte, J. M. et al., Postprandial metabolic and hormonal responses of obese dyslipidemic subjects with metabolic syndrome to test meals, rich in carbohydrate, fat or protein. *Atherosclerosis* 2010, *210*, 307–313.
- [13] Ruotolo, G., Howard, B. V., Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr. Cardiol. Rep.* 2002, *4*, 494–500.
- [14] Manning, P. J., Sutherland, W. H., McGrath, M. M., de Jong, S. A. et al., Postprandial cytokine concentrations and meal composition in obese and lean women. *Obesity (Silver Spring)* 2008, *16*, 2046–2052.
- [15] Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C. C., LaPoint, K., McIntosh, M., Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J. Nutr.* 2009, *139*, 1–4.
- [16] van Oostrom, A. J., Alipour, A., Plokker, T. W., Sniderman, A. D., Cabezas, M. C., The metabolic syndrome in relation to complement component 3 and postprandial lipemia in patients from an outpatient lipid clinic and healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2007, *190*, 167–173.
- [17] van Dijk, S. J., Feskens, E. J., Bos, M. B., Hoelen, D. W. et al., A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009, *90*, 1656–1664.
- [18] Lopez-Miranda, J., Williams, C., Lairon, D., Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br. J. Nutr.* 2007, *98*, 458–473.
- [19] Grundy, S. M., Brewer, H. B., Jr., Cleeman, J. I., Smith, S. C., Jr., Lenfant, C., 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*, e13–e18.
- [20] 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.
- [21] Lairon, D., Lopez-Miranda, J., Williams, C., Methodology for studying postprandial lipid metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007, *61*, 1145–1161.
- [22] Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W., Fu, P. C., Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 1974, *20*, 470–475.
- [23] Bucolo, G., David, H., Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.* 1973, *19*, 476–482.
- [24] Warnick, G. R., Benderson, J., Albers, J. J., Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin. Chem.* 1982, *28*, 1379–1388.
- [25] Gabriellsson, B. G., Olofsson, L. E., Sjogren, A., Jernas, M. et al., Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obesity Res.* 2005, *13*, 649–652.
- [26] Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B. et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, *3*, RESEARCH0034.
- [27] Gutierrez-Mariscal, F. M., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Yubero-Serrano, E. M. et al., Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 induces postprandial changes in p53 in response to oxidative DNA damage in elderly subjects. *Age (Dordr)* 2011, in press, DOI: 10.1007/s11357-011-9229-1.
- [28] Gustafson, B., Hammarstedt, A., Andersson, C. X., Smith, U., Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007, *27*, 2276–2283.
- [29] Shen, J., Arnett, D. K., Peacock, J. M., Parnell, L. D. et al., Interleukin1beta genetic polymorphisms interact with

- polyunsaturated fatty acids to modulate risk of the metabolic syndrome. *J. Nutr.* 2007, *137*, 1846–1851.
- [30] 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.
- [31] 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 men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, *80*, 1487–1491.
- [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*, e70–e76.
- [33] 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*, e141–e146.
- [34] Paniagua, J. A., Gallego de la Sacristana, A., Romero, I., Vidal-Puig, A. et al., 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*, 1717–1723.
- [35] Blackburn, P., Despres, J. P., Lamarche, B., Tremblay, A. et al., Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men. *Obesity (Silver Spring)* 2006, *14*, 1747–1754.
- [36] Poppitt, S. D., Keogh, G. F., Lithander, F. E., Wang, Y. et al., Postprandial response of adiponectin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and C-reactive protein to a high-fat dietary load. *Nutrition* 2008, *24*, 322–329.
- [37] Stow, J. L., Ching Low, P., Offenhauser, C., Sangermani, D., Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology* 2009, *214*, 601–612.
- [38] Bruun, J. M., Lihn, A. S., Pedersen, S. B., Richelsen, B., Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, *90*, 2282–2289.
- [39] Smythies, L. E., White, C. R., Maheshwari, A., Palgunachari, M. N., The apolipoprotein A-I mimetic, 4F, alters the function of human monocyte-derived macrophages. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2010, *298*, C1538–C1548.
- [40] McGrath, K. C., Li, X. H., Puranik, R., Liang, E. C., Role of 3beta-hydroxysteroid-delta 24 reductase in mediating anti-inflammatory effects of high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009, *29*, 877–882.
- [41] Shoelson, S. E., Herrero, L., Naaz, A., Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007, *132*, 2169–2180.
- [42] Zhang, J., Wu, W., Li, D., Guo, Y., Ding, H., Overactivation of NF-kappaB impairs insulin sensitivity and mediates palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrine* 2010, *37*, 157–166.
- [43] van Oostrom, A. J., Alipour, A., Sijmonsma, T. P., Verseyden, C. et al., Comparison of different methods to investigate postprandial lipaemia. *Neth. J. Med.* 2009, *67*, 13–20.

nutrición clínica

Dietética Hospitalaria

Nutr. clín. diet. hosp. 2011; 31(supl. 1)

**VII Congreso Internacional
nutrición, alimentación y dietética**

XV Jornadas Nacionales de nutrición práctica

30 - 31 MARZO Y 1 ABRIL 2011
FACULTAD DE MEDICINA - UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
II EUROPEAN WEEK OF PRACTICAL NUTRITION

 **XV JORNADAS
NACIONALES DE
NUTRICIÓN PRÁCTICA**

VII Congreso Internacional
**NUTRICIÓN, 
ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA**



siendo poco probable que la obesidad actúe como un factor protector y por ello se produzca una disminución de ingresos, por tanto concluimos que en el HURS no se codifica la obesidad adecuadamente. Discusión La recogida de este diagnóstico en la historia, así como su codificación favorece los estudios clínicos, epidemiológicos de morbimortalidad. La mera existencia de información sobre un determinado proceso gen

CONTROL DE ALÉRGENOS EN ALIMENTOS DURANTE EL AÑO 2010 EN EL DISTRITO ALMERIA

Romero López MV, Villegas Aranda JM, Martínez Martínez M

Distrito Sanitario Almería

jmvillegas@ono.com

Introducción: Se han identificado algunos grupos de alimentos que están asociados a la aparición de alergias. Es el caso de crustáceos, huevos, pescado, cacahuets, soja, leche, o sulfitos utilizados como aditivos, para los que es obligatorio su mención en el etiquetado. Aunque los aditivos alimentarios pueden provocar reacciones adversas, a menudo, resulta difícil evitarlos, porque no siempre se mencionan en el etiquetado. La declaración en el etiquetado es obligatoria cuando los alérgenos estén presentes en el producto final como resultado de su incorporación como ingredientes, ingredientes de un ingrediente compuesto, aditivos y/o aromas, soportes o diluyentes de un aditivo o aroma y como coadyuvantes tecnológicos, utilizados en la elaboración del alimento. Hay programas que comprueban la presencia de alérgenos y estimulan a que estos figuren en el etiquetado de acuerdo con el Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre. **Materiales y métodos:** En el Distrito Sanitario Almería se han realizado una serie de tomas de muestras para comprobar la presencia de alérgenos no contemplados en el etiquetado de los alimentos. Esta recogida de muestras se ha realizado según el programa anual de Control de Alérgenos en los productos alimenticios de la Secretaría General de Salud Pública de Andalucía. Se han analizado un total de 10 muestras. Se han investigado los siguientes alérgenos: Proteínas de soja (5 muestras), proteínas de leche (2 muestras) y β -lactoglobulina-caseína (3 muestras). Los alimentos seleccionados para la toma de muestras han sido: morcilla y chorizo para la investigación del alérgeno proteínas de leche, chorizo, morcilla y rosquillas para la investigación de β -lactoglobulina y caseína y helado, hamburguesa, rosquillas, zumo de naranja y de piña para la investigación del alérgeno proteínas de soja. **Resultados:** De las diez muestras analizadas, una de ellas, ha sido positiva en la presencia de proteínas de leche. La muestra positiva corresponde al alimento chorizo. Este alimento presenta en su composición, proteínas de leche, sin embargo, esto no está indicado en el etiquetado del producto. **Conclusiones:** Cada vez se utilizan más aditivos en la elaboración de alimentos. La procedencia de las materias primas que se utilizan en la elaboración de alimentos puede ser de cualquier lugar del mundo, por lo que el control de ingredientes en el producto final puede ser complicado. El muestreo sistemático de alérgenos no declarados en los alimentos, puede mejorar los controles de las industrias alimentarias y el etiquetado de sus productos, reduciendo la incidencia de alergias de origen alimentario.

Nutr. clín. diet. hosp. 2011; 31(supl. 1): 101

DIETARY FAT DIFFERENTIALLY INFLUENCES ADIPOKINES GENE EXPRESSION IN ADIPOSE TISSUE IN METABOLIC SYNDROME PATIENTS: FROM THE LIPGENE STUDY

Meneses María Eugenia, Camargo Antonio, Perez-Martínez Pablo, Delgado-Lista Javier, Jimenez-Gomez Yolanda, Cruz-Teno Cristina, Paniagua Juan Antonio, Roche Helen, Perez-Jimenez Francisco, Malagon María M, López-Miranda Jose

Lipids and Atherosclerosis Unit, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba and CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III. 14004, Cordoba, Spain. Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Cordoba, Spain. Nutrigenomics Research Group, UCD Conway Institute, School of Public Health & Population Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland
eugenia-meneses@hotmail.com

Introduction: It has been proposed that the quantity and quality of dietary fat influences adipose tissue function. The aim of this study was to investigate the effect of the quantity and quality of dietary fat on the postprandial gene expression pattern of adipokines and two proteins related to lipid metabolism in adipose tissue from Metabolic Syndrome patients. **Methods:** A randomized, controlled trial conducted within the LIPGENE study randomly assigned MetS patients to 1 of 4 diets: high-SFA [HSFA; 38% energy (E) from fat, 16% E as SFA], high-monounsaturated fatty acid [HMUFA; 38% E from fat, 20% E as MUFA], and two low-fat, high-complex carbohydrate [LFHCC; 28% E from fat] diets supplemented with 1.24 g/d of long-chain n-3 PUFA or a placebo for 12 weeks each. A fat challenge with the same fat composition as the diets was conducted postintervention. The gene expressions of adiponectin, resistin, RBP-4, PAI-1, perilipin and vimentin were measured post-intervention in adipose tissue. **Results:** The long-term consumption of a HMUFA diet induced a significant postprandial decrease in adiponectin and perilipin gene expression ($p=0.008$ and $p=0.014$, respectively) and RBP-4 tended to decrease. In contrast, the postprandial expression of the resistin and vimentin genes was not affected by any of the diets tested. PAI-1 transcripts were only detectable in the postprandial state, but no significant differences were found among the diets. **Conclusion:** In conclusion, the quantity and quality of dietary fat induces a differentially postprandial gene expression of adipokines in adipose tissue in patients with metabolic syndrome.

EFFECTO COMPARATIVO DE DIFERENTES ACEITES UTILIZADOS PARA FREÍR SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA POSTPRANDIAL

Pérez Herrera A, Rangel Zúñiga OA, Torres Sánchez L A, Camargo Antonio, Luque de Castro D, Moreno Navarrete José M^a, López Miranda J, Pérez Jiménez F

Unidad de Investigación Lípidos y Arteriosclerosis, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía. Universidad de Córdoba. CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III. España. Departamento de Química Analítica, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba. & Departamento de Diabetes, Endocrinología y Nutrición. Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIGBI), España.
cm2prhea@uco.es

Introducción El aceite de oliva ha sido tradicionalmente el alimento principal que garantizaba el aporte de la grasa monoinsatura-

TRACK 4

T4:P.001

Tumor necrosis factor-alpha up-regulates chemerin secretion and mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes

Costa AGV^{1,2}, Prieto-Hontoria PL¹, Lorente-Cebrián S¹, Bressan J³, Martínez JA¹ and Moreno-Aliaga MJ¹¹Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology, University of Navarra, Pamplona, Spain;²Department of Zootecny, Federal University of Espírito Santo, Alegre, Brazil; ³Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil

Introduction: Chemerin is an adipokine that has been associated with some features of metabolic syndrome. Also, it has been suggested that obesity-linked low-grade chronic inflammation could regulate chemerin production. The aim of this study was to examine the effects of TNF- α on chemerin secretion and gene expression, as well as the signalling pathways involved in 3T3-L1 adipocytes.

Methods: Mature 3T3-L1 adipocytes were serum-starved for 3 hours before experimental period. Then, the cells were incubated during 24 hours with or without TNF- α (5 ng/ml). In some experiments, adipocytes were pre-incubated for 1 hour with the AMPK activator (AICAR) or with some protein kinase inhibitors: PI3K (LY294002), AMPK (Compound C), JNK (SP600125), MAPK (PD98059) and PKA (H89). Changes in chemerin mRNA expression were assayed using real-time RT-PCR and the amount of chemerin secreted into the media was measured by a specific ELISA kit.

Results: TNF- α treatment increased the total amount of chemerin secreted to the media (64.3%, $P < 0.05$) and up-regulated stimulated chemerin mRNA levels ($P < 0.01$). Moreover, treatment of control adipocytes with LY294002, H89 and AICAR inhibited both the secretion and mRNA expression of chemerin. However, only pre-incubation with LY294002 and H89 was able to reverse the stimulatory effect of TNF- α on chemerin gene expression and secretion to media. **Conclusion:** These results support the ability of TNF- α to positively regulate chemerin secretion and mRNA expression in adipocytes. Moreover, the PI3K and PKA pathways are likely to be involved in the effects of TNF- α on chemerin production.

Conflict of Interest: None.

Funding: This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2009-108073/ALI) and by Línea Especial about Nutrition, Obesity and Health (University of Navarra LE/97). A.G.V. Costa was supported by scholarship by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and by CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil.

T4:P.002

Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome

Meneses-Álvarez M^{1,2}, Camargo-García A^{1,2}, Cruz-Teno C^{1,2}, Jiménez-Gómez Y³, Pérez-Martínez P^{1,2}, Delgado-Lista J^{1,2}, Malagó n-Poyato MM³, Pérez-Jiménez F^{1,2}, Roche H⁴ and López-Miranda J^{1,2}¹Lipids and Atherosclerosis Research Unit, Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Córdoba, Spain;²Instituto de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Córdoba, Spain;³Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, Córdoba, Spain;⁴Nutrigenomics Research Group, UCD Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin, Dublin, Ireland

Introduction: Adipose tissue (AT) dysfunction is one of the main features in the metabolic syndrome (MetS), which is especially impor-

tant during the postprandial state. The aim was study the effect of four diets with different quantity and quality of fat on postprandial inflammatory response in AT.

Methods: A randomized, controlled trial conducted within the LIP-GENE study randomly assigned MetS patients (39) to 1 of 4 diets: high-SFA [HSFA; 38% energy (E) from fat, 16% E as SFA], high-monounsaturated fatty acid (HMUFA; 38% E from fat, 20% E as MUFA), and 2 low-fat, high-complex carbohydrate (LFHCC; 28% E from fat) diets supplemented with 1.24 g/d of long-chain n-3PUFA or placebo for 12 week each. A fat challenge with the same fat composition as the diets was conducted post intervention. Expression of the inflammatory genes, p65, IKK β , I κ B β , IL-6, MCP-1 and IL1 β , were measured post-intervention at postprandial state.

Results: We found a postprandial increase in NF- κ B p65 subunit gene expression after the consumption of the four diets, which was nevertheless only statistically significant after the consumption of LFHCC ($P = 0.044$) and LFHCC n-3 ($P = 0.038$) diets. Furthermore, we observed that IKK β ($P < 0.001$), MCP-1 ($P < 0.001$) and IL1 β ($P < 0.001$) gene expression was induced at postprandial state regardless of quantity and quality of fat in the diets. In addition, IL-6 transcripts were only detected in postprandial state.

Conclusions: Our results suggest that an exacerbated postprandial inflammatory response occurs in individuals with MetS, which is independent of the fat quantity and quality in the diet.

T4:P.003

Transcriptional control of obesity-induced inflammation in adipose tissue

Venteclaf N¹, Allil R¹, Treuter E² and Clement K¹¹INSERM U872, Nutriomique Team, Cordelier Research Center, Paris, France; ²Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Introduction: Obesity has become a global epidemic and is one the most significant public health challenges of the 21st century. In recent years, more and more evidence emerged that inflammation is the crucial physiological process in obesity complications. Studies from our group have reported how deregulation of adipose tissue secretory functions contributes to obesity complications. However, the precise molecular mechanisms that integrate the inflammatory response with metabolic homeostasis at the cellular and systemic level remain unclear. Based on previous implications we investigated here the role of a co-repressor complex (NCORs/GPS2) as a transcriptional key component of obesity-induced inflammation in human adipose tissue.

Methods: Gene expression and protein recruitment onto inflammatory gene promoters of co-repressor complex components were analyzed in human adipose tissue. In addition, siRNA experiments have been performed in human pre-adipocytes to characterize the biological function of the complex.

Results: Important core components of the co-repressor complex are differentially regulated in adipose tissue (AT) of non-obese versus obese subjects. Expression level of the co-repressor complex is associated with the AT inflammatory status of obese subjects. siRNA experiments reveal the importance of the complex in the control of adipose cell inflammation. Taken together, the data suggest that targeting the co-repressor complex could be an alternative strategy to control inflammatory processes linked to obesity.

Discussion: Our study extends the knowledge of anti-inflammatory mechanisms directed by the co-repressor complex and implies alternative strategies for the treatment of obesity complications.

T4:P.004

Withdrawn

