

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

**ESTUDIO DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LA EVALUACIÓN
DE LA DIETA MEDITERRÁNEA COMO PATRÓN DE DIETA SALUDABLE
EN POBLACIONES EUROPEAS**

ISABEL BONDIA PONS, 2007

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT: MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT

BIENNI 2002-2004

**ESTUDIO DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LA EVALUACIÓN
DE LA DIETA MEDITERRÁNEA COMO PATRÓN DE DIETA SALUDABLE
EN POBLACIONES EUROPEAS**

Memòria presentada per Isabel Bondia Pons
per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Directores de Tesis:

Dra. M. Carmen López Sabater

Dra. Ana I. Castellote Bargalló

Isabel Bondia Pons

ISABEL BONDIA PONS, 2007

Esta tesis ha sido financiada por el proyecto QLK1-CT-2001-00287 de la Unión Europea “*Effect of the Mediterranean Diet pattern in the Primary Prevention of CVD*” y por El Centre Català de Nutrició de l’Institut d’Estudis Catalans y Mercadona S.A. en relación a la *Encuesta Catalana de Salud y Alimentación ESCA 2002-2003*.

Asimismo Isabel Bondia Pons ha recibido una beca doctoral de “*Formación de Profesorado Universitario (F.P.U.)*” del Ministerio Español de Educación y Ciencia y una ayuda para una estancia breve de investigación de cuatro meses de duración en el Department of Food and Nutritional Sciences de la University College Cork de Irlanda.

Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos

The roots of science are bitter, but the fruit is sweet

(Aristóteles)

*A mis queridísimos padres y hermana Águeda, por ser siempre mi ejemplo, mi alegría,
mi apoyo y mi refugio.*

Son muchos los recuerdos acumulados durante estos cuatro años y dos meses de doctorado. Recuerdo la tarde lluviosa en la que acabé de metilar la muestra número mil de mis “queridos” ácidos grasos de plasma; la ilusión al poner caras en los congresos de Edimburgo y Barcelona a autores de algunos de mis artículos preferidos; las numerosas visitas técnicas para conseguir que finalmente nos cambiaran el inyector “*destroza agujas*” de mi caprichoso fast-GC; las amenas “*comidas de tuperware*” en las mesas de afuera durante los primeros veranos del doctorado; los mil inventos para codificar claramente las cajas analizadas de la red *PREDIMED* y el alivio de la organización de envíos de las muestras de la red *INMA*; la alegría al ver los coeficientes de variación después de mi primer kit *ELISA* de vitamina D en Irlanda; la sensación de bienestar tan gratificante durante mi exposición oral en el agradable meeting de los partners del *YOUNG Project* en Cork y al impartir mis primeras clases prácticas de Bromatología y Nutrición a alumnos de la Facultad de Farmacia; las largas horas de intentos fallidos “jugando” con esas bases de datos de SPSS que no paraban (ni paran!) de actualizarse; la “maratón” al regresar de Cork de hematócritos y ácidos grasos de las 150 ratas de uno de los últimos proyectos en el que he estado participando hasta diciembre de 2006, la sorpresa al insertar el artículo nº 1000 en mi base de *Reference Manager* de la sección de artículos leídos; las largas noches y fines de semana escribiendo tesis al llegar a casa después de todo un intenso y cansado día de experimental...hasta que Águeda me “obligaba” a parar en la madrugada; y un largo etc. Todos estos recuerdos no hubieran existido sin la presencia de gente a la que debo mis agradecimientos más sinceros.

En primer lugar, quiero agradecer de forma especial a mis dos directoras de tesis, las doctoras Carmen López-Sabater y Ana Isabel Castellote, la confianza que siempre han depositado en mí y en mi trabajo.

Gracias Carmen, por introducir a una química en el mundo de la nutrición (ya desde aquellas amenas clases en Ciencia y Tecnología de los Alimentos) y por tu constante insistencia en que este mundo me necesita como doctora!

Gracias Ana, por ponerme al frente del GC-2010 (comportando largas horas de insomnio, pero a la vez gratificantes “conversaciones químicas”) y por entender mi debilidad por el orden y el perfeccionismo.

Las dos sabéis lo que os aprecio y os deseo los mejores éxitos en vuestras actuales y futuras investigaciones.

Gracias al Ministerio de Educación y Ciencia por otorgarme una Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) para llevar a cabo mi tesis doctoral.

Special thanks to Dr. Mairead Kiely for giving me the chance to do a PhD-stay in her research group in the Dept. Food and Nutritional Sciences at the University College of Cork. It was a great pleasure and a very profitable, positive and encouraging experience! Many thanks to Prof. Morrissey for putting me in contact with Dr. Kiely and to Prof. Cashman for his kindness while I was working in the Bioscience Institute.

I also appreciate the warm welcoming I received from all the nice *SEAFOODPLUS* partners who attended the *YOUNG* meeting in Cork (*Muito obrigado! Esker mila! Takk!* and of course *Go raibh maith agaibh!*)

Thanks so much to Dr. George Paschos for his supervision and confidence in my ability during my visit to UCC, and to Dr. Thomas Hill for introducing me to the fascinating and complex world of vitamin D.

My most sincere thanks go to dearest Alice, for her generosity in sharing with me part of her PhD project during those unforgettable months, but overall for becoming such a great friend! You are next, dear Dr Lucey!

And of course, *thanks a million* (as you Irish say!) to my other dearest “Irish angels”: Eibhlís (thanks so much for your friendly support, future Dr O’Connor from Kerry!), Suzanne (many thanks my “Scot-quoting-teacher”!), Siobhan, Rachel, Sarah, Olivia and Eileen for all those great memories from in and outside the lab!

Gràcies al Professor Mariné per aconseguir amb la seva experiència i dedicació que la Enquesta de Salut i Alimentació Catalana fós una realitat al Departament de Nutrició i Bromatologia i per ser un excel·lent nexe d’unió amb l’Institut d’Estudis Catalans, facilitant sempre les qüestions més burocràtiques!

Gràcies al Prof. Serra-Majem pel seu interès, valuosa aportació i sàvia revisió de les publicacions sobre la ESCA 2002-2003, pel seu sempre amable tracte i per organitzar un dels congressos on he disfrutat més científicament durant aquests anys de doctorat!

Gracias a todos los partners del proyecto *EUROLIVE*, en especial a la Dra. Covas, por su dinamismo y siempre útiles comentarios. Gracias a todos los investigadores de los nodos de la red *PREDIMED*, en especial a la Dra. Lamuela por su excelente coordinación y liderazgo en relación al grupo de la UB. Gracias a los investigadores de la red *INMA*, en especial al Dr. Sunyé y al Dr. Ferrer por su accesibilidad y motivación. Y aunque no haya estado directamente vinculada a mi proyecto de tesis, también gracias a la Dra. Campoy por su amable trato desde aquella primera reunión de la red *INMA* en Granada. Y sobretodo gracias a todos los voluntarios que han participado en los diversos estudios en los que he trabajado durante estos años de tesis que desafortunadamente no han podido plasmarse al completo en esta memoria como hubiera sido mi deseo.

Gracias a la Dra. De Villa y al Dr. Ormazábal por ayudarme y alentarme con sus prácticos consejos en momentos claves de mi “autodidactismo” en el complejo (pero enriquecedor y adictivo) mundo del tratamiento estadístico por SPSS.

Gracias a la Dra. Barragán por su amabilidad, cercanía y útil ayuda para afrontar la última fase del camino! Llega la etapa de actualizar el currículum de nuevo!

Mis mejores deseos a todo el profesorado, personal y estudiantes del Departamento de Nutrición y Bromatología de la UB, que ha sido mi “segunda casa” durante estos años. En especial, muchas gracias a las doctoras Rosa Lamuela, Elvira López y Cristina Andrés por el siempre amable y cordial trato que me han demostrado, i com no, mil gràcies al sempre afable i amable Professor Boatella per la seva divertida i alegre salutació “*condicion sine qua non*” per creuar els pasadissos del departament!

Gràcies a la sempre pacient Montse pels seus alegres “bon dia” a l’entrar cada matí a treballar i per la seva ajuda amb els “faxos a l’estranger de la Isa”! (igual que vaig fer amb el fast GC-2010, crec que escriuré un PNT del nou fax...però aquest cop segons les normes “ISA” que no “ISO”!), y gracias también a Toñi y Montse por su efectividad y simpatía al llevarles los encargos de fotocopias, y como no, al siempre irónico y “gruñón-pero poco mordedor” Fernando que tras cuatro años de intentos fallidos ha acabado aprendiéndose el nombre de la “recicladora de papel” de Grasas II!

Grazie mille a la “*inimitable comunidad italiana*” (la Dra. Stefania Vichi, Tommy e Marika) por contagiarme desde mi primer día en el departamento su optimismo y sinceridad! Auguri e tanti grazie!, a la alegre y siempre “*fashionable*” fiel Lulú por ponerme siempre al día con sus amenas visitas al mundo de Grasas II y por sus prácticos y expertos consejos de diseño para el power point!, i a la Dra Gemma Brufau per les llargues hores compartides a la sala dels GC on somiàvem amb les nostres respectives estades a l’estranger that finally turned out to be true!

Y no, claro que no me olvido de los “*Des-Gras(i)ados II*”. Los que hace poco que se fueron: la pionera Dra. Gimeno, Roseta, Dra. Morera y el Dr. Sala (Aleix, gràcies pel teu constant i ja mític “la lluita continua” des de terres plujoses! arribant a Itaca!); los de siempre: Xellita y la “*couple de las enchiladas chilangas*”, Karinilla y Jorge (gracias Georgi, por los divertidos momentos musicales a dúo que amenizaban esas horas de trabajo cuando sólo quedabamos nosotros en el laboratorio! ánimo, que ya no te queda nada Dr Chávez!); y las que hace poco que llegaron: espero que els “*trucs de la Isa-©*” us siguin molt útils (gràcies Olga -“*Miss sucesora de Reds Temàtiques*”, per posar un toc d’humor a la meva última etapa al laboratori entre fosfolípid i fosfolípid! Ànims!).

Muchísimas gracias a todos mis amigos (nacionales e internacionales) por elogiar siempre mi trabajo aunque a veces no supierais de lo que estaba hablando! (It’s my friends who make my world! “*Isa’s viva*” will be properly celebrated!) y de forma especial a Doris, Thomas, San San y Lindsey.

Thanks so much dear Lindsey for your “*fine grammatical editing tips*” and those funny “*English pronunciation*”-Atlanta-BCN-web conferences! You know, if the financial world ever bores a bussiness man like you...consider scientific translations! (just joking!) Eh Mr Moshell, *Frau Doktor Oma Isa* got it!

Many thanks dearest San San for making me laugh with your witty sense of humour since the happy memories I have of your famous carrot cake and cool MSc graduation, and for all your sincere support in the last steps of my PhD. Keep up the good work, future Dr Kuang!

Vielen Dank lieber Thomas dafür, dass Du mit deiner treuen Unterstützung immer warst, trotz der Distanz Heidelberg-BCN! Der Kölner Dom wartet auf beide PhDs, Herrn Dr. Fagoziten!

Und herzlichen Dank liebe Doris für deine ehrliche Freundschaft seit unserer ersten Begegnung (that was thanks to “*der Boss*”... na klar!) bei dem unvergesslichen “*Naturin-Qualitätswesen Grillfest*” in Weinheim und für deine leckeren und so speziellen Weihnachtsplätzchen, die, davon bin ich überzeugt, “*Doktoratsvollenergie*” hatten!

Pero si hay tres personas a las que debo de forma muy especial que esta tesis empezara y haya llegado a su fin son sin duda mis queridísimos padres y hermana Águeda.

Mil gracias **queridísima Ague**, por las muchas horas de descanso que sé que te he robado “vilmente” para que me ayudaras en un millón de cosas!

Gracias *sister* por ser mi leal confidente, mi mejor amiga y mi perfecta asesora, por enseñarme a enfocar y solucionar los problemas de forma objetiva y valiente, y por seguir el hilo de mis historias sin desesperarte cuando “abro y minimizo” tantas ventanas a la vez! Y sobretodo gracias *Schwester* por ese espíritu viajero tan contagioso que tienes, que me ha permitido desconectar y vivir tantas “aventuras europeas” inolvidables (...y las que sé que nos quedan!) Siempre serás mi ejemplo de generosidad, profesionalidad y fuerza de voluntad.

Por cierto *Agüeda*, como experta en el mundo de patentes europeas, ¿crees que sería viable patentar la “*dieta-final-de-tesis-de-adelgazamiento-progresivo*” con Isa-marca registrada?...aunque lo sé, lo mejor es seguir la Genuina Dieta Mediterránea de mamá!

Y por supuesto, doy gracias a Dios por esos padres tan maravillosos. Gracias por inculcarme con vuestro ejemplo la importancia de trabajar con esfuerzo, dedicación y espíritu de superación; siempre de forma discreta, justa, ordenada y responsable; y de aprender a aceptar y luchar contra las injusticias y contratiempos siempre de forma serena y respetuosa. Gracias por apoyarme al 100% en mis decisiones y por esa infinita paciencia con vuestra hija “la científica”!

Queridísimo papá, ¿quién te iba a decir durante mis años de Químicas, cuando me ayudabas pacientemente en el salón de nuestra entrañable casa con aquellas libretas de laboratorio de Química Analítica, que tu hija pequeña acabaría defendiendo su tesis doctoral en la que fue tu antigua facultad?! Es que los genes son así de caprichosos mi querido *papucho*!...por cierto, ya sabía que todo un experto en bases de datos no diría que no a una ración XXL de bibliografía por ordenar!!! (lo prometido es deuda)

Y mi **Queridísima mamá**, si hay una *SOLA* cosa que tengo bien clara de esta tesis es que *NO* pienso comenzar a defenderla si no veo dentro de la sala a la persona que mejor me conoce y que me ha ayudado y apoyado *SIEMPRE* a seguir adelante en todo! Así que no vale que te quedes esperando afuera como pretendías! Además, estoy convencida que tus “*nervios de madre*” durante la exposición oral de mi defensa de tesis se acabarán en cuanto empiecen los míos con el turno de preguntas del tribunal!

...y que sepáis que el 2007 inauguraremos nuestros entrañables “*Natale in Roma*” con un alto en nuestra intensa ruta romana con un “*cappucino e Panettone*” que esta vez irá a cargo de la (esperemos) nueva doctora en la familia!

“O Signore, dammi acutezza nell’intendere, capacità nel ritenere, ordine e facilità nell’apprendere, sottigliezza nell’interpretare e nel parlare.”

(extracto de una hermosa lettera di S. Tommaso d’Aquino a uno studente que encontré en Santa Maria Novella en Firenze el 7 de Diciembre de 2006)

Abreviaturas utilizadas

a. año/s

ADN ácido desoxirribonucleico

AG ácido/s graso/s

AGE ácidos grasos esenciales

AGI ácidos grasos insaturados

AGL ácidos grasos libres

AGNE ácido graso no esterificado

ALA ácido α -linolénico

AGMI ácido graso monoinsaturado

AGPI ácido graso poliinsaturado

AGPI-CL ácido graso poliinsaturado de cadena larga

AGS ácido graso saturado

ARA ácido araquidónico

CG cromatografía de gases

c-HDL colesterol de lipoproteínas de alta densidad

c-LDL colesterol de lipoproteínas de baja densidad

AC análisis de clústers

CCF cromatografía en capa fina

CoA coenzima A

CHD enfermedad coronaria (*coronary heart disease*)

CVD enfermedad cardiovascular (*cardiovascular disease*)

CP consumo de pescado

DGLA ácido dihomo- γ -linolénico

DHA ácido docosahexaenoico

d_c diámetro interno de columna

$D_{m,0}$ coeficiente de difusión del analito en la fase gaseosa a la presión de salida

DM dieta mediterránea

DMT dieta mediterránea tradicional

EC éster/es de colesterol

EPA ácido eicosapentaenoico

f_2 factor de compresibilidad de un gas

FAD flavina adenina dinucleótido

FAME éster metílico de un ácido graso (*fatty acid methyl ester*)

FID detector de ionización de llama (*flame ionisation detector*)

GLCA ácido γ -linolénico

GTP Guanosín trifosfato

H hombre

HA hipertensión arterial

HDL lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*)
IM infarto de miocardio
L longitud de columna
LA ácido linoleico
LDL lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*)
LOD límite de detección
LT leucotrieno/s
M mujer
NAD dinucleótido adenina-nicotinamida (*nicotinamide adenine di-Nucleotide*)
 N_{req} número de platos teóricos de una columna cromatográfica
OMS Organización Mundial de la Salud
PA patrón alimentario
PAE patrón alimentario empírico
PAT patrón alimentario teórico
PC prostaciclina/s
PCA análisis de componentes principales (*principal components analysis*)
PDM patrón de dieta mediterránea
PG prostaglandina/s
PL fosfolípido/s
 p_0 presión a la salida de columna
 R_s grado de separación entre un par crítico de componentes
SD desviación estándar
SENC Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SPE extracción en fase sólida (*solid phase extraction*)
TCD Detector de conductividad térmica (*termic conductivity detector*)
TG triglicérido/s
TX tromboxano/s
 t_R tiempo de retención de un compuesto
 \bar{u} velocidad media del gas portador
 u_0 velocidad lineal del gas portador a la salida de la columna
VLDL lipoproteínas de muy baja densidad
 η viscosidad dinámica
 $1/\alpha$ inversamente proporcional

ÍNDICE

I. INTERÉS.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. PARTE BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. ÁCIDOS GRASOS: CLASIFICACIÓN, BIOSÍNTESIS, FUNCIONES Y FUENTES ALIMENTARIAS	5
1.1. Constitución química y clasificación de los ácidos grasos	5
1.2. Biosíntesis de los ácidos grasos	7
1.2.1. Vías biosintéticas	7
1.2.1.1. <i>Formación de ácidos grasos saturados</i>	8
1.2.1.2. <i>Formación de ácidos grasos insaturados</i>	8
1.2.1.3. <i>Formación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga</i>	9
1.2.2. Ácidos grasos esenciales	11
1.2.2.1. <i>El ácido linoleico, precursor de la serie n-6</i>	11
1.2.2.2. <i>El ácido α-linolénico, precursor de la serie n-3</i>	12
1.3. Principales funciones de los ácidos grasos	14
1.3.1. Combustible energético	14
1.3.2. Unidades estructurales de membranas	14
1.3.3. Precusores de la síntesis de eicosanoides	16
1.4. Fuentes alimentarias de los ácidos grasos	18
2. ÁCIDOS GRASOS COMO BIOMARCADORES LIPÍDICOS	22
2.1. En busca de un biomarcador de la ingesta total de lípidos	22
2.2. Elección del medio para la determinación de ácidos grasos en el organismo humano	22
2.3. Distribución lipídica del plasma humano	24
2.4. Factores que pueden influir en la determinación de la composición de ácidos grasos	25
2.5. Ácidos grasos y enfermedad cardiovascular	27
2.5.1. La arteriosclerosis	27
2.5.2. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular	31
2.5.3. El síndrome metabólico	42
2.5.4. Efecto de los ácidos grasos en la enfermedad cardiovascular	45
2.5.4.1. <i>Ácidos grasos saturados</i>	45
2.5.4.2. <i>Ácidos grasos monoinsaturados</i>	46
2.5.4.3. <i>Ácidos grasos poliinsaturados</i>	47
2.5.4.4. <i>Ácidos grasos trans</i>	60

2.6. Relación de los ácidos grasos con otras enfermedades.....	61
2.6.1. Cáncer y ácidos grasos.....	61
2.6.2. Artritis reumatoide y ácidos grasos.....	63
2.6.3. Depresión y ácidos grasos.....	66
2.6.4. Asma y ácidos grasos.....	68
3. LA DIETA MEDITERRÁNEA COMO PATRÓN DE DIETA SALUDABLE.....	70
3.1. La Dieta Mediterránea Tradicional.....	71
3.2. Evidencia de los beneficios de la Dieta Mediterránea a través de estudios científicos: del Estudio de los Siete Países a la actualidad.....	72
3.3. Principales fuentes de lípidos de la Dieta Mediterránea.....	77
3.3.1. El aceite de oliva, fuente de ácido oleico.....	77
3.3.2. El pescado, fuente de ácidos grasos de la serie n-3.....	80
3.4. El Patrón de la Dieta Mediterránea: enfoques metodológicos.....	84
3.4.1. Patrones alimentarios “definidos <i>a priori</i> ”.....	84
3.4.1.1. <i>El uso de índices para evaluar la adherencia a la dieta mediterránea.....</i>	<i>85</i>
3.4.1.2. <i>Las recomendaciones y objetivos nutricionales y la dieta mediterránea.....</i>	<i>88</i>
3.4.2. Patrones alimentarios “derivados <i>a posteriori</i> ”.....	90
3.4.2.1. <i>El análisis de componentes principales.....</i>	<i>90</i>
3.4.2.2. <i>El análisis de clusters.....</i>	<i>91</i>
4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EL ORGANISMO HUMANO.....	92
4.1. Extracción lipídica.....	92
4.2. Fraccionamiento lipídico.....	92
4.2.1. Cromatografía en capa fina.....	93
4.2.2. Extracción en fase sólida.....	93
4.3. Derivatización de los ácidos grasos.....	94
4.4. Análisis por cromatografía de gases.....	95
4.4.1. De la cromatografía de gases convencional a la cromatografía de gases rápida.....	97
4.4.1.1. <i>Conceptos teóricos.....</i>	<i>97</i>
4.4.1.2. <i>Estrategias para un análisis rápido por cromatografía de gases.....</i>	<i>99</i>
4.4.1.3. <i>Limitaciones instrumentales para un análisis de cromatografía de gases rápida.....</i>	<i>101</i>
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	104
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	104

2. PUBLICACIONES	106
2.1. Metodología Analítica	106
2.1.1. <i>Publicación 1</i> : Comparación de la cromatografía de gases convencional y rápida en la determinación de ácidos grasos en plasma humano.....	106
2.1.2. <i>Publicación 2</i> : Determinación de ácidos grasos de fosfolípidos en muestras biológicas por extracción en fase sólida y cromatografía de gases rápida.....	113
2.1.3. <i>Publicación 3</i> : Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography.....	119
2.2. Cumplimiento del Patrón de Dieta Mediterránea	141
2.2.1. <i>Publicación 4</i> : Identification of foods contributing to the dietary lipid profile of a Mediterranean population.....	141
2.2.2. <i>Publicación 5</i> : Compliance with the European and national nutritional objectives in a Mediterranean population.....	163
2.2.3. <i>Publicación 6</i> : <i>A priori</i> approach of the Mediterranean Diet in a population sample from coastal north-east Spain.....	171
2.3. Componentes lipídicos principales de la Dieta Mediterránea	189
2.3.1. <i>Publicación 7</i> : Moderate Consumption of Olive Oil by Healthy European Men Reduces the Systolic Blood Pressure in Non-Mediterranean Participants.....	189
2.3.2. <i>Publicación 8</i> : Long-chain n-3 fatty acids and classical cardiovascular disease risk factors among the Catalan population.....	194
2.3. Incidencia de los principales isómeros de los ácidos grasos trans y del ácido linoleico conjugado en la Dieta Mediterránea	213
2.4.1. <i>Publicación 9</i> : Evaluation of the main isomers of conjugated linoleic acid and trans fatty acid in a sample from Mediterranean north-east Spain.....	213
2.5. Ácidos grasos y patologías	230
2.5.1. <i>Publicación 10</i> : Fatty acid and diseases: does the current Catalan population follow the medical nutritional advice?.....	230
3. DISCUSIÓN GENERAL	246
3.1. Sobre la Metodología Analítica	246
3.2. Sobre el Cumplimiento del Patrón de Dieta Mediterránea	248
3.3. Sobre los Componentes lipídicos principales de la Dieta Mediterránea	250
3.4. Sobre la Incidencia de los principales isómeros de los ácidos grasos trans y del ácido linoleico conjugado en la Dieta Mediterránea	251
3.5. Sobre los Ácidos grasos y patologías	252
V. CONCLUSIONES	254
VI. BIBLIOGRAFÍA	256

VII. ANEXO.....	289
1. Trabajo de investigación realizado durante la estancia de formación en la University College Cork en Irlanda.....	289
1.1. Título, coordinadores y duración del trabajo de investigación.....	289
1.2. Objeto general de la estancia de investigación.....	289
1.3. Objetivos específicos del trabajo de investigación.....	290
1.4. Antecedentes bibliográficos.....	290
1.5. Diseño del estudio.....	294
1.6. Metodología experimental.....	294
1.7. Resultados.....	295
1.8. Discusión y conclusiones.....	297
2. Comunicaciones en forma de Póster presentadas durante la realización de la tesis doctoral.....	299
3.1. Listado de las comunicaciones.....	299
3.2. Pósteres.....	300
3. Indices de impacto de los artículos ya publicados.....	306
4. Currículum vitae de la doctorante.....	307

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1** Ejemplos de estructuras de AGS, AGMI y AGPI de la serie n-6.....pág. 6
- Fig. 2** Ejemplos de estructuras de los AGPI de la serie n-3.....pág. 7
- Fig. 3** Series de ácidos grasos n-7 y n-9.....pág. 9
- Fig. 4** Series de ácidos grasos n-6 y n-3.....pág. 10
- Fig. 5** Detalle de los principales componentes de la bicapa fosfolípida de la membrana celular.....pág. 15
- Fig. 6** Lugares de síntesis y perfiles de acción de los metabolitos más importantes del ARA en leucocitos, plaquetas y células endoteliales.....pág. 17
- Fig. 7** Síntesis de eicosanoides a partir de los AG de las series n-6 y n-3.....pág. 17
- Fig. 8** Metabolismo diferencial de los AGS, AGMI y AGPI tras la activación inflamatoria de la fosfolipasa A₂ (PLA₂).....pág. 18
- Fig. 9** Esquema de la transición de la pared arterial normal a la lesión aterosclerótica incipiente.....pág. 28
- Fig. 10** Esquema de la formación de la placa fibrosa-lipídica.....pág. 29
- Fig. 11** Esquema de la maduración de la placa aterosclerótica.....pág. 30
- Fig. 12** Esquema de las complicaciones trombóticas de la aterosclerosis.....pág. 30
- Fig. 13** Esquema de la regulación del metabolismo de la insulina.....pág. 34
- Fig. 14** Esquema de la regulación del metabolismo de la glucosa entre tejidos.....pág. 34
- Fig. 15** Esquema de los factores claves involucrados en los procesos de coagulación y de fibrinólisis.....pág. 40
- Fig. 16** Esquema de la interacción entre los posibles mecanismos de acción de los ácidos grasos EPA y DHA en la enfermedad cardiovascular.....pág. 52
- Fig. 17** Efectos del ratio de AG n-6/n-3 en la regulación de la inflamación.....pág. 53
- Fig. 18** Esquema de la supuesta zona de acción de los AGPI n-3 en la inhibición de la activación endotelial, potenciando así la disminución del proceso de aterogénesis temprana.....pág. 55
- Fig. 19** Esquema de los efectos diferenciales de la fagocitosis por macrófagos en la progresión y estabilidad de las placas de ateroma.....pág. 58
- Fig. 20** Esquema de los mecanismos de acción propuestos de los AGPI-CL n-3 en el crecimiento tumoral.....pág. 62
- Fig. 21** Estructura química de la fase estacionaria bis-cianopropilsiloxano.....pág. 96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ácidos grasos más comunes en los tejidos humanos.....	pág. 23
Tabla 2. Componentes lipídicos del plasma (g/l).....	pág. 25
Tabla 3. Contenido medio de AG y antioxidantes de la DMT de Creta en 1960.....	pág. 71
Tabla 4. Estudios destacados en la investigación de la asociación entre pescado y enfermedad cardiovascular.....	pág. 83
Tabla 5. Principales estudios realizados en base al índice MDS.....	pág. 87
Tabla 6. Objetivos nutricionales para la población española aprobados por la SENC.....	pág. 89
Tabla 7. Eluyentes y clases de lípidos eluidos con el método Kaluzny <i>et al.</i> , 1985.....	pág. 94

I. INTERÉS

I. INTERÉS

La composición lipídica del organismo humano refleja la formación endógena de lípidos así como la ingesta procedente de la dieta. Un exceso calórico no sólo de lípidos, sino también de los otros dos macronutrientes principales, carbohidratos y proteínas, puede conducir a un aumento de la concentración de triglicéridos en las células adiposas, siendo la obesidad visceral uno de los factores de riesgo de predisposición de la patología cardiovascular. Las enfermedades cardiovasculares son en la actualidad la principal causa de morbilidad y mortalidad en las sociedades industrializadas, por lo que las recomendaciones nutricionales constituyen un elemento clave en su prevención, control y tratamiento.

La creciente evidencia científica sugiere que ciertos patrones alimentarios pueden influir de forma favorable en la enfermedad cardiovascular modificando importantes factores de riesgo, tales como la dislipidemia, la obesidad, el estrés oxidativo y la hipertensión. Uno de estos patrones de dieta saludable es la denominada “Dieta Mediterránea Tradicional”, que fue definida como el patrón de dieta consumido en áreas productoras de aceite de oliva de la región mediterránea, especialmente de Creta, Grecia y sur de Italia a finales de los años 50 y principios de los años 60, y que se caracterizaba por un consumo de aceite de oliva como fuente principal de lípidos, un elevado consumo de alimentos de origen vegetal y de cereales no refinados, un consumo moderado a alto de pescado, un consumo moderado de leche, productos lácteos y vino, así como un bajo consumo de carne.

En base a los diversos estudios realizados por la comunidad científica al respecto, diversos organismos internacionales en el campo de la nutrición y la salud pública recomiendan la promoción de los hábitos dietarios derivados de la Dieta Mediterránea, destacando sus posibles efectos beneficiosos en las denominadas “enfermedades del siglo XXI”, que son principalmente las de origen cardiovascular, la diabetes, la obesidad, tanto adulta como infantil, así como diversos tipos de cáncer. La creciente incidencia durante los últimos años de estas patologías en las poblaciones europeas, sugiere una desviación de los “patrones alimentarios prudentes” a los denominados “patrones occidentales”, caracterizados por elevadas ingesta de grasas, carne y cereales refinados. Este hecho plantea la necesidad de preservar y promover la dieta mediterránea tradicional en la población europea, sin excepción de los “países mediterráneos” que le han dado origen.

Es por ello que la evaluación del grado de cumplimiento de la Dieta Mediterránea en la población actual a través de biomarcadores biológicos específicos resultaría de gran utilidad para poder establecer recomendaciones más precisas en los diferentes sectores de la población. Hasta la fecha, la determinación del perfil de ácidos grasos en diferentes muestras biológicas del organismo humano parece ser la forma más objetiva de obtener datos de ingesta lipídica. De esta forma, la cromatografía de gases se ha convertido en la técnica analítica indispensable para el estudio de la biosíntesis y metabolismo humano, permitiendo detectar y cuantificar cambios en ácidos grasos esenciales y no esenciales derivados de la ingesta alimentaria, siempre y cuando se hayan optimizado previamente todas las etapas de preparación y derivatización de la muestra. Así mismo, la reciente mejora en la instrumentación y en las columnas capilares permite un análisis del perfil total de ácidos grasos sensible, reproducible y rápido, de gran utilidad para su aplicación en análisis de rutina y en estudios con gran número de muestras.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es **evaluar la dieta mediterránea como patrón de dieta saludable en diversas muestras de la población europea a través del estudio de su perfil de ácidos grasos**. Para cumplir con este objetivo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- **Puesta a punto y validación de métodos analíticos** para la determinación del perfil de ácidos grasos totales, ácidos grasos de fosfolípidos, así como de los principales isómeros del ácido linoleico conjugado, mediante la técnica de cromatografía de gases rápida acoplada a la detección por ionización de llama en diversas muestras biológicas.
- **Identificar los alimentos** que contribuyen en mayor medida al perfil lipídico de la dieta de una muestra de la población mediterránea.
- **Evaluar el grado de cumplimiento de los actuales objetivos nutricionales nacionales y europeos**, así como del **patrón de “Dieta Mediterránea Tradicional”** en una muestra de la población mediterránea.
- **Investigar el efecto del componente lipídico principal de la dieta mediterránea, el aceite de oliva, en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular**, a través de la evaluación de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales (presión sanguínea, concentración de triglicéridos plasmáticos, colesterol total, colesterol-LDL y colesterol-HDL) y del perfil de ácidos grasos totales en plasma.
- **Examinar la relación entre el perfil de ácidos grasos plasmáticos totales y en fosfolípidos** de una muestra de la población mediterránea **con sus ingestas dietarias**, con especial atención en el aporte de **ácidos grasos polinsaturados de cadena larga de la serie n-3** a través del **consumo de pescado**.
- **Evaluar la incidencia de los principales isómeros de los ácidos grasos trans propios del “patrón alimentario occidental”** así como del **ácido linoleico conjugado** en una muestra de la población mediterránea.

- **Investigar la relación entre el perfil plasmático de ácidos grasos y el estado nutricional** de una muestra de la población mediterránea **con los factores de riesgo cardiovascular clásicos** (presión sanguínea, concentración de triglicéridos plasmáticos, colesterol total, colesterol-LDL y colesterol-HDL) **y diversas patologías** (diabetes, depresión, artritis reumatoide, asma y obesidad).

III. PARTE BIBLIOGRÁFICA

1. ÁCIDOS GRASOS: CLASIFICACIÓN, BIOSÍNTESIS, FUNCIONES Y FUENTES ALIMENTARIAS

1.1. CONSTITUCIÓN QUÍMICA Y CLASIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos (AG) son moléculas orgánicas constituidas por una cadena alquílica con un grupo carboxílico terminal. En el organismo humano se encuentran formando parte de la estructura básica de triglicéridos (TG), fosfolípidos (PL) y ésteres de colesterol (EC), hallándose en menor grado en forma de ácidos grasos libres (AGL) (Snider et al., 2006).

Su clasificación está basada en función de la longitud y el grado de insaturación de la cadena de carbonos (**Figuras 1 y 2**). Los ácidos grasos de interés biológico presentan número par de átomos de carbono y longitud de cadena entre 14 y 24 átomos. En función de la longitud de la cadena, se diferencian en ácidos grasos de cadena corta (4-6 carbonos), de cadena media (8-12 carbonos), de cadena larga (14-20 carbonos), y de cadena muy larga (≥ 22 carbonos). En el mundo animal, la cadena hidrocarbonada es en su mayoría no ramificada. En función del grado de insaturación, se distinguen ácidos grasos saturados (sin dobles enlaces en su estructura; AGS), monoinsaturados (con un doble enlace; AGMI), y poliinsaturados (con dos o más dobles enlaces en disposición metileno-interrupta; AGPI). Diversas propiedades de los lípidos constituidos por AG, tales como el punto de fusión o grado de fluidez, están directamente relacionadas con la longitud y grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada (Berg et al., 2001).

En la naturaleza, la disposición espacial de los dobles enlaces es casi siempre una conformación de tipo *cis*. Este hecho origina un ángulo en dicha posición, provocando un acodamiento en la molécula, que impide el empaquetamiento ordenado de las cadenas hidrocarbonadas, requiriéndose menor energía para romper las fuerzas intermoleculares entre los ácidos grasos insaturados (AGI) (McKee, 2003; Snider et al., 2006). Aunque no son mayoritarios, también existen AG con dobles enlaces en posición *trans*, con una disposición espacial ordenada similar a la de los AGS (Stender y Dyerberg, 2004; Reddy et al., 2004). Estos AG *trans* se forman por efecto de la flora luminal en los animales rumiantes o bien por transformación química en determinados procesos tecnológicos (Craig-Schmidt, 2006).

Debido a que el organismo humano no puede sintetizar de forma endógena todos los AG, cabe distinguir entre ácidos grasos no esenciales y ácidos grasos esenciales (AGE).

Estos últimos, que deben ser aportados a través de la dieta, son el ácido linoleico (18:2 n-6; LA) y el ácido α -linolénico (18:3 n-3; ALA), precursores de las series metabólicas n-6 y n-3 respectivamente (McNamara y Carlson, 2006; Smit et al., 2004).

Por convención, la nomenclatura de las “series n” para los AGPI, se basa en numerar el átomo de carbono con el primer doble enlace (también denominado “carbono ω ”), empezando por el extremo metílico del AG (Moyad, 2005). Así por ejemplo, los AGPI de las series n-3 y n-6 se caracterizan por tener su primer doble enlace en el carbono tres (ω -3) y seis (ω -6) respectivamente. Por su parte, el sistema de nomenclatura delta es útil para denominar todos los dobles enlaces, sus posiciones en la cadena de carbonos, así como las enzimas desaturasas específicas que catalizan su introducción en la molécula. De esta forma, los ácidos grasos esenciales se representan como C18:2 ^{Δ 9,12} (LA) y C18:3 ^{Δ 9,12,15} (ALA) respectivamente (Griffiths y Morse, 2006).

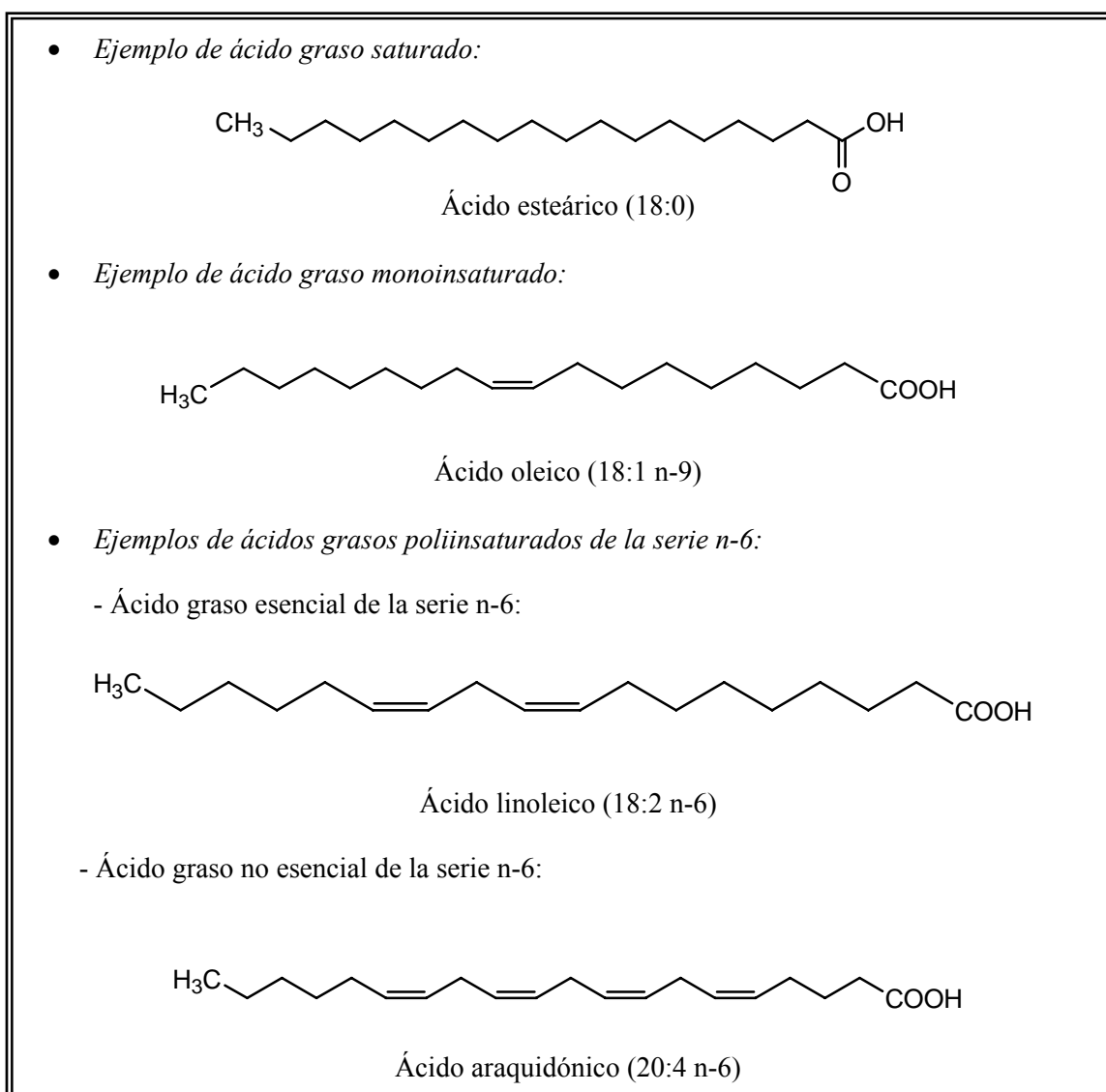


Figura 1. Ejemplos de estructuras de AGS, AGMI y AGPI de la serie n-6.

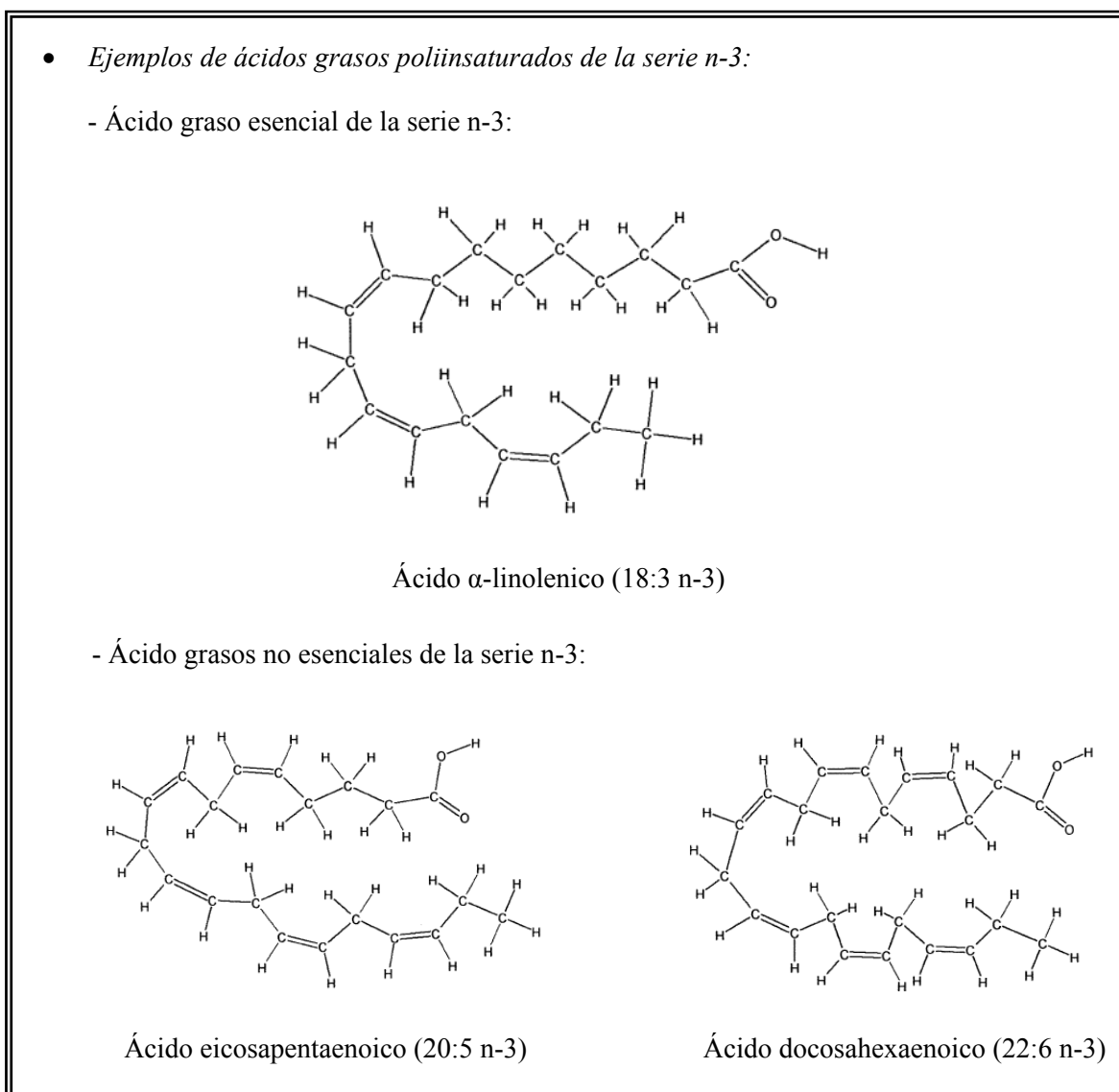


Figura 2. Ejemplos de estructuras de los AGPI de la serie n-3
(Figura adaptada de Holub y Holub, 2004)

1.2. BIOSÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

1.2.1. Vías biosintéticas

La glucosa es el mayor precursor para la síntesis de ácidos grasos. El exceso de carbohidratos de la dieta, que ya no se requiere para la producción de energía y síntesis de glucógeno, es convertido a ácidos grasos en el hígado en estados de no ayuno. La glucosa provee las moléculas de carbono para la síntesis de AG (via acetil CoA), así como el NADPH requerido para el proceso. Otros sustratos como algunos aminoácidos, también pueden contribuir a la lipogénesis (Saleh et al., 1999; Snider et al., 2006).

1.2.1.1. Formación de ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos saturados pueden sintetizarse de forma endógena en el organismo humano a través del acetyl CoA, metabolito procedente principalmente de la degradación de la glucosa así como de algunos aminoácidos. La síntesis es especialmente importante en hígado y tejido adiposo y se lleva a cabo en el citoplasma celular (Agostoni et al., 2001).

La formación del ácido palmítico (16:0) se realiza a expensas de ocho moléculas de acetyl-CoA. Como el acetyl-CoA no puede atravesar la pared mitocondrial, su salida al citoplasma exige un sistema especial que recibe el nombre de “lanzadera del citrato”. En este sistema, el citrato producido a partir del acetyl-CoA no sigue la vía del ciclo tricarboxílico para su degradación oxidativa con fines energéticos sino que abandona la mitocondria y regenera acetyl-CoA en el citoplasma. Para completar la lanzadera, el oxalacetato generado a partir del citrato debe ser recuperado en la mitocondria. Para ello se necesitan reacciones enzimáticas adicionales en una de las cuales se genera NADPH, que se va a utilizar posteriormente en la biosíntesis del ácido graso. Así, el acetyl-CoA es activado en presencia de CO₂ y por medio de la acetyl-CoA carboxilasa se transforma en malonil-CoA (Mataix, 2002).

En el primer ciclo de la síntesis, el malonil-CoA se condensa con otra molécula de acetyl-CoA y el β-ceto compuesto resultante es reducido y deshidratado hasta formar un acil-CoA saturado con cuatro átomos de carbono. En cada uno de los ciclos posteriores se van añadiendo dos unidades de carbono gracias a la intervención de una serie de enzimas denominadas ácido graso sintetasa. El primer AGS resultante es el ácido palmítico. Las enzimas implicadas en la biosíntesis son activadas por concentraciones altas de hidratos de carbono y por concentraciones bajas de lípidos, e inhibidas por un elevado aporte de grasas con la dieta o por niveles elevados de AGPI (Agostoni et al., 2001).

1.2.1.2. Formación de ácidos grasos insaturados

La síntesis citoplasmática de ácidos grasos finaliza con la formación del ácido palmítico. Los demás ácidos grasos saturados de mayor longitud de cadena y los insaturados se originan a partir del palmítico por procesos de elongación y desaturación. Estas reacciones se desarrollan sobre todo en el retículo endoplasmático de las células hepáticas (Mataix, 2002).

La elongación se realiza de forma análoga a la citoplasmática por sistemas enzimáticos de operatividad constante. La actuación de estas elongasas sobre el ácido palmítico origina el ácido esteárico (18:0) y homólogos superiores menos abundantes.

La desaturación es obra de sistemas enzimáticos complejos, que incluyen proteínas enzimáticas, flavoproteínas y citocromos, necesiéndose la presencia de oxígeno y poder reductor. Las desaturasas introducen el doble enlace en posiciones específicas. La $\Delta 9$ -desaturasa está distribuida en los seres vivos de forma amplia y es responsable de la formación del ácido palmitoleico (16:1 n-7) a partir del palmítico, y del ácido oleico (18:1 n-9) a partir del ácido esteárico (Mataix, 2002).

1.2.1.3. Formación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

La actuación de las elongasas y desaturasas sobre los ácidos palmitoleico, oleico, linoleico y α -linolénico, origina cuatro series de ácidos grasos denominadas n-7, n-9, n-6 y n-3 respectivamente (**Figuras 3 y 4**). Las dos últimas corresponden a las series generadas a partir de los dos ácidos grasos esenciales para el organismo humano. Los sistemas enzimáticos que intervienen en estas vías son fundamentalmente hepáticos, aunque también existen en la glándula mamaria de madres lactantes (Mataix, 2002). Cada una de las series incluye ácidos grasos relacionados metabólicamente entre sí. Pero en ningún caso puede sintetizarse alguno de estos compuestos a partir de un AG de otra serie.

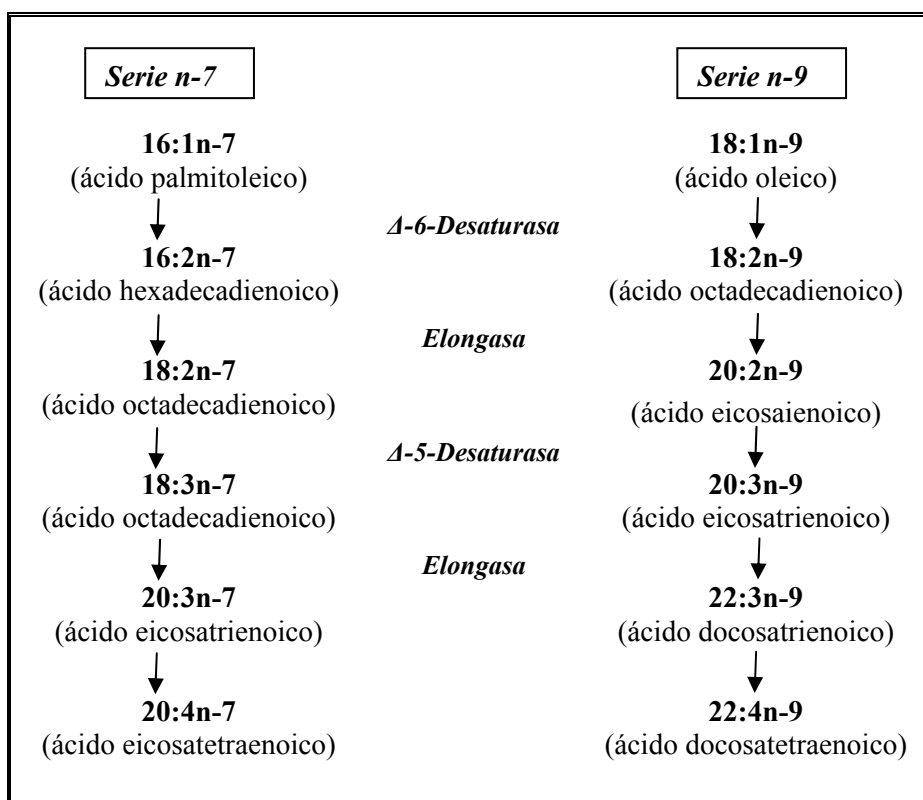


Figura 3. Series de ácidos grasos n-7 y n-9.

Cada elongasa o desaturasa puede actuar indistintamente sobre ácidos grasos de cualquiera de las series en las etapas correspondientes, conllevando fenómenos de competencia entre las series. Las elongasas y desaturasas, especialmente la $\Delta 6$ -desaturasa, tienen más afinidad por los AG más insaturados (serie n-3) (Nakamura y Nara, 2003). No obstante, este efecto puede ser contrarrestado por la mayor cantidad de los derivados de la serie n-6 que se encuentran generalmente en la mayoría de dietas actuales. El orden de preferencia de actuación de las enzimas desaturasas por las diferentes series de ácidos grasos está establecido en $n-3 > n-6 > n-9$ (Innis, 1991; Innis, 2005). Así, debido a su naturaleza competitiva y su diferente papel biológico, es importante mantener un equilibrio entre los AG de la serie n-3 y n-6 de la dieta (Smit et al., 2004). Si se consume mucho LA y poco ALA, la vía prioritaria de actuación de las enzimas será la n-6, con inhibición de las etapas correspondientes en las otras series.

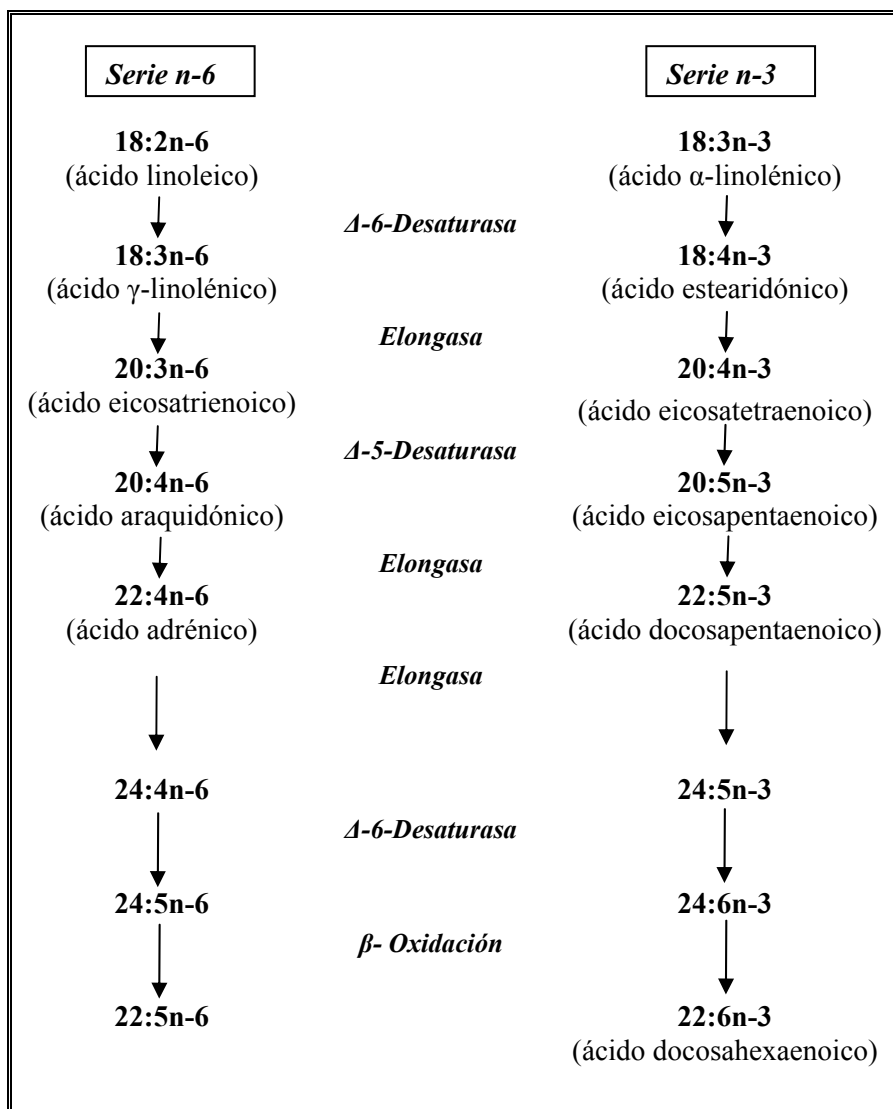


Figura 4. Series de ácidos grasos n-6 y n-3.

1.2.2. Ácidos grasos esenciales

Los ácidos grasos esenciales para el organismo humano son el ácido linoleico, precursor de la serie n-6, y el ácido α -linolénico, precursor de la serie n-3. Ambos son sintetizados en los organismos vegetales mediante reacciones químicas vinculadas indirectamente con la síntesis de la clorofila, en las que intervienen las enzimas Δ 12- y Δ 15-desaturasa (Calder, 2004; Moyad, 2005) no pudiendo ser sintetizados en los animales al carecer éstos de la enzima desaturasa que inserta el doble enlace en las posiciones n-6 y n-3 de la cadena de átomos de carbono del ácido graso (Roche, 1999; Nakamura y Nara, 2003). Sin embargo, su esencialidad para los mamíferos se demostró hace ya más de 75 años (Burr y Burr, 1929; Burr y Burr, 1930).

Se estima que las necesidades mínimas de linoleico y α -linolénico en humanos son respectivamente del 1% y 0.2% de la ingesta energética diaria (Calder, 2004). Las recomendaciones de ingesta saludable para la población en general, por parte de diversos organismos internacionales, son del orden del 3% y 0.7% respectivamente (Cunnane S. en nombre de *The International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL)* 2004; Wijendran y Hayes, 2004). Sin embargo, algunas de las dietas occidentales actuales sólo cubren un 50% de la ingesta diaria de ALA recomendada (Bourre, 2005).

La deficiencia en ácidos grasos esenciales se caracteriza por la aparición en plasma de cantidades superiores a las normales del ácido eicosatrienoico (20:3 n-9). Este hecho se debe a la conversión de ácido oleico a ácido eicosatrienoico como consecuencia de la potenciación de la serie n-9 cuando los niveles de los ácidos LA y ALA son bajos. Entre los signos clínicos de la deficiencia en AGE se encuentran la reducción de peso del cerebro y del cuerpo, cambios en la piel, infertilidad, pérdida de tonificación muscular, cambios degenerativos renales, pulmonares y hepáticos, aumento de la susceptibilidad a infecciones, así como cambios de comportamiento (Smit et al., 2004).

1.2.2.1. El ácido linoleico, precursor de la serie n-6

El ácido linoleico, precursor de la serie n-6, es el ácido graso esencial de mayor consumo. Su predominio refleja el hecho de ser el AGPI más común incorporado en los fosfolípidos dinámicos (especialmente lecitina) necesarios para la estructura de las membranas y lipoproteínas de alta densidad (HDL) involucradas en el transporte lipídico. Su elongación y desaturación da lugar a la formación de ácido araquidónico (20:4n-6; ARA), un ácido graso participante en el control de numerosas actividades celulares en el organismo humano (Das, 1999; Funk et al., 2001; Nakamura et al., 2001, Wijendran y Hayes, 2004; Sacks y Campos, 2006).

Diversos estudios han mostrado el efecto del ácido linoleico sobre los niveles plasmáticos de colesterol total y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Hayes, 2000; Mensink et al., 2003) en la reducción del riesgo de enfermedad coronaria (CHD) (Riemersma et al., 1986; Dolecek, 1992; Roberts et al., 1993; Iso et al., 2002; Wijendran y Hayes, 2004; Hooper et al., 2006). Paralelamente, mecanismos de actuación relacionados con el proceso inflamatorio han demostrado recientemente una influencia beneficiosa de este ácido graso en la enfermedad cardiovascular (Sacks y Campos, 2006). Todos estos aspectos serán tratados más detalladamente posteriormente en el apartado 2.5.4.3.

1.2.2.2. El ácido α -linolénico, precursor de la serie n-3

La importancia en el organismo humano del ácido α -linolénico y de otros ácidos grasos de la serie n-3, principalmente el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3; EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6n-3; DHA), ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) ha quedado demostrada a través de la numerosa evidencia científica disponible (Mori y Beilin, 2001; Schmidt et al., 2006; Chalon, 2006; Freemantle et al., 2006; Bakewell et al., 2006; Hibbeln et al., 2006). Se cree que la esencialidad del ácido α -linolénico podría deberse principalmente al hecho de ser el sustrato para la síntesis de los AGPI-CL n-3, EPA y DHA (Sinclair et al., 2002) ya que actualmente todavía es difícil adjudicar efectos funcionales específicos directamente al ácido α -linolénico (Burdge, 2006).

La conversión del ácido α -linolénico a sus derivados de cadena larga no se considera del todo eficiente en humanos. Estudios realizados con isótopos estables, así como estudios en los que voluntarios aumentaron su ingesta diaria de ALA durante un período determinado, han mostrado conversión de ALA a EPA y 22:5n-3, pero limitada conversión a DHA (Finnegan et al., 2003; Hussein et al., 2005; Burdge y Calder, 2005; Williams y Burdge, 2006). En el caso de las mujeres el porcentaje de conversión es mayor debido posiblemente a un efecto regulador estrógeno (Burdge et al., 2002; Pawlosky et al., 2001; Pawlosky et al., 2003; Burdge, 2006). Paralelamente, procesos de envejecimiento, enfermedad y estrés, así como un consumo excesivo de ácidos grasos de la serie n-6, pueden modificar también la conversión de ácido α -linolénico a sus ácidos grasos derivados (Bourre, 2004). Todo ello implica que la forma más sencilla de aumentar los niveles de los AGPI-CL n-3 en el organismo humano es a través de su consumo directo, principalmente a través del consumo de pescado.

Los AGPI-CL n-3 son componentes estructurales básicos de los fosfolípidos de las membranas de los tejidos del organismo humano, siendo especialmente abundantes en retina y cerebro, en donde el DHA constituye más del 26% del total de ácidos grasos (SanGiovanni y Chew, 2005; McNamara y Carlson, 2006).

Estos ácidos contribuyen en numerosas propiedades de las membranas como su fluidez, flexibilidad y permeabilidad, siendo esenciales para un correcto funcionamiento de los tejidos (Muskiet et al., 2004). Conviene destacar que los AGPI-CL son necesarios desde la misma concepción del individuo (Arterburn et al., 2006). Contenidos más elevados de estos ácidos en la circulación fetal que en la materna, fenómeno que recibe el nombre de *biomagnificación* (Innis, 1991; Helland et al. 2006), sugieren un papel más importante para el transporte transplacental que su propia síntesis a nivel fetal. De aquí que la relación entre el estatus fetal y maternal de estos ácidos grasos y su reducido almacenamiento por parte de la madre durante el embarazo y la lactancia, reflejen la necesidad de un elevado aporte de los mismos en la dieta materna (Hornstra, 2000; Lauritzen et al., 2001). Tanto es así que diversos estudios han mostrado que un alto estatus de DHA en la madre, así como un mayor consumo de pescado durante el embarazo, se han relacionado con beneficios para el desarrollo del niño, entre los que destacan principalmente los de carácter visual y cognitivo (Helland et al., 2003; Innis, 2005; Oken et al., 2004; Oken et al., 2005; Cheatham et al., 2006).

Otra importante característica de los ácidos grasos de la serie n-3 es su papel en la prevención y modulación de variadas patologías, comunes en las civilizaciones occidentales (Hibbeln et al., 2006). Numerosos estudios científicos (Hu et al., 1999; Djousse et al., 2001; Wang et al., 2006; Djousse et al., 2005; Harper y Jacobson, 2005; Harris, 2005; Schmidt et al., 2006; Breslow, 2006; Psota et al., 2006; Engler y Engler, 2006) han puesto de manifiesto la acción protectora de los AGPI-CL n-3 contra la enfermedad cardiovascular (comentada más extensamente en el apartado 2.5.4.3.)

Además de la enfermedad cardiovascular, existen otras patologías que pueden verse favorablemente influidas por los AGPI n-3. Entre éstas destacan enfermedades relacionadas con la deficiencia de AGE en las primeras etapas de la vida, que afectan al desarrollo visual y conductual del niño (Hodge et al., 2005; Lewin et al., 2005; Dijk-Brouwer et al., 2005; Muskiet et al., 2006), desórdenes psiquiátricos (Logan, 2004; Schachter et al., 2005; McNamara y Carlson, 2006), trastornos autoinmunes como el lupus o la nefropatía (MacLean et al., 2004), función cerebral (Freemantle et al., 2006; Chalon, 2006; Birberg-Thornberg et al., 2006), la enfermedad de Crohn (Connor, 2000), diversos cánceres (Larsson et al., 2004; Hooper et al., 2006; MacLean et al., 2006), la osteoporosis (Fernandes et al., 2003), el asma y patologías alérgicas (Prescott y Calder, 2004; Wong, 2005) y la artritis reumatoide (Rennie et al., 2003).

Así mismo, los AGPI-CL despiertan un interés creciente como moduladores de expresión genética (“interacción dieta-genes”), implicándose en el crecimiento y desarrollo del individuo (Horton y Shimomura, 1999; Michalik et al., 2003).

1.3. PRINCIPALES FUNCIONES DE LOS ÁCIDOS GRASOS

1.3.1. Combustible energético

En el organismo humano, los lípidos constituyen una forma eficaz y concentrada de almacenamiento de energía. La mayoría de ácidos grasos, especialmente saturados y monoinsaturados, tienen un destino fundamentalmente energético mediante su degradación oxidativa (Saleh et al., 1999; Doege y Stahl, 2006). La degradación energética de los AG tiene lugar en la mitocondria y es importante en todos los tejidos que contienen dichos orgánulos celulares, especialmente hígado, miocardio y músculo esquelético, con la notable excepción del cerebro (Mataix, 2002).

La oxidación de los ácidos grasos consiste en un proceso cíclico en el que se van produciendo de forma sucesiva moléculas de acetil CoA como resultado de una oxidación en carbono β con el concurso de las coenzimas FAD y NAD. Las formas reducidas de ambas coenzimas (FADH_2 y $\text{NADH}+\text{H}^+$) conectan directamente con las cadenas de transporte electrónico respiratorio produciendo así una importante cantidad de ATP. Las moléculas de acetil CoA ingresan por su parte en el ciclo de Krebs con producción final de coenzimas reducidas y GTP (Snider et al., 2006). Cabe destacar que si bien los derivados activados (acil CoA) de los AG de cadena corta y media pueden entrar sin problemas en la mitocondria para ser utilizados directamente, los de los AG de cadena larga necesitan de la intervención de la carnitina para penetrar en la mitocondria. La carnitina, compuesto derivado de la lisina, se sintetiza perfectamente en el organismo siempre que se disponga de cantidades suficientes de lisina, metionina, niacina, piridoxina y ácido ascórbico (Mataix, 2002).

1.3.2. Unidades estructurales de membranas

La membrana celular no es una barrera rígida que separa el espacio intracelular del extracelular, sino que representa un sistema dinámico en constante renovación, que se adapta en función de las aportaciones y demandas energéticas del organismo (Heller et al., 2003). Está formada por una bicapa fosfolipídica (**Figura 5**) donde coexisten fosfolípidos, colesterol y proteínas (Berg et al., 2001). La fluidez de membrana, que debe mantenerse dentro de un rango determinado para presentar la mejor funcionalidad, viene influenciada por la naturaleza de los ácidos grasos que componen los fosfolípidos, así como por las interacciones entre estos y el colesterol, y entre proteínas y lípidos (Griffiths y Morse, 2006). Los AGS se disponen de forma empaquetada, formando una estructura casi cristalina, con muy poco movimiento. Contrariamente, los AGI ocupan mayor espacio y son más móviles, permitiendo un mejor desplazamiento de las proteínas a través de la bicapa fosfolipídica, y una mayor permeabilidad de membrana (Li et al., 2005).

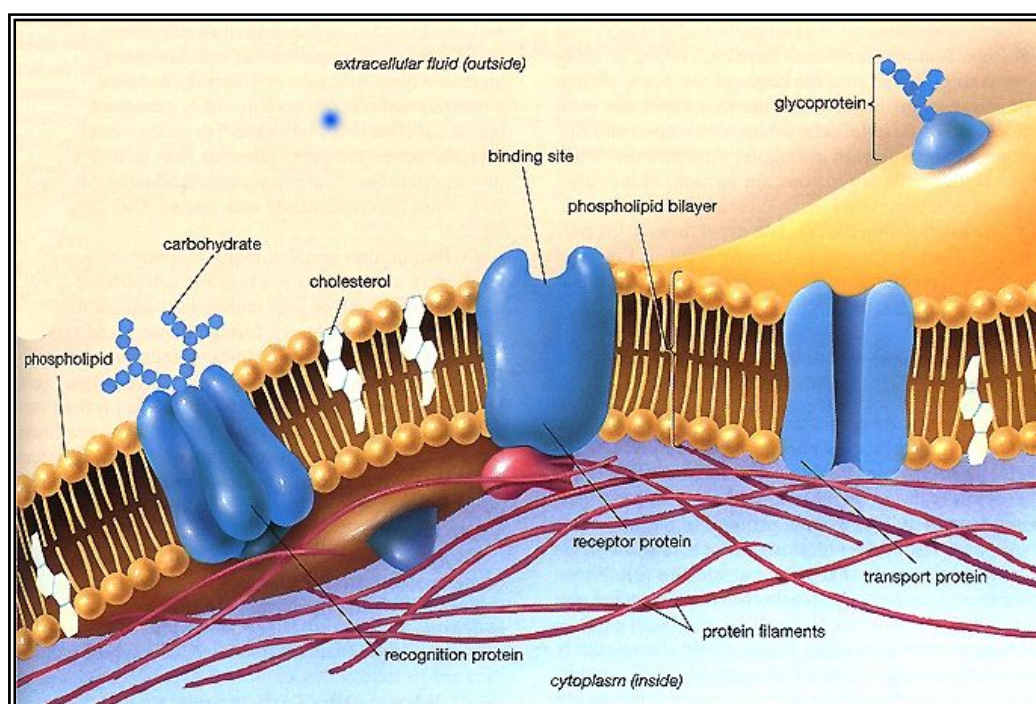


Figura 5. Detalle de los principales componentes de la bicapa fosfolipídica de la membrana celular. (Figura adaptada de www.elienmelien.tripod.com)

El grado de insaturación de los ácidos grasos no influye únicamente en la fluidez de la membrana sino que se relaciona también con su facilidad de oxidación. Los AGPI son muy oxidables pudiendo llegar a peroxidarse, afectando seriamente la integridad de la membrana y las funciones que desempeña (Berg et al., 2001). Sin embargo, hay que destacar que los AGPI contribuyen significativamente a las propiedades biofísicas de las bicapas fosfolipídicas proporcionando un entorno apropiado para las actividades de las proteínas asociadas a membrana (Mitchell et al., 2003), siendo algunos de ellos sustrato para la biosíntesis de mensajeros en etapas de señalización (Lewis et al., 1990; Tilley et al., 2001).

La composición de AGPI de la dieta y de las membranas celulares, y en particular la cantidad relativa de AGPI n-3 y n-6, produce cambios significativos en la función celular (Bakewell et al., 2006). Este hecho ha sido estudiado extensamente tanto en el sistema nervioso como en el sistema inmune (Innis, 2005; Calder, 2004). Por tanto, una óptima función tisular requiere de un suministro adecuado de AGPI a través de la dieta para que puedan ser incorporados en las membranas celulares.

1.3.3. Precursores de la síntesis de eicosanoides

Los eicosanoides son una serie de compuestos de gran actividad biológica, de vida corta, derivados de tres ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono, el ácido eicosatrienoico (20:3n-6; ácido dihomo- γ -linolénico; DGLA), el ácido araquidónico y el ácido eicosapentaenoico (Agostoni et al., 2001). Su síntesis se realiza a partir de los ácidos grasos precursores, una vez liberados de los fosfolípidos de membrana que los contienen por la acción de varias fosfolipasas. Seguidamente, dichos AGPI sirven de sustrato a las enzimas ciclo-oxigenasas (COX-1, una enzima constitutiva; COX-2, una enzima inducible), lipoxigenasas (5-, 12-, y 15-lipoxigenasa), y citocromo P450 mono-oxigenasas. Al carecer las enzimas de especificidad, puede existir competencia entre sustratos distintos para formar eicosanoides (Grimm et al., 2002). Las ciclo-oxigenasas dan lugar a prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX), mientras que las lipo-oxigenasas producen leucotrienos (LT), hidroxiácidos y lipoxinas. La oxidación de los AGPI mediada por la mono-oxigenasa citocromo P-450 genera hidroxi-, dihidroxi- y epoxi-ácidos (Larsson et al., 2004). Su distribución tisular es variable. Mientras las prostaglandinas se forman prácticamente en todos los tejidos, el resto de eicosanoides tiene localizaciones menos generalizadas. Los TX son característicos de las plaquetas, las prostaciclina (PC) se producen en el endotelio arterial y los LT son de origen principalmente leucocitario (Heller et al., 2003).

Las funciones de los eicosanoides son muy diversas. Estas moléculas, consideradas poderosos reguladores autocrinos y paracrinos de las funciones celulares y tisulares (Uauy et al., 1999; Uauy et al., 2001) son capaces de inducir fenómenos biológicos de fundamental importancia. Entre sus funciones destacan la contracción y la relajación de la musculatura lisa, el control del tono vascular, la agregación y anti-agregación plaquetaria, así como efectos en la respuesta inmune (Francois y Coffman, 2004; Moyad, 2005; Plat y Mensink, 2005).

En general, los eicosanoides derivados del ARA (**Figura 6**) tienen carácter pro-inflamatorio y proagregante (Tapiero et al., 2002; Innis, 2003; Calder, 2006) mientras los derivados del EPA son anti-inflamatorios e inhiben la agregación plaquetaria (Din et al., 2004) (**Figuras 7 y 8**). El balance de los precursores de estos eicosanoides difiere ampliamente en los diferentes tejidos humanos, reflejando diferentes hábitos dietéticos entre la población mundial (Lands, 2005). Así por ejemplo, la dieta de la mayoría de las sociedades actuales presenta mayores aportes de AG de la serie n-6 *versus* los AG de la serie n-3. Una de las posibles estrategias para reducir la síntesis de eicosanoides proinflamatorios sin aumentar los niveles plasmáticos del AG precursor, podría consistir en promover la producción de inhibidores naturales del ARA, tales como el ácido dihomo- γ -linolénico a través del aporte del ácido γ -linolénico (Brooke et al., 2000).

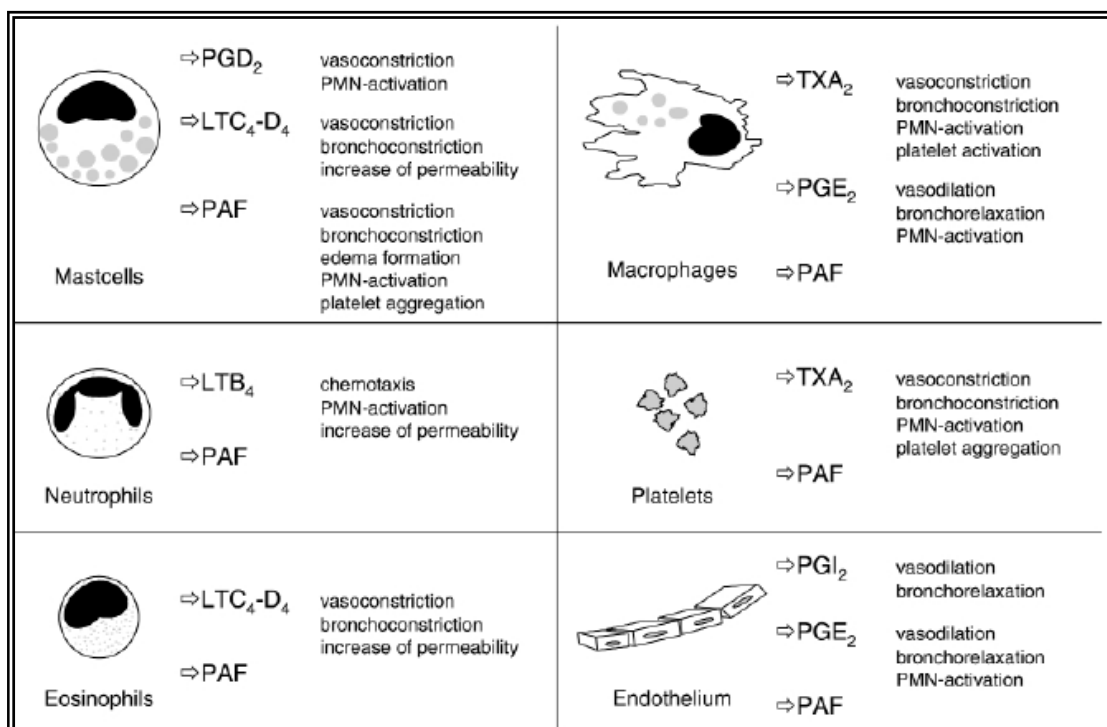


Figura 6. Lugares de síntesis y perfiles de acción de los metabolitos más importantes del ARA en leucocitos, plaquetas y células endoteliales. (LT, leucotrieno; PAF, factor activador plaquetario; PG, prostaglandina; TX, tromboxano) (Figura adaptada de Heller et al., 2003)

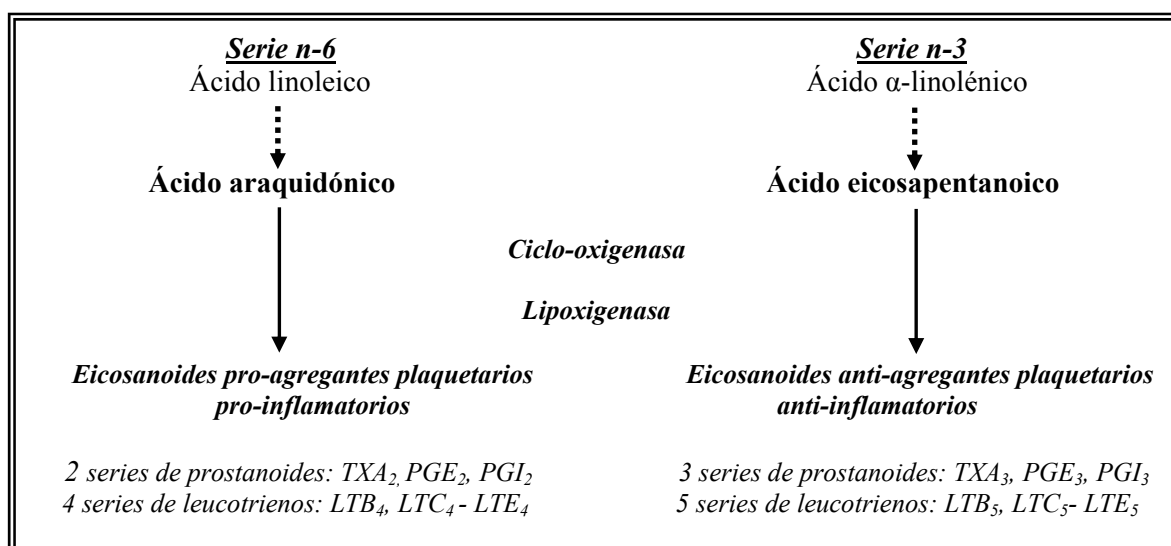


Figura 7. Síntesis de eicosanoides a partir de los AG de las series n-6 y n-3.

Los eicosanoides son conocidos en el argot médico con el nombre de “mediadores locales”, ya que generalmente llevan a cabo sus funciones en el lugar donde se producen, debido a su corta vida media y a su rápida inactivación enzimática (Heller y Koch, 2000).

Además de las anteriores funciones, los ácidos grasos están involucrados en la regulación genética (Jump y Clarke, 1999; Sampath y Ntambi 2005), en el transporte y disposición del colesterol (Ostlund et al., 2002) son responsables de la impermeabilidad de la piel al agua, y de la regulación de la permeabilidad en el intestino y otros tejidos (Norlen y Al-Amoudi, 2004; de Jager et al., 2004).

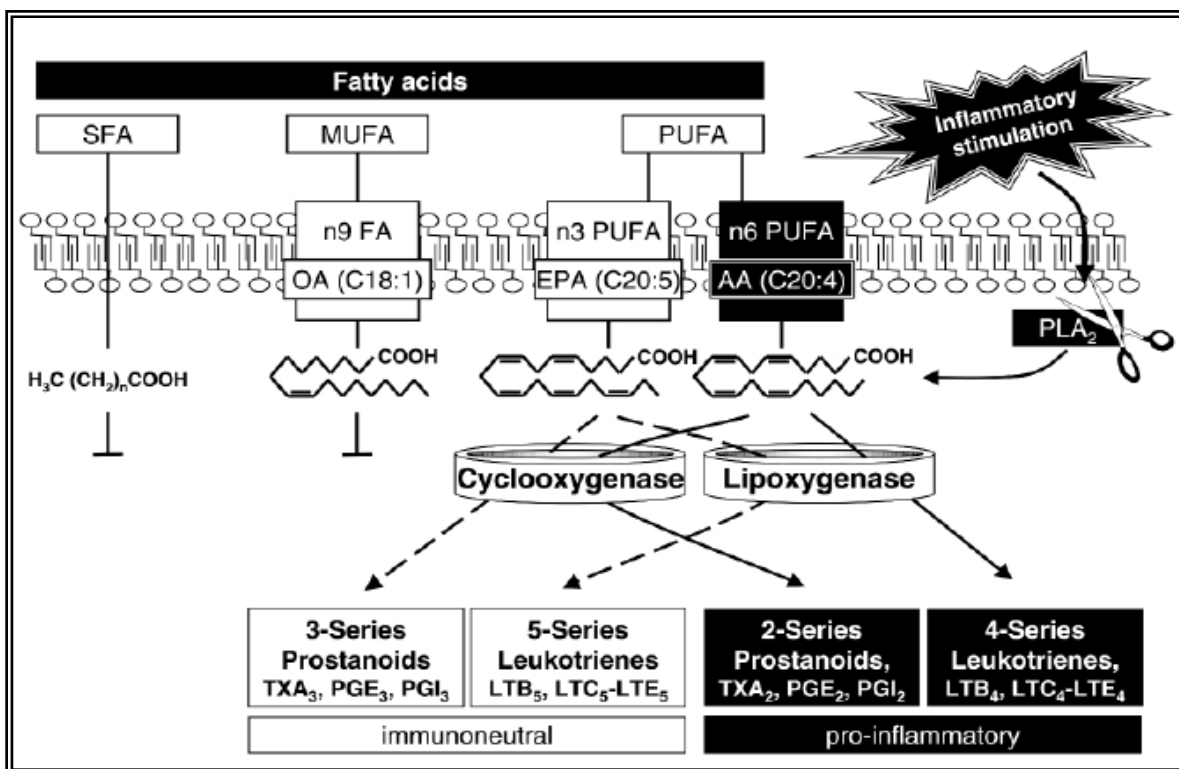


Figura 8. Metabolismo diferencial de los AGS, AGMI y AGPI tras la activación inflamatoria de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). La fosfolipasa A₂ libera AG de los TG de membrana (representado por unas tijeras). (Figura adaptada de Heller et al., 2003)

1.4. FUENTES ALIMENTARIAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Desde un punto de vista alimentario, los ácidos grasos se encuentran presentes mayoritariamente formando parte de la estructura de triglicéridos.

Los ácidos grasos saturados se hallan principalmente en productos de origen animal, tales como la mantequilla, el queso, la leche entera y las carnes grasas; así como en productos manufacturados como pasteles, galletas, *fast food*, o helados (Chong et al., 2006). Los AGS se pueden encontrar en grandes cantidades en aceites vegetales de palmiste, palma y coco (Mataix, 2002). Entre todos los ácidos grasos saturados, el ácido palmítico es el más abundante en la dieta humana, formando parte de carnes, productos cárnicos y algunos aceites vegetales. Otros AGS son el ácido esteárico y el ácido mirístico, presentes principalmente en grasa cárnica y láctica.

Para evitar un consumo excesivo de AGS, conviene establecer unos hábitos alimenticios saludables que comprendan una selección y un equilibrio energético de las fuentes de estos ácidos grasos. Así por ejemplo, los alimentos de origen lácteo no deben excluirse de la dieta habitual de la población debido a su perfil lipídico, ya que son una conocida fuente de calcio y de otros nutrientes beneficiosos para el organismo humano, y un consumo adecuado ha mostrado incluso beneficios en el desarrollo de la enfermedad coronaria en el recientemente publicado “*CARDIO2000 Study*” (Kontogianni et al., 2006).

Entre los ácidos grasos monoinsaturados, el de mayor importancia nutricional es el ácido oleico, que se halla en proporción abundante en el aceite de oliva, y en determinados aceites de canola (Reddy y Katan, 2006). Mientras el aceite de oliva representa el alimento con la mayor fuente de AGMI en la dieta Mediterránea (Perez-Jiménez et al., 2005), no ocurre lo mismo en otras regiones del mundo. Así por ejemplo, en la actual dieta americana, son las grasas de lácteos, carne de bovino y los aceites vegetales parcialmente hidrogenados los que aportan el contenido de AGMI a la dieta (Chong et al., 2006). De esta forma, los beneficios para la salud derivados del consumo de AGMI, y en especial del ácido oleico en el contexto de la dieta mediterránea tradicional, pueden verse enmascarados en dietas como la americana (Alonso et al., 2006) en las que los ácidos grasos monoinsaturados son aportados por fuentes alimentarias que a la vez son ricas en ácidos grasos saturados y ácidos grasos *trans*, el consumo de los cuales debe reducirse debido a sus implicaciones negativas en la salud humana (Ascherio et al., 1999; Hulshof et al., 1999; Oomen et al., 2001; Sacks, 2002; Reddy y Katan, 2004).

Entre los ácidos grasos poliinsaturados, el más abundante es el ácido linoleico, que se encuentra sobretodo en los aceites de semillas tales como el aceite de girasol, maíz, cártamo, germen de trigo, pepita de uva y cacahuete (Calder, 2004; Griffiths y Morse, 2006). Así pues, con la notable excepción de las mantecas de coco y de palmiste, en el mundo vegetal dominan los ácidos grasos insaturados. Entre los AGPI n-6 cabe destacar también la existencia del denominado ácido linoleico conjugado (CLA), término utilizado para designar al conjunto de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico que tienen los dos dobles enlaces conjugados. El CLA se encuentra de forma natural únicamente en la carne, leche y productos lácteos procedentes de animales rumiantes (Pariza et al., 2001). El isómero principal, el cis-9, trans-11 CLA, constituye el 85-90% del contenido total de CLA en productos lácteos (Palmquist et al., 2005). Sin embargo, el aporte de CLA en la dieta humana es relativamente bajo (Lawson et al., 2001) y algunos autores han propuesto enriquecer determinados alimentos (Jones et al., 2005; Lock et al., 2005; Tricon et al., 2006) de forma directa, principalmente mantequillas y otros productos lácteos (Malpuech-Brugere et al., 2004) o de forma indirecta a través del control y características de la alimentación del ganado (Chouinard et al., 2001; Abu Ghazaleh et al., 2001; Bauman et al., 2006).

En cuanto a los AGPI de la serie n-3, el precursor de la serie, el ácido α -linolénico, sintetizado por los cloroplastos de diversas plantas, se encuentra en semillas y aceites de semillas, siendo la fuente principal actual el aceite de lino (Moyad, 2005; Harper y Jacobson, 2005). En pequeñas cantidades, se halla en los aceites de colza y soja, así como en nueces y en la mayoría de los vegetales (Sinclair et al., 1994; Covington, 2004; Gebauer et al., 2006). A pesar de que el contenido lipídico total de vegetales y legumbres es bastante bajo, su proporción relativa en ALA, asociada con el considerable tamaño de la porción media, así como la elevada frecuencia de consumo en los países mediterráneos, resulta en unos niveles de ingesta de ácido α -linolénico apreciables (Galli y Marangoni, 2006).

Los otros AGPI-CL n-3 importantes desde el punto de vista alimentario, EPA y DHA, están presentes principalmente en pescados grasos. Conviene destacar que ambos ácidos no son producidos por los pescados, sino por organismos marinos unicelulares que son consumidos de forma habitual por las especies marinas (Moyad, 2005). Por su parte, el grado de insaturación y la longitud de la cadena es superior en los animales marinos que en los de agua dulce. Mientras los pescados magros almacenan principalmente la grasa en forma de triglicéridos en el hígado, la de los pescados grasos se halla en la carne. El aceite obtenido de estas zonas se denomina aceite de pescado, y presenta la característica de ser muy rico en los AGPI-CL n-3. Entre las diversas variables que influyen en la cantidad de estos ácidos grasos en los pescados y sus aceites, destacan sus hábitos alimentarios y sus características metabólicas, así como la estación, temperatura del agua y fase del ciclo reproductivo en el que se encuentren (Calder, 2004; Moyad, 2005). Aunque el pescado y el marisco son las fuentes mayoritarias de los AGPI-CL n-3, una gran variedad de fuentes alimentarias alternativas se está desarrollando gracias a los efectos beneficiosos para la salud de esta familia de ácidos grasos (Metcalf et al., 2003; Bauch et al., 2006; Upritchard et al., 2005). Se pueden encontrar alimentos procesados enriquecidos con AGPI-CL n-3 de microalgas, microorganismos y otras fuentes (Kroes et al., 2003; Baró et al., 2003), así como carne y leche de ganado alimentado con dietas ricas en AG de la serie n-3 (Simopoulos, 1999¹; Bourre, 2005; Rymer y Givens, 2005; Howe et al., 2006). Así por ejemplo, en poblaciones como la australiana, en la que la cantidad y la frecuencia de consumo de carne es significativamente superior a la de pescado, el consumo de carne de bovino, pollo y caza enriquecidos en estos ácidos grasos supone una ingesta de AGPI-CL n-3 de más del 40% (Mann et al., 2003; Howe et al., 2006).

Por último, las fuentes alimentarias de los AG *trans* son, por una parte, la leche y la carne de rumiantes, y por otra, los productos obtenidos industrialmente a partir de aceites vegetales o de pescado por hidrogenación parcial (Craig-Schmidt, 2006). La saturación parcial de los enlaces confiere a los aceites una consistencia semisólida que favorece su aplicación en la fabricación de pastas y bollería (*shortening*) (Cantwell et al., 2005).

La composición de los productos obtenidos es muy variable y depende tanto del material de partida como de las peculiaridades del proceso de hidrogenación utilizado (Innis et al., 1999; Elias et al., 2002; Skeaff et al., 2006). Los isómeros *trans* producidos industrialmente pueden llegar a representar más de un 40% de la fracción grasa de determinados alimentos, mientras que los procedentes de los rumiantes del orden de un 3% (Stender et al., 2006¹). El isómero *trans* predominante en grasa de rumiantes es el ácido vaccénico (18:1, *t11*), mientras que el ácido elaídico (18:1, *t9*) y el ácido 18:1, *t10* son los isómeros mayoritarios en las grasas vegetales hidrogenadas comercializadas en la actualidad (Craig-Schmidt, 2006). En un estudio reciente, Stender y colaboradores han mostrado que en un apreciable número de países de la Unión Europea aún es posible una ingesta diaria elevada de ácidos grasos *trans* originados industrialmente (Stender et al., 2006¹). Teniendo en cuenta que actualmente son todavía millones de europeos los que presentan un promedio de ingesta diaria de AG *trans* superior a 5g, este estudio pone de manifiesto que la reducción en el consumo de estos ácidos grasos, y en el riesgo asociado que conllevan para la salud humana (Mozaffarian et al., 2006) puede llevarse a cabo tomando medidas en el campo de la legislación.

Por el momento, Dinamarca es el único país de la Unión Europea que, desde enero de 2004, dispone de una legislación restrictiva en el uso de ácidos grasos *trans* producidos industrialmente, permitiendo un máximo del 2% de estos ácidos grasos en cualquier producto alimentario. En cambio, en el resto de países europeos, es legal comercializar alimentos con más del 50% de la fracción grasa constituida por ácidos grasos *trans* producidos industrialmente, sin obligación de advertir al consumidor si el alimento no va empaquetado (como es el caso en restaurantes y cadenas de “comida rápida”) y con la sola advertencia de mencionar “grasa parcialmente hidrogenada” en la lista de ingredientes en el caso de productos empaquetados. La experiencia danesa ha demostrado que alimentos similares pueden ser producidos con o sin ácidos grasos *trans* de origen industrial (Stender et al., 2006¹). Este hecho se ha puesto de manifiesto especialmente en la categoría de alimentos de “comida rápida”, en la que se ha llegado a encontrar contenidos de ácidos grasos *trans* de menos de 1g a más de 20g para un mismo alimento de una misma cadena comercial en diferentes ciudades europeas (Stender et al., 2006²).

A la iniciativa danesa, cabe sumar la reciente decisión de la Junta de Salud del Ayuntamiento de la ciudad de Nueva York de regular el uso de ácidos grasos *trans*, consumidos principalmente a través de los aceites de fritura utilizados en las cadenas de “comida rápida”. La eliminación de las grasas artificiales *trans* de todos sus productos tendrá que realizarse antes de Julio de 2008 (MSNBC News Services, 2006). A esta decisión se sumarán en breve otras ciudades de los Estados Unidos tales como Chicago y Los Angeles (Fuster, 2006).

2. ÁCIDOS GRASOS COMO BIOMARCADORES LIPÍDICOS

2.1. EN BUSCA DE UN BIOMARCADOR DE LA INGESTA TOTAL DE LÍPIDOS

A diferencia de otros macronutrientes, la cantidad y tipo de lípidos de la dieta varía significativamente entre culturas y con el paso del tiempo (Arab, 2003). El uso de métodos tradicionales de evaluación nutricional resulta una herramienta muy útil (Serra Majem et al., 1994; Cade et al., 2002; Subar et al., 2006; Willet y Hu, 2006; Tooze et al., 2006) pero a veces insuficiente (Lafay et al., 2000; Álvarez et al., 2000; Popkin et al., 2001; Kipnis et al., 2003; Neuhouser et al., 2003; Dodd et al., 2006) para poder llevar a cabo estudios que evalúen el efecto que las diferentes fuentes lipídicas, sus cantidades y cambios en la ingesta, tienen sobre la salud humana.

Además de las dificultades que comporta evaluar la totalidad de lípidos consumidos por un individuo debido a la amplia diversidad de éstos en la dieta, en ocasiones resulta difícil reconocer y cuantificar todos los lípidos presentes en la dieta (un ejemplo lo constituyen las salsas y aderezos utilizados en la preparación de los platos; el tipo de aceite o grasa utilizada en las frituras o formas de preparación de los alimentos; etc.). Estas dificultades, sumadas al hecho de que los datos de ingesta de lípidos aportados por individuos con sobrepeso suelen ser inferiores a los reales, debido a implicaciones de tipo social (Winkler, 2005) hacen necesaria la búsqueda de biomarcadores en el organismo humano (Kon et al., 1999; Chajes et al., 2001; Baylin et al., 2002) que proporcionen información objetiva sobre la ingesta de lípidos. Por otra parte, los lípidos y las sustancias solubles en lípidos presentan la ventaja sobre otros nutrientes de tener una vida media larga y de disponer de depósitos de almacenamiento accesibles en el organismo humano.

Actualmente la determinación de la composición en ácidos grasos en diferentes tejidos y fluidos del organismo humano está considerada una herramienta útil para evaluar la ingesta lipídica. La composición en AG se utiliza básicamente para cuantificar cambios de ingesta de lípidos en circulación, así como para reflejar el consumo de ácidos grasos esenciales y ácidos grasos no esenciales aportados de forma exógena al organismo (Arab, 2003; Kingetal et al., 2006).

2.2. ELECCIÓN DEL MEDIO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EL ORGANISMO HUMANO

Los ácidos grasos pueden ser determinados como ácidos grasos libres en plasma, en suero, como componentes de los triglicéridos circulantes, formando parte de la estructura

de fosfolípidos y ésteres de colesterol, como componentes de las membranas de eritrocitos, así como componentes del tejido adiposo en diferentes localizaciones del cuerpo humano (Arab et al., 2002; King et al., 2006). Dependiendo del tipo de medio que se analice, se obtendrá información de la ingesta de lípidos referente a diferentes tiempos desde que el alimento haya sido consumido. Así, los marcadores de la ingesta de lípidos a más corto plazo son los ácidos grasos presentes en los quilomicrones, los cuales reflejan la ingesta lipídica de la dieta que entra directamente a circulación entero hepática tras la ingesta del alimento. La ingesta de lípidos de las horas posteriores al consumo del alimento viene reflejada por la determinación de AG en los triglicéridos circulantes. Por otra parte, los ácidos grasos libres, unidos a la albúmina y liberados del tejido adiposo cuando las concentraciones de insulina y glucosa son bajas, son determinados mayoritariamente por su velocidad de liberación del tejido adiposo como ácidos grasos no esterificados (AGNE) (Saleh et al., 1999). El siguiente biomarcador es el formado por los niveles de los ácidos grasos individuales en suero o plasma, provenientes de EC, TG, y PL, y refleja la ingesta lipídica de varios días después del consumo del alimento (Kohlmeier, 1995). Los niveles de ácidos grasos en suero han sido considerados desde hace tiempo indicadores sensibles de cambios en las ingesta de lípidos poliinsaturados procedentes de la dieta (Dougherty et al., 1987; Corrocher et al., 1992).

Tabla 1. Ácidos grasos más comunes en los tejidos humanos

C	AGS	AGMI	AGPI n-3	AGPI n-6
12	12:0 (Ácido láurico)	12:1		
14	14:0 (Ácido mirístico)	14:1n-5		
16	16:0 (Ácido palmítico)	16:1n-7		
18	18:0 (Ácido esteárico)	18:1n-9 <i>cis</i> (Ácido Oleico)	18:3n-3 (Ácido α -linoleico)	18:2n-6 (Ácido Linoleico)
20	20:0	20:1n-9	20:5n-3 (EPA)	20:3n-6 20:4n-6 (ARA)
22	22:0 (Ácido behénico)	22:1n-9	22:5n-3 (DPA) 22:6n-3 (DHA)	22:5n-6
24	24:0 (Ácido lignocérico)			

Las membranas de los eritrocitos y plaquetas son también de interés, ya que la composición de sus ácidos grasos refleja ingestas a mayor largo plazo que los lípidos circulantes en plasma (Manku et al., 1983). Así por ejemplo, al ser la vida media de un glóbulo rojo de unos 120 días, los ácidos grasos que constituyen su membrana, pueden reflejar ingestas de los últimos meses. Sin embargo, se requiere llevar a cabo el proceso de lisis y aislamiento de los eritrocitos de forma rápida y sistemática, evitando procesos de oxidación que darían lugar a errores en la determinación de AGPI (Zeleniuch-Jacquotte et al., 2000).

En el caso en que se desee determinar la ingesta de lípidos a largo plazo, se ha de recurrir al análisis del tejido adiposo, siempre y cuando no haya habido una pérdida severa de peso (Baylin et al., 2002). Como no es necesario que los adipocitos estén intactos, la aspiración con jeringa es la técnica preferida para la recogida del tejido a analizar (Handelman et al., 1988). Uno de los inconvenientes es la variación de la composición del tejido adiposo con la edad del individuo. El almacenamiento de lípidos al nacer y en las primeras etapas de la vida difiere de la composición lipídica en posteriores etapas de desarrollo y en la etapa adulta. Así mismo, el embarazo también puede afectar el perfil lipídico de la madre debido a que la deposición de lípidos está favorecida al inicio del embarazo (Otto et al., 2001).

2.3. DISTRIBUCIÓN LIPÍDICA DEL PLASMA HUMANO

El plasma sanguíneo es la fase líquida de la sangre, y representa alrededor del 7.5% del agua total del organismo. Es el intermediario entre el compartimento intersticial en el que se hallan los tejidos y los órganos de intercambio con el medio externo. A través del plasma se aportan a los tejidos los sustratos necesarios para su funcionamiento (Altman y Ditmer, 1971; Marban, 1980). Se trata de una solución acuosa en la que el agua representa alrededor del 91-93% de su peso. Los solutos son sustancias orgánicas y minerales y sus concentraciones son relativamente estables en una misma especie. Mientras las proteínas plasmáticas se hallan en una concentración de 72g/l de plasma, los lípidos totales no superan concentraciones superiores a 5-8g/l en plasma (**Tabla 2**). Debido a su insolubilidad en agua, en el plasma los lípidos se encuentran en forma de lipoproteínas.

Los ácidos grasos también se hallan en membranas celulares y formando parte de los triglicéridos de reserva en los adipocitos. La proporción en la que se encuentran en cada medio y compuesto orgánico parece depender del tipo de ácido graso (Vidgren et al., 1997; Zock et al., 1997; Smedan et al. 1999; King et al., 2006; Crowe et al., 2006).

Tabla 2. Componentes lipídicos del plasma (g/l)

Lípidos totales	5-8 g/l
<i>Colesterol total</i>	1.6-2.6 g/l
• Colesterol esterificado	1.2-2.0 g/l
• Colesterol libre	0.4-0.7 g/l
<i>Glicéridos (85% de TG)</i>	0.7-1.5 g/l
<i>Ácidos grasos no esterificados</i>	0.1-0.2 g/l
<i>Fosfolípidos</i>	1.5-2.5 g/l

2.4. FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Para poder interpretar de forma adecuada los niveles de ácidos grasos obtenidos para una muestra de una población, es conveniente conocer qué factores pueden influir en la determinación de la composición de AG en un tejido o fluido del organismo humano. Entre los principales factores destacan:

- *La ingesta de lípidos a través de la dieta:* en función de los alimentos consumidos por el individuo, la presencia de determinados ácidos grasos será mayor o menor en diferentes tejidos y fluidos de su organismo (Raatz et al., 2001; Fusconi et al., 2003; Scaglioni et al., 2004).
- *La proporción relativa de otros ácidos grasos en el medio:* debido a que la composición en AG se expresa generalmente en porcentaje total de lípidos y no en valores absolutos de sangre o grasa, grandes ingestas de un ácido graso específico pueden dar lugar a un porcentaje relativo menor de otro AG incluso cuando la ingesta de éste no haya sido modificada. Por este motivo, durante el análisis del perfil de AG, es conveniente añadir estándares cuantificables de uno o más ácidos grasos no presentes de forma natural en la muestra a analizar.
- *El estado nutricional del individuo:* el estado nutricional del individuo puede influir de forma adversa en el perfil de AG derivado de su ingesta lipídica (Trebble et al., 2003; Smit et al., 2004). Debido a que las desaturasas son metaloenzimas, se requieren cantidades adecuadas de hierro, zinc, cobre y magnesio para que el metabolismo de los ácidos grasos funcione de forma normal.

- *El uso de suplementos:* tales como cápsulas de aceite de pescado, que aumentan el contenido de ácidos grasos de cadena larga de la serie n-3 (Covington, 2004).
- *Las etapas de manipulación y almacenamiento de las muestras a analizar:* muestras almacenadas durante periodos largos de tiempo antes de ser analizadas, pueden sufrir procesos de degradación y las consecuencias de pérdida de refrigeración (Zeleniuch-Jacquotte et al., 2000). Un cuidado almacenamiento bajo atmósfera de nitrógeno y a -80°C minimiza pérdidas por oxidación.
- *Las etapas de pretratamiento de la muestra a analizar y el método analítico utilizado:* una manipulación inadecuada en el muestreo puede dar lugar a pérdidas de algunos AG. Así, el contacto con el aire (o con hierro en el caso de eritrocitos) puede dar lugar a procesos de oxidación no deseables (Standford et al, 1991).
- *Ciertas patologías:* tales como la fibrosis quística, problemas de mala absorción, cirrosis hepática, diabetes, etc, pueden influir en la determinación del perfil de AG. Un ejemplo lo constituyen las enfermedades peroxisomales (como el síndrome Zellweger, la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X o la de tipo neonatal), que son patologías congénitas raras caracterizadas por la ausencia o defecto de peroxisomas en las células del organismo. Como se sabe, una de las reacciones más características en el peroxisoma es la degradación (por β -oxidación) de los ácidos grasos de cadena muy larga. La β -oxidación peroxisomal acorta la longitud de cadena de estos AG lo suficiente para que las mitocondrias puedan seguir degradándolos mediante la β -oxidación mitocondrial. Si no hay peroxisomas, este proceso es defectuoso y los AG de cadena muy larga aumentan en plasma y tejidos. En la actualidad, las terapias farmacológicas y dietéticas ayudan a paliar las anomalías derivadas de estas patologías (Moser et al., 1999; Martínez, 2001).
- *Polimorfismos genéticos de las enzimas elongasas y desaturasas:* La respuesta de los parámetros bioquímicos indicadores del perfil lipídico de un individuo a los cambios dietéticos puede verse afectada por polimorfismos funcionales en genes que codifican proteínas que juegan un papel importante en el metabolismo lipídico (Ordovas y Schaefer, 1999; Murphy et al., 2002; Nakamura y Nara, 2003; Doege y Stahl, 2006). La identificación de estos polimorfismos genéticos no sólo puede ser de gran ayuda para clarificar el papel de ciertas proteínas en el metabolismo lipídico, sino también para diferenciar entre los sujetos hipercolesterolémicos que podrían beneficiarse de los tratamientos dietéticos y los que no (Weggemans et al., 2001).

2.5. ÁCIDOS GRASOS Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

2.5.1. La arteriosclerosis

La arteriosclerosis es una enfermedad vascular que se produce por un engrosamiento y rigidez de las arterias, caracterizada por un desarrollo lento y asintomático hasta el momento en que las lesiones arterioscleróticas alcanzan un grado tal que son capaces de producir complicaciones isquémicas de importante relevancia clínica (Badimón, 1995; Badimón et al., 2002; Fuster y Moreno, 2005).

Existe una arteriosclerosis “fisiológica” que obedece a los cambios constitucionales debidos al envejecimiento entre los que destaca la gran disminución de elastina en la pared arterial. Este proceso puede verse agravado en varias condiciones patológicas, entre las que destaca la aterosclerosis (Ross, 1999; Mataix, 2002). La aterosclerosis se caracteriza por la existencia de placas fibro-adiposas elevadas en la íntima arterial (denominadas “ateromas”) especialmente en la aorta, arterias coronarias y arterias cerebrales, que producen un estrechamiento de la luz del vaso o estenosis (Stary et al., 1995; Iuliano, 2001; Sirol et al., 2006). La deposición de calcio en la pared arterial aparece temprano durante el proceso aterosclerótico (Djousse et al., 2005). Estudios histológicos muestran una alta correlación entre la extensión de la placa calcificada en las arterias coronarias y el peso total de la placa con la probabilidad de vulnerabilidad y rotura de la misma (Sangiorgi et al., 1998; Rumberger et al., 1999).

La inestabilidad de las placas ha sido relacionada entre otros factores con el contenido de partículas LDL oxidadas presentes en las mismas (Nishi et al., 2002; Metso et al., 2004). El grado de avance del proceso aterosclerótico puede desembocar en diversas y serias consecuencias clínicas, que abarcan desde procesos isquémicos a infarto de miocardio e incluso muerte súbita.

El proceso isquémico resulta de la dificultad que tiene la sangre en llegar a los tejidos irrigados, debido al estrechamiento progresivo que las placas de ateroma provocan en la luz de las arterias afectadas. Viene acompañado de un dolor muy intenso y angustioso (denominado angina de pecho), provocado por el exceso de lactato que se produce durante la anaerobiosis debida a la falta de oxígeno. El crecimiento de las placas de ateroma predispone la rotura de las mismas con formación de trombos (fenómeno denominado trombosis), provocando obliteración u oclusión del vaso (Lefevre et al., 2004). Cuando la obstrucción es completa, cesa la irrigación del tejido, que se necrosa dando lugar al infarto de miocardio.

El ateroma puede producir también el debilitamiento progresivo de la pared arterial, que se dilata dando lugar al aneurisma, que puede facilitar su rotura y la consiguiente hemorragia. Los estudios científicos también postulan que el daño en el revestimiento celular endotelial de los vasos sanguíneos provoca una respuesta que inicia muchos de los factores involucrados en la hemostasis (Ross, 1999; Lefevre et al., 2004).

En la actualidad, el concepto de aterogénesis se entiende como un proceso activo que implica un comportamiento celular alterado en respuesta a señales moleculares definidas (Libby y Ridker, 2006). La evidencia científica actual otorga un papel primordial a la inflamación como mecanismo unificador entre los factores de riesgo cardiovascular (comentados en el apartado 2.5.2.) la formación de la lesión y su tendencia a dar lugar a complicaciones trombóticas (Vilez-Gonzalez et al., 2006).

El proceso de aterogénesis se puede resumir en cuatro fases cronológicas. La primera de ellas es la *fase de iniciación*, que en la sociedad contemporánea aparece con demasiada frecuencia en la infancia y adolescencia (Pesonen et al., 2006; Schwarzenberg y Sinaiko, 2006; Gidding, 2006; Fuster et al., 2006). Como se sabe, la arteria muscular normal presenta una estructura trilaminar. Una monocapa de células endoteliales recubre la capa íntima, constituyendo la lámina elástica interna la separación entre la capa íntima y la media túnica. Cuando las moléculas asociadas con los factores de riesgo estimulan el estrés oxidativo o inflamatorio, inducen la expresión de moléculas de adhesión para leucocitos y quimioatrayentes que envían leucocitos a la capa íntima (**Figura 9**).

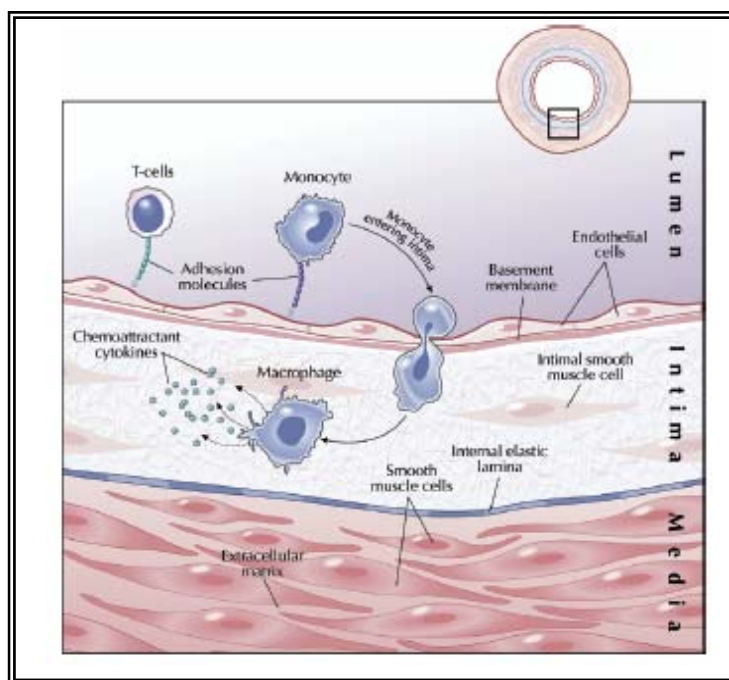


Figura 9. Esquema de la transición de la pared arterial normal a la lesión aterosclerótica incipiente. (Figura adaptada de Libby y Ridker, 2006)

La posterior transición de una veta grasa a una lesión más fibrosa implica la migración de células de la musculatura lisa (SMCs) de la media túnica a través de la lámina elástica interna a la íntima, donde secretan moléculas de la matriz extracelular tales como colágeno fibrilar y elastina. Los fagocitos mononucleares ingieren lipoproteínas modificadas como LDL oxidadas a través de receptores *scavenger* para formar las células espumosas. Así mismo, los fagocitos mononucleares en las lesiones liberan mediadores proinflamatorios incluyendo citoquinas, leucotrienos, prostaglandinas, así como especies reactivas de oxígeno, y cuando las SMCs reciben el estímulo fibrogénico, estimulan la producción de macromoléculas de la matriz extracelular, incluyendo colágeno fibrilar (**Figura 10**).

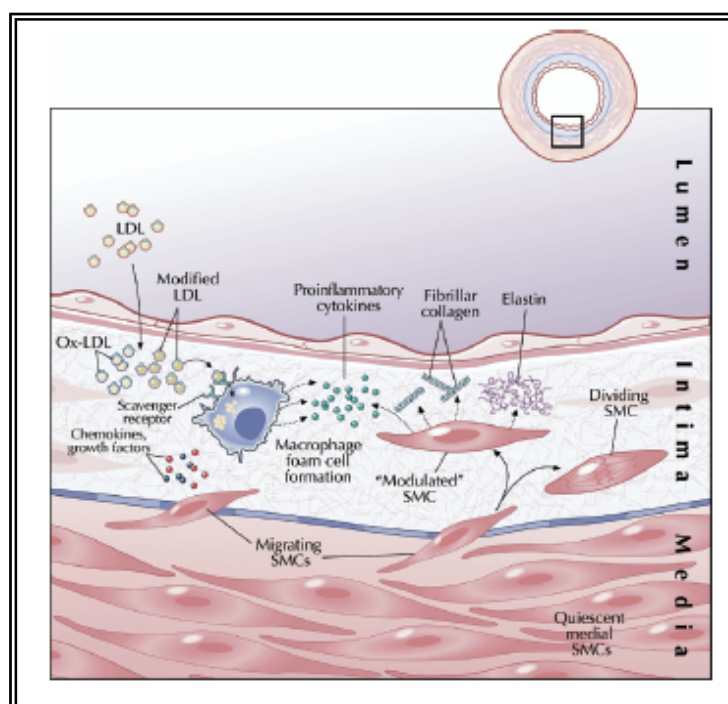


Figura 10. Esquema de la formación de la placa fibrosa-lipídica.
(Figura adaptada de Libby y Ridker, 2006)

La lesión incipiente entra entonces en la *fase de progresión* (**Figura 11**), que generalmente tiene lugar durante la etapa adulta joven y mediana edad. La aterosclerosis se manifiesta entonces mediante síntomas estables crónicos o bien a través de las complicaciones trombóticas comentadas anteriormente. Las lesiones maduras generan un tapón fibroso compuesto por una densa matriz extracelular, debajo del cual se halla un núcleo lipídico con macrófagos, restos celulares y acumulaciones lipídicas extracelulares. Los diferentes mediadores proinflamatorios pueden potenciar la muerte celular por apoptosis en la lesión avanzada.

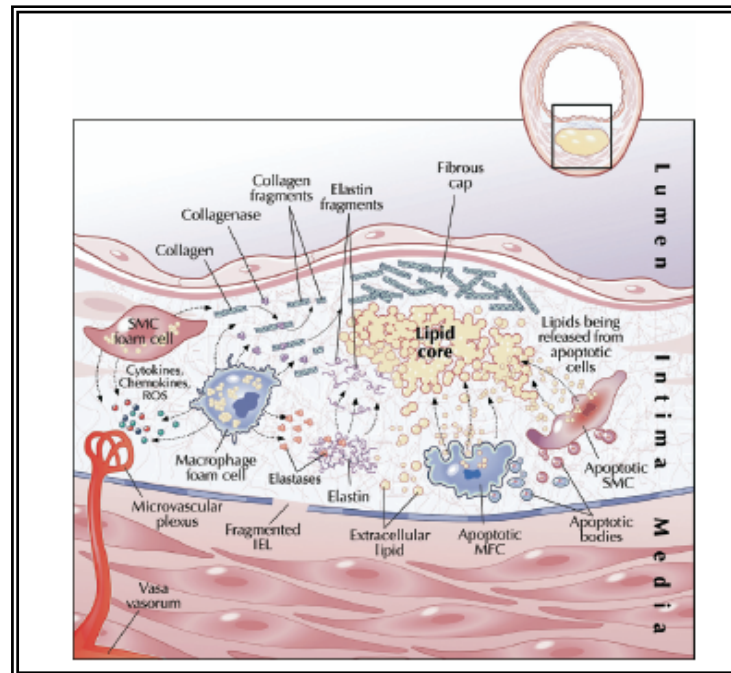


Figura 11. Esquema de la maduración de la placa aterosclerótica. (IEL: internal elastic lamina; MFC: macrophage foam cell; ROS: reactive oxygen species) (Figura adaptada de Libby y Ridker, 2006)

La tercera etapa o fase de complicaciones aterotrombóticas (Figura 12) se manifiesta tradicionalmente en la madurez o en la vejez del individuo.

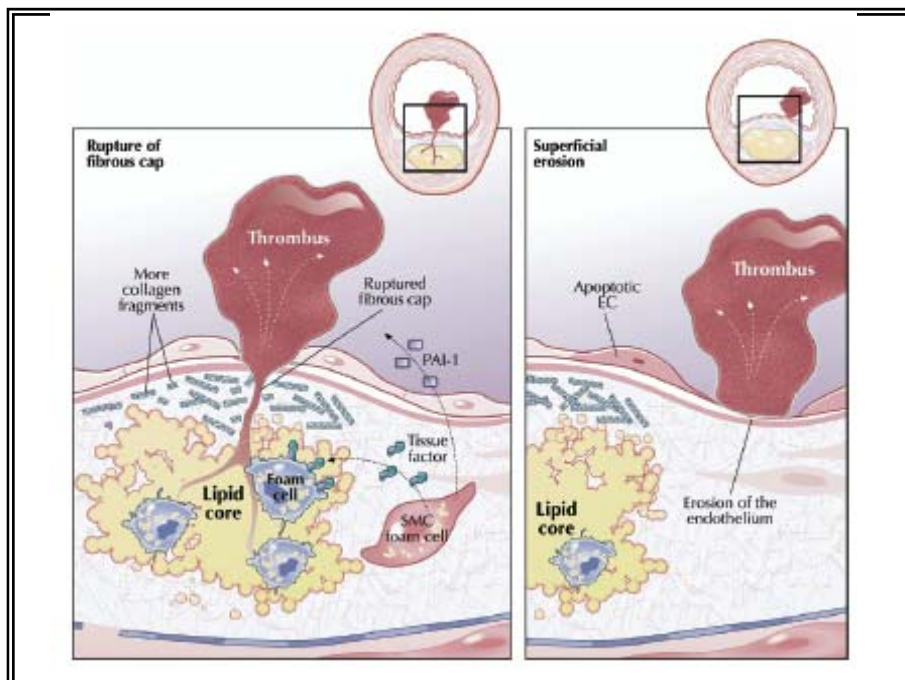


Figura 12. Esquema de las complicaciones trombóticas de la aterosclerosis. (Figura adaptada de Libby y Ridker, 2006)

El mecanismo esquematizado en la parte izquierda de la **Figura 12** representa la ruptura de la placa de ateroma, que ha sido previamente debilitada en la fase anterior. El mecanismo de la derecha representa la formación del trombo coronario implicando una erosión superficial de las células endoteliales, probablemente causada por apoptosis endotelial o descamación. Conviene sin embargo destacar que los individuos con aterosclerosis presentan lesiones con características anatomopatológicas de más de una de las anteriores fases, que coexisten a menudo muy próximas, confirmando el complejo proceso de esta patología (Libby y Ridker, 2006).

2.5.2. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial resultante de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Aunque algunos factores de riesgo de importancia no son modificables (edad, sexo, herencia genética), la actual evidencia científica sugiere que hoy en día, la mayoría de los nuevos casos de infarto agudo de miocardio podrían ser predichos por la presencia y grado de factores de riesgo modificables, la mayoría de los cuales influidos por la dieta (De Caterina et al., 2006). A este dato hay que añadir un estudio reciente de Menotti y colaboradores que muestra, con un seguimiento de 35 años de algunas de las cohortes de diferentes países europeos que participaron en el “*Seven Countries Study*”, que un parámetro tan sencillo como es el nivel de colesterol sérico de los participantes al inicio del seguimiento, ha resultado estar significativamente relacionado con el riesgo de padecer enfermedad coronaria en un futuro. La asociación es muy fuerte durante los primeros 10 años, disminuyendo durante los 25 años siguientes, sugiriendo de cualquier manera una memoria biológica a largo término de los niveles séricos de colesterol (Menotti et al., 2006).

Los factores de riesgo cardiovascular no modificables son:

- *Herencia genética*: Determinados factores genéticos son sin duda los que justifican en mayor o menor grado el riesgo cardiovascular, y así ocurre con defectos relacionados con el metabolismo de las proteínas o con ciertos mecanismos de susceptibilidad de la pared arterial (Mataix, 2002). Se espera que en un futuro se puedan llegar a conocer las alteraciones genéticas responsables de las modificaciones del metabolismo lipídico, así como sus mecanismos de actuación, para poder incidir y subsanar los errores genéticos que comportan.
- *Edad*: El proceso de envejecimiento es el resultado del daño acumulativo en las células y tejidos del organismo, y depende tanto de factores intrínsecos y extrínsecos, como el material genético de cada individuo, su estilo de vida y el entorno que le rodea (Battino y Ferreiro, 2004; Noel y Reddy, 2005). Entre los

factores responsables del daño acumulativo que conducen al envejecimiento cabe destacar los oxidantes biológicos, ya sean producidos endógenamente o exógenamente. En las múltiples reacciones redox necesarias para el buen funcionamiento del organismo humano se producen continuamente trazas de radicales libres. Estos compuestos, altamente inestables, contienen uno o más electrones desapareados que los hacen especies muy reactivas, reaccionando con ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos (Battino et al., 1999) e iniciando múltiples reacciones en cadena que resultan en la oxidación de miles de partículas por todo el organismo (Gaziano, 2000). A pesar de que el cuerpo humano dispone de excelentes mecanismos de defensa naturales contra los radicales libres (compuestos antioxidantes) inevitablemente las defensas no son perfectas y el daño oxidativo va acumulándose con el tiempo (Mashima et al., 2001). De ahí, que a medida que el ser humano envejece, aumenta el riesgo cardiovascular. Si además se tiene en cuenta el sexo del individuo, se ha observado que las mujeres >75 años padecen más infartos de miocardio que los hombres del mismo rango de edad, pero esta tendencia es contraria entre la población joven (los hombres <45 años sufren infarto de miocardio cinco veces más en comparación con las mujeres de su misma edad) (Manolio et al., 1992; Daviglus et al., 2004; Sattler et al., 2005). En definitiva, las mujeres padecen de enfermedad coronaria a una edad más tardía que los hombres. Conviene destacar también que el estado nutricional frecuentemente empeora con la edad pudiendo agravarse el riesgo de episodios de trombosis (Allman-Farinelli y Dawson, 2005).

- *Sexo*: Las mujeres presentan la ventaja de tener concentraciones de c-HDL significativamente más elevadas que los hombres, lo cual supone una protección adicional contra la CVD (Panel de expertos del NCEP, 2001). También se ha visto que las partículas de LDL de las mujeres son de tamaño superior que las de los hombres (Schaefer, 2002).
- *Estados posmenopáusicos de diversa etiología*: El aumento del riesgo cardiovascular en las mujeres posmenopáusicas se cree que está relacionado con la disminución de sus niveles de estrógenos (Sattler et al., 2005). Sin embargo diversos estudios a gran escala en mujeres recibiendo terapia hormonal sustitutiva (Hulley et al., 1998; Bittner et al., 2000; Rossouw et al., 2002; Manson et al., 2003; Wassertheil-Smoller et al., 2003; Bibbins-Domingo et al., 2005) han cuestionado la sustitución con estrógenos a pesar de sus beneficios en el perfil lipídico. Así por ejemplo, en el estudio “*Iniciativa Saludable en Mujeres*”, las mujeres con terapia hormonal sustitutiva mostraron un aumento de un 24% del riesgo cardiovascular (Rossouw et al., 2002). El mecanismo de actuación de los estrógenos se puede resumir en los siguientes pasos: los estrógenos estimulan la secreción hepática de

triglicéridos (aumentando así los niveles de triglicéridos), inhiben la acción de la lipasa hepática (aumentando así los niveles de colesterol HDL) y aumentan la descomposición de LDL a través de los receptores celulares de LDL (disminuyendo por tanto los niveles de colesterol LDL). Actualmente se cree que otros factores de riesgo cardiovascular, tales como los que afectan a la coagulación sanguínea y a la función endotelial, podrían ser los responsables del exceso de morbilidad en mujeres posmenopáusicas más que cambios desfavorables en su perfil lipoproteico (Sattler et al., 2005).

- *Diabetes mellitus*: la incidencia de diabetes ha aumentado de manera drástica durante las últimas cuatro décadas (Brown, 2005) principalmente como resultado del aumento de la población obesa (Rathmann et al., 2003; Connor, 2004) e incluso entre la población infantil y adolescente (Min et al., 2005; Libman y Arslanian, 2006). De hecho, en los individuos con diabetes de tipo 2 el riesgo de enfermedad coronaria está incrementado de 2 a 4 veces en comparación con los no diabéticos (Haffner y Lehto, 1998; Eckel, 2001). La diabetes, caracterizada por elevados niveles de glucosa en sangre, está asociada desde hace tiempo a un elevado riesgo de complicaciones microvasculares tales como la nefropatía, retinopatía y neuropatía (Resnick et al., 1999; McGarry, 2001) siendo más reciente su asociación con diferentes macroangiopatías de tipo aterosclerótico (Howard et al., 2002; Ahmed y Goldstein, 2006). Estudios como “*The Framingham Heart Study*” han mostrado un significativo incremento del riesgo de enfermedad coronaria y cardiovascular en individuos diabéticos que en individuos sanos (Brand et al. 1998; Eckel, 2001; Haffner y Cassells, 2003). Desde un punto de vista patogénico, investigaciones recientes en diabetes de tipo 1 han sugerido que los niveles elevados de glucosa podrían contribuir directamente al proceso de aterosclerosis (Nathan et al., 2003). A su vez, datos epidemiológicos respaldan la asociación entre diferentes grados de hiperglicemia y el riesgo CVD (Khaw et al., 2001; Haffner y Cassells, 2003; Gerstein, 2004; Balkau et al., 2004; Reynolds et al., 2006; Prisant, 2006). Desde un punto de vista fisiopatológico, la resistencia a la insulina afecta a todos los tejidos sensibles a esta hormona (**Figura 13**) incluyendo el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. La insulina es secretada por las células β del páncreas en respuesta al aumento de glucosa en sangre y disminuye la producción de glucosa en el hígado y aumenta su eliminación, utilización y almacenaje en tejido adiposo y muscular (Saltiel y Kahn, 2001).

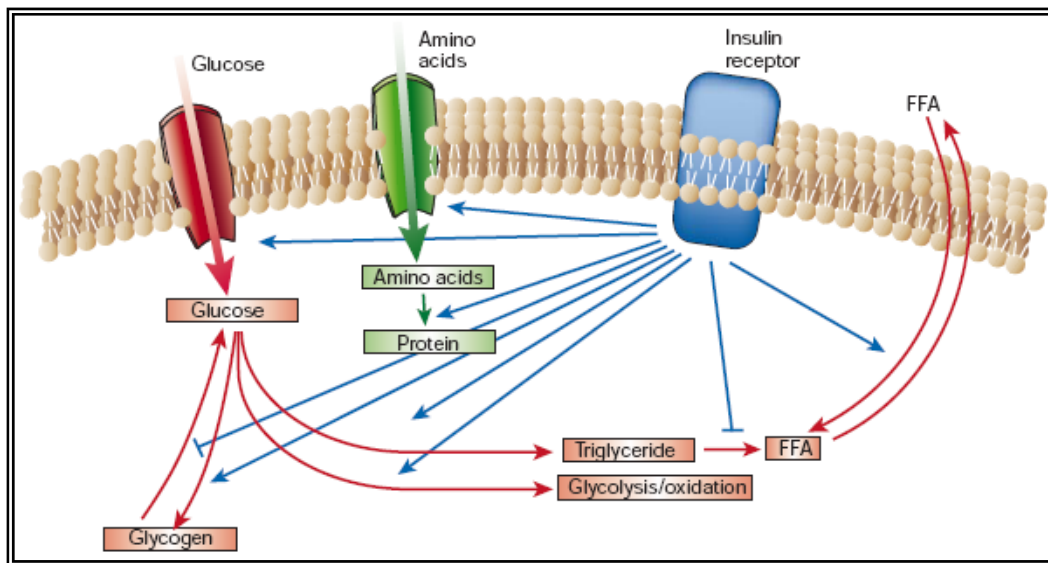


Figura 13. Esquema de la regulación del metabolismo de la insulina.
(Figura adaptada de Saltiel y Kahn, 2001)

Conviene destacar la importancia de los adipocitos en la resistencia a la insulina, especialmente de la grasa visceral abdominal (Carey et al., 1996; Stumvoll et al., 2005; Ahmed y Goldstein, 2006). Los adipocitos liberan ácidos grasos libres circulantes que reducen la eliminación de glucosa en músculo, la secreción de insulina por parte de las células β y aumentan la producción de glucosa en el hígado (Figura 14).

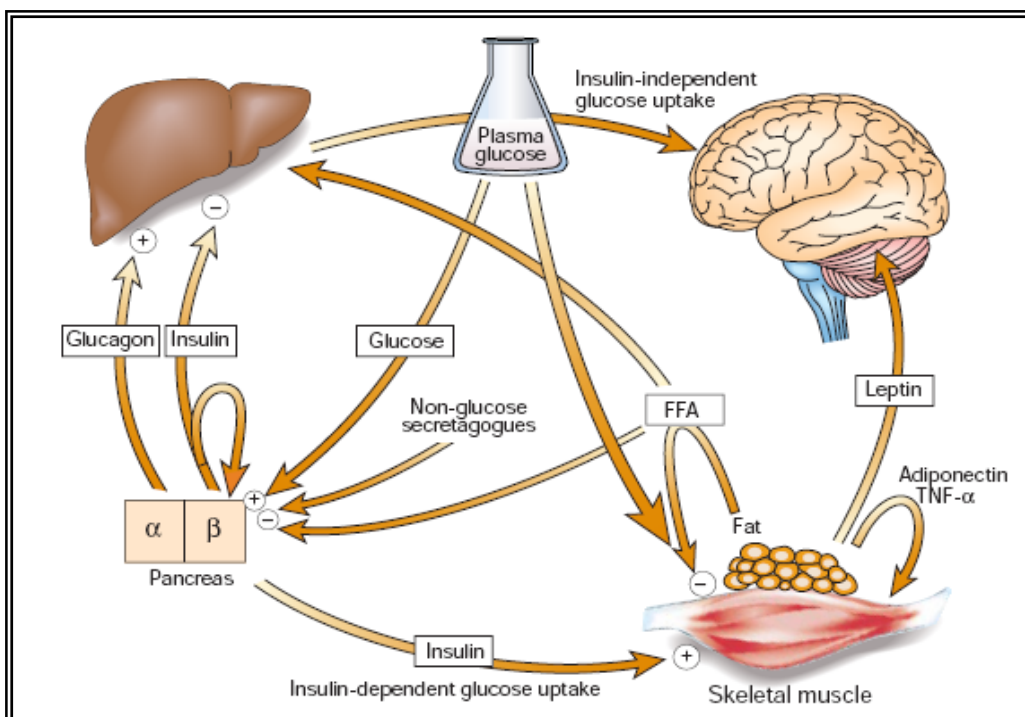


Figura 14. Esquema de la regulación del metabolismo de la glucosa entre tejidos.
(Figura adaptada de Saltiel y Kahn, 2001)

Por obstaculización directa de los mecanismos de señalización celular, niveles elevados de AG en la circulación agravan la resistencia a la insulina en el músculo esquelético y el hígado (Shulman, 2000; Boden, 2003). Niveles elevados de citoquinas inflamatorias, tales como el TNF α y la IL-6, son liberados por tejido adiposo visceral expandido, denominado “adipoquinas”, influyendo adversamente en la cascada de señalización de la insulina (Rajala y Scherer, 2003; Lazar, 2005). Estos mediadores tienen un efecto perjudicial en la acción de la insulina en el hígado y en tejido muscular esquelético y se cree que contribuyen a la resistencia a la insulina sistémica (Savage et al., 2005). Por su parte, la adiponectina, una proteína secretora de tejido adiposo específico, ha recibido recientemente atención por su posible papel protector en la enfermedad CVD en pacientes con diabetes (Schulze et al., 2005) debido a sus efectos insulino-sensibilizadores en hígado, músculo y tejido adiposo, así como por su efecto anti-inflamatorio en el sistema vascular (Goldstein y Scalia, 2004; Trujillo y Scherer, 2005). Así mismo, la hiperglicemia contribuye a la disfunción endotelial e incrementa el estrés oxidativo vascular en los individuos diabéticos (Kuroki et al., 2003) considerándose éste la principal causa de las consecuencias más graves del infarto de miocardio en diabéticos (Di Filippo et al., 2006). La función plaquetaria y los factores plasmáticos de coagulación también se alteran en esta patología favoreciéndose la agregación plaquetaria y la propensión a la trombosis (Creager et al., 2003).

Conviene resaltar también que los componentes de la dieta son importantes predictores del riesgo de diabetes tipo 2 (Stoekli y Keller, 2004). Así, diversos estudios han mostrado un papel perjudicial en el riesgo CVD en diabéticos con patrones alimentarios de “vida sedentaria” y “dieta occidental”, caracterizados por el consumo frecuente de carne roja, carbohidratos refinados, dulces y productos lácteos ricos en grasa saturada; y un papel protector en el riesgo CVD en diabéticos y de “patrones alimentarios prudentes”, caracterizados por una alta ingesta de frutas, verduras, hortalizas, legumbres y carbohidratos no refinados (Hu et al., 2001; Tuomilehto et al., 2001; Van Dam et al., 2002¹; Van Dam et al., 2002²; Wang et al., 2003). Adicionalmente, el consumo de pescado (Hu et al., 2003) y de dietas ricas en AGMI como la dieta mediterránea tradicional (DMT), parecen tener también un papel protector en el riesgo cardiovascular de la población diabética (Ros, 2003).

Entre los factores de riesgo cardiovascular modificables cabe destacar:

- *Hipertensión arterial*: Los niveles elevados de presión sanguínea son un importante factor de riesgo de enfermedad coronaria y de ataque isquémico y hemorrágico (Reddy y Katan, 2004; Basile, 2006). La hipertensión arterial interviene en el proceso aterosclerótico, entre otros mecanismos, por su capacidad de lesionar el endotelio, contribuyendo al desarrollo de las placas de ateroma y al

desencadenamiento de episodios agudos (Sharma y McNeill, 2006). Se ha visto que los componentes de la dieta juegan un papel importante en la prevención de la hipertensión (Beilin et al., 2001). Entre los factores nutricionales relacionados positivamente con la hipertensión arterial está la ingesta de sal (Elliot et al., 1996; Svetkey et al., 2004; Harsha et al., 2004), claramente demostrada en “*The Dietary Approaches to Stop Hipertensión (DASH) Trial*” (Sacks et al., 2001), en “*The DASH-Sodium Trial*” (Sacks et al., 2001) y en “*The Trial of Nonpharmacologic Interventions in the Elderly (TONE)*” (Appel et al., 2001), la obesidad (Chiuve et al., 2006; Boursier, 2006) y el consumo de alcohol (Corrao et al., 2000; Mukamal et al., 2003).

Un reciente estudio prospectivo (Chiuve et al., 2006) con un seguimiento de 16 años de más de 40000 individuos procedentes de “*The Health Professionals Follow-up Study*”, resalta con los resultados obtenidos, que muchos episodios de riesgo cardiovascular podrían prevenirse a través de la adherencia a un estilo de vida sano incluso en individuos que siguen tratamiento farmacológico contra la hipertensión. Destacadas organizaciones de la salud han puesto de manifiesto el problema creciente de hipertensión arterial en niños (Couch y Daniels, 2005). Evitar un exceso de ganancia de peso en las primeras etapas de la vida se considera un factor clave para la prevención de hipertensión en la etapa adulta, siendo la reducción de peso también una intervención terapéutica importante para la prevención y tratamiento de la hipertensión en niños obesos o con sobrepeso (Mark, 2006). Por su parte, la lactancia materna y el consumo regular de frutas y verduras durante la infancia se han relacionado con adecuados niveles de presión sanguínea en la adolescencia (Sherry, 2005). Así mismo, el tipo de grasa de la dieta influye en los valores de la presión sanguínea (Grimsgaard et al., 1999). Recientemente se ha corroborado que cambios en las proporciones de la grasa aportada por la dieta, mediante la reducción del aporte de AGS y el incremento de AGMI, implican una disminución de la presión sanguínea diastólica en individuos sanos (Rasmussen et al., 2006).

- *Aumento de c-LDL*: El carácter aterogénico de la lipoproteína de baja densidad está bien establecido (Sniderman y Cianflone, 1999). Las partículas LDL más pequeñas (LDL densas) tienen un carácter más aterogénico (St Pierre et al., 2001) ya que son atrapadas más fácilmente por los proteoglicanos de la capa basal de la arteria, permanecen más tiempo en la íntima arterial y se oxidan en mayor grado (Shaefer, 2002). Estas LDL densas se originan cuando el hígado sintetiza mucha apo B. La apo B forma parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a razón de una molécula de proteína por partícula. Ante una misma cantidad de lípidos exportables, la cantidad de partículas de VLDL dependerá de la cantidad de

moléculas de apo B y serán tanto más pequeñas cuanto mayor sea su número (McNamara et al., 1996). Una vez transformadas las VLDL en LDL, las LDL pequeñas son aparentemente peor reconocidas por los receptores específicos titulares y mejor atrapadas en el foco ateromatoso (Campos et al., 1992). Además, se ha visto una correlación inversa entre las concentraciones de triglicéridos y el tamaño de partícula de las LDL (McNamara et al., 1992; Campos et al., 1992). Los niveles en plasma de c-LDL son regulados principalmente por la eliminación de partículas LDL por los receptores hepáticos de LDL. Cuanto mayor sea la expresión de estos receptores en el hígado, mayor será el grado de eliminación hepática de LDL, favoreciendo así la disminución en las LDL aterogénicas circulantes en plasma (Brown y Goldstein, 1986).

En enfermedades con hipertrigliceridemias, las LDL se enriquecen de triglicéridos y son peor reconocidas por los receptores LDL, con lo que recirculan en el plasma. Además, se ha podido comprobar que la pérdida de peso incrementa el tamaño de las partículas de LDL y que este tamaño no es heredable (Schaefer, 2002). La falta completa de receptores hepáticos de LDL es la causante de la hipercolesterolemia severa en pacientes con hipercolesterolemia familiar, que pueden llegar a tener niveles de c-LDL muy superiores a 1000 mg/dL (Zschocke y Schaefer, 2003). La regulación transcripcional de estos receptores de LDL se produce a través de un rígido y complejo mecanismo de retroalimentación regulado por la acción coordinada de cinco proteínas bien caracterizadas (Horton et al., 2002).

- *Aumento de LDL oxidada (LDL-ox) circulante*: Una elevada concentración de LDL oxidada ha sido relacionada con un aumento en el riesgo de CVD (Toshima et al., 2000; Suzuki et al., 2002; Nordin et al., 2003; Holvoet et al., 2003; Shimada et al., 2004; Meisinger et al. 2005). De hecho, modificaciones oxidativas de las LDL a través de la acción de células vasculares como células endoteliales, macrófagos y células de la musculatura lisa, y su ulterior acumulación en la pared arterial juegan un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis (Steinberg, 1997; Itabe, 2003). Estas LDL-ox inducen una respuesta de las células endoteliales que aumenta la adhesión y migración de monocitos del flujo sanguíneo a la íntima y su diferenciación a macrófagos, un proceso que estimula la peroxidación de las LDL (Díaz et al., 1997; Stocker y Keane, 2004). Las LDL-ox atrapadas en la pared arterial son reconocidas por receptores *scavenger* presentes en la superficie de los macrófagos y se convierten en dianas para su internalización, que finalmente conducen a la formación de la célula espumosa (Osterud y Bjorklid, 2003). Así mismo, las concentraciones de LDL-ox se han relacionado con el grosor de la íntima media y con la incidencia de placas en las arterias carótidas y femorales en hombres (Hulthe y Fagerberg, 2002; Metso et al., 2004), así como con el progreso

del proceso de aterosclerosis en las arterias carotidas (Wallenfeldt et al, 2004). Diversos estudios han mostrado que la ingesta de determinados alimentos y nutrientes puede influir de manera significativa en el proceso de oxidación de las LDL, sugiriendo un papel bioactivo debido básicamente a sus propiedades antioxidantes (Lapointe et al., 2006).

- *Aumento de Lipoproteína (a)*: La Lp(a) es una apolipoproteína con apo B-100, que muestra una gran capacidad aterogénica (Orth-Gomer et al., 1997). El mecanismo de entrada de la Lp(a) en el endotelio parece ser similar al de la LDL. Se cree que su contenido en lípidos y apo B es capaz de provocar una modificación oxidativa y promover la proliferación de células musculares lisas. Parece poseer capacidad de inhibir el sistema fibrinolítico, al competir su apo(a) con el fibrinógeno por el sitio de unión a las células endoteliales, plaquetas y fibrina. Las concentraciones de Lp(a) están genéticamente determinadas en parte debido a una marcada variación en isoformas de apo(a) (Rodríguez et al., 1994). Elevadas concentraciones están asociadas con un aumento de la secreción de apo(a). Los niveles de Lp(a) pueden bajarse con niacina o terapia de reemplazo de hormonas (Taskinen et al., 1996).
- *Disminución de c-HDL*: La HDL es la responsable de la eliminación del exceso de colesterol de los tejidos en un proceso conocido como “transporte inverso del colesterol”, lo que le confiere un claro papel antiaterogénico (Sattler et al., 2005). El exceso de colesterol de los tejidos extrahepáticos se transporta al hígado y órganos esteroideogénicos, en los que es usado para la síntesis de lipoproteínas, ácidos biliares y hormonas esteroideas (Stein y Stein, 1999; Nofer et al., 2002; Dastani et al., 2006). Alteraciones en este sistema de “transporte inverso de colesterol” favorecen la acumulación de colesterol en la pared vascular, predisponiendo un aumento del riesgo del desarrollo de arterioesclerosis (Sattler et al., 2005). Además, las HDL son antioxidantes frente a las LDL y frenan el reclutamiento de los monocitos circulantes y su transformación en macrófagos en el interior de la placa de ateroma (Mataix, 2002).
- *Concentraciones elevadas de homocisteína*: Elevadas concentraciones de homocisteína en plasma se han asociado con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (Eikelboom et al., 1999; Wald et al., 2002; Mazza et al., 2004). La homocisteína es un metabolito del aminoácido esencial metionina, que contiene un grupo tiol en su estructura. Su conversión a su precursor metionina o su transsulfuración a cisteína son los pasos metabólicos que reducen las concentraciones de homocisteína total en las células y en sangre (Andreotti et al., 2000). Entre los factores que pueden influir en su metabolismo destacan el ácido

fólico, la vitamina B-6 y la vitamina B-12, ya que son cofactores en las etapas enzimáticas del metabolismo de la homocisteína (Selhub et al., 1992; Weikert et al., 2005). Los niveles de homocisteína en plasma aumentan con la edad, por problemas en la función renal, por una baja ingesta de vitamina B, así como por defectos genéticos de las enzimas que participan en su metabolismo (Mazza et al., 2004). Pacientes con homocistinuria, que tienen hiperhomocisteinemia severa, mueren prematuramente de aterotrombosis. Muchos, pero no todos los estudios transversales y prospectivos indican de media que niveles de homocisteína total inferiores a los 10 µg/L están asociados o predicen el desarrollo de la enfermedad vascular periférica y de lesiones macrovasculares cerebrales y coronarias (Andreotti et al., 2000; Falk et al., 2001). La modificación de los patrones alimenticios tiene un efecto decisivo en las concentraciones de homocisteína (Appel et al., 2000; Jacques et al., 2001, Ganji y Kafai, 2003; Gao et al., 2003; Li et al., 2006). Recientemente Weikert y colaboradores han mostrado que un patrón alimentario relacionado con el metabolismo de la homocisteína, consistente en una combinación de una alta ingesta de aceite de oliva, fruta fresca, nueces, pan integral, champiñones, vino y verduras de la familia de las crucíferas, está asociada con una disminución del riesgo coronario en dos poblaciones alemanas independientes (Weikert et al., 2005).

- *Obesidad*: La obesidad está considerada un factor independiente de riesgo de la enfermedad cardiovascular (Rashid et al., 2003) y así lo demuestran estudios recientes (York et al., 2004; Bray et al., 2004; Yusuf et al., 2005; Haffner y Taegtmeyer, 2003; Rabin et al., 2006). Además de los efectos adversos para la salud, conviene destacar que la obesidad también constituye una enorme carga económica para la salud pública (Roux y Donaldson, 2004). La asociación obesidad-enfermedad cardiovascular se hace más estrecha si se tiene en cuenta la distribución de grasa corporal, siendo más evidente cuando el acúmulo de grasa es a nivel abdominal (Mamalakis et al., 2002; Suzuki et al., 2006; Licata et al., 2006). Diversas medidas antropométricas, tales como el valor de la circunferencia de la cadera, han atraído el interés científico como posibles factores independientes del riesgo cardiovascular (Benetou et al., 2006) acumulando asociaciones inversas con los datos de mortalidad y morbilidad de CVD y otras patologías (Seidell et al., 2001; Lissner et al., 2001; Snijder et al., 2004; Sakai et al., 2005). La obesidad abdominal también incrementa el riesgo de síndrome metabólico en adolescentes con sobrepeso (Cook et al., 2003; Chia y Boston, 2006) y los niños con componentes del síndrome metabólico tienden a continuar con ellos durante la etapa adulta (Malecka-Tendera y Mazur, 2006). Por todo ello es necesario intensificar esfuerzos en la población infantil para evitar ganancias de peso inapropiadas durante la infancia que repercutirán posteriormente en la etapa adulta

(Graf et al., 2006; Lichtenstein et al., 2006¹). Una forma de mantener un buen estado físico y cardiovascular se basa en realizar ejercicio físico de forma regular, el cual ayuda a eliminar posibles excesos de peso y a mantener un peso saludable (Fogelhom y Kukkonen-Harjula, 2000; Boursier, 2006). El mantenerse físicamente activo mejora factores de riesgo CVD como la presión sanguínea, el perfil lipídico y los niveles de glucosa en sangre, a la vez que disminuye el riesgo de desarrollar otras enfermedades crónicas como la diabetes de tipo 2, la osteoporosis, la depresión y obviamente la obesidad (Maron et al., 2004).

- *Aumento del fibrinógeno e inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1):* Un gran número de infartos de miocardio son debidos a una trombosis oclusiva, o un coágulo de sangre que impide el flujo sanguíneo en arteria coronaria (Lefevre et al., 2004). El proceso de hemostasis supone un complejo sistema de factores, que normalmente generan y degradan los coágulos sanguíneos, trabajando dentro de un delicado equilibrio (Stassen et al., 1997). Los tres sistemas biológicos que contribuyen a la formación del coágulo son la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis (**Figura 15**).

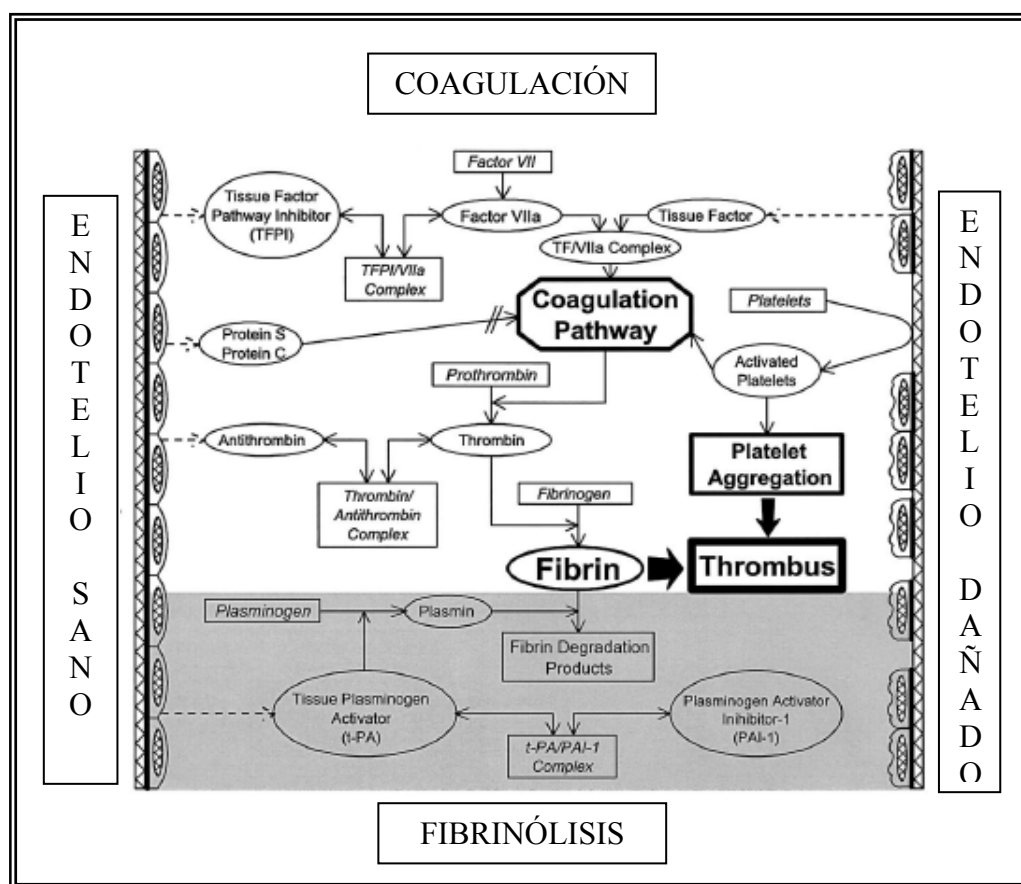


Figura 15. Esquema de los factores claves involucrados en los procesos de coagulación y de fibrinólisis (Figura adaptada de Lefevre et al., 2004)

Los óvalos de la **Figura 15** representan enzimas o complejos activados mientras los cuadros en cursiva representan los inactivados. El polígono de nombre “*coagulation pathway*” representa la serie de reacciones implicadas en la cascada de coagulación que incluye la activación de los factores V, VII, VIII, IX y X. En la actualidad un aumento del riesgo cardiovascular ha sido relacionado con algunos de los factores hemostáticos (Tracy et al., 1997; Ridker et al., 1997) entre los que destacan el factor VII (Mennen et al., 1997) el fibrinógeno (Danesh et al., 1998) y el PAI-1 (Ridker et al., 1993). Aunque se ha sugerido el grado de activación plaquetaria como un posible factor de riesgo cardiovascular, actualmente los resultados de los estudios realizados al respecto no permiten una asociación clara, principalmente por las limitaciones en los métodos de análisis utilizados (Lefevre et al., 2005).

Por otra parte cabe destacar la evidencia científica que sugiere una relación entre los factores hemostáticos de riesgo cardiovascular y los diferentes tipos de AG aportados por la dieta, AGPI n-3 (Knapp, 1997; de Lorgeril et al., 1999), AGS (Hunter et al., 2000), AGPI n-6 (Larsen et al., 1999) y AGMI (López-Segura et al., 1996) resaltando una vez más el papel fundamental que los hábitos alimentarios tienen en la salud humana.

- *Tabaco*: Se sabe que los fumadores muestran elevados niveles de fibrinógeno, hecho que se asocia al riesgo de aterosclerosis y complicaciones cardiovasculares agudas. Por otra parte, el tabaco origina muchos compuestos oxidantes que facilitan la oxidación de la LDL, por lo que asociaciones internacionales recomiendan categóricamente eliminar su consumo (Lichtenstein et al., 2006²). Además, la exposición al humo de tabaco en fumadores pasivos muestra efectos tan adversos como los ocasionados a los fumadores activos (Barnoya y Glantz, 2005). Así mismo, un reciente estudio muestra que entre los factores contribuyentes al denominado síndrome metabólico (tratado en el apartado 2.5.3.) la dislipidemia se ha asociado con el consumo crónico de tabaco (Masulli et al., 2006).

Así pues, a través de los factores de riesgo modificables de la enfermedad cardiovascular, la mejora de los patrones alimentarios que aseguren un aporte de nutrientes adecuado junto a un equilibrio energético (Bazzano et al., 2003; Knuops et al., 2004; Hung et al., 2004; Appel et al., 2005; Carrero et al., 2005; Kontogianni et al., 2006) así como la mejora en el estilo de vida (Guthrie et al., 2002; Nielsen et al., 2003; Klein et al., 2004; Pereira et al., 2005; Chiuvé et al., 2006) han de establecerse las estrategias para reducir el riesgo de esta patología en la población general (Lichtenstein et al., 2006²; Fuster, 2006).

Tanto es así que Zyriax y colaboradores plantearon el estudio caso-control “*Coronary Heart Disease in Women-The CORA Study*” (Zyriax et al., 2005) con el objetivo de valorar el orden de magnitud del efecto de la nutrición en la enfermedad cardiovascular independientemente de los factores de riesgo clínicos, que actualmente siguen siendo los factores diana clásicos de la terapia farmacológica. Los resultados mostraron un mayor impacto de los hábitos alimenticios en la enfermedad coronaria en mujeres independientemente de y aditivamente a los factores de riesgo convencionales, sugiriendo que el potencial de la nutrición como parte de un estilo de vida saludable es comunmente infravalorado a favor del tratamiento farmacológico (Zyriax et al., 2005).

2.5.3. El síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un término utilizado para designar un grupo de anomalías metabólicas consistentes básicamente en la resistencia a la insulina y otros factores de riesgo cardiovascular ya mencionados, tales como la obesidad visceral, la dislipidemia y los estados de inflamación sistémica (Singh et al., 2006). Fue sugerido por primera vez a finales de los 80 denominándolo “síndrome X” (Reaven, 1988) y actualmente existe cierta controversia en la comunidad científica sobre su utilidad práctica (Kahn et al., 2005; Grundy et al., 2005; Reaven, 2005; Ford et al., 2005). Para algunos investigadores, el síndrome metabólico se basa en recordar a la clase médica que determinados factores de riesgo tienden a agruparse, de forma que puede ser utilizado en el campo de la salud pública como un indicador más de los problemas de salud asociados a la obesidad y la diabetes (Alberti et al., 2005; Unwin, 2006). Entre las cuestiones que se plantean entorno al uso del síndrome metabólico destacan:

- La necesidad de establecer una única definición del mismo, para evitar la disyuntiva que surge al poder caracterizar a dos individuos con el síndrome metabólico teniendo éstos diferentes perfiles de los factores de riesgo que lo definen (Unwin, 2006). Sus principales definiciones se muestran resumidas a través de sus componentes en la **Tabla 4**, siendo la definición de la *Federación Internacional de Diabetes* la más reciente (Alberti et al., 2005).
- La importancia de discernir si el síndrome metabólico *per se* ofrece una mayor información predictiva que la de sus componentes por separado (Singh et al., 2006). Diversos estudios centrados en este tópico han sido revisados concluyendo que el síndrome no ofrece información extra que sus componentes (Kahn et al., 2005; Iribarren et al., 2006). Sin embargo, un estudio reciente ha sugerido que el síndrome podría proveer poder predictivo de episodios cardiovasculares incluso después del ajuste de sus componentes individuales (Scuteri et al., 2005).

Tabla 4. Principales definiciones del síndrome metabólico a través de sus componentes (tabla adaptada de Unwin, 2006)

<i>Reaven 1998¹</i>	<i>OMS 1999²</i>	<i>NCEP 2001³</i>	<i>IDF 2005⁴</i>
Componentes del síndrome metabólico			
Resistencia a la insulina, absorción estimulada de glucosa	Resistencia a la insulina (cuartil más elevado dentro de una población) Regulación reducida de glucosa o diabetes	Glucosa en plasma en ayunas ≥ 6.1 mmol/L o diabetes diagnosticada	Glucosa en plasma en ayunas ≥ 5.6 mmol/L o diabetes diagnosticada
	Obesidad central: ratio cintura-cadera > 0.9 (h), >0.85 (m); y/o IMC > 30kg/m ²	Obesidad abdominal: CC > 102cm(h), >88cm (m)	Obesidad abdominal: puntos de corte específicos en función del grupo étnico
Niveles elevados de VLDL-TG Niveles bajos de HDL-col	Niveles elevados de TG plasmáticos: ≥ 1.7 mmol/L HDL-col bajo: <0.9 mmol/L (h); <1mmol/L (m)	Niveles elevados de TG: ≥ 1.7 mmol/L Niveles bajos de HDL-col: <1.0 mmol/L (h); <1.3 mmol/L (m)	Niveles elevados de TG: ≥ 1.7 mmol/L Niveles bajos de HDL-col: <1.0 mmol/L (h); <1.3 mmol/L (m)
Hipertensión	Presión arterial elevada: ($\geq 140/90$ mmHg) Microalbuminuria	Presión arterial elevada: ($\geq 130/85$ mmHg) o hipertensión diagnosticada y tratada	Presión arterial elevada: ($\geq 130/85$ mmHg) o hipertensión diagnosticada y tratada

Definiciones de síndrome metabólico de acuerdo con: ¹ Criterios para la definición de “síndrome X” no especificados. Los rasgos característicos son: resistencia a la insulina, pero no todos los 5 componentes deben estar presentes en el mismo individuo; ² Intolerancia a la glucosa y/o resistencia a la insulina y al menos dos de los otros componentes. (OMS, 1999); ³ Presencia de tres o más de los componentes (NCEP *Adult Treatment Panel III* (Expert Panel, 2001)); ⁴ Presencia de obesidad central y al menos dos componentes más. (IDF: *International Diabetes Federation* (Alberti et al., 2005))

- El valor clínico que ofrece en comparación con otras alternativas para predecir el riesgo cardiovascular, tales como las basadas en la ecuación de Framingham (Gordon et al., 1977; De Backer et al., 2003; Stern et al., 2005). De hecho, en las ecuaciones de Framingham y otras similares, los factores de riesgo presentan diferentes ponderaciones en función de su contribución y grado de importancia. En cambio, en el síndrome metabólico todos sus componentes son ponderados de forma equitativa.

Aún teniendo en cuenta las anteriores cuestiones y limitaciones, conviene destacar que la prevalencia de este síndrome está aumentado de forma alarmante, no sólo en la población adulta, sino entre adolescentes y jóvenes (Kaufman, 2002; Cook et al., 2003; Unwin et al., 2003; Weiss et al., 2004; de Ferranti et al., 2004). Por tanto, y aunque sólo sirva como una simple reseña del nivel de riesgo cardiovascular asociado a la obesidad, su uso ya supone una herramienta útil para comparar diferentes poblaciones y seguir sus cambios a través del tiempo.

En este punto cabe destacar también los resultados de dos estudios epidemiológicos llevados a cabo con una muestra de más de 35000 individuos respectivamente, que indican que la agrupación de los componentes del síndrome metabólico incrementa significativamente el riesgo de mortalidad por cáncer de colón en comparación con sus componentes considerados de forma individual (Trevisan et al., 2001; Colangelo et al., 2002). Así mismo, Cowey y Hardy, en una reciente revisión sobre la relación síndrome metabólico-cáncer examinan los estudios más relevantes al respecto, planteando posibles mecanismos de actuación, y concluyen que un estudio más detallado de los mecanismos patológicos subyacentes asociados a los factores de riesgo del síndrome, permitirían establecer nuevas estrategias y criterios para los facultativos a la hora de diagnosticar y tratar a los pacientes con los factores de riesgo en estudio (Cowey y Hardy, 2006).

Por su parte, enfermedades como la artritis reumatoide también muestran un marcado aumento de prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular (Sattar et al., 2003; Maradit-Kremers et al., 2005). Recientemente se ha observado que de nuevo los factores de riesgo por separado se hallan más fuertemente asociados con la aterosclerosis subclínica que agrupados en las actuales definiciones del síndrome metabólico (Dessein et al., 2006). Paralelamente, Boney y colaboradores investigaron los efectos del síndrome metabólico en las primeras etapas de la vida, observando que los recién nacidos con mayor peso corporal de madres diabéticas tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar el síndrome metabólico en la infancia. Así mismo, aquellos recién nacidos de madres obesas también tienen mayor riesgo de desarrollar el síndrome (Boney et al., 2005)

2.5.4. Efecto de los ácidos grasos en la enfermedad cardiovascular

Los lípidos procedentes de la dieta en general, y los ácidos grasos en particular, pueden afectar de forma favorable o adversa al desarrollo y progresión del proceso de aterosclerosis y riesgo de enfermedad cardiovascular. Parte de los efectos de los ácidos grasos de la dieta en la CVD se explica a través de los factores de riesgo tradicionales “lípidos-lipoproteína” (ej. colesterol total, LDL-c, HDL-c, triglicéridos) (Zyriax y Windler, 2000; Hu y Willet, 2002; Wolfram, 2003), y parte se explica por otros mecanismos como los que relacionan los ácidos grasos de la dieta con los procesos de hemostasis, peroxidación lipídica y estrés oxidativo de la pared vascular, y procesos inflamatorios y de la función endotelial (Zalba et al., 2000; Lefevre et al., 2004; Thijssen y Mensink, 2005). Mecanismos alternativos a los propuestos tradicionalmente sobre el papel de los componentes de la dieta en la enfermedad cardiovascular ayudarán a tener un mejor conocimiento de la influencia de los hábitos alimentarios en el riesgo cardiovascular (Serrano-Martínez et al., 2004).

2.5.4.1. Ácidos grasos saturados

El marcado efecto del aumento del colesterol sérico por parte de los AGS se conoce desde finales de los años cincuenta (Anderson et al., 1957; Hegsted et al., 1965). Sin embargo, no fue hasta la década de los noventa cuando diferentes estudios demostraron que no todos los AGS afectan de la misma manera las concentraciones de colesterol en el organismo (Wahrburg, 2004). Son sólo tres AGS, el ácido láurico (12:0), el ácido mirístico (14:0), y el ácido palmítico (16:0) los que influyen significativamente en el colesterol total y en las LDL (Kris-Etherton y Yu, 1997; Temme et al., 1996; Mensink et al., 2003). Estos AGS disminuyen la actividad de los receptores de LDL (Dietschy et al., 1993; Dietschy, 1998). Se cree que este efecto tiene lugar por disminución de la expresión del receptor de LDL del mensajero del ácido ribonucleico (mRNA) (Spady et al., 1983; Nicolosi et al., 1990), así como por una disminución de la fluidez de la membrana (Hennesy et al., 1992).

Por otra parte, los AGS de cadena corta y mediana (4:0-10:0), así como el ácido esteárico (18:0) no causan una variación significativa de los niveles de colesterol (Bonanome et al., 1988). En el caso del ácido esteárico, ha sido descrita una disminución en los niveles de colesterol-HDL (Yu et al., 1995). En un estudio en el que se comparaban ácido mirístico, palmítico y esteárico, se vio que el ácido esteárico reducía los niveles tanto de LDL como de HDL (Aro et al., 1997), de forma que los *ratios* de LDL/HDL y de apo B/apo A-I no se veían afectados. La evidencia epidemiológica (Dwyer, 1995; Hu et al., 1997; Hu et al., 2001) por su parte sugiere que distinguir esteárico del resto de AGS en los consejos dietéticos para reducir el riesgo de CVD no parece estar justificado.

Además, estos ácidos grasos saturados se encuentran altamente correlacionados en las dietas normales debido a que se encuentran en las mismas fuentes alimentarias (Hu et al., 2001). Aún así, hay que destacar que los efectos del ácido esteárico son más favorable que los debidos a los ácidos grasos *trans* (Mensink, 2005).

Desde un punto de vista hemostático, estudios de suplementación no han logrado demostrar un claro aumento de la agregación plaquetaria con dietas ricas en ácido palmítico y esteárico (Turpeinen et al., 1998; Kelly et al., 2001; Kelly et al., 2002). Sin embargo, diversos estudios en la década de los noventa mostraron una asociación positiva entre la ingesta de AGS y los niveles del factor VII (Marckmann et al., 1993; Mitropoulos et al., 1994; Marckmann et al., 1994; Elmer et al., 1995; Niskanen et al., 1997). El efecto de los AGS es independiente de los cambios en la ingesta total de grasa debido a que la sustitución de AGS por carbohidratos, AGMI o AGPI produce básicamente resultados similares (Junker et al., 2001). La reducción en la actividad coagulante del factor VII con la reducción de AGS viene acompañada por una disminución en el antígeno del factor VII, sugiriendo que estos efectos son el resultado de niveles más bajos de proteína y no de activación reducida (Mitropoulos et al., 1994). Estos resultados son consistentes con observaciones hechas en estudios poblacionales que muestran una asociación positiva entre la ingesta de AGS y los niveles plasmáticos del factor VII (Shahar et al., 1995; Mennen et al., 1997), y en especial el efecto es mayor en el caso de ácido láurico y mirístico (Tholstrup et al., 1994) y ausente para el ácido esteárico (Hunter et al., 2000; Kelly et al., 2001).

2.5.4.2. Ácidos grasos monoinsaturados

La primera evidencia epidemiológica de una correlación negativa entre la ingesta de AGMI, mortalidad global, y mortalidad debida a CVD, fue puesta de manifiesto por el “*Seven Countries Study*” (Keys et al., 1986). Este estudio mostró que la mortalidad por CVD era particularmente baja en países mediterráneos, donde el aceite de oliva (rico en ácido oleico) era la principal fuente de lípidos.

Existen otros estudios prospectivos que muestran un aumento en el riesgo de CVD con un incremento de la ingesta de AGMI (Posner et al., 1991; Esrey et al., 1996). Sin embargo, en estos estudios no se ajustaron los resultados por ingesta de otro tipo de lípidos. Un estudio más reciente, en el que sí se ajustó por ingesta de otra clase de lípidos consumidos, sí mostró una asociación inversa entre CVD y AGMI (Pietinen et al., 1997). Un resultado similar se observó en el “*Nurses’ Health Study*” tras ajustar variables confusoras, aunque la asociación del riesgo cardiovascular fue más débil para los AGMI que para los AGPI (Hu et al., 1997).

Resulta importante destacar el ajuste por variables de confusión, ya que en aquellas poblaciones en las que el aporte de AGMI no proviene en su mayor parte de la ingesta de aceite de oliva, como ocurre en la región Mediterránea, la ingesta de AGMI puede relacionarse positivamente con un aumento del riesgo cardiovascular. Así por ejemplo, la fuente principal de AGMI en los Estados Unidos proviene de grasas cárnicas, lácteas y de aceites vegetales parcialmente hidrogenados, encontrándose los AGMI fuertemente correlacionados con la ingesta de ácidos grasos saturados y *trans* (Hu et al., 2001).

Así mismo, muchos investigadores han demostrado el efecto hipocolesterolémico de los AGMI cuando los AGS de la dieta son sustituidos por AGMI (Becker et al., 1983; Wardlaw et al., 1990; Mensink et al., 2003). Supuestamente, cuando los AGS disminuyen y los AGMI aumentan de forma simultánea, la supresión de la actividad de los receptores de LDL es neutralizada y se mejora la eliminación celular de LDL (Dietschy, 1998). Una de las ventajas otorgadas a los AGMI es la de no reducir los niveles del colesterol de las HDL, contrariamente a lo que se ha observado con dietas ricas en AGPI (Delaplanque et al., 1991; Pérez-Jiménez et al., 2002)

También se ha observado que al reemplazar carbohidratos por ácidos grasos monoinsaturados, los niveles de HDL aumentan sin afectar las LDL (Sacks y Katan, 2002; Mensink et al., 2003). Este cambio en la dieta puede mejorar la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en pacientes con diabetes mellitus (Ros, 2003). Los AGMI presentan además un efecto protector contra la oxidación de las LDL (Lapointe et al., 2006). Debido a su estructura química, los AGMI son mucho más estables y menos susceptibles de peroxidación lipídica que los AGPI. Se ha observado que una ingesta elevada de AGMI resulta en un incremento en la concentración de ácidos grasos monoinsaturados en las partículas de LDL, conllevando a una menor susceptibilidad de éstas a oxidarse en comparación a partículas de LDL con altas concentraciones de AGPI (Reaven et al., 1996; Kratz et al., 2002; Thijssen, 2005). Finalmente es interesante destacar que estudios llevados a cabo con animales han puesto de manifiesto la esencialidad para determinados órganos del principal AGMI, el ácido oleico (Bourre, 2004).

2.5.4.3. Ácidos grasos poliinsaturados

Ácidos grasos de la serie n-6

Estudios realizados a finales de los noventa demostraron que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6, mayoritariamente el ácido linoleico, disminuyen de forma significativa las concentraciones de colesterol total y LDL cuando sustituyen ácidos grasos saturados en la dieta (Gardner y Kraemer, 1995; Kris-Etherton et al., 1997).

El ácido linoleico también disminuye el colesterol de las HDL, mientras que el araquidónico de la dieta tiene poco o ningún efecto en las concentraciones de las lipoproteínas plasmáticas (Nelson et al., 1997). Así mismo, estudios de intervención usando dietas ricas en AGPI resultaron más efectivos en disminuir el colesterol sérico que dietas con bajo contenido en grasa pero alto contenido en carbohidratos (Sacks y Katan, 2002; Appel et al., 2005). La asociación inversa entre AGPI y CVD observada en el “*Nurses’ Health Study*” sugirió que los AGPI n-6 podrían tener otros efectos beneficiosos en la enfermedad cardiovascular además de la mejora del perfil lipídico. En este mismo estudio, una elevada ingesta de AGPI n-6 se asoció con una significativa baja incidencia de diabetes de tipo 2 (Hu et al., 1999). Además el *ratio* entre AGPI: AGS también se asoció con un menor riesgo de CVD.

Diversos estudios han mostrado que un consumo alto de AGPI ejerce un papel protector contra el riesgo cardiovascular (Ascherio, 2002; Binkoski et al., 2005; Oh et al., 2005). Sin embargo, elevadas ingestas conducen a una elevada susceptibilidad a la peroxidación lipídica (Lapointe et al., 2006), un efecto especialmente negativo en relación a la oxidación de las LDL y la génesis tumoral (Wahrburg, 2004). Varios estudios que han comparado los efectos en la oxidación de las LDL debidos a una suplementación de aceites de pescado, ricos en AG n-3, frente a la de aceites ricos en AGMI o AGPI de la serie n-6, han mostrado en su mayoría una reducción en el *lag time* y en la velocidad de oxidación, parámetros indicadores del proceso de oxidación (Turini et al., 2001; Leigh-Firbank et al., 2002; Pedersen et al., 2003; Mesa et al., 2004). Una hipótesis para este paradójico resultado sugiere que los lípidos presentes en la superficie de la LDL son inicialmente más fácilmente oxidados en las partículas de LDL de individuos consumidores de aceite de pescado, pero la extensión de la oxidación es menor (Lapointe et al., 2006). Por tanto, mientras los AGPI de la serie n-6 han sido claramente identificados promoviendo la oxidación de las LDL, los efectos de los AGPI n-3 sobre la misma parecen diferir dependiendo del ácido graso (Mesa et al., 2004). Este hecho destaca el diferente papel de los AGPI en el proceso de oxidación dependiendo de la posición de sus dobles enlaces.

Por otra parte, muy pocos estudios prospectivos han evaluado la interacción entre AGPI de las series n-6 y n-3 y el riesgo coronario (Hu et al., 1999; Djousse et al., 2001; Mozaffarian et al., 2005). Entre ellos es interesante destacar los resultados de un estudio prospectivo de cohortes de 14 años de seguimiento en más de 45000 hombres sin problemas cardiovasculares al inicio del estudio, que mostraron que un consumo apreciable de AGPI-CL n-3 (≥ 250 mg/d) está asociado con menor riesgo de muerte súbita en un 40-50% independientemente de los antecedentes de ingesta de AGPI de la serie n-6 (Mozaffarian et al., 2005). Estos resultados sugieren que los AGPI n-6 ni contrarrestan ni

umentan enormemente los beneficios cardiovasculares de un consumo modesto de AGPI-CL n-3.

Paralelamente, De Caterina y colaboradores descubrieron que tanto los AGPI de la serie n-6 como los de la serie n-3 tienen propiedades antiinflamatorias que inhiben la activación aterogénica de las células vasculares endoteliales (De Caterina et al., 2000). Ambos tipos de AGPI inhiben la producción de células endoteliales de moléculas de adhesión e interleuquinas, mediadores claves que propagan el proceso de aterosclerosis (Sacks y Campos, 2006). Estos efectos antiinflamatorios también se han hallado en células monocíticas (Zhao et al., 2005). La acción protectora de AGPI específicos se ha relacionado directamente con el número de dobles enlaces en la molécula, independientemente de su configuración isomérica, hipotizando que éstos reducen la generación de peróxido de hidrógeno, que como se sabe es un activador crítico del sistema del factor nuclear κ -B de los factores de transcripción, que controla la expresión coordinada de moléculas de adhesión y de quimioatrayentes leucocito-específicos en la estimulación de citoquinas (De Caterina y Zampolli, 2001).

Los AGPI n-6 también inhiben la activación de NF- κ B en células endoteliales por otro mecanismo que involucra los ácidos epoxieicosatrienoicos antiinflamatorios (Node et al., 1999). Estos ácidos son producidos a partir de los AGPI n-6 a través de la citocromo P-450 epoxigenasa CYP2J2, y tienen a su vez importantes propiedades vasodilatadoras por vías de hiperpolarización y relajación de las células vasculares de la musculatura lisa (Oltman et al., 1998). El estudio “*CHIANTY*” añade relevancia clínica a los estudios mecanísticos en ácidos grasos poliinsaturados ya que elevados niveles plasmáticos de AGPI n-6 (especialmente de ácido araquidónico) y de AGPI n-3 (especialmente DHA) fueron asociados con niveles reducidos de marcadores proinflamatorios (particularmente IL-6 y IL-1-ra) y niveles aumentados de marcadores antiinflamatorios (particularmente TGF- β), así como el ácido α -linolénico fue asociado con niveles reducidos de proteína C reactiva (Ferrucci et al., 2005).

El ácido linoleico conjugado

Durante los últimos años, el ácido linoleico conjugado, término utilizado para designar al conjunto de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico que tienen los dos dobles enlaces conjugados, ha despertado un interés en la comunidad científica basado en los beneficios para la salud hallados en estudios en animales (Corl et al., 2003; Pariza, 2004; Lock et al., 2004; Toomey et al., 2006) y en un menor grado en estudios en humanos (Smedman y Vessby, 2001; Gaullier et al., 2002; Rainer y Heiss, 2004; Terpstra, 2004). Entre éstos, cabe destacar los resultados obtenidos en variables relacionadas directamente con el riesgo de enfermedad cardiovascular, tales como el perfil lipídico en

sangre (Nicolosi et al., 1997; Mougios et al., 2001; Benito et al., 2001; Petridou et al., 2003), el crecimiento y regresión de lesiones aterómicas (Kritchevsky et al., 2004), la composición corporal (Blankson et al., 2000; Zambell et al., 2000; Wang et al., 2004; Gaullier et al., 2004), la sensibilidad a la insulina (Riserus et al., 2002; Aminot-Gilchrist et al., 2004) y la función inmune (Cook et al., 1993; Roche et al., 2001; Albers et al., 2003).

A pesar de que los estudios en animales han sido en su mayoría muy prometedores, no ocurre lo mismo en su aplicación en humanos, y por ello conviene aceptar con cautela los beneficios descritos hasta el momento, hasta que sean verificados por estudios futuros de mayor duración (Wahle et al., 2004; Tricon et al., 2005). Los dos principales isómeros del CLA de mayor objeto de estudio son el *cis-9, trans-11* CLA (conocido como ácido ruménico) y el *trans-10, cis-12* CLA. Otros isómeros tales como el *cis-9 cis-11* CLA y el *trans-9 trans-11* CLA también muestran algunos efectos biológicos pero su evidencia es todavía muy limitada (Tanmahasamut et al., 2004; Lai et al., 2005).

Una de las principales limitaciones durante los primeros años de investigación de esta familia de isómeros del ácido linoleico conjugado ha sido su dificultad de identificación y separación por las técnicas convencionales utilizadas hasta el momento para la determinación de los ácidos grasos debido principalmente a procesos de isomerización durante la metodología de análisis (Yamasaki et al., 1999; Noone et al., 2002; Henrksen et al., 2005; Kramer et al., 2004). A este hecho cabe sumarle también la no disponibilidad de isómeros completamente puros para evaluar los efectos específicos de cada isómero, habiéndose tenido que utilizar mezclas de isómeros que podrían ser una de las causas de la discrepancia de resultados en los diferentes estudios (Tricon et al., 2006). Así por ejemplo, en cuanto al perfil lipídico, Tricon y colaboradores mostraron recientemente que la suplementación en individuos sanos de los isómeros *cis-9, trans-11* CLA y *trans-10, cis-12* CLA altamente purificados, tenía un efecto opuesto en el perfil lipídico en sangre (Tricon et al., 2004). Mientras el *cis-9, trans-11* CLA disminuyó el ratio LDL: HDL y el ratio Colesterol total: HDL, el *trans-10, cis-12* CLA los aumentó, sugiriendo una influencia beneficiosa del ácido ruménico relativa al segundo isómero. Paralelamente, los avances instrumentales durante la reciente investigación científica en este campo han permitido ir subsanando los obstáculos metodológicos para llevar a cabo estudios de intervención más concretos y fiables (Ratnayake et al., 2006; De la Fuente et al., 2006). Por otra parte, se estima que la ingesta de CLA de la población mundial actual oscila entre cantidades negligibles y 1500 mg/día (McGuire et al., 1999), siendo su contribución a la dieta humana en general relativamente baja. Por tanto, hasta la fecha y hasta que se confirmen los beneficios relacionadas con la salud humana de isómeros específicos del CLA, no es posible establecer recomendaciones nutricionales al respecto.

Ácidos grasos de la serie n-3

El interés mostrado por parte de la comunidad científica por los AG de la serie n-3 sigue creciendo debido a la constante aparición de potenciales efectos beneficiosos para la salud (Deckelbaum y Akabas, 2006). Aunque en la actualidad todavía no se tiene claro si estos efectos son debidos al ALA, el EPA y el DHA, o solamente al EPA y/o DHA.

Cantidades más elevadas de α -linolénico que las encontradas habitualmente en la dieta (>1 - 2 g/día) han mostrado efectos protectores en relación a la enfermedad cardiovascular (De Lorgeril et al., 1999; Harris, 2005). Los resultados obtenidos en el estudio prospectivo de cohortes, de 18 años de seguimiento de un elevado número de mujeres que participaron en el “*Nurses’ Health Study*”, han mostrado una asociación inversa del consumo de ALA con el riesgo de muerte cardíaca súbita, pero no con otros tipos de episodios de muerte por enfermedad coronaria o de infartos de miocardio no mortales (Albert et al., 2005). La relación hallada resultó ser de tipo lineal y se mantuvo significativa incluso en mujeres con elevadas ingestas de AGPI-CL n-3.

Por su parte, también se han realizado estudios del efecto del ácido α -linolénico y riesgo cardiovascular en hombres (Brouwer et al., 2004). Mientras los estudios “*The Multiple Risk Factor Intervention Trial*” (Dolecek, 1992) y “*The Finnish Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study*” (Pietinen et al., 1997) mostraron asociaciones inversas entre el consumo de ALA y el riesgo por muerte coronaria, en el “*Zutphen Elderly Study*” (Oomen et al., 2001) no se halló relación alguna con el riesgo de enfermedad coronaria. Adicionalmente, el informe actualizado de “*The Health Professional Follow-Up Study*” (Mozaffarian et al., 2005) muestra únicamente una tendencia de una asociación inversa de consumo de ALA con el riesgo de enfermedad coronaria en general, principalmente en hombres con bajas ingestas de EPA y DHA, no habiéndose encontrado relación con el riesgo de muerte cardíaca súbita. Estos resultados contradictorios en relación al riesgo de muerte cardíaca súbita se unen a la hipótesis de posibles diferencias de asociaciones en función del sexo, ya que como se ha mencionado previamente en el apartado 1.2.2.2., diversos estudios muestran que la conversión limitada de ALA a EPA y DHA parece ser superior en las mujeres, por mediación de los estrógenos (Giltay et al., 2004; Burdge et al., 2006). A este hecho hay que sumarle que una mayor proporción de ALA parecer ser β -oxidada en hombres que en mujeres, metabolizándose como fuente de energía (Graham, 2004). Por otra parte, el α -linolénico también ha sido asociado con la reducción de factores inflamatorios y lipídicos del riesgo CVD en individuos hipercolesterolémicos (Zhao et al., 2004) y se ha relacionado inversamente con el desarrollo de placas de ateroma calcificadas en arterias coronarias (Djousse et al., 2005)

Por su parte, la asociación entre los AGPI-CL n-3 y la enfermedad cardiovascular fue establecida a partir de las observaciones de la baja mortalidad por CHD que presentaban los esquimales de Groenlandia a pesar de consumir una dieta rica en grasa (Din et al., 2004). En 1970 los investigadores daneses Bang y Dyerberg propusieron que este hecho podía deberse al alto contenido de AGPI-CL n-3 en la dieta de los esquimales, en la que destacaba el alto consumo de pescado, carne de foca y ballena (Dyerberg et al., 1975; Bang et al., 1976). Desde entonces, numerosos estudios han centrado su atención en evaluar la relación entre la ingesta de AGPI-CL n-3 y la enfermedad cardiovascular (Kris-Etherton et al., 2003; Holub y Holub, 2004; Harper y Jacobson, 2005; Hooper et al., 2006; Schmidt et al., 2006; Psota et al., 2006; Iso et al., 2006; Jacobson, 2006; Deckelbaum y Akabas, 2006).

Diversos grupos de investigación han descrito varios efectos y mecanismos de acción de esta familia de ácidos grasos (Das, 2000; De Caterina y Zampolli, 2001; Calder, 2004; DeFilippis y Sperling, 2006; De Caterina et al., 2006). La **Figura 16** los resume, indicando los símbolos positivos y negativos una acción positiva o negativa en la protección CVD respectivamente.

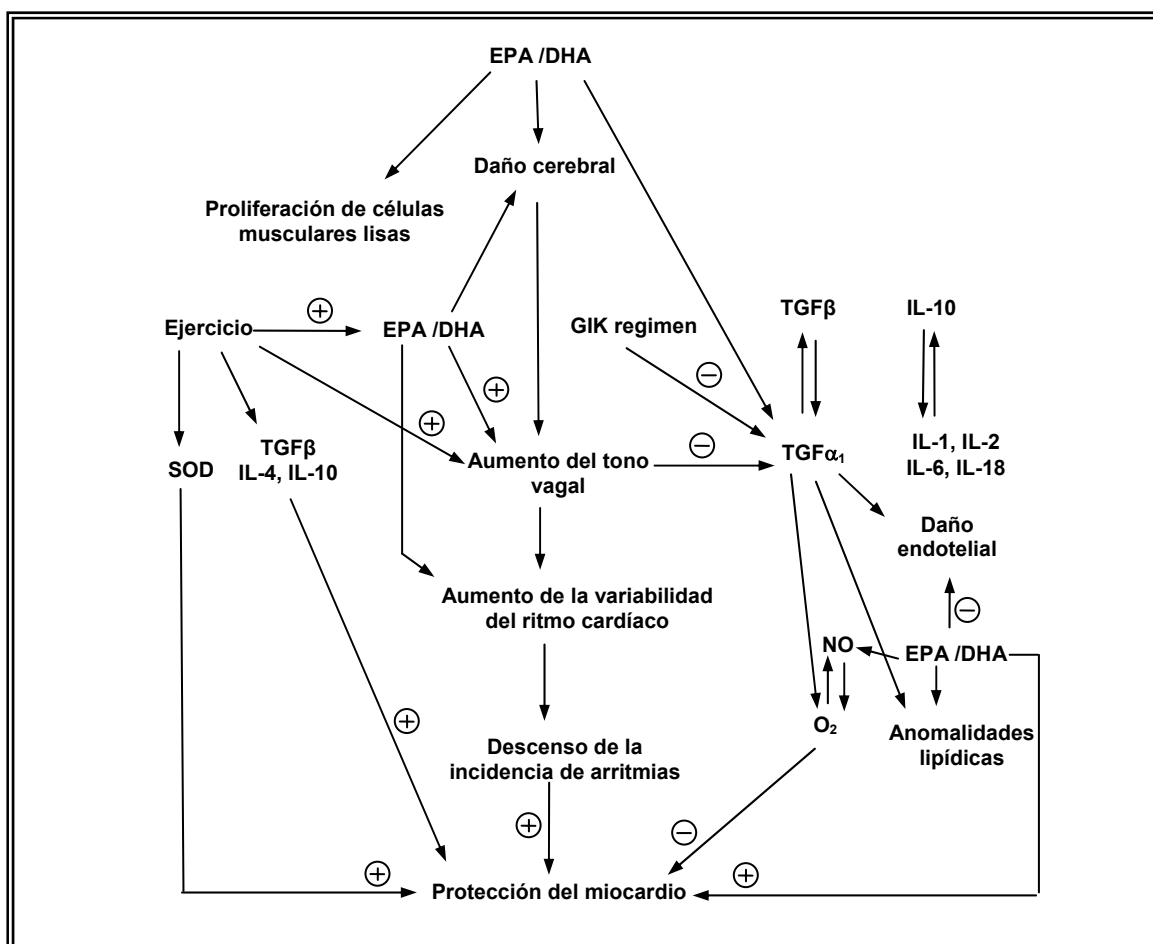


Figura 16. Esquema de la interacción entre los posibles mecanismos de acción de los ácidos grasos EPA y DHA en la enfermedad cardiovascular (Figura adaptada de Das, 2000)

Entre los mecanismos de acción de los AGPI-CL n-3 cabe destacar:

- Efectos anti-inflamatorios:* A ingestas suficientemente elevadas, los AGPI-CL n-3 reducen la producción de eicosanoides inflamatorios, citoquinas y especies oxígeno reactivas, así como la expresión de moléculas de adhesión (Calder, 2006). Estos ácidos grasos actúan tanto directamente, sustituyendo el ácido araquidónico como sustrato de eicosanoides e inhibiendo su metabolismo (Yaqoob y Calder, 2003; Din et al., 2004) como indirectamente, alterando la expresión de genes inflamatorios a través de efectos en la activación de factores de transcripción (Robinson et al., 1996; Benjafeld et al., 2001; De Caterina y Massaro, 2005). Su actuación en el metabolismo de los eicosanoides (**Figura 17**) se explica por el hecho que los AG de la serie n-3 reducen la transformación del ácido linoleico a ácido araquidónico al competir con éste por las enzimas requeridas para la síntesis de eicosanoides (Heller y Koch, 2000). La formación de TXA_2 , que favorece la agregación y vasoconstricción, se ve reducida a favor del TXA_3 que tiene un efecto agregante y vasoconstrictor mucho más débil (Nestel et al., 2002). Adicionalmente, la reducción de la formación de LTB_4 y un simultáneo incremento de la formación de LTB_5 causan la disminución de procesos inflamatorios.

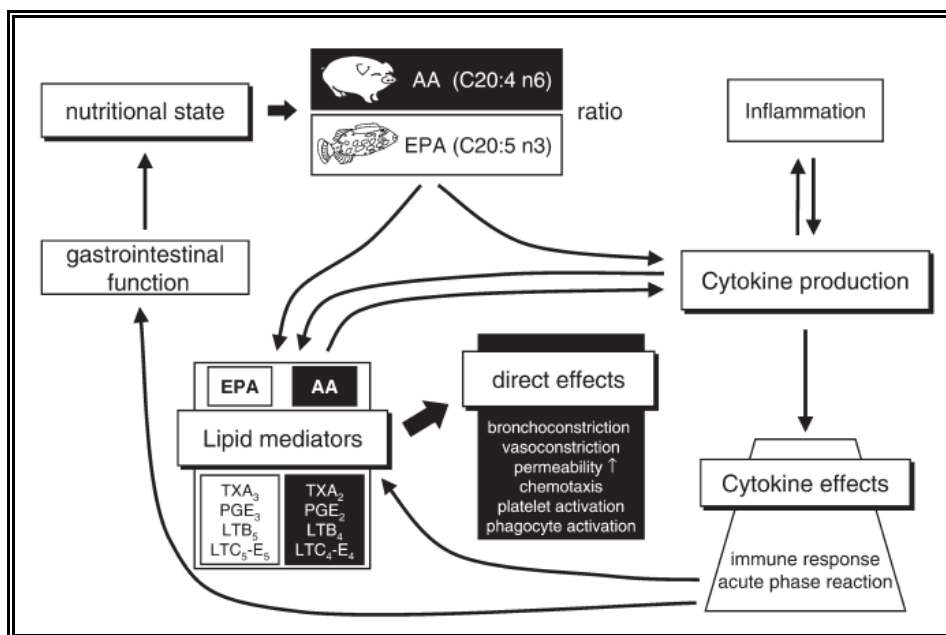


Figura 17. Efectos del ratio de AG n-6/n-3 en la regulación de la inflamación. Aunque los metabolitos del ARA (en negro) pueden inducir hiperinflamación, los mediadores derivados del EPA(en blanco) son más inmuno-neutrales (Figura adaptada de Heller et al., 2003).

La importancia de biomarcadores de activación inflamatoria ha sido puesta de manifiesto por diversos estudios (López-García et al., 2004; Calder, 2006). Se ha sugerido que la proteína C reactiva, un marcador de la inflamación sistémica y predictor independiente de enfermedad cardiovascular en mujeres sanas (Ridker et al., 2000) juega un papel activo en el proceso de aterogénesis (Blake y Ridker, 2003). Adicionalmente, el receptor soluble del factor nuclear de transcripción, que es inducido por el propio TNF y otras citoquinas, y es considerado desde hace tiempo un indicador de los procesos inflamatorios (Aderka, 1996) ha sido asociado con, la enfermedad coronaria, la angina de pecho y la obesidad (Hauner et al., 1998; Benjafield et al., 2001). En individuos sanos se ha encontrado que la ingesta a través de la dieta de AGPI n-3 está inversamente asociada con niveles plasmáticos de biomarcadores de inflamación (Pischon et al., 2003; López-García et al., 2004).

- *Efectos inhibidores de la activación endotelial*: El endotelio es un órgano regulador muy activo que detecta y evalúa las señales hemodinámicas, humorales e inflamatorias a las que está constantemente expuesto, y a las que responde con la secreción de factores que afectan el tono y estructura vascular (Cooke, 2000). Su disfunción es un factor etiológico en la aterosclerosis que aparece cuando el endotelio es activado permanentemente de forma elevada (De Caterina y Massaro, 2005). Bajo estas condiciones, la expresión de las moléculas de adhesión y citoquinas incrementa, la adhesión de leucocitos y plaquetas cambia, y la producción del vasodilatador óxido de nitrógeno disminuye (Cooke et al., 2005). Se ha visto que los AGPI de la serie n-3 disminuyen la receptividad endotelial a los estímulos proinflamatorios y proaterogénicos (**Figura 18**) disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión, reduciendo la interacción leucocitos-endotelio, así como aumentando la producción del óxido nítrico (Brown et al., 2001; De Caterina et al., 2004).

De entre los AGPI de la serie n-3, el DHA parece ser el ácido graso con un efecto inhibitor de la activación endotelial más potente (De Caterina y Massaro, 2005). Así mismo, diversos estudios han demostrado que estos ácidos grasos también mejoran la dilatación y elasticidad arterial (Goodfellow et al., 2000; Nestel et al., 2002; Thies et al., 2003; López-García et al., 2004). Se ha postulado que los AGPI-CL n-3 podrían inhibir los procesos de inflamación y activación endotelial al disminuir la producción de peróxido de hidrógeno (De Caterina y Massaro, 2005) ya que como se ha comentado anteriormente los múltiples dobles enlaces de la estructura de los ácidos grasos poliinsaturados les permiten reaccionar con especies oxígeno reactivas.

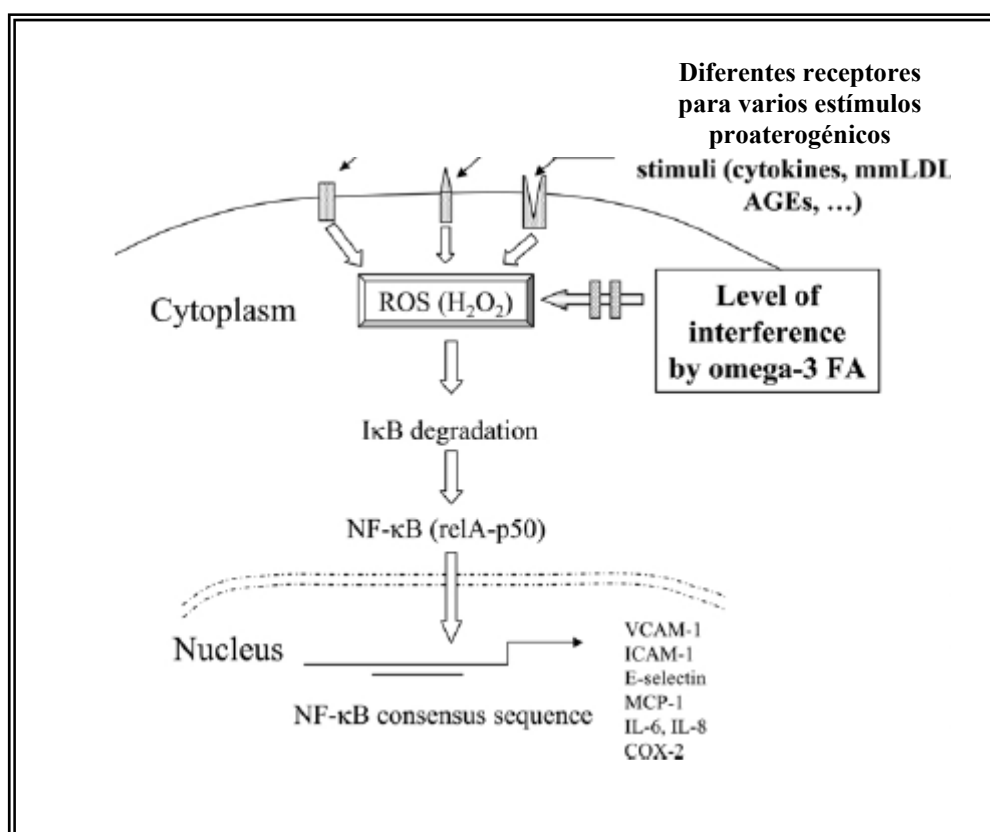


Figura 18. Esquema de la supuesta zona de acción de los AGPI n-3 en la inhibición de la activación endotelial, potenciando así la disminución del proceso de aterogénesis temprana. (Figura adaptada de De Caterina y Massaro, 2005)

- *Efectos antitrombóticos:* A pesar de que los estudios pioneros realizados en esquimales de Groenlandia (Dyeberg et al., 1978) mostraron que una ingesta muy elevada de AGPI-CL n-3 de origen marino inhibía la reactividad plaquetaria (incrementando el tiempo de sangrado cutáneo y afectando la agregabilidad plaquetaria) sugiriendo así que el consumo de estos ácidos grasos podría prevenir la trombosis coronaria, estudios posteriores con dosis más realistas de AGPI-CL n-3 también han mostrado un efecto inhibitor plaquetario por parte de estos ácidos grasos aunque bastante mínimo (Kristensen et al., 2001; Schmidt, 2003). Además, a los pacientes con aterosclerosis o con un alto riesgo de enfermedad coronaria se les suele recomendar tratamientos con aspirinas y /o otros inhibidores plaquetarios, y la adición de los AGPI-CL n-3 a tratamientos con aspirina aparentemente no favorece una mayor reactividad plaquetaria (Svaneborg et al., 2002). Por su parte, un estudio basado en investigar la influencia del enriquecimiento de fosfolípidos de las LDL por separado con EPA y DHA en la susceptibilidad de la LDL a la oxidación y en la habilidad de la LDL nativa y la LDL oxidada en la generación de trombina, concluyó en que ni el EPA ni el DHA afectaron significativamente la tendencia

trombótica de las LDL oxidadas en comparación con el placebo utilizado (aceite de oliva), aunque DHA tendió a disminuirla (Mesa et al., 2004).

- *Efectos antiarrítmicos*: Tres estudios clínicos, “*The Indian Experiment of Infarct Survival-4*” (Singh et al., 1997), “*The Diet and Reinfarction Trial (DART)*” (Burr et al., 1989) y el “*Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell’ Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione*” (Marchioli et al., 2002) han mostrado que tan sólo unos pocos meses de un consumo moderado de AGPI n-3 consiguen reducir el riesgo de episodios cardíacos como la muerte súbita cardíaca. Estos resultados sugieren un efecto inmediato de los AGPI n-3 en procesos arrítmicos antes que un efecto lento a través de la evolución o retroceso de la aterosclerosis (Simopoulos, 1999²; Brouwer et al., 2006). A su vez, un estudio piloto a pequeña escala diseñado para evaluar la seguridad de una infusión a base de AGPI n-3 en la iniciación de taquicardia ventricular prolongada en pacientes con un alto riesgo de muerte cardíaca súbita, mostró que la infusión no inducía la arritmia, sino que resultaba en una disminución de la misma en algunos pacientes (Schrepf et al., 2004), aunque los mismos autores sugieren que se trata de resultados preliminares que requieren de una confirmación con estudios placebo-control ciegos y aleatorios debido a las limitaciones del estudio piloto. Adicionalmente, diversos estudios observacionales (Siscovick et al., 1995; Albert et al., 1998; Hu et al., 2002; Albert et al., 2002) muestran una fuerte relación entre el consumo de pescado y los niveles en sangre de AGPI n-3 con enfermedad coronaria mortal y con muerte cardíaca súbita pero no con episodios cardiovasculares no mortales. Parece ser que la presencia de AGPI n-3 en fosfolípidos de membrana de cardiomiocitos disminuye la excitabilidad eléctrica y modula la actividad de los canales iónicos de sodio, potasio y calcio, asegurando así la estabilidad eléctrica en la célula previniendo arritmias (Leaf et al., 2003). De las arritmias cardíacas prolongadas, la fibrilación atrial (también denominada fibrilación auricular) es la más común, siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a través de un aumento del riesgo de ataque tromboembólico (Kannel et al., 1998; Benjamín et al., 1998). La prevalencia de fibrilación atrial aumenta con la edad, considerándola un problema para la población mayor. En base a los resultados de los anteriores estudios, tres estudios recientes plantearon la hipótesis que una ingesta de AGPI n-3 en humanos no sólo podía influir en arritmias de tipo ventricular sino también en las de tipo atrial. Por una parte, el estudio llevado a cabo por Mozaffarian y colaboradores, encontró una asociación inversa de fibrilación atrial con la ingesta de atún y otros pescados cocinados al horno o a la parrilla, pero no con pescados fritos o hamburguesas de pescado (Mozaffarian et al., 2004). Los autores atribuyeron estas diferencias al diferente contenido en AGPI-CL n-3 de los platos de pescado consumidos.

Por otra parte, el “*Danish Diet, Cancer, and Health Study*” (Frost y Vestergaad, 2005) no mostró ninguna asociación entre la ingesta de AGPI-CL n-3 procedente de pescado y la fibrilación atrial, aunque los autores no pudieron excluir la posibilidad de una variable de confusión residual debida a la ingesta de cápsulas de aceite de pescado. Finalmente, el tercer estudio (Brouwer et al., 2006) que utilizó datos procedentes de más de cinco mil participantes de “*The Rotterdam Study*” (Hofman et al., 1991) tampoco observó una asociación entre elevadas ingestas de EPA y DHA de pescado con la fibrilación atrial. Una posible explicación para esta falta de asociación podría estar relacionada con la edad de los participantes, más jóvenes que la muestra estudiada por Mozaffarian y colaboradores. Paralelamente los resultados recientes de “*The Study on Omega-3 Fatty acids ventricular Arrhythmia (SOFA) Study*” conducido en 26 unidades de cardiología de Europa, no indican evidencia de un efecto protector de la ingesta de AGPI-CL de la serie n-3 derivada de aceites de pescado en la arritmia ventricular en pacientes con defibriladores implantables (Brouwer et al., 2006).

- *Efecto reductor del ritmo cardíaco:* Se cree que los AGPI-CL n-3 podrían tener también un efecto antiarrítmico a través del sistema nervioso autónomo, debido a que una baja variabilidad del ritmo cardíaco ha sido asociada con un posible incremento de la mortalidad post-infarto de miocardio y otros episodios cardiovasculares (van Boven et al., 1998; Mori et al., 1999). La variabilidad del ritmo cardíaco es un predictor independiente de mortalidad (La Rovere et al., 1998) y de episodios antiarrítmicos (Stein y Kleiger, 1999) y se ha visto incrementada a través de los AGPI-CL n-3 en individuos sanos (Christensen et al., 1999; Mori et al., 1999), en pacientes con angiografía coronaria (Christensen et al., 2001¹) y en pacientes con diabetes mellitus (Christensen et al., 2001²).
- *Efecto antihipertensivo:* Diversos estudios han mostrado una asociación entre la reducción de la presión sanguínea, especialmente de la presión sanguínea sistólica, y la ingesta de AGPI-CL n-3 derivados de pescado y aceite de pescado, especialmente en individuos hipertensos, individuos con aterosclerosis y con hipercolesterolemia (Morris et al., 1993; Dewailly et al., 2001¹; Geleijnse et al., 2002). Parece que los efectos de EPA y DHA en la presión sanguínea son diferentes, siendo el DHA el componente activo en el aceite de pescado (Mori et al., 1999). Así mismo, una disminución de la resistencia a la vibración o un aumento de la rigidez de las arterias se ha considerado un factor destacable en el desarrollo de la hipertensión sistólica y de un aumento de la presión rítmica, que contribuye a una disminución del flujo coronario durante la diástole (Dart et al., 1993; Benetos et al., 1998; Domanski et al., 1999).

- Efectos de estabilización de la placa de ateroma:* Se sabe que la vulnerabilidad de la placa de ateroma a la ruptura, más que el grado de aterosclerosis (Felton et al., 1997) es un determinante clave en la aparición de episodios cardiovasculares agudos con trombosis (Plutzky, 1999). Los macrófagos juegan un papel crucial en la desestabilización y ruptura de la placa de ateroma (**Figura 19**) por lo que se ha sugerido que una eliminación selectiva de éstos podría ser beneficiosa para la estabilidad de la placa. Sin embargo, se trata de células fagocíticas, que juegan también un papel adicional clave en el *scavenging* de las lipoproteínas modificadas y células muertas (Jessup y Kritharides, 2000; Martinet y Kockx, 2001, Hansson, 2005). Estudios recientes señalan un papel complejo de la fagocitosis en el proceso de la aterosclerosis (Schrijvers et al., 2006). Por otra parte, resultados como los obtenidos por Thies y colaboradores en los que se ha visto que la incorporación de AGPI-CL n-3 a través de suplementos de aceite de pescado, podría actuar estabilizando las placas de ateroma, produciendo cambios estructurales en las mismas (Thies et al., 2003), merecen ser tenidos en cuenta para el desarrollo de futuros tratamientos para la enfermedad cardiovascular.

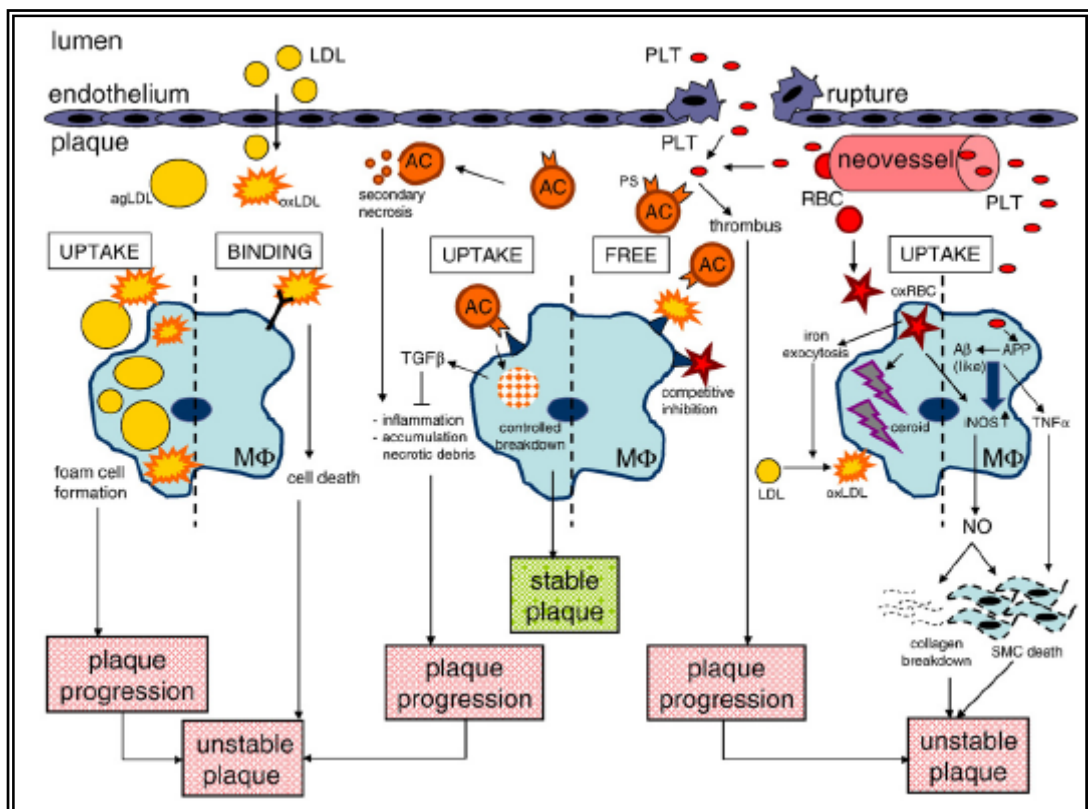


Figura 19. Esquema de los efectos diferenciales de la fagocitosis por macrófagos en la progresión y estabilidad de las placas de ateroma.

(MΦ: macrófago; PLT: plaqueta; AC: célula de apoptótica; RBC: eritrocito; PS: fosfatidilserina)
 (Figura adaptada de Schrijvers et al., 2006)

- *Efecto reductor de la concentración de triglicéridos séricos:* Este efecto reductor por parte de los AGPI-CL n-3 se conoce desde hace tiempo (Harris, 1997; Storlien et al., 1997; Din et al., 2004). EPA y DHA actúan principalmente reduciendo el contenido de triglicéridos de las partículas de las VLDL, inhibiendo su síntesis hepática, mientras el número de partículas permanece prácticamente constante (Nestel, 2000; De Caterina et al., 2001). Se cree que la reducción de la síntesis de TG por parte de los AGPI-CL n-3 podría tener lugar a través de tres mecanismos principales: una biodisponibilidad reducida del sustrato (es decir, de los ácidos grasos) que podría ser de menor importancia que el aumento en la β -oxidación, la disminución de la entrega de ácidos grasos libres al hígado y la reducción de la síntesis hepática de los ácidos grasos; un aumento de la síntesis de fosfolípidos; y una disminución de la actividad de las enzimas triglicérido-sintetasas, la diacilglicerol aciltransferasa o la ácido fosfatídico-fosfohidrolasa (Harris y Bulchandani, 2006). Han llegado a determinarse reducciones de los niveles de TG del orden de 25-40% (Pieke et al., 2000). Mientras en personas normolipémicas, el colesterol de las LDL y HDL se ve poco afectado por los AGPI n-3, en pacientes con hiperlipidemia se han observado diferentes efectos dependiendo de la cantidad aportada de ácidos grasos de la serie n-3 y de la etiología de la hiperlipidemia (Goodfellow et al., 2000). Por su parte, los resultados del “*Japan EPA Lipid Intervention (JELIS) Study*”, con 18645 individuos hipercolesterolémicos (14981 de los cuales sin historial previo de CVD) en los que durante 4,5 años de seguimiento todos los pacientes recibieron tratamiento con estatinas, y la mitad de ellos a su vez una dosis diaria 1,8g de EPA altamente purificado, mostró que la adición del aceite de pescado a una terapia con bajas dosis de estatinas, significativamente reducía la incidencia de muerte cardíaca súbita, infarto de miocardio y anginas inestables. Estos beneficios fueron mayores en los 3664 pacientes del grupo de prevención secundaria (Yokoyama y Origasa, 2003; Cleland et al., 2006).
- *Reducción de la lipidemia posprandial:* Con la actuación de los AGPI-CL n-3 la lipidemia posprandial se ve reducida y los remanentes potencialmente aterogénicos son eliminados. Esta etapa del catabolismo de los TG explica parcialmente el aumento deseable de las concentraciones de HDL₂ (Harris et al., 1988; Nestel, 2000; Wahrburg, 2004). En relación al supuesto efecto positivo de los AGPI-CL n-3 en el colesterol de las HDL, cabe decir que no ha sido encontrado sistemáticamente en los estudios realizados, si bien se ha puesto de manifiesto principalmente cuando se ingieren grandes cantidades de estos ácidos grasos (Harris, 1989; Hojo et al., 1998; Dewailly et al., 2001²).

Así pues, el ácido linoleico, principal AGPI n-6 de la dieta, y los AGPI-CL n-3 ha mostrado ser beneficiosos para la enfermedad cardiovascular (Kris-Etherton et al., 2004; Oda et al., 2005) como resultado de mecanismos comunes, como en la reducción de los procesos inflamatorios, así como de otros mecanismos no comunes, como la reducción de colesterol LDL sérico por parte del ácido linoleico o la reducción de los niveles de triglicéridos por parte de los AGPI-CL n-3. Aún así, es necesario un mejor conocimiento del papel del ácido araquidónico en el proceso de la aterosclerosis (Sacks y Campos, 2006) así como de la elucidación de nuevos mecanismos de actuación del resto de ácidos grasos poliinsaturados.

2.5.4.4. Ácidos grasos *trans*

Una elevada ingesta de AG *trans* puede contribuir a aumentar el riesgo de enfermedad cardiovascular a través de múltiples mecanismos (de Roos et al., 2003; Mozaffarian, 2006). Diversos estudios han demostrado que dietas con el isómero *trans* del ácido 18:1 o ácido eláidico, el isómero *trans* mayoritario en las dietas europeas (Hulshof et al., 1999), elevan los niveles de c-LDL y disminuyen los de c-HDL en comparación con su isómero *cis* (Judd et al., 1994; Sundram et al., 1997; Zock y Katan, 1997; Lichtenstein et al., 1999; Katan, 2000; Oomen et al., 2001; Mensink et al., 2005). Efectos similares se han hallado con los isómeros *trans* de otros AG más insaturados y/o de cadena más larga (Almendingen et al., 1995; Zock y Katan, 1997). Un reciente meta-análisis de cuatro estudios prospectivos de larga duración, concluye que una ingesta de AG *trans* correspondiente a un 2% de la ingesta energética diaria (aproximadamente 5g/día), está asociada con un aumento del riesgo de CHD de un 25% (Mozaffarian et al., 2006). Esto indica un riesgo de CHD entre 4-5 veces mayor por gramo de AG *trans* que por gramo de AGS (Stender et al., 2006¹). Por otra parte, los AG *trans* incrementan los niveles de TG plasmáticos (Katan et al., 1995) y de lipoproteína a (Nestel et al., 1992; Sundram et al., 1997), asociada positivamente con el riesgo cardiovascular (Utermann, 1989).

Además, los ácidos grasos *trans* pueden afectar de forma adversa el metabolismo de los ácidos grasos esenciales y el balance de prostaglandinas al inhibir la enzima $\Delta 6$ -desaturasa y, como resultado, pueden promover la formación de trombos (Jones, 1993). Más recientemente, los AG *trans* han sido asociados en diversos estudios observacionales con elevados niveles de marcadores circulantes de inflamación sistémica, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleuquina 6 y la proteína C reactiva (Mozaffarian et al., 2004¹; Mozaffarian et al., 2004²; Lopez-García et al., 2005). El efecto pro-inflamatorio de los AG *trans* también se ha puesto de manifiesto en estudios controlados randomizados (Han et al., 2002, Baer et al., 2004).

Aunque es necesaria una mayor evidencia científica, se cree que los efectos pro-inflamatorios de los AG *trans* podrían ser mayores en el caso de los isómeros *trans* del ácido linoleico y ácido oleico, que en el caso del ácido palmitoleico (Lemaitre et al., 2002; Mozaffarian, 2006). Paralelamente, los AG *trans* parecen influir en la salud endotelial (Monees et al., 2005), habiéndose asociado elevadas ingestas de AG *trans* con elevados niveles de marcadores circulantes de disfunción endotelial, como son las moléculas de adhesión soluble sICAM-1 y sVCAM-1 (de Roos et al., 2001; Lopez-García et al., 2005). Finalmente, se cree que una elevada ingesta de AG *trans* de origen industrial puede aumentar el ritmo cardíaco en individuos sanos, incrementando el riesgo de muerte súbita (Dyerberg et al., 2004; Dyerberg et al., 2006) y promover la resistencia a la insulina en humanos (Christiansen et al., 1997; Lovejoy, 1999).

2.6. RELACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS CON OTRAS ENFERMEDADES

2.6.1. Cáncer y ácidos grasos

Son cada vez más los estudios con animales y estudios *in vitro* los que indican que los ácidos grasos de la serie n-3, especialmente EPA y DHA, inhiben el proceso de carcinogénesis (Larsson et al., 2004; Stehr y Heller, 2006). Entre los mecanismos (**Figura 20**) que se han propuestos destacan:

- *Supresión de la biosíntesis de eicosanoides derivados del ácido araquidónico*, la cual resulta en una alteración de la respuesta inmune a las células cancerígenas y modulación de la inflamación, proliferación celular, apoptosis, metastasis, y angiogénesis. Eicosanoides generados a partir del ácido araquidónico, tales como la prostaglandina PGE₂, el leucotrieno LTB₄, el tromboxano TXA₂ y el ácido 12-hidroxicosatetraenoico, han sido positivamente relacionados con el proceso de carcinogénesis (Rose et al., 1999). Así por ejemplo, se ha visto que la PGE₂ promueve la supervivencia de las células cancerígenas, hallándose en mayor concentración que en células normales (Chulada et al., 2000). Los mecanismos por los que esta prostaglandina promueve el tumor, incluyen inhibición de apoptosis y estimulación de proliferación celular (Tsutsumi et al., 2002; Leahy et al., 2002).
- *Alteración del metabolismo estrógeno*, conllevando la reducción del crecimiento celular estimulado mediante estrógenos. Es bien conocido que los estrógenos tienen efectos proliferativos en tejidos “estrógeno-sensibles” y que altas concentraciones de estos compuestos pueden aumentar el riesgo de cáncer de pecho y el de otros cánceres dependientes de hormonas (Noble et al., 1997). Aunque un consumo elevado de AGPI n-3 relativo al de AGPI n-6 podría disminuir la producción

endógena de estrógenos, en la actualidad no hay evidencia de estudios en humanos que hayan examinado de forma directa esta cuestión (Larsson et al., 2004).

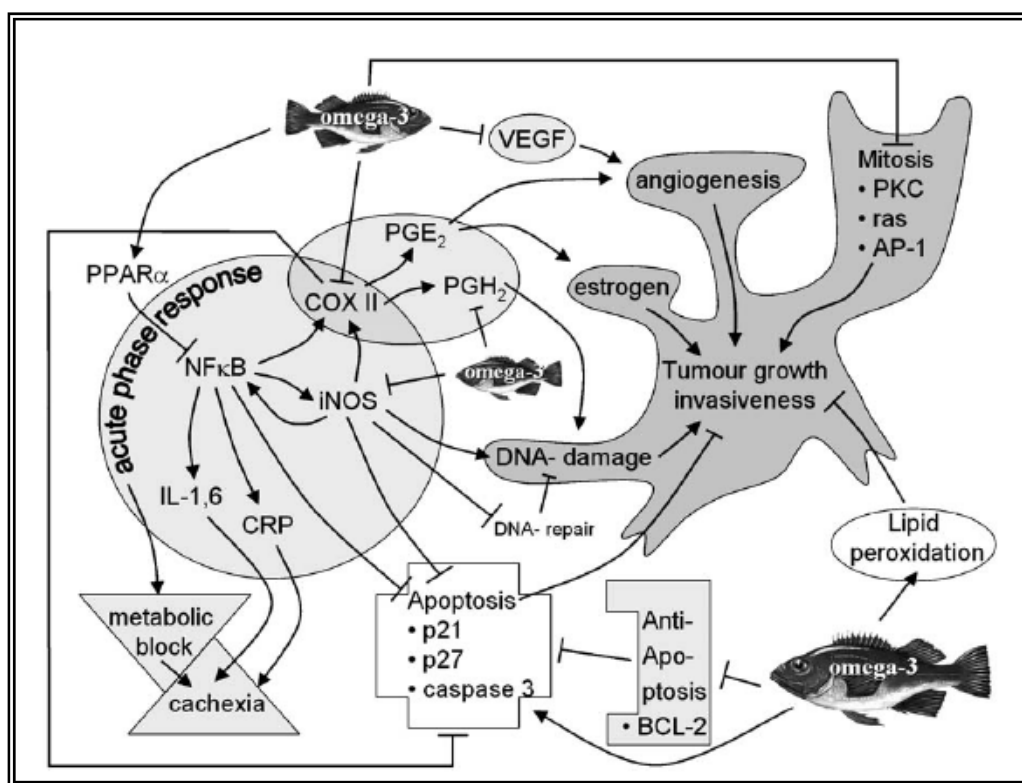


Figura 20. Esquema de los mecanismos de acción propuestos de los AGPI-CL n-3 en el crecimiento tumoral.

(Figura adaptada de Stehr y Heller, 2006)

- *Influencia en la actividad de factores de transcripción, expresión de genes, y transducción de señales, que conducen a cambios en el metabolismo, crecimiento celular, y procesos de diferenciación.* Entre los factores de transcripción regulados por AG se halla el *peroxisoma proliferator-activated receptor-α* (PPARα) (Jump et al., 2002), que además de estar implicado en la regulación del metabolismo lipídico y la homeostasis, ha sido relacionado con procesos de proliferación y diferenciación celular, y respuestas inflamatorias (Vamecq y Lattruffe, 1999; Grimaldi, 2001). Sus ligandos naturales preferidos son los ácidos LA, ALA, ARA y EPA (Berger y Moller, 2002; Houseknecht et al., 2002). Por su parte, la familia de los factores de transcripción nuclear κB participa en la adhesión celular, activación del ciclo celular, apoptosis y carcinogénesis (Schwartz et al., 1999). Se ha visto que los AGPI de la serie n-3 disminuyen significativamente la activación del NF-κB en macrófagos (Novak et al., 2003).

- *Aumento o disminución de la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS).* Los radicales libres y las ROS producidas a nivel celular pueden atacar los AGPI para formar hidroxiperóxidos lipídicos, los cuales se descomponen en reacciones en cadena para formar más radicales libres y aldehídos reactivos. Estos metabolitos generan potencialmente aductos promutagénicos exocíclicos de ADN en las células humanas, que conducen al desarrollo del cáncer (Fang et al., 1996; Nair et al., 1997). Diversos estudios indican que un aumento del consumo de EPA y DHA a través de la dieta no incrementa la susceptibilidad oxidativa del c-LDL (Bonanome et al., 1996; Higdon et al., 2001) a la vez que disminuye la producción de superóxidos en individuos sanos (Calder et al., 2002). Por su parte, se cree que los procesos de inflamación incrementan la producción de radicales libres y ROS, contribuyendo al proceso de carcinogénesis. En este sentido, diversos estudios sugieren que los productos de oxidación derivados de los AGPI de la serie n-3 inhiben el crecimiento celular (Dommels et al., 2003). Aún así, son necesarios más estudios *in vivo* para elucidar el papel que tienen los hidroxiperóxidos lipídicos en la modulación del crecimiento de tumores.
- *Mecanismos que comprenden sensibilidad a la insulina y fluidez de membrana.* Estos mecanismos han sido menos estudiados que los anteriormente expuestos. Se ha visto que el EPA mejora la sensibilidad a la insulina en ratas y en pacientes con diabetes de tipo 2 (Popp-Snijders et al., 1987; Minami et al., 2002). Dicho efecto podría ser mediado por la acción de PPAR α y PPAR γ (Picard et al., 2002, Francis et al., 2003; Scaglioni et al., 2006), involucrando también los componentes fosfolipídicos de las membranas del músculo esquelético (Storlien et al., 1997).

2.6.2. Artritis reumatoide y ácidos grasos

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica inflamatoria autoinmune, que implica la inflamación de articulaciones, manifestada por procesos de hinchazón y desgaste de músculos, y que a su vez está asociada con un mayor riesgo de CVD y osteoporosis (Rennie et al., 2003; Alkaabi et al., 2003). Aparece generalmente en adultos entre 40-60 años, y afecta de dos a tres veces más a mujeres que a hombres.

La pérdida de masa celular, conocida como caquexia reumatoide, predomina en el músculo esquelético, pero también tiene lugar en vísceras y en el sistema inmune. La caquexia reumatoide conduce a un debilitamiento muscular y a una pérdida de su capacidad funcional, y se cree que es la responsable de acelerar la morbilidad y mortalidad de esta patología (Walsmith et al., 2002).

Caracterizada por procesos de inflamación, tanto localizada como sistémica, con elevadas concentraciones plasmáticas de citoquinas pro-inflamatorias, tales como la interleukina-6, interleukina-1 β y el factor TNF- α (Walsmith et al., 2002) se cree que la artritis reumatoide tiene su origen en una susceptibilidad genética subyacente, manifestada en respuesta a una reacción ambiental. Sin embargo, aún se desconocen las causas exactas de dicha patología.

Los tratamientos convencionales para la artritis reumatoide, que incluyen fármacos antiinflamatorios no-esteroidales, fármacos antirreumáticos de baja acción, y corticoesteroides, tienen como objetivo reducir el dolor y la inflamación de las articulaciones de los pacientes, minimizando la pérdida de función y la reducción de la progresión del daño de la articulación. Sin embargo, este tipo de tratamiento es raramente totalmente efectivo y algunas terapias farmacológicas tienen potenciales efectos secundarios, tales como sangrado gastro-intestinal y pérdida de masa ósea (Sarzi-Puttini et al., 2000; Kremer et al., 2005). Este hecho, sumado a efectos anti-nutriente derivados de algunos tratamientos, ha sugerido que la dieta puede jugar un papel importante en el control de la artritis reumatoide, particularmente en el alivio de sus síntomas y en la reducción del riesgo de complicaciones (Danao-Camara et al., 1999).

Al posible papel beneficioso por parte de la dieta, cabe sumar el del ejercicio físico como una combinación de fortalecimiento muscular esquelético y ejercicio aeróbico, que debe ser prescrito por un facultativo en función del estado y desarrollo de la artritis reumatoide en cada paciente, y que ha demostrado mejorar tanto la capacidad física, la tonificación cardiovascular como la fuerza muscular en pacientes con dicha enfermedad (Komatireddy et al., 1997; Hakkinen et al., 1999; Rall et al., 2000). Así, en lo referente al papel de los ácidos grasos en la artritis reumatoide, cabe destacar el papel de los AGPI de la serie n-3, y el del ácido oleico. Como se ha visto previamente, la composición de ácidos grasos en plasma y en fosfolípidos de diversos tejidos varía en función de la ingesta a través de la dieta. Este hecho ha promovido la realización de estudios de suplementación con ácido γ -linolénico (18:3 n-6; GLA) y AGPI-CL n-3, con el objetivo de modular el sistema inmune a través de la reducción del ARA, precursor de los eicosanoides pro-inflamatorios (Haugen et al., 1994).

Los ácidos grasos estudiados más detenidamente en relación a la artritis reumatoide son el EPA y el DHA (Cleland et al., 2003; Hagfors et al. 2005). Diversos estudios, centrados en el efecto de la suplementación de aceite de pescado en la artritis reumatoide, han mostrado que la evidencia de mejoras clínicas significativas en la artritis reumatoide y en el estado inflamatorio a través de los aceites de pescado es consistente (Kremer, 2000; James et al., 2000; Volker et al., 2000; Calder y Zurier, 2001; Darlington y Stone, 2001).

Un aumento en el consumo de AGPI-CL n-3 está asociado con efectos beneficiosos en pacientes con artritis reumatoide (Rennie et al., 2003). Sin embargo, se necesita más investigación para establecer ingestas recomendadas de estos AG a través del consumo de alimentos, y no solamente de suplementos de aceites de pescado, para conferir claros efectos beneficiosos en enfermos de artritis reumatoide.

Paralelamente, existe poca evidencia de la eficacia relativa AGPI n-3 de origen vegetal en forma de ácido α -linolénico. Únicamente un estudio aleatorio ha investigado hasta el momento el efecto de niveles moderados de ALA (2g/día; 12 semanas) en individuos sanos, sin mostrar ningún cambio en los marcadores de inflamación o respuesta inmune (Thies et al., 2001). Como la conversión de ALA a EPA es relativamente ineficiente, es probable que se requieran mayores dosis para conseguir respuestas inmunológicas (Calder y Zurier, 2001).

Por otra parte, muchos aceites de origen vegetal son ricos en ácido linoleico, cuyo metabolismo produce GLA, el cual es, a su vez, convertido a DGLA y ARA. En las células inflamatorias humanas, el GLA se convierte fácilmente a DGLA, acumulándose en estas células carentes de enzimas necesarias para la subsiguiente conversión a ARA (Barham et al., 2000). En consecuencia, este aumento de GLA reduce la síntesis de potentes mediadores de inflamación derivados de ARA e incrementa la acción anti-inflamatoria a través de los eicosanoides derivados del DGLA (Calder y Zurier, 2001). Existe cierta evidencia de un posible beneficio de aceites vegetales ricos en GLA en la artritis reumatoide, pero la mayoría de estudios realizados hasta el momento son de poca duración (Belch et al., 1998; Rennie et al., 2003) por lo que sería conveniente investigar su potencial a largo plazo.

Especial atención ha sido puesta también en el papel del ácido oleico en el tratamiento de la artritis reumatoide. Cuando los AGMI están presentes en la dieta, generalmente lo hacen sustituyendo parte de los AGPI n-6, y consecuentemente, reduciendo la competición entre los AGPI de las series n-3 y n-6, resultando en un aumento de la incorporación de los AGPI n-3 en los PL de membrana (Darlington y Stone, 2001). Así mismo, el metabolismo del ácido oleico produce ácido eicosatrienoico, que al igual que el EPA, compite con los AGPI n-6. Como el aceite de oliva es una de las fuentes principales de ácido oleico, diversos estudios se han centrado en examinar los efectos de este aceite en la artritis reumatoide. Dos estudios del tipo caso-control hallaron una asociación inversa entre el consumo de aceite de oliva y el riesgo de artritis reumatoide (Linos et al., 1991; Linos et al., 1999) y un estudio de intervención de seis meses en pacientes con artritis reumatoide concluyó en una significativa reducción en el dolor y el índice articular (Brzski et al., 1991).

Un estudio reciente de 24 semanas de duración, también con pacientes de artritis reumatoide, ha demostrado el papel sinérgico del aceite de oliva extra-virgen y del aceite de pescado rico en AGPI-CL n-3, reportando significativas mejorías en parámetros clínicos típicos de evaluación del proceso de la enfermedad, en comparación con pacientes que sólo fueron tratados con aceite de pescado (Berbert et al., 2005).

A estos estudios cabe sumar una reducción en la actividad inflamatoria, así como un incremento en la función física y mejora de la vitalidad, en pacientes suecos con artritis reumatoide que se sometieron a una intervención de tres meses basada en la dieta mediterránea tradicional de Creta (Sköldstam et al., 2003; Hagfors et al., 2005) mostrando un efecto beneficioso en la artritis reumatoide resultante de la sinergia de un consumo de pescado y de aceite de oliva, ambos característicos de la dieta de las regiones del Mediterráneo.

2.6.3. Depresión y ácidos grasos

La depresión es una enfermedad muy compleja y heterogénea (Logan, 2004). Diversos factores de tipo neurobiológico, fisiológico, genético, psicológico y ambiental pueden contribuir al proceso de esta patología. Durante los últimos años la comunidad científica ha mostrado un interés creciente por la posible influencia de los factores nutricionales sobre el desarrollo y sintomatología de la depresión (Horrobin, 2002; Schachter et al., 2005). Los AGPI-CL n-3, y en especial el ácido eicosapentaenoico, están siendo considerados como agentes potenciales en el tratamiento de dicha patología (Colin et al., 2003; Bourre, 2005; McNamara 2006; Sontrop y Campbell, 2006) desde que en 1995 Hibbeln y Salem comenzaron a estudiar la relación entre ácidos grasos poliinsaturados y depresión (Hibbeln y Salem, 1995; Reis y Hibbeln, 2006). Dado que aproximadamente el 20% del peso seco del cerebro se debe a AGPI, y que uno de cada tres ácidos grasos en el sistema nervioso central es poliinsaturado, diversos investigadores han postulado que para algunos individuos, una ingesta inadecuada de AGPI-CL n-3 pueda conllevar consecuencias neuropsiquiátricas (Edwards et al, 1998; Logan, 2004; Hibbeln et al., 2006). Además, se ha observado que niveles bajos de DHA se corresponden con niveles bajos del ácido 5-hidroxiindolaacético del fluido cerebroespinal, que es el metabolito principal de serotonina, conocida por su efecto protector contra la depresión (Hibbeln et al., 1998).

Diversos estudios epidemiológicos y de doble ciego aleatorios controlados sostienen una relación entre el consumo de pescado y marisco y los AGPI-CL n-3 con una baja incidencia de depresión (Parker et al., 2006) observándose correlaciones negativas significativas entre el consumo de pescado o la suplementación con AGPI-CL n-3 y el porcentaje de depresión (Hibbeln, 1998), depresión post-parto (Hibbeln, 2002; Freeman et al., 2006), desorden bipolar (Stoll et al., 1999 y 2001; Noaghiul y Hibbeln, 2003),

depresión unipolar (Nemets et al., 2002; Su et al., 2003), suicidio (Hibbeln, 2006) y desorden afectivo estacional (Cott y Hibbeln, 2001). Sin embargo, es importante destacar que existen numerosos factores culturales, económicos y sociales que se deben tener en cuenta como variables de confusión para poder dar por válidos los resultados de estos estudios (Barberger-Gateau et al., 2005; Sontrop y Campbell, 2006). Se ha observado, de forma general, que los individuos con un mayor consumo de pescado siguen estilos de vida más saludables, incluyendo a su vez ejercicio físico y control del estrés, que los que no consumen pescado o lo hacen de forma no regular (Galobardes et al., 2001; Logan, 2004). A pesar de que los mecanismos por los que los AGPI n-3 actúan en el sistema nervioso central no se conocen completamente, existen dos áreas principales de estudio en este campo (Alessandri et al., 2004; Sublette et al., 2004; Logan, 2005; Sublette et al., 2006):

- *Importancia de los AGPI-CL n-3 en las membranas neuronales:* los AGPI-CL n-3 son componentes indispensables en los fosfolípidos de membrana del sistema nervioso central, teniendo un papel crítico en la estructura dinámica y funciones de las membranas neuronales (Mullen y Martin, 1992; Yehuda et al., 2005). Como se sabe, la estructura cuaternaria de las proteínas insertadas en la bicapa lipídica de la célula es sensible a los componentes lipídicos. Estas proteínas tienen funciones celulares críticas debido a su actuación como transportadores y receptores. Los AGPI-CL n-3 pueden alterar la fluidez de la membrana desplazando el colesterol de la misma (Yehuda et al., 2002). Una fluidez óptima, influida por los AGE, es requerida para los procesos de unión y señalización neurotransmisora dentro y entre células (Salem et al., 2001).
- *Importancia de los AGPI-CL n-3 a través de la modulación de citoquinas:* las citoquinas, incluyendo las IL-1 β , IL-2 y IL-6, el interferon-gamma y el TNF α , pueden tener efectos directos e indirectos en el sistema nervioso central. Algunas de las actividades documentadas de estas citoquinas incluyen disponibilidad precursora neurotransmisora disminuida, activación del eje hipotálamo-pituitario, y alteraciones del metabolismo de neurotransmisores como el de mRNA (Maes y Smith, 1998). La depresión severa se ha asociado con elevados contenidos de IL-1 β y TNF α (Suarez et al., 2003). Así mismo, el estrés psicológico puede causar una elevación de estas citoquinas. Se ha sugerido que el papel anti-inflamatorio de los AGPI-CL n-3 podría influir en el factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) en la depresión (Logan, 2003). Este polipéptido, que sostiene la supervivencia y el crecimiento de neuronas a lo largo del desarrollo y etapa adulta, ha sido relacionado negativamente con los síntomas severos de depresión (Hashimoto et al., 2004). Diversos antidepresivos y el ejercicio voluntario puede aumentar el BDNF, mientras dietas ricas en AGS y sucrosa y el estrés psicológico, inhiben la producción de BDNF (Logan, 2003).

2.6.4. Asma y ácidos grasos

El asma es una enfermedad crónica inflamatoria del tracto respiratorio, caracterizada por una hiper-receptividad aérea y producción de mucosidad que conducen a episodios de respiración con dificultad, tos, y falta de aliento (Wong, 2005). Esta patología, que afecta tanto a niños como adultos (Sears et al., 2003) presenta un grado de incidencia creciente, que se halla actualmente entre el 7-15% en los países occidentales (McKeever et al., 2004). Los factores subyacentes a los inicios de la patología abarcan desde infecciones virales del tracto respiratorio en los primeros años de vida (Sigurs et al., 2005) hasta exposiciones a aereo-alergenos (Salam et al., 2004), polución (Peden et al., 2005) y humo de tabaco en el ambiente habitual (Morgan et al., 2004; Kurukulaaratchy et al., 2004; James et al., 2005) o en el ambiente profesional de los adultos (Malo et al., 2001; Lemanske et al., 2006). Los factores genéticos también contribuyen significativamente a la expresión y severidad de la patología (Cookson, 2002) habiéndose clasificado genéticamente como un desorden complejo que no sigue las características de herencia simples (Hoffjan et al., 2003, Eder et al., 2004; Vercelli, 2004; Hoffjan et al., 2005). A pesar de que el tratamiento con medicamentos y la manipulación ambiental siguen siendo la piedra angular del control del asma (Mihirshahi et al., 2003; Lemanske et al., 2003) la intervención nutricional se ha manifestado en los últimos años como una terapia potencial esperanzadora (Black et al., 1997; Stanaland, 2004; Wong, 2005).

La respuesta inflamatoria es compleja y multifactorial, viéndose implicados una variedad de células inflamatorias, entre las que se incluyen macrófagos alveolares, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, plaquetas, y una diversidad de mediadores inflamatorios (Busse et al., 2001; Simopoulos, 2002). Las personas que padecen asma tienen las vías respiratorias crónica e irreversiblemente inflamadas y son hipersensibles a alergenos específicos del ambiente. Esta hipersensibilidad se cree que está causada por una respuesta exagerada de las células *T-helper*. Ante la exposición a un estímulo, los linfocitos *T-helper* organizan la cesión de leucotrienos desde células inflamatorias activadas, a través de la acción catalítica de la 5-lipoxigenasa (Spector et al., 2003). Se cree que determinados leucotrienos (entre los que se hallan el LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) son los mediadores químicos mayoritarios en la patogénesis del asma. Estos eicosanoides son potentes quimioatrayentes que, al unirse a receptores diana específicos, inducen directamente el proceso de broncoconstricción y producción de mucosidad de las células respiratorias. De hecho, se ha observado que la producción de estos leucotrienos es mayor en personas asmáticas que en las que no padecen dicha patología (Shindo et al., 1997). Por su parte, la prostaglandina D₂, el principal metabolito cicloxigenasa del ácido araquidónico producido por las células mástil en respuesta a la acción alérgica, es liberado en grandes cantidades durante los ataques asmáticos y ha sido propuesto como marcador de la activación de las células mástil en el proceso asmático (Kabashima y Narumiya, 2003).

Así pues, el control de la producción y actuación de eicosanoides es crucial en el tratamiento del asma, tal y como se deriva de los fármacos anti-asmáticos utilizados para tal efecto, entre los que se encuentran antagonistas orales de leucotrienos (Panel de Expertos, 2002; De Caterina et al., 2004). La eficacia de estos fármacos confirma la importancia de los leucotrienos en la patogénesis del asma, postulando que los derivados de los AG de la serie n-3 pueden jugar un papel prometedor como agentes anti-inflamatorios en la intervención del asma y diversas alergias (Gil, 2002; Prescott et al., 2004; Wong, 2005; Reisman et al., 2006).

Sin embargo, una reciente revisión concluyó en que la evidencia derivada de los ensayos clínicos realizados con AG de la serie n-3 en el tratamiento del asma y/o alergias es menor que la aportada por estudios observacionales (McKeever et al., 2004). Por su parte, una revisión de estudios controlados aleatorios de duración entre 2 y 10 meses (Stenius-Aarniala et al., 1989; McDonald et al., 1991; Thien et al., 1993; Hodge et al., 1998; Nagakura et al., 2000; Okamoto et al., 2000; Emelyanov et al., 2002) recomienda la realización de un estudio controlado aleatorio de larga duración con una dosis diaria de por lo menos 3g de AGPI-CL n-3, que es la que se considera necesaria en el caso de administración a adultos, y en el que estén claramente definidos los tipos, fuentes y formulaciones en las que se suministren, así como se controle la exposición a alérgenos e irritantes en el interior y exterior de los hogares de los voluntarios (Reisman et al., 2006).

Así mismo, resultados como los obtenidos por Mickleborough y colaboradores (Mickleborough et al., 2006), que muestran una reducción de mediadores inflamatorios, un menor requerimiento de broncodilatadores y una mejora en la función pulmonar, en la broncoconstricción inducida por el ejercicio (Mickleborough et al., 2003; Anderson et al., 2005) en pacientes asmáticos con una dieta suplementada con aceite de pescado, sugieren que este aceite puede representar una intervención no-farmacológica potencialmente beneficiosa para el tratamiento del asma. Paralelamente, estudios en los que una ingesta habitual de pescado graso durante el embarazo podría proteger al niño de padecer asma, refuerzan el papel saludable que los AGPI-CL n-3 pueden desempeñar en el organismo humano (Dunstan et al., 2003; Salam et al., 2005).

3. LA DIETA MEDITERRÁNEA COMO PATRÓN DE DIETA SALUDABLE

La salud de un individuo y de la población en general es el resultado de interacciones entre genética y factores ambientales (Simopoulos, 2001). Entre estos últimos, destaca el estado nutricional (Simopoulos, 1999²; Sacks, 2002). Así como el perfil genético no ha variado en los últimos 10000 años, notables diferencias en el abastecimiento e ingesta de diferentes tipos de alimentos, gasto energético y actividad física tienen lugar generación tras generación (Sanders, 2000; Simopoulos¹, 2001; Simopoulos², 2001; Moreno et al., 2002).

Hoy en día, las sociedades industrializadas se caracterizan por un desequilibrio en el balance energético (debido a un aumento en el aporte de energía a través de los alimentos y una disminución en el gasto energético; un aumento en el consumo de AGS, AGPI de la serie n-6, AG-*trans*, y una reducción en la ingesta de AGPI de la serie n-3, aumentando el *ratio* n-6/n-3 a valores muy lejanos del 2-1/1 de la dieta de nuestros antepasados del Paleolítico; una reducción en la ingesta de carbohidratos complejos y fibra; una disminución en el consumo de frutas y verduras, así como de antioxidantes y algunos minerales (Simopoulos, 2001; Ferro-Luzzi et al., 2002; Serra-Majem et al., 2004; Pereira et al., 2004; Erkkila y Lichtenstein, 2006; Fernandez-Vergel et al., 2006).

Por todo ello, resulta pertinente modificar los hábitos alimentarios hacia dietas representativas de un patrón alimentario saludable. Debido a la elevada evidencia científica de los beneficios de la dieta mediterránea sobre la salud humana, parece apropiado un retorno a la “dieta mediterránea tradicional” (DMT) (Assmann, 2002, Serra-Majem et al., 2006). Ésta representa una alternativa más agradable al paladar que las dietas bajas en grasa para promover una alimentación saludable (Sánchez-Villegas et al., 2003; Martínez-González et al., 2003), presentando un bagaje de tradición milenaria con ninguna evidencia de daño o perjuicio para la salud humana, que la hace muy apropiada en el campo de la salud pública (Trichopoulou y Vasilopoulou, 2000; Martínez-González et al., 2004; Dernini et al., 2006). Sin embargo, paradójicamente, los mayores beneficiarios durante estos últimos años de la investigación derivada del “estilo de vida mediterráneo” no han sido precisamente los países mediterráneos. Países como Suiza, Japón y los países escandinavos son los que actualmente presentan mayor esperanza de vida (Willet, 2006). Este hecho, sumado al alejamiento del patrón de DMT por parte de la población joven (Sánchez-Villegas et al., 2002; Moreno et al., 2002; Varo et al., 2003), resalta la necesidad de preservar y promover la DMT también en los países que le dieron origen (Alexandratos, 2006; García-Closas et al., 2006; Fundación Dieta Mediterránea, 2006).

3.1. LA DIETA MEDITERRÁNEA TRADICIONAL

La región mediterránea engloba más de 20 países, cuyas poblaciones varían en cultura, etnia, religión, desarrollo económico-social y otros diversos factores que pueden influir en sus hábitos alimentarios. Sin embargo, los patrones dietéticos que prevalecen en la región mediterránea presentan también marcadas características en común, destacando el uso de aceite de oliva como fuente lipídica principal (Naska et al., 2006). La comunidad científica define como “dieta mediterránea tradicional” al patrón de dieta consumido en áreas productoras de aceite de oliva de la región mediterránea, especialmente de Creta, Grecia y sur de Italia, a finales de los años 50 y principios de los años 60 (Assmann et al., 2002; Trichopoulou 2004; Kok et al., 2004). Los componentes que la caracterizan son (Hu, 2003; Fundación Dieta Mediterránea, 2006):

- Consumo de aceite de oliva como fuente de lípidos principal, favoreciendo un elevado *ratio* de AGMI/AGS resultante de la ingesta de lípidos de la dieta.
- Alto consumo de alimentos de origen vegetal: frutas, verduras y hortalizas
- Alto consumo de legumbres
- Alto consumo de cereales no refinados, incluyendo el pan
- Consumo moderado a alto de pescado
- Consumo moderado de leche y productos lácteos (principalmente queso y yogur)
- Bajo consumo de carne y productos cárnicos
- Consumo moderado de alcohol (principalmente vino), normalmente en las comidas

La **Tabla 3** muestra la composición media en ácidos grasos y algunos antioxidantes que presentaba la dieta mediterránea tradicional de Creta en 1960 (Keys et al., 1968).

Tabla 3. Contenido medio de AG y antioxidantes de la DMT de Creta en 1960

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
Grasa total (% Energía)	40.1
AGS (g)	28.0
AG trans (g)	0.4
AGMI (g)	84.1
AGPI (g)	13.4
β-caroteno (mg)	1.8
Vitamina E (mg)	23.3
Vitamina C (mg)	136
Flavonoides (mg)	15.7

A pesar del elevado aporte de grasa total, la ingesta de AGS era inferior al 10% del total de la energía y la presencia de ácidos grasos *trans* era prácticamente inexistente (Kok et al., 2004). Con posterioridad a los estudios pioneros de Keys y colaboradores, otros autores han sugerido que el elevado aporte de grasa total de la dieta mediterránea tradicional de la década de los 60 en Creta (>42%) representaba los datos de una de las regiones mediterráneas por excelencia, pero en otras zonas del Mediterráneo, la ingesta de grasa total en la misma época era sustancialmente menor (Ferro-Luzzi et al., 2002). Así en Corfu, el aporte de grasa total representaba el 31-34% de la energía total, siendo del 25-27% en las regiones italianas (Fidanza y Fidanza Alberti, 1968).

3.2. EVIDENCIA DE LOS BENEFICIOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA A TRAVÉS DE ESTUDIOS CIENTÍFICOS: DEL ESTUDIO DE LOS 7 PAÍSES A LA ACTUALIDAD

La primera evidencia científica relacionada con la dieta consumida en el Mediterráneo en los años 60 fue puesta de manifiesto por las observaciones realizadas por el Dr. Grande Covian y colaboradores sobre la baja incidencia de enfermedad cardiovascular que presentaban los individuos de la región mediterránea (Willet, 2006). Este hecho condujo a Keys a llevar a cabo el conocido “*Seven Countries Study*” ((Keys, 1980; Keys et al., 1986). Dicho estudio, realizado con 14 poblaciones pertenecientes a 7 países, mostró que la tasa de mortalidad debida a la CVD era entre dos y tres veces inferior en el sur de Europa en comparación con el Norte de Europa y los Estados Unidos; siendo remarcablemente inferior en la cohorte de Creta (Renaud et al., 1995).

La baja incidencia de infartos de miocardio en los países del área mediterránea también fue puesta de manifiesto posteriormente en el estudio llevado a cabo por la OMS, conocido como el proyecto MONICA (“*Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease*”), esta vez comparando países mediterráneos con países anglosajones (Tunstall-Pedoe et al., 1999). Uno de los principales aportes del estudio de Keys *et al.* fue la demostración que la ingesta de lípidos saturados estaba fuertemente relacionada con la incidencia y mortalidad por enfermedad cardiovascular. Al mismo tiempo, otros investigadores realizaron diversos estudios de intervención para determinar los efectos de determinados tipos de lípidos en los niveles de colesterol sérico (Willet, 1998), llegando a resumirlos en las ecuaciones de Keys y Hegsted (Keys 1980; Hegsted, 1986). En ambas ecuaciones, los cambios de colesterol estaban positivamente relacionados con aumentos de lípidos saturados, e inversamente relacionados con la ingesta de lípidos poliinsaturados. Este hecho tuvo como resultado que en las décadas de los 70-80 diversos países reemplazaran el consumo de ácidos grasos saturados por poliinsaturados, viéndose significativas reducciones en la incidencia de CVD en países no mediterráneos como Finlandia, Inglaterra o Estados Unidos (Ehnholm et al., 1982; Willet, 1998).

Sin embargo, a finales de 1980, y con el objetivo de reducir la grasa saturada de la dieta, muchos nutricionistas trasladaron a sus pacientes la falsa idea de que debía ser reducido todo tipo de lípidos de la dieta (Willet, 2006). La idea que la grasa no era beneficiosa para la salud llegó incluso a modificar las recomendaciones nutricionales propuestas por organismos nacionales e incluso internacionales, tales como la OMS (WHO, 2002; WHO 2003), olvidando otro de los resultados derivados del “*Seven Countries Study*”. En él, la grasa total no se había relacionado significativamente con la incidencia de CVD, encontrándose incluso ingestas similares de grasa total en los países con mayor y menor incidencia de CVD. Obviamente, la diferencia estaba en el tipo de grasas consumidas por los respectivos países.

Paradójicamente, la promoción de dietas bajas en grasa desembocó en la aparición de un elevado número de casos de obesidad, principalmente en el Norte de Europa y en Estados Unidos. La sustitución de las calorías aportadas anteriormente por los lípidos por carbohidratos, en su mayoría azúcar y carbohidratos refinados, fue una de las causas del aumento de obesidad entre la población (Cooper et al., 2000; Rosamond et al., 1998). A partir de la década de los 80, los niveles de HDL se convirtieron en una mejor herramienta de predicción del riesgo de CVD que los niveles de colesterol sérico total considerados hasta el momento. De igual modo, se descubrió que niveles elevados de triglicéridos también estaban relacionados positivamente con la enfermedad cardiovascular. Un estudio en el que el 10% de la energía procedente de AGS se sustituyó por una parte por aceite de oliva (componente lipídico principal de la dieta mediterránea), y por otra por carbohidratos complejos, resultó en una disminución del colesterol total muy similar en ambos casos, pero en un aumento de TG y disminución de HDL sólo en la dieta de carbohidratos (Mensik et al., 1987). Este resultado ha sido reproducido en posteriores estudios (Mensik et al. 1992; Katan et al., 1995) siendo un elemento importante para entender los beneficios en la salud derivados de la dieta mediterránea.

Posteriormente diversos estudios prospectivos han mostrado que la adherencia al patrón de dieta mediterránea (PDM) está asociada a una baja mortalidad debida a la CVD y otras causas (Trichopoulou et al., 1995; Osler et al., 1997; Kouris-Blazos et al., 1999; Lasheras et al., 2000; Trichopoulou et al., 2003; Knoop et al., 2006). De igual forma, estudios del tipo caso-control han relacionado el PDM con una baja incidencia de eventos coronarios no fatales (Panagiotakos et al., 2002; Martínez-Gonzalez et al., 2002; Fernández-Jarne et al., 2002), así como diversos ensayos aleatorios han encontrado una elevada reducción de nuevos casos de infarto y de muerte por CVD, en pacientes que después de haber sufrido un infarto de miocardio siguieron un patrón de dieta mediterránea (De Lorgeril et al., 1999; Kris-Etherton et al., 2001; Singh et al., 2002).

Cabe destacar que hasta el momento actual, muy pocos estudios han analizado la eficacia de una intervención con una alimentación de tipo mediterráneo. Entre ellos, cabe citar la notable eficacia preventiva de enfermedad y muerte coronaria del grupo asignado a dieta mediterránea en el conocido *Lyon Diet Heart Study* (De Lorgeril et al., 1999; De Lorgeril y Salen, 2006). Este estudio, con un seguimiento de 5 años, encontró una reducción relativa del 50-70% en el riesgo de mortalidad o repetición de infarto en pacientes asignados a una dieta de tipo mediterráneo (a la que se añadió el uso de una margarina rica en ALA) comparada con la dieta del grupo control basada en una dieta baja en grasa recomendada por la Asociación Americana del Corazón. Se cree que los beneficios hallados se debieron principalmente a procesos de tipo antitrombótico y antiarrítmico, ya que los niveles de lípidos eran muy similares en ambas dietas utilizadas en el estudio (Willet, 2006).

Otro de los estudios que examinó el efecto de una dieta mediterránea rica en el ácido α -linolénico fue "*The Indo-Mediterranean Trial*" (Singh et al., 2002), llevado a cabo también en pacientes con CVD. En este caso, la reducción relativa del riesgo CVD fue de un 52%. Los dos estudios anteriores, aunque basados en "dietas del tipo Mediterráneo", no mostraron especial consideración al aceite de oliva, considerada la mayor fuente de AGMI en los países mediterráneos (Martínez-González et al., 2004). De hecho, el aporte de AGMI, expresado en porcentaje de energía total, fue del 12,9% y del 10% en los respectivos estudios, valores claramente inferiores a los encontrados habitualmente en la dieta mediterránea tradicional (15-20%) (Martínez-González et al., 2004). Sin embargo, ambos estudios destacaron el papel beneficioso del ALA en la CVD, al igual que hizo "*The Mediterranean Alpha-linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) Study*", un estudio de prevención primaria en individuos hipercolesterolémicos (Bemelmans et al., 2000; Bemelmans et al., 2002).

El ácido α -linolénico se encuentra presente en diversos vegetales presentes en la dieta mediterránea (Galli et al., 2006), como en verduras silvestres como el *purslane*, ingrediente común en las ensaladas griegas (Kok et al., 2004; Simopoulos 2005) o en frutos secos como las nueces (Kris-Etherton et al., 1999). Entre los beneficios de los frutos secos se ha demostrado su efecto protector en el desarrollo de cardiopatía isquémica (Kris-Etherton et al. 2001), reducciones significativas con dieta con nueces del colesterol total y LDL en pacientes hipercolesterolémicos de ambos sexos (Zambón et al., 2000; Ros et al., 2004) y correlaciones inversas del consumo frecuente de nueces y semillas con diversos marcadores inflamatorios, especialmente en población caucásica (Jiang et al., 2006). Así mismo, se ha sugerido una correlación inversa entre el consumo de nueces y semillas con el índice de masa corporal, y diversos estudios han demostrado que a pesar de su naturaleza de alimento graso de densidad calórica elevada, no se producen cambios de peso con la ingesta controlada de nueces (Sabate, 2003).

En los últimos años, el interés creciente de estudiar patrones alimentarios (PA) en epidemiología nutricional (Hu et al., 2000; Fung et al., 2005; Hu et al., 2002; Bach et al., 2006) ha hecho que el PDM continúe siendo motivo de nuevos estudios científicos (Kant et al., 2004). Tras algunos estudios epidemiológicos basados en examinar la asociación de diversos patrones alimentarios con el exceso de peso (Maskarinec et al., 2000; Togo et al., 2001; Lin et al., 2003; Newby et al., 2003), cabe destacar dos estudios llevados a cabo en poblaciones mediterráneas con el fin de analizar el posible efecto protector del PDM contra la incidencia y prevalencia de obesidad, la cual no sólo está aumentando a nivel epidémico en los países industrializados (WHO, 2000; Bray et al., 2004; Rabin et al., 2006) sino que representa una carga económica cada vez mayor en sus costes sanitarios (Foz et al., 2000; Martínez et al., 2004; Schulze et al., 2006). El primero de estos estudios, llevado a cabo en individuos sanos de la población española, ha mostrado que un mayor índice de masa corporal está asociado con una menor adhesión al PDM (Schröder et al., 2004), disminuyéndose el riesgo de obesidad con una alta adherencia al patrón de DMT. Estas asociaciones se mantuvieron después del ajuste del consumo energético total, el grado de actividad física, el nivel de estudios, el consumo de alcohol y de tabaco, concluyendo que el PDM puede ser eficaz para desarrollar estrategias de control de peso (Schröder et al., 2006; Nanchahal et al., 2005).

Por su parte, el segundo estudio (Panagiotakos et al., 2006), denominado “*ATTICA Study*” en honor al nombre de la región griega en la que se llevó a cabo, ha mostrado que una mayor adherencia al PDM está asociada con un 50% menos de probabilidad de padecer obesidad o sobrepeso comparado con un patrón de dieta no mediterráneo tras control de variables confusoras potenciales y más específicamente con un 59% de menor probabilidad de tener obesidad abdominal.

En mujeres sanas no mediterráneas, el PDM también ha sido asociado con una disminución en la concentración de LDL oxidadas (Lapointe et al., 2005), uno de los factores de riesgo de CVD (Holvoet et al., 2003). La hipercolesterolemia es otro de estos factores y está asociada con la disfunción endotelial (Sorensen et al., 1994). Recientemente se ha observado que los niveles del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), un factor de crecimiento angiogénico, aumentan en pacientes con riesgo de CVD, como en personas hipertensas o con tres o más factores de riesgo clínicos (Felmeden et al., 2003), indicando una necesidad de reparación vascular.

Así mismo, una amplia evidencia sugiere que los procesos inflamatorios juegan un papel esencial en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis (Ross, 1993; Libby 2002). Elevadas concentraciones de mediadores inflamatorios, tales como la proteína C-reactiva (CRP) y la interleukina 6 pueden reflejar la inflamación de la pared arterial, que permite la adhesión de leucocitos.

Entre los estudios recientes, destaca un estudio italiano llevado a cabo en pacientes con síndrome metabólico, que tras un seguimiento de dos años, mostraron que el grupo que siguió el PDM presentaba niveles significativamente más bajos de CRP y diversas interleuquinas, así como una función endotelial mejorada (Esposito et al., 2004) y un estudio sueco en individuos sanos, que mostró que el PDM reducía el número de plaquetas y leucocitos, así como los niveles del índice de vasoregulación de VEGF. Este hecho podría ser atribuido a la elevada concentración de AG de la serie n-3, que promueven una composición favorable de los fosfolípidos séricos (Ambring et al., 2006). Recientemente, Michalsen y colaboradores concluyeron un estudio en el que la dieta Mediterránea no tuvo ningún efecto significativo en diversos marcadores de inflamación y factores de riesgo metabólico en pacientes con enfermedad coronaria (Michalsen et al., 2006). Esta falta de efecto se puede deber al hecho de que el 80% de los pacientes seguían un tratamiento con estatinas, ampliamente conocidas por su efecto reductor de los marcadores de inflamación. Es plausible asumir que el uso generalizado de medicamentos tales como la aspirina y estatinas por los pacientes con enfermedad coronaria pueda ser el responsable del enmascaramiento de efectos independientes de la dieta Mediterránea en marcadores de inflamación (Zarraga y Schwarz, 2006). También se ha visto que el PDM disminuye la resistencia a la insulina y mejora la función endotelial en pacientes con síndrome metabólico (Esposito et al., 2004) y atenúa los procesos de inflamación y coagulación en adultos sanos (Chrysohoou et al., 2004).

Por otra parte, uno de los pocos estudios de intervención en prevención primaria, conocido como “*The Mediterranean Diet, Cardiovascular Risks and Gene Polymorphisms (Medi-RIVAGE) Study*” (Vincent et al., 2004; Vincent-Baudry et al., 2005) ha demostrado la reducción de factores de riesgo cardiovascular moderados después de tres meses de intervención con un PDM. Los niveles de colesterol total, colesterol de lipoproteínas ricas en TG, TG, apolipoproteínas A-I y B, insulina y glucosa, disminuyeron significativamente tras el periodo de intervención, prediciendo una reducción del 15% en el riesgo de CVD (Vincent-Baudry et al., 2005).

Actualmente, se está llevando a cabo en España otro estudio de intervención en prevención cardiovascular primaria, denominado “*Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED)*” de una duración de cuatro años (Estruch et al., 2006). En él, los participantes, exentos de enfermedad cardiovascular, pero con alto riesgo de desarrollarla, son asignados a una dieta baja en grasa, una DM suplementada con aceite de oliva virgen extra, o una DM suplementada con frutos secos. Los primeros tres meses de intervención han mostrado que los individuos que han seguido las dietas basadas en la DM han mejorado su perfil lipídico, disminuido su presión sanguínea, su resistencia a la insulina y su concentración de biomarcadores inflamatorios (proteína C reactiva, interleukina-6, molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular-1

(VCAM-1) comparados con los individuos a los que se les ha asignado la dieta baja en grasa (Estruch et al., 2006).

Por su parte, los resultados de un estudio de cohortes “*Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) Study*”, llevado a cabo en universitarios españoles, muestran tras dos años de seguimiento, una mayor adhesión al PDM rico en aceite de oliva se asoció con una reducción en el riesgo de hipertensión en hombres (Martínez-González, 2006). Así mismo, en esta cohorte mediterránea, la ingesta de productos lácteos bajos en grasa se vió también asociada con un menor riesgo de hipertensión (Alonso et al., 2006). A pesar de que los participantes aumentaron su peso medio durante el período de intervención, los incrementos de peso resultaron menores en aquellos individuos con una mayor adhesión a un PDM *a priori*, siendo no estadísticamente significativos después de un ajuste multivariante (Sánchez-Villegas et al., 2006). Así mismo, el estudio *SUN* refuerza la asociación inversa entre fibra y consumo de frutas/verduras y ganancia de peso en las poblaciones mediterráneas (Bes-Rastrollo et al., 2006).

Finalmente, al efecto protector de la dieta mediterránea contra la enfermedad cardiovascular, cabe sumarle su posible contribución en la protección contra ciertas patologías (Trichopoulou, 2004; Sánchez-Villegas et al., 2003) como la diabetes de tipo 2 (Ryan et al., 2000; Rodríguez-Villar et al., 2003), hipertensión (Ferrara et al., 2000), derrame cerebral (Joshiyura et al., 1999), osteoporosis (Trichopoulou et al., 1997), artritis reumatoide (Hagfors et al., 2005) y algunos tipos de cáncer tales como el cáncer de mama, de estómago, colorectal o cáncer de próstata (Martín Moreno et al., 1994; Willet et al., 1996; Bautista et al., 1997; Key et al., 2002; Bosetti et al., 2003; Colomer et al., 2006; Zadak et al., 2006).

3.3. PRINCIPALES FUENTES DE LÍPIDOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

3.3.1. El aceite de oliva, fuente de ácido oleico

El aceite de oliva es el aceite obtenido del fruto de *Olea europaea* por presión física, constituido por una fracción mayoritariamente compuesta por glicéridos saponificables (98- 99% del aceite) que en su mayoría son triglicéridos (Perez-Jimenez et al., 2002). De esta fracción cabe destacar su peculiar abundancia en el ácido oleico, que abarca entre el 60-85% del total de ácidos grasos de los triglicéridos; mientras el ácido linoleico se halla en concentraciones del 3-21% (Serra-Majem et al., 2003; Perona et al., 2006).

Por su parte, la fracción minoritaria del aceite de oliva (1-2%) comprende componentes insaponificables, compuestos fenólicos y ceras que, a pesar de su baja proporción, le confieren importantes actividades biológicas (Visioli y Galli, 2001;

Carluccio et al., 2003; Visioli et al., 2005). Así por ejemplo, se ha visto que los compuestos fenólicos del aceite de oliva tienen un potencial antioxidante mayor en comparación con otros aceites vegetales (Kris-Etherton et al., 2002; Chong et al., 2006), y que además de sus propiedades antioxidantes, los fenoles del aceite de oliva virgen podrían tener propiedades antiinflamatorias y antitrombóticas (Ruano et al., 2005). Además, este aceite presenta una sustancia antiinflamatoria denominada oleocantal, con un potencial y perfil sorprendentemente muy similar al del ibuprofeno (Beauchamp et al., 2005).

El ácido oleico, principal ácido graso presente en el aceite de oliva, constituye aproximadamente el 29% de la ingesta calórica diaria en muchos países mediterráneos (Perona et al., 2006). Diversos estudios sobre el papel de diferentes ácidos grasos insaturados en la activación celular endotelial sugieren que el ácido oleico no activa las células endoteliales, confirmando sus beneficios en eventos tempranos de aterosclerosis en comparación con otros AG insaturados (Hennig et al., 2000), con dietas ricas en ácido linoleico (Ryan et al., 2000) y con dietas ricas en carbohidratos (Fuentes et al., 2001). Dietas enriquecidas en ácido oleico reducen la susceptibilidad de las LDL a ser oxidadas (Tsimikas et al., 1999). Estudios *in vitro* en células endoteliales han mostrado que el ácido oleico puede prevenir la activación endotelial por inhibición de la expresión de moléculas de adhesión o por aumento de la producción de óxido de nítrico (Chirston et al., 2003). La suplementación de células del endotelio con ácido oleico *in vitro* reduce la sensibilidad celular endotelial a los agentes oxidantes, creando un ambiente pro-oxidante reducido, que contribuye a un efecto vascular directo ateroprotector (Massaro et al., 2002; Toborek et al., 2002). Lipoproteínas ricas en AGMI debido a un consumo de aceite de oliva a largo plazo han mostrado ser menos susceptibles a la oxidación que partículas enriquecidas con AGPI (Hargrove et al., 2001).

El elevado consumo de AGMI en la dieta mediterránea se ha asociado también con una reducción en el riesgo del deterioro cognitivo relacionado con la edad (Solfrizzi et al., 1999). Este efecto se ha relacionado con el papel que los AGMI desempeñan en mantener la integridad estructural de las membranas neuronales.

De acuerdo con la teoría de los radicales libres, el proceso de envejecimiento es el resultado del daño oxidativo producido a lo largo de la vida, principalmente a nivel mitocondrial. Algunos de los daños oxidativos no pueden ser contrarestados totalmente y conducen a una disfunción celular. Las membranas de las mitocondrias son muy sensibles al ataque radicalario, debido a la presencia de dobles enlaces en las colas de sus fosfolípidos. Por tanto, un nivel bajo de insaturación, como el del ácido oleico, contribuirá a disminuir el estrés oxidativo celular (Quiles et al., 2004; Battino y Ferreiro, 2004). No hay que olvidar que los ácidos grasos del aceite de oliva se hallan protegidos por antioxidantes naturales, tales como carotenoides, tocoferoles, y compuestos fenólicos

(Rastrelli et al., 2002) que contribuyen a inactivar los efectos de los radicales libres y peroxidación lipídica (Fitó et al., 2002; Owen et al., 2000; Masella et al., 2001; Gimeno et al., 2002; Aguilera et al., 2003; Marrugat et al., 2004; Lamuela-Raventós et al., 2004; Vissiers et al., 2004; Covas et al., 2006) que podrían afectar a la rigidez arterial (Visioli et al., 2002; Chernichow et al., 2004).

Adicionalmente y en base a los recientes resultados de “*The Effect of Olive Oil on Oxidative Damage in European Populations (EUROLIVE) Study*” donde se analizó el perfil lipídico plasmático y el daño oxidativo a través de biomarcadores de estrés oxidativo en individuos de cinco países europeos (Covas et al., 2006), y del estudio de Salvini y colaboradores sobre la reducción del daño oxidativo de ADN en mujeres postmenopáusicas (Salvini et al., 2006), sería recomendable que entre los diferentes tipos de aceites de oliva del mercado, se optara por consumir el aceite de oliva virgen, caracterizado por una mayor concentración de compuestos fenólicos en su composición. Además, se cree que las elevadas ingestas de AGMI podrían tener también un efecto protector contra el Alzheimer, contrariamente a la ingesta de AGS y AG *trans* (Panza et al., 2004).

Por otra parte, varios estudios muestran el efecto reductor de la presión arterial, tanto sistólica como diastólica, por parte del aceite de oliva en individuos normo e hipertensos (Espino et al., 1996; Pérez-Jiménez et al., 2002; Psaltopoulou et al., 2004; Alonso et al., 2004). Los mecanismos por los que los AGMI y en concreto el ácido oleico podrían modificar los niveles de presión sanguínea no se conocen en profundidad. Parece ser que una alta ingesta de AGMI modifica la composición de los AG de los fosfolípidos de la membrana celular de forma que altera la regulación de la presión sanguínea, conduciendo a la reducción de la misma (Ruiz-Gutierrez et al., 1996; Hermansen, 2000; Alonso et al., 2006). Por otra parte, los resultados de “*The Pizarra Study*” (Soriguer et al., 2003) sugirieron otra explicación para el posible efecto beneficioso de los AGMI en la presión arterial. En este estudio, la cantidad de compuestos polares en los aceites utilizados para cocinar, resultado de la degradación de éstos durante el proceso de fritura, se relacionó directamente con los niveles de presión sanguínea, observándose que fue el uso del aceite de oliva el que redujo la formación de estos compuestos de degradación. Además, el consumo de aceite de oliva se asoció directamente con el contenido de AGMI de los fosfolípidos plasmáticos, y a su vez se asoció inversamente con los niveles de presión sanguínea. Así pues, el alto contenido en antioxidantes procedentes del consumo de aceite de oliva y de alimentos de origen vegetal en la dieta mediterránea, así como el aporte de minerales como potasio, magnesio y calcio, podrían ser también responsables de la salud del sistema vascular y del aparente efecto protector del patrón de dieta mediterránea contra la hipertensión (Herrera et al., 2001; Liu et al., 2001; Pammani et al., 2003; Kahonen et al., 2003; Alonso et al., 2006).

Finalmente, diversos estudios en animales de experimentación han mostrado recientemente un posible efecto protector del aceite de oliva contra el cáncer (Costa et al., 2004; Cullinen, 2006; Colomer et al., 2006). Los mecanismos por los cuales el aceite de oliva podría ejercer este efecto contra la promoción y progresión del cáncer podrían basarse en cambios en las membranas celulares, alteración de la biosíntesis de eicosanoides, modulación de la expresión genética y prevención del daño del ADN inducido por metabolitos oxígeno reactivos (Bartsch et al., 1999).

3.3.2. El pescado, fuente de ácidos grasos de la serie n-3

El consumo habitual de pescado es una de las características de la población de la región mediterránea, especialmente en las zonas costeras. Son muchos los estudios centrados en investigar la asociación entre la ingesta de pescado y/o aceite de pescado (y consecuentemente de los AGPI-CL n-3 que los caracterizan) con la enfermedad cardiovascular (Din et al., 2004; Calder, 2004). La **Tabla 4** muestra a modo de resumen destacados estudios llevados a cabo al respecto.

Recientemente diversos científicos han revisado la copiosa evidencia científica derivada de los estudios centrados en investigar los posibles efectos beneficiosos en la enfermedad cardiovascular del consumo de pescado y AGPI-CL n-3 (Kris-Etherton et al., 2003; He et al., 2004; Harper y Jacobson, 2005; Bouzan et al., 2005; Hooper et al., 2006; Wang et al., 2006; Schmidt et al., 2006; Psota et al., 2006). La polémica suscitada por la revisión llevada a cabo por Hooper y colaboradores, en la que concluía que los AGPI de la serie n-3 no tenían un efecto beneficioso claro sobre la mortalidad total, los episodios cardiovasculares y el cáncer (Hooper et al., 2006) provocó la réplica de otros expertos en este campo (Geleijnse et al., 2006; Wang et al., 2006; Von Schacky et al., 2006).

Un panel de expertos compuesto por los investigadores Von Schacky, Harris, Mozaffarian y Kris-Etherton, revisó de forma crítica y objetiva el diseño del estudio de Cochrane publicado por Hooper y colaboradores, llegando a la conclusión que no hay razón para revisar las recomendaciones sugeridas por *The ISSFAL* con respecto al consumo de pescado y AGPI de la serie n-3 en la población en general y en los individuos con riesgo cardiovascular (Von Schacky et al., 2006). Así mismo, es interesante destacar los resultados obtenidos de la revisión llevada a cabo por Wang y colaboradores, que indican que el aumento del consumo de EPA y DHA, bien sea a través de pescado o suplementos o ambos, reduce las tasas de mortalidad, infarto de miocardio y muerte cardíaca repentina. La evidencia fue mayor en los estudios de prevención secundaria pero también estuvo presente en los de prevención primaria (Wang et al., 2006; Deckelbaum y Akabas, 2006).

Los efectos beneficiosos derivados de los AGPI-CL n-3 constituyentes del pescado han sido previamente descritos a lo largo de esta tesis (*apartados 1.2.2.2.; 2.5.4.3; 2.6.*). Sin embargo, cabe destacar que a pesar de que la asociación entre un consumo habitual de pescado y la composición de AGPI-CL n-3 de lípidos plasmáticos, membranas celulares y tejido adiposo ha sido demostrada ya desde la década de los noventa (Bjerve et al., 1993; Hjartaker et al., 1997) es conveniente disponer de observaciones fiables de dosis/respuesta en la población general actual, caracterizada por un amplio rango de consumo de pescado de diferentes tipos y procedencias (Amiano et al., 2001; Mori y Woodman, 2006; Deckelbaum y Akabas, 2006; Hibbeln et al., 2006).

Diversas organizaciones han hecho recomendaciones en relación al consumo de pescado, principalmente de pescado graso, tanto para la población general como para personas con riesgo de padecer CVD (British National Formulary, 1999; Kris-Etherton et al, 2002; Van de Werf et al., 2003; Hibbeln et al., 2006; *European Society of Cardiology*, 2003; *OMS/FAO*, 2003; *ISSFAL*, 2004; *American Heart Association*, 2006). Sin embargo, todavía existe un gran vacío entre el consumo actual de pescado y AGPI-CL n-3 y muchas de estas recomendaciones (Calder, 2004). Actualmente, en el área mediterránea, la ingesta de AGPI-CL n-3 procedente del consumo de pescado y derivados es apreciable, pero no elevada, salvo excepciones en algunas regiones de España (Galli y Marangoni, 2006). Por ello, es necesario desarrollar estrategias para redefinir y promover el consumo de pescado y marisco en el contexto del patrón de dieta saludable mediterráneo.

Por su parte, las propiedades de determinadas especies marinas de acumular en mayor o menor grado sustancias nocivas para la salud humana, como compuestos bifenilos policlorados, dibenzofuranos y dibenzotoxinas policloradas y metil-mercurio entre otros (Schechter et al 2001; Kiviranta et al., 2002; Domingo, 2004; Coelhan et al., 2006) hacen que a determinados sectores de la población, como son las mujeres embarazadas, se les recomiende un consumo moderado de algunas de estas especies. Aún así, los múltiples beneficios aportados por un consumo habitual e incluso elevado de pescado, son claramente dominantes versus la contaminación ambiental que puedan haber sufrido las especies marinas hasta llegar al consumidor. Un reciente estudio ha mostrado que las principales especies de pescado consumidas por la población mediterranea catalana actual no contribuyen de forma remarcable al aumento de las concentraciones de contaminantes policlorados a través de los hábitos alimenticios de esta población (Bocio et al., 2006).

De hecho, dos estudios recientes llevados a cabo en Japón muestran los beneficios derivados de un elevado consumo de pescado. El primero de ellos concluyó que poblaciones con una alta frecuencia de consumo de pescado, como es el caso de la población japonesa, tienen mayor biodisponibilidad de AGPI-CL n-3 que aquellas en las que la ingesta es baja (Wakai et al., 2005). El segundo estudio, llevado a cabo en una

muestra de población de más de 41000 individuos, y conocido como “*The Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I*” ha mostrado que, en comparación con un consumo modesto de pescado de una vez por semana (aprox. 20g pescado/día), un consumo más elevado se ha asociado con una sustancial reducción del riesgo coronario, principalmente de episodios cardíacos no fatales, entre individuos de mediana edad (Iso et al., 2006).

Tabla 4. Estudios destacados en la investigación de la asociación entre pescado y enfermedad cardiovascular.
(* CP, consumo de pescado; † 1/α, inversamente relacionada)

<i>Referencia</i>	<i>País, sexo</i>	<i>n</i>	<i>Resultados principales</i>
Kromhout et al., 1985	Países Bajos, H	852	El CP* en 1960 1/α† con la mortalidad por CHD durante 20 a
Norell et al., 1986	Suecia, HM	10966	El CP en 1967 1/α con MI fatal y la mortalidad por CHD durante 14 a
Keli et al., 1994	Países Bajos, H	552	El CP en 1960 1/α con incidencia de derrame cerebral durante 15 a
Kromhout et al., 1995	Países Bajos, HM	272	El CP en 1971 1/α con la mortalidad por CHD durante 17 a
Ascherio et al., 1995	USA, H	44895	El CP en 1986 no fue relacionado con CHD, MI, CHD fatal o MI no fatal durante 6 a
Kromhout et al., 1995	Países Bajos, HM	272	El CP en 1971 1/α con la mortalidad por CHD durante 17 a
Gillum et al., 1996	USA, HM	5192	El CP en 1970 1/α con incidencia de derrame cerebral durante 16 a. en H negros y M blancas, pero no en H blancos
Albert et al., 1998	USA, H	20551	El CP en 1982 1/α con la mortalidad total y muerte súbita durante 11 a
Oomen et al., 2000	Finlandia, Italia, Holanda, H	2713	El CP en 1970 1/α con la mortalidad por CHD en Italia, pero no en Finlandia ni Holanda; El consumo de pescado azul, pero no blanco, 1/α† con la mortalidad por CHD en los tres países.
Tavani et al., 2001	Italia, HM	985	El CP, pescado fresco, AGPI-CL n-31/α con el riesgo de padecer un primer MI no fatal
Hu et al., 2002	USA, M	84688	El CP en 1980 1/α con la incidencia de CHD, mortalidad por CHD, y MI no fatal.
Hu et al., 2003	USA, M	5103	Un CP elevado entre 1980-1996 1/α con incidencia de CHD y de mortalidad total entre M diabéticas.
Mozaffarian et al., 2003	USA, HM	3910	El CP y atún en 1990 1/α con la mortalidad por CHD y arritmia, pero no con MI no fatal, durante 9.3 a
Erkkila et al., 2003	Finlandia, HM	415	El CP en 1995 1/α con la mortalidad total durante 5 a, pero no con la mortalidad por CHD o MI agudo; Un alto CP en 1995 se asoció con un bajo riesgo de CHD fatal y MI no fatal durante 5 a.
Dallongeville et al., 2003	Francia, Irlanda, H	9758	El CP entre 1991-1993 se asoció con una disminución en el ritmo cardíaco.
Panagiotakos et al., 2006	Grecia, HM	1107	El CP moderado en 2001 parece moderar los efectos nocivos del tabaco en la incidencia de síndromes coronarios agudos. Sin embargo, CP elevados no parecen conferir ningún beneficio extra en el riesgo coronario.

3.4. EL PATRÓN DE LA DIETA MEDITERRÁNEA: ENFOQUES METODOLÓGICOS

Como se ha visto, el patrón de dieta mediterránea se caracteriza por una serie de alimentos y nutrientes comunes que lo definen, y que de forma sinérgica, le confieren propiedades beneficiosas sobre la salud humana diferenciándolo de otros patrones alimentarios. Sin embargo, durante décadas, la mayoría de los estudios nutricionales en general, se han centrado en investigar el papel que determinados nutrientes, alimentos o grupos de alimentos ejercían por separado sobre la salud (Osler et al., 2002; Kant, 2004) obviando que a menudo es difícil separar los efectos específicos de estos nutrientes o alimentos debido a su marcada interrelación (Jacques et al., 2001).

La combinación de alimentos y nutrientes consumidos por la población general refleja preferencias individuales por ciertos alimentos moduladas por una mezcla de determinantes genéticos, culturales, sociales, medioambientales, económicos, de salud y de estilo de vida (Quandt et al., 1999; van den Bree et al., 1999; Burke et al., 2005; Naska et al., 2006). Además, los nutrientes pueden interaccionar entre ellos influenciando su biodisponibilidad y absorción en el organismo humano (Schulze et al., 2006). Todos estos factores justifican la tendencia actual de utilizar patrones alimentarios (Knoops et al., 2006) que permitan reflejar la complejidad de la ingesta alimentaria a través de su estudio conjunto. Así, en el caso del PDM, los beneficios obtenidos de muchos de sus componentes por separado, tales como los derivados del consumo de aceite de oliva, pescado, o de frutas y verduras, se unen en el PDM para poder dar explicación de forma conjunta a las ventajas que supone la adherencia a este patrón alimentario (Martínez-Gonzalez, 2003).

Para la confección de éste y el resto de patrones alimentarios, la comunidad científica cuenta con dos enfoques metodológicos principales que son, por una parte, los patrones alimentarios teóricos (PAT) o “definidos *a priori*”, y por otra, los patrones alimentarios empíricos (PAE) o “derivados *a posteriori*” (Kant, 2004; Schulze et al., 2006; Knoops et al., 2006).

3.4.1. Patrones alimentarios “definidos *a priori*”

Los patrones alimentarios teóricos son patrones alimentarios que comportan el uso de una puntuación de “calidad de la dieta” basada en recomendaciones nutricionales o dietas recomendadas (Hoffmann et al., 2004), dando lugar a los denominados *índices de dieta*.

Al estar basados en la evidencia científica disponible previa al estudio a realizar, reciben el nombre de PA definidos *a priori*. Estos índices pueden agruparse en función de tres categorías de puntuación principales (Kant, 2004). La puntuación puede basarse en la variedad de la dieta (Kant et al., 1997; Hatloy et al., 1998; Fernández et al., 2000) como el “*Food-based quality index*” (Lowik et al., 1999), en la evaluación de concordancia con recomendaciones nutricionales de nutrientes y/o alimentos (Drewnowski et al., 1996; Haines et al., 1999; Dubois et al., 2000; Hann et al., 2001; McCullough et al., 2002) como el “*Healthy Diet indicador*” que está basado en las recomendaciones de la OMS para la prevención de enfermedades crónicas (Huijbregts et al., 1997) y finalmente en la evaluación de las características de la dieta mediterránea (Gerber et al., 2000; Scali et al., 2001; Woo et al., 2001; Gerber et al., 2006) como el “*Mediterranean Adequacy Index*”, que tenía como dieta de referencia la DM consumida en los años 60 en una de las regiones italianas participantes en “*The Seven Countries Study*” (Alberti-Findanza et al., 2004).

Adicionalmente, y con el fin de poder realizar comparaciones entre la calidad de las dietas entre países diferentes, Kim y colaboradores crearon el denominado “*Diet Quality Index-International (DQI-I)*” basado en las cinco características de la dieta: variedad de los componentes de la dieta, competencia para garantizar una dieta saludable como precaución en contra de la malnutrición, moderación en el sentido de evaluar la ingesta de alimentos y nutrientes que están relacionados con enfermedades crónicas y que pueden necesitar restringirse, y equilibrio global en términos de proporcionalidad en fuentes energéticas y composición de ácidos grasos de la dieta (Kim et al., 2003). Aunque este índice ha sido satisfactoriamente aplicado para comparar las dietas de las poblaciones americanas y chinas, su aplicación en poblaciones europeas que siguen el PDM ha de ser interpretada cuidadosamente (Popkin et al., 2003; Tur et al., 2005).

3.4.1.1. El uso de índices para evaluar la adherencia a la dieta mediterránea

Los índices de la dieta mediterránea pretenden evaluar de forma global la calidad de una dieta tomando como referencia la dieta tradicional mediterránea (Bach et al., 2006). Resumen la calidad de la dieta en un valor numérico final que resulta de puntuar diferentes componentes, tales como determinados alimentos, grupos de alimentos o combinación de alimentos y nutrientes. Dependiendo de la forma en que el índice es calculado, los métodos de evaluación se clasifican en tres categorías diferentes:

- *Índices basados en una puntuación positiva o negativa de sus componentes:* El índice más extensamente utilizado (Bach et al., 2006), denominado *Mediterranean Diet Store (MDS)* fue creado por Trichopoulou y colaboradores para medir el grado de adhesión al PDM tradicional griego (Trichopoulou et al. 1995).

Desde entonces, se han publicado numerosas variaciones con el objetivo de continuar evaluando la relación dieta mediterránea-salud. El MDS se basó en asignar una puntuación de 0 a 1 de acuerdo con la ingesta diaria de cada uno de los ocho componentes en que se simplificó la dieta mediterránea tradicional griega (elevado *ratio* AGMI/AGS, alto consumo de frutas, de verduras, de legumbres, de cereales (incluyendo pan y patatas); moderado consumo de alcohol, de leche y productos lácteos; y bajo consumo de carne y productos cárnicos). Las medianas de la ingesta de cada componente de la muestra total, diferenciadas por sexo, fueron tomadas como puntos de corte (Costacou et al., 2003). Para cada componente, un individuo recibía un punto positivo si su ingesta era superior a la mediana de la muestra en caso de componentes “protectores” (frutas, verduras, etc.) y si su ingesta era inferior a la mediana de la muestra para componentes “no-protectores” (carne, lácteos, etc.). De esta forma, la suma de la puntuación obtenida para todos los componentes podía ir desde 0 (mínima adhesión a la DM) hasta 8 (máxima adhesión a la DM). A modo de resumen, la **Tabla 5** muestra los principales estudios realizados en base a índices de dieta mediterránea basados en el MDS de Trichopolou et al.

- *Índices que añaden o sustraen componentes estandarizados*: Este tipo de índices expresan la adhesión a la DM en tanto por ciento relativo. En primer lugar, los valores de ingesta de cada componente son ajustados por energía para cada individuo. Seguidamente, el valor ajustado obtenido es estandarizado como un valor z (media/SD). Así por ejemplo, si el valor medio observado para la ingesta de verduras es de 180 g/día, con una SD de 140 g/día, a un individuo que consuma 200 g/día le corresponderá un valor de $z = ((200-180)/140) = 0,14$. El valor de z total es la suma de todos los valores de z derivados de componentes “protectores” a los que se les resta los valores de z de componentes “no-protectores”. Finalmente, se calcula el porcentaje relativo de adhesión a la DM usando el rango de valores de z (máximo y mínimo) de la muestra (Sánchez-Villegas et al., 2002).

Tabla 5. Principales estudios realizados en base al índice MDS

Referencia	Índice	Objetivos	Tipo de estudio (duración, nombre)	País/población (n, edad)	Principales resultados
Trichopoulou et al., 1995	MDS-1	Adhesión PDM- esperanza de vida	Cohorte (4-5 a)	Grecia 182; >70a	+1p MDS: ↓17% RR mortalidad (CI: 1, 31%)
Osler y Schroll, 1997	MDS-1 variado	Adhesión PDM, esperanza de vida	SENECA, Cohort (6a)	Dinamarca 202; >70a	↑Adh. MDS ↓mortalidad
Martínez-González et al., 2002	MDP variado	Adhesión PDM- infarto miocárdio	MONICA, caso-control	España 342; <80y	↑ 1 punto MDP ↓OR de IM en 0.92
Van Staveren et al., 2002	MDS-1 variado	Adhesión PDM, esperanza de vida	SENECA, Cohort (10a)	12 países Europeos; 2586 >70a	No asociación significativa
González et al., 2002	MDS-1 variado	Adhesión PDM, f. sociodemogr.	EPIC, Cohort (5a)	España 41446 ; 29-69a	↑Adh. MDS ↑age, ↓s.class
Trichopoulou et al., 2003	MDS-2	Adhesión PDM- índice de mortalidad	EPIC, Cohort (3.7a)	Grecia 22043; 20-84a	+2p MDS: ↓25% RR mortalidad (CI: 13, 36%)
Schröder et al., 2004	MDS-2 variado	Adhesión PDM, Obesidad	Estudio transversal	España 3100 ; 25-74a	↑Adh. MDS ↓IMC
Psaltopoulou et al., 2004	MDS-2 variado	Aceite de oliva, HTA y Adhesión PDM	EPIC, Cohort (5a)	Grecia 20343; 20-86a	↑+3p MDS ↓HTA
Knoops et al., 2004	MDS-2 variado	Adhesión PDM, esperanza de vida	HALE (10a)	11 países Europeos; 2539; 70-90a	↑Adh. MDS ↑supervivencia
Trichopoulos y Lagiou, 2004	MDS-1 variado	Adhesión PDM- índice de mortalidad	Estudio ecológico	15 países Europeos	Diferencias entre países med y no med.
Panagiotakos et al., 2004	Dietary store	Adhesión PDM- Perfil lipídico	ATTICA, Cohort (1a)	Grecia 1280; >28a	↑ 1 punto MDS ↓19% LDL-C, ↓32% LDL-oxid
Serra-Majem et al., 2004	MDQI en niños y adolescentes	Adhesión PDM en niños y adolescentes	KIDMED, estudio descriptivo	España; 3850; 2-24a	% MD excelente por áreas y clases 49,4% MD intermedia
Trichopoulou et al., 2005 ²	MDS variado	Adhesión PDM- índice de mortalidad	EPIC, cohorte (4a)	9 países europeos 74607 individuos sanos	+2p MDS: ↓8% RR mortalidad (CI: 3-12%)
Bilenko et al., 2005	MDS-1 variado	Adhesión PDM, CVD	Estudio caso-control	Israel 1159; >35a	↓1 punto MDP, ↑23-55% riesgo CVD
Trichopoulou et al., 2005 ¹	MDS-2	Adhesión PDM- índice de mortalidad	EPIC, cohorte (3.78 a)	Grecia 1302 pacientes de CVD	+2p MDS: ↓27% RR mortalidad (CI: 7, 42%)
Gerber et al., 2006	Med-DQI	Adhesión PDM- v.demográficas y estilo de vida	Estudio transversal	Francia 964; 30-77 ^a	↑Med-DQI: ↑edad, area rural, no fumadores

- *Índices basados en cocientes entre componentes*: Estos índices se basan en el cociente entre la suma de energía procedente de “productos mediterráneos” (grupos de alimentos protectores) y la suma de energía de “productos no-mediterráneos” (animales de origen animal y dulces). Valores elevados del índice indican una mayor adhesión a la DM. La aplicación de este índice a una población italiana participante en “*The Seven Countries Study*” (Alberti-Fidanza et al., 1999) mostró un progresivo abandono del PDM en dicha población. En la población española se aplicó con el fin de evaluar la influencia de variables sociodemográficas sobre la adhesión al PDM. Los resultados obtenidos mostraron una mayor adhesión a la dieta mediterránea en hogares de clase baja que de clase alta y en áreas rurales que en ciudades (Fuentes-Bol, 2002).

A los índices anteriores, cabe sumar la reciente puesta a punto de un programa informático denominado “*MedDietScore*”, capaz de evaluar de forma rápida la adhesión de un individuo al PDM y su relación con el riesgo cardiovascular (Panagiotakos et al., 2006). Así mismo, los resultados positivos derivados de una intervención promotora de la dieta mediterránea en la población escocesa, a través de la evaluación de la efectividad de una página web con información nutricional sobre el PDM (Papadaki et al., 2005) han mostrado el potencial del posible uso de las nuevas tecnologías para llegar a un amplio número de individuos, a un relativo bajo coste, con el objetivo de promover cambios en sus hábitos de alimentación.

3.4.1.2. Las recomendaciones y objetivos nutricionales y la dieta mediterránea

La promoción de hábitos alimentarios adecuados, que sigan modelos de dietas saludables como el PDM, constituye uno de los componentes más importantes en las estrategias de promoción de la salud (Tur et al., 2004). Para ello se cuenta con dos herramientas principales en el campo de la salud pública: los objetivos nutricionales y las recomendaciones alimentarias (Serra-Majem et al., 2001). Los actuales objetivos nutricionales para la población española fueron desarrollados bajo consenso por la *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC)* en la Declaración de Bilbao de 2000 (Aranceta et al., 2001; Serra-Majem 2001), distinguiéndose dos tipos de objetivos nutricionales, los intermedios y los finales (**Tabla 6**). Los objetivos nutricionales intermedios se basan en el análisis de datos actuales nutricionales y de consumo de alimentos derivados de encuestas nutricionales; reflejando objetivos alcanzables en la población española actual.

Por su parte, los objetivos nutricionales finales reflejan objetivos a largo plazo y están basados en la evidencia científica actual en el contexto del proyecto *EURODIET*, con la incorporación de adaptaciones pertinentes a la realidad mediterránea e idiosincrasia en España (Kafatos et al., 2001; Serra-Majem et al., 2001).

Tabla 6. *Objetivos nutricionales para la población española aprobados por la SENC*

	<i>Objetivos nutricionales intermedios</i>	<i>Objetivos nutricionales finales</i>
Lactancia materna	4 meses	≥ 6 meses
Fibra	> 22 g/día	> 25 g/día
Folato	> 300 µg/día	> 400 µg/día
Calcio	≥ 800 mg/día	
Sodio	< 7 g/día	< 6 g/día
Yodo	150 µg/día	
Flúor	1 mg/día	
Actividad física	-	PAL > 1.75
BMI (kg/m ²)	< 25	21 - 23
Grasa total (% energía)	≤ 35%	30- 35%
AGS	≤ 10%	7- 8%
AGMI	20%	15- 20%
AGPI	5%	
AGPI n-6	-	2 g linolénico
AGPI n-3	-	> 200 mg DHA
Colesterol	< 350 mg/día	< 300 mg/día
Carbohidratos (% energía)	> 50%	50- 55%
Frutas	> 300 g/día	> 400 g/día
Verduras	> 250 g/día	> 300 g/día
Alcohol (vino)	< 2 vasos/día	

El proyecto *EURODIET*, fundado por la Comisión Europea en 1998, surgió con el objetivo de desarrollar y unificar recomendaciones nutricionales europeas, teniendo en cuenta la variabilidad en la dieta y estilos de vida de los países europeos, así como el elevado aumento de enfermedades crónicas relacionadas con estos factores. El porcentaje permitido de energía proveniente de los lípidos es la principal diferencia entre las recomendaciones españolas (≤ 35%) y las establecidas por *EURODIET* (< 30%). Este hecho muestra que las recomendaciones nutricionales deben establecerse en lo que de forma realista puede lograrse en base a un determinado contexto socio-económico (Becker et al., 1999; Tur et al, 2004).

En la región mediterránea, caracterizada por el consumo de aceite de oliva en elevadas cantidades, se plantea un conflicto con los objetivos nutricionales clásicos para los países occidentales, que limitan la ingesta total de grasa a porcentajes inferiores al 20-30%. Sin embargo, y debido a los beneficios saludables derivados del PDM, los objetivos nutricionales de los países mediterráneos permiten una ingesta superior de lípidos totales respecto al resto de la población europea, siempre y cuando se opte por la reducción de grasas saturadas sin modificar el consumo habitual de aceite de oliva (Trichopoulos, 2002; Serra-Majem et al, 2003).

Así pues, la dieta mediterránea, definida en diversos encuentros científicos internacionales como una dieta variada, no muy calórica, basada en productos frescos, locales y estacionales (Willet et al., 1995; De Lorgeril y Salen, 2006; Bach et al., 2006) se halla en concordancia con los actuales objetivos y recomendaciones nutricionales para la población española y europea; así como con las directrices para una dieta saludable resultantes del programa “*Countrywide Integrated Non-communicable Diseases Intervention (CINDI)*”, llevado a cabo por la OMS con el fin de reducir la morbilidad y mortalidad por las enfermedades no transmisibles más comunes (WHO 2003).

3.4.2. Patrones alimentarios “derivados *a posteriori*”

Los patrones alimentarios “derivados *a posteriori*” están basados únicamente en los datos aportados por el estudio en curso, derivando en patrones alimentarios puramente empíricos (Schulze et al., 2006). Los dos métodos exploratorios más aplicados en epidemiología nutricional son los análisis de componentes principales (*Principal component analysis (PCA)* ó *factor analysis*) y los análisis por clusters (*Cluster analysis (CA)*). Ambas metodologías funcionan bien identificando los patrones alimentarios principales de una determinada población bajo estudio (Hu et al., 2002; Kerver et al., 2003; Newby et al., 2004).

3.4.2.1. El análisis de componentes principales

El método PCA identifica alimentos que frecuentemente son consumidos de forma conjunta. Agrupa alimentos o grupos de alimentos en base al grado en que se correlacionan unos con otros. El objetivo consiste en identificar combinaciones lineales de alimentos o grupos de alimentos que expliquen la mayor variación en la dieta entre individuos (Newby et al., 2004; Schulze et al., 2006). Se trata de una técnica multivariante que utiliza información procedente de cuestionarios de frecuencia alimentaria o de registros alimentarios para identificar patrones o factores comunes de consumo de alimentos (Hu et al., 2000).

La mayoría de estudios de este tipo ha elegido nombrar al factor con bajo consumo de grasa, y alto consumo de frutas, verduras y cereales, “el patrón prudente”; mientras aquel con mayor ingesta de grasas, carne y cereales refinados como “el patrón occidental”.

Pero a excepción de pocos casos, los factores escogidos representan entre el 13-30% de la variancia en los datos de la dieta (Kant, 2004). Entre los estudios basados en PCA se distinguen estudios de tipo *cross-sectional* que relacionan los PA con ingesta de nutrientes, estilo de vida y variables sociodemográficas (North et al., 2000; Tseng et al., 2001; Schulze et al., 2001); con biomarcadores u otras variables biológicas como la concentración plasmática de lípidos (Hu et al., 1999; Fung et al., 2001; van Dam et al., 2003); y estudios prospectivos de Cohortes que asocian los PA con índices de mortalidad y morbilidad (Kumagai et al., 1999; Hu et al., 2000; Terry et al., 2001; Waijers et al., 2006). Entre sus aplicaciones, cabe destacar su uso en la caracterización de los hábitos alimentarios de la tercera edad (Diehr et al., 2003; Knoops et al., 2004; Ledikwe et al., 2004; Bamia et al., 2005; Pala et al., 2006) con el objetivo de poder desarrollar recomendaciones nutricionales tangibles y específicas para este grupo de la población, y en la identificación y predicción del riesgo cardiovascular en la población (Fung et al., 2001; Kerver et al., 2003).

3.4.2.2. El análisis de clusters

El análisis de clusters (CA) define clusters de individuos que se excluyen mutuamente (Schulze et al., 2006). Reduce los datos obtenidos de la dieta en patrones basados en diferencias individuales en ingestas medias, de forma que un individuo sólo puede pertenecer a un único cluster (Newby et al., 2004). Al igual que en el caso de los PCA, la bibliografía muestra estudios de tipo transversal en los que se asocian clusters con variables sociodemográficas, biológicas y/o determinados nutrientes (Wirfalt et al., 2000; Quatromoni et al., 2002; Millen et al., 2002; Osler et al., 2002).

Recientemente, el método estadístico de *Reduced rank regresion* (RRR) ha sido aplicado en epidemiología nutricional como herramienta adicional al análisis de patrones alimentarios (Hoffmann et al., 2004¹; Weikert et al., 2005), y puede ser considerado como un híbrido entre las metodologías de PCA y CA. Este método permite identificar patrones alimentarios asociados con niveles plasmáticos de biomarcadores (Hoffmann et al., 2004; Heidemann et al., 2005) que están estrechamente relacionados con enfermedades de interés (Weikert et al., 2005).

4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EL ORGANISMO HUMANO

La determinación más común de la composición de ácidos grasos en muestras biológicas comprende cuatro etapas principales que son: extracción lipídica, fraccionamiento o aislamiento de componentes lipídicos, derivatización a compuestos volátiles, y análisis por cromatografía de gases (CG).

4.1. EXTRACCIÓN LIPÍDICA

Los métodos actuales de extracción de lípidos en muestras biológicas siguen basándose en los métodos originales desarrollados a finales de la década de los años cincuenta. El más ampliamente utilizado es el *método Folch*, que utiliza como agente extractor una mezcla binaria de cloroformo/metanol 2:1(v/v), a la que sigue una etapa de lavado con solución salina (Folch *et al.*, 1957).

Dos años más tarde a la aparición del *método Folch*, Bligh y Dyer optimizaron la extracción redefiniendo las cantidades de cloroformo, metanol y agua, hasta lograr un sistema bifásico en el que la capa final de cloroformo contuviera los componentes lipídicos, mientras que la formada por metanol/agua los componentes no lipídicos (Bligh y Dyer, 1959). Posteriormente, el uso de otros disolventes tales como n-butanol/agua (Dae y Bremer, 1970) o hexano/isopropanol 3:2 (v/v) (Hara y Radin, 1979) fue también propuesto para la extracción lipídica.

Un estudio centrado en la comparación de diferentes métodos de extracción para el aislamiento de fosfolípidos de muestras biológicas (Kolarovic y Fournier, 1986) concluyó en que los métodos con una única fase de extracción conllevan a recuperaciones de PL más altas que aquellos métodos que utilizan disolventes bifásicos. Aún así, el método más utilizado en la extracción lipídica, según la bibliografía actual, sigue siendo el *método Folch*.

4.2. FRACCIONAMIENTO LIPÍDICO

La fase orgánica resultante de la etapa de extracción comprende una variedad de componentes lipídicos de diferente polaridad tales como triglicéridos, ésteres de colesterol, esteroides libres, fosfolípidos, gliceroglicolípidos, esfingolípidos, o AGL. En el caso en que se desee analizar los ácidos grasos de cada uno de los componentes lipídicos por separado, se ha de proceder a una etapa de fraccionamiento, bien sea por cromatografía en capa fina (CCF) o por extracción en fase sólida (SPE).

4.2.1. Cromatografía en capa fina

La técnica de cromatografía en capa fina ha sido y sigue siendo ampliamente utilizada en la separación de los diferentes componentes de extractos lipídicos de muestras biológicas. Los extractos lipídicos de plasma y suero han sido tradicionalmente fraccionados en placas de sílica gel G utilizando un sólo eluyente constituido por: n-hexano o éter de petróleo / dietil éter/ ácido acético en proporciones del orden de 85:15:2 (v/v/v) (Bradley et al. 1979; Moilanen y Nikkari, 1981; Wang, 1983; Cairns y Peters, 1983). Modificaciones variando hexano por heptano (Schmitz et al., 1984), o el ácido acético por ácido fórmico (Tvrzická et al., 1990) o prescindiendo del dietil éter o del ácido acético (Hiramatsu et al., 1980) han generado nuevas metodologías de trabajo. La elección de dos eluyentes permite separar por un lado los lípidos apolares y neutros de los fosfolípidos, componentes más polares del extracto lipídico (Macala et al., 1983; Kovács et al., 1986; Alvarez et al., 1992). Uno de los métodos de dos eluyentes más utilizado se basa en n-heptano/ dietil éter/ ácido acético 85:15:1 (v/v/v), para separar EC y TG, y cloroformo/ metanol/ agua 60:30:5 (v/v/v) para separar la fracción de fosfolípidos (Skorepa *et al.*, 1983).

A la CCF clásica hay que sumar la aparición de otros métodos basados en la CCF con zona de concentración (Suzuki et al., 1993) o la de la CCF multidimensional (White et al., 1998). Sin embargo, a pesar de su continua aplicación, la CCF resulta una técnica lenta y tediosa, que puede dar lugar a bajos porcentajes de recuperación, así como a problemas de oxidación, principalmente de ácidos grasos poliinsaturados, debido a una prolongada exposición al aire de las placas de sílica (Bernhardt et al., 1996).

4.2.2. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida supone una alternativa viable a la separación de fracciones lipídicas por CCF, y comprende generalmente cuatro etapas básicas: acondicionamiento del cartucho extractor, carga de la muestra, lavado (para eliminar impurezas o analitos no deseados) y elución selectiva de los compuestos de interés (Christie, 2006). La optimización de cada una de las anteriores etapas es la que permite el desarrollo de nuevos métodos de análisis por SPE (Hennion, 1999; Spivakov et al., 2006).

Aunque en la actualidad son muchas y variadas las fases estacionarias disponibles en la gama de cartuchos de extracción sólida, se ha visto que para la separación de lípidos las fases más efectivas son del tipo aminopropil (Kim y Salem, 1993; Suzuki et al., 1997; Bodennec et al., 2000; Burdige et al., 2000).

Kaluzny y colaboradores fueron de los primeros en aplicar las columnas aminopropil en la separación de lípidos (Kaluzny et al., 1985). La **Tabla 7** muestra los eluyentes y clases de lípidos eluidos según este método, en el que es necesario el uso de dos columnas SPE por muestra a analizar. Posteriormente, otros autores han seguido desarrollando métodos por SPE en función de las clases de lípidos que se deseen analizar (Christie, 1992; Burdge et al. 2000). Así, por ejemplo, el método descrito por Agren *et al.* permite separar ésteres de colesterol (con hexano), triglicéridos (con hexano/cloroformo/acetato de etilo 100:5:5), mono- y diglicéridos (con cloroformo/2-propanol 2:1), ácidos grasos libres (cloroformo/ metanol/ ácido acético 100:2:2) y fosfolípidos (metanol/ cloroformo/agua 10:5:4) con el uso de una sola columna de SPE por muestra (Agren et al., 1992).

Tabla 7. Eluyentes y clases de lípidos eluidos con el método Kaluzny et al., 1985.

<i>Eluyente</i>	<i>Lípidos eluidos</i>
Cloroformo/2-Propanol (2:1)	Lípidos neutros
2% Ácido acético en dietil éter	Ácidos grasos libres
Metanol	Fosfolípidos
Hexano	Ésteres de colesterol
1% Dietil éter, 10% cloruro de metilo en hexano	Triglicéridos
5% Acetato de etilo en hexano	Colesterol
15% Acetato de etilo en hexano	Diglicéridos
Cloroformo/ Metanol (2:1)	Monoglicéridos

Entre las ventajas aportadas por la extracción SPE destaca la reducción en el tiempo de elución, el ahorro de reactivos, así como la facilidad de un análisis simultáneo de muestras muy superior a la permitida por CCF.

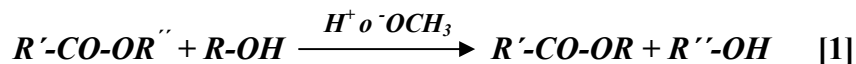
4.3. DERIVATIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Para poder analizar los ácidos grasos por cromatografía de gases conviene transformarlos en compuestos más volátiles. La transformación a ésteres metílicos (FAME) suele ser la derivatización más usual ya que permite el análisis mejorando la forma de los picos, favoreciendo así una mejor separación (Liu et al., 1994).

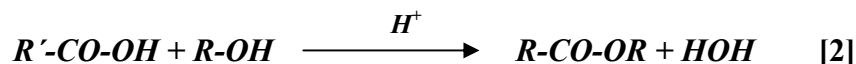
La formación de FAME se realiza en presencia de un agente catalizador mezclado o disuelto en metanol. La catálisis puede ser ácida (HCl, H₂SO₄ o BF₃) o básica (NaOCH₃, KOH o NaOH).

Las reacciones que tienen lugar en el proceso de derivatización de ácidos grasos son:

- *Reacciones de transesterificación* (catalizadas por un ácido o una base):

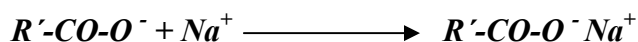
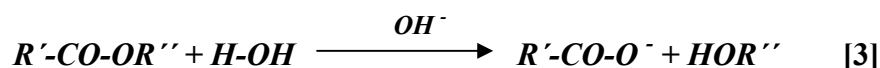


- *Reacciones de esterificación* (catalizadas por ácidos):



La presencia de agua en el sistema interfiere en ambas reacciones, ya que una vez formados los ésteres, puede tener lugar una *hidrólisis*, reacción inversa a la esterificación.

Así como la hidrólisis ácida es reversible (reacción 2), la hidrólisis básica es irreversible y se denomina *saponificación*:



La elección de los agentes de metilación dependerá de la composición lipídica de la muestra a analizar, así como de otros parámetros como la temperatura y del tiempo de reacción. El uso de trifluoruro de boro/metanol es actualmente una de las alternativas más sugerentes para la etapa de derivatización y fue puesto de manifiesto gracias a un estudio detallado (Morrison & Smith, 1964) en el que se establecieron la temperatura y tiempos de reacción en función de los diferentes tipos de lípidos. Así, a una temperatura constante de 100°C y concentraciones de BF₃/MeOH entre el 20-30%, los AG libres sólo necesitan dos minutos para convertirse en ésteres metílicos, mientras las esfingomielinas necesitan 90 minutos para su completa derivatización.

4.4. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

La técnica utilizada para la determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos en forma de sus ésteres metílicos es la cromatografía de gases (Seppänen-Laakso et al., 2002; Tvrzická et al., 2002). El uso de columnas capilares polares permite separar un gran número de FAME en función de su temperatura de ebullición y polaridad (Myer y Kuksis, 1995). Así, por lo general, los ácidos grasos de cadena corta y los de menor número de insaturaciones eluyen antes que los de cadena larga y mayor número de dobles enlaces respectivamente.

La fase estacionaria más ampliamente utilizada está compuesta por bis-cianopropilsiloxano (**Figura 21**). Cuanto mayor es la proporción de este compuesto en la fase estacionaria, mayor grado de polaridad tiene la columna. La composición de este tipo de fases permite a su vez la separación de diversos isómeros geométricos *cis/trans* e isómeros posicionales.

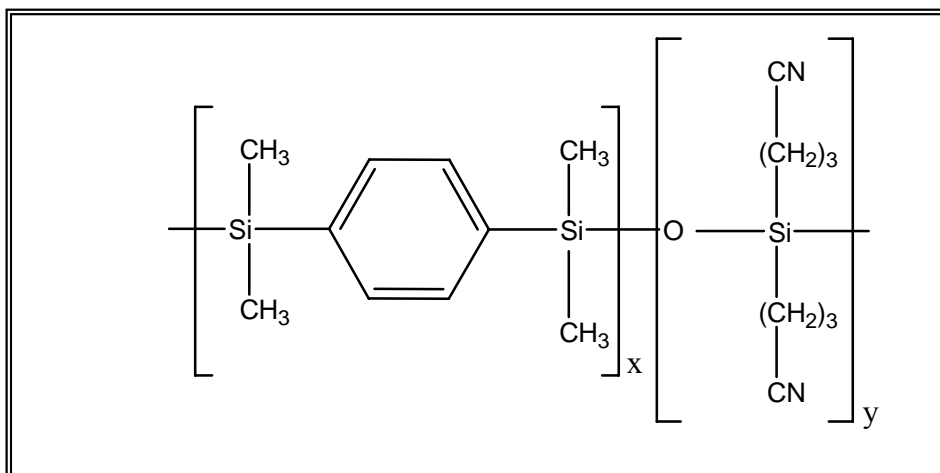


Figura 21. Estructura química de la fase estacionaria bis-cianopropilsiloxano

La combinación de la CG con un detector de espectrometría de masas es la mejor solución para el análisis de muestras que contengan AG inusuales (Bizzozero et al., 1991). Sin embargo, el sistema de detección preferido en los análisis de rutina es el ionizador de llama (FID). Los detectores de conductividad térmica (TCD) también se utilizaron en los primeros análisis de FAME, con resultados comparables a los obtenidos por FID, pero actualmente se utilizan sólo en casos de análisis de muestras gaseosas (Tvrzická et al., 2002). En cuanto al detector FID, cabe destacar que una buena optimización de las condiciones de operación, especialmente de los gases portadores y auxiliar, incrementa el rango lineal efectivo permitiendo lograr buenos resultados cuantitativos (Albertyn et al., 1982).

El análisis cualitativo de los FAME presentes en la muestra en estudio, se realiza en base a sus diferentes tiempos de retención (t_R). El sistema de identificación por t_R está basado en una dependencia lineal entre el logaritmo del volumen de retención y el número de átomos de carbono de homólogos bajo las condiciones cromatográficas establecidas (Tvrzická et al., 2000). La disponibilidad de patrones de diferentes muestras biológicas, alimentarias y de origen sintético, permite que los FAME sean claramente identificados en base a la comparación del t_R del éster metílico en patrón y en muestra. Conviene destacar que si el instrumento dispone de un programa de integración automático, en los análisis de rutina con gran número de muestras a analizar, el t_R debe ir actualizándose debido al envejecimiento de la columna.

Por su parte, el análisis cuantitativo en CG-FID se basa en la relación entre la masa de “carbonos efectivos” (átomos de carbono de unidades metileno; en el caso de los FAME todos los carbonos excepto el del grupo carboxilo) y la respuesta del detector. Así, la cuantificación de un ácido graso se basa en la comparación de su área con la de un patrón interno, de concentración exactamente conocida, adicionado a la muestra al principio del análisis. Al ser la relación de áreas proporcional a la relación de concentraciones, se puede expresar el resultado en cantidad de masa del ácido graso por volumen de muestra. En aquellas ocasiones en las que no se requiere de los valores de concentración de cada ácido graso en la muestra, los resultados suelen expresarse en porcentaje de áreas (%). Para cada ácido, este método expresa el resultado del porcentaje relativo del AG frente al total de ácidos grasos.

4.4.1. De la cromatografía de gases convencional a la cromatografía de gases rápida

La reducción del tiempo de análisis es uno de los objetivos de todo investigador al desarrollar un nuevo método. En cromatografía de gases, este interés por reducir el tiempo de análisis se despertó en los inicios de la técnica, con la invención de las columnas capilares en 1958 (Matisová y Dömötörova, 2003). Pero no ha sido hasta estos últimos años en que los avances en instrumentación han permitido la puesta a punto de la cromatografía de gases rápida (CG rápida) de forma rutinaria en empresas y centros de investigación (Cramers et al., 1999; Klee et al., 2002).

4.4.1.1. Conceptos teóricos

Para entender cuales son los parámetros que influyen en la optimización de la velocidad de análisis en GC, es necesario tener en cuenta las ecuaciones teóricas que expresan el tiempo de análisis en función de varios parámetros operacionales del sistema cromatográfico (Cramers et al., 1999; Cramers y Leclercq 1999; Korytár et al., 2002).

El primer objetivo en cromatografía de gases es conseguir suficiente separación entre los compuestos de interés. Esto implica que el número de platos teóricos (N_{req}) requeridos de una columna cromatográfica debe ser suficiente como para lograr una completa separación. Es obvio que una separación que requiera solamente de un número de platos teóricos bajo ($\cong 1000$), será más rápida que la separación de una muestra compleja, que requiera de millones de platos. Así pues, para poder comparar diferentes métodos por CG rápida es necesario utilizar condiciones de resolución normalizadas, implicando que para una determinada separación N_{req} se asume constante. Para lograr la separación de dos componentes la muestra es inyectada en la columna.

En ella, cada componente interacciona de forma característica con la fase estacionaria de la columna y por lo tanto viaja a través de la misma con una velocidad específica propia. Componentes viajando a diferentes velocidades eluyen a diferentes tiempos, produciéndose la separación deseada. El tiempo de retención t_R de un compuesto se expresa como:

$$t_R = t_M \cdot (1 + k) \quad [4.1]$$

donde t_M es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido por la columna y k es el factor de retención, relacionado con los parámetros termodinámicos que gobiernan el proceso de distribución del compuesto entre fase móvil y fase estacionaria.

Este t_M a su vez se define como:

$$t_M = \frac{L}{\bar{u}} = \frac{L}{u_0 \cdot f_2} \quad [4.2]$$

donde L es la longitud de la columna; \bar{u} es la velocidad media del gas portador; u_0 es la velocidad lineal del gas portador a la salida de la columna; y f_2 es el factor de compresibilidad del gas. Por definición, el grado de separación (R_S) entre un par crítico de componentes viene expresado como:

$$R_S = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{4 \cdot \sigma} \quad [4.3]$$

donde $t_{R,2}$ y $t_{R,1}$ son los tiempos de retención del segundo y primer pico del par crítico en eluir; y donde σ es la desviación estándar media de los dos picos (en unidades de tiempo, s) que resulta de los procesos de ensanchamiento de banda (*band broadening*) que tienen lugar en la separación cromatográfica durante la migración de los compuestos a través de la columna. A su vez, σ está relacionada con la altura de plato teórico H y el número de platos teóricos N , resultando la expresión:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = \frac{L}{H} \quad [4.4]$$

Sustituyendo las ecuaciones [4.1] y [4.4] en [4.3] se llega a la ecuación:

$$N_{req} = 16 \cdot R_S^2 \cdot \left(\frac{1+k_2}{k_2} \right)^2 \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \quad [4.5]$$

donde α es la retención relativa ($\alpha = k_2 / k_1$). Para picos de igual tamaño, la separación a línea base se consigue a $R_s > 1.5$, pero se considera una separación suficiente con $R_s = 1$.

Una vez lograda la separación entre el par crítico a una resolución específica, el segundo paso es conseguir dicha separación en el menor tiempo posible. Así, t_R se expresa como:

$$t_R = [N \cdot (1 + k)] \cdot \left[\frac{H}{u_0 \cdot f_2} \right] \quad [4.6]$$

Combinando las ecuaciones [4.5] y [4.6], se llega a la definición del t_R como:

$$t_R = 16 \cdot R_s^2 \cdot \left[\left(\frac{(1+k)^3}{k^2} \right) \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \right] \cdot \left(\frac{H}{u_0 \cdot f_2} \right) \quad [4.7]$$

Aplicando la ecuación de Golay-Giddings, que describe la dependencia de la altura de plato experimental con la velocidad lineal del gas portador y los parámetros de columna y la ecuación de flujo de Hagen-Poiseuille, sobre la ecuación 4.7 se llega a la siguiente ecuación:

$$t_R = (1+k) N_{rec}^{3/2} \frac{9}{8} \sqrt{3} F(k) \left[\frac{\eta}{p_0 D_{m,0}} \right]^{1/2} d_c \quad [4.8]$$

donde $F(k) = 1 + 6k + 11k^2 / 98(1+k)^2$; η es la viscosidad dinámica; p_0 es la presión a la salida de columna; $D_{m,0}$ es el coeficiente de difusión del analito en la fase gaseosa a la presión de salida, y d_c es el diámetro interno de columna.

4.4.1.2. Estrategias para un análisis rápido por cromatografía de gases

Las ecuaciones [4.5] y [4.8] del apartado anterior han mostrado explícitamente los parámetros que afectan al tiempo de análisis en columnas capilares. En base a ellas, se diferencian básicamente tres estrategias para llevar a cabo separaciones rápidas (David et al., 1999; Korytár et al., 2002; Matisová y Dömötörova, 2003) que son:

- Estrategia 1: Minimizar la resolución a un valor suficiente para lograr la separación
- Estrategia 2: Maximizar la selectividad del sistema cromatográfico
- Estrategia 3: Desarrollar un método que reduzca el tiempo de análisis a una resolución constante.

Minimización de la resolución

La minimización de la resolución a un valor suficiente para lograr la separación supone la estrategia más rápida y de menor riesgo para conseguir reducir el tiempo del análisis. Para llevarla a cabo se puede optar por:

- *Reducir la longitud de la columna:* la ganancia de tiempo es proporcional a la reducción de la longitud en condiciones de separación isoterma. En gradiente de temperaturas, la ganancia es menor a mayor rango de temperaturas.
- *Aumentar la velocidad del gas portador por encima del máximo:* la ganancia de tiempo es proporcional al incremento de temperatura en condiciones isoterma. En el caso de gradiente dependerá de las temperaturas que se alcancen en el análisis. La velocidad máxima está restringida por los reguladores de presión del sistema.
- *Aumentar la temperatura isoterma:* esta opción obviamente es sólo posible si se trabaja en condiciones isoterma. Supone una ganancia del doble de tiempo por cada 15°C de incremento de la temperatura. La restricción viene marcada por la temperatura máxima de trabajo de la columna.
- *Aumentar la temperatura inicial de análisis* (en el caso de trabajar con gradiente de temperatura): la ganancia de tiempo depende fuertemente de las temperaturas de inicio y fin del programa escogido.
- *Seleccionar un programa de temperaturas rápido:* la ganancia de tiempo es proporcional al incremento de la velocidad de la temperatura. Flujos superiores a los 20-40°C/ min. requieren instrumentación específica.
- *Convertir un análisis en condiciones isoterma en uno con gradiente de temperaturas:* se pueden lograr sustanciales ganancias en el tiempo de análisis.
- *Controlar el programa de presión y velocidad simultáneamente:* requiere de un control electrónico de la presión y del flujo.
- *Reducir el grosor de la película:* la ganancia de tiempo es proporcional al grosor del *film* en columnas de película estrecha, siendo superior para columnas de película ancha.

Maximización de la selectividad

En el caso en que no se haya logrado reducir el tiempo de análisis siguiendo la estrategia de minimizar la resolución, se puede optar por:

- *Utilizar una fase estacionaria más selectiva o aplicar columnas acopladas:* se puede lograr una ganancia significativa pero el proceso de selección de la fase estacionaria puede ser tedioso.
- *Utilizar CG bidimensional:* los picos sin resolver pueden ser transferidos a una segunda columna para una completa separación en una fase estacionaria diferente. Se pueden conseguir grandes ganancias en el tiempo de análisis pero se requiere de una instrumentación mucho más compleja.

Desarrollo de un método que reduzca el tiempo de análisis a una resolución constante

Las dos opciones que permiten la estrategia de reducción del tiempo de análisis a una resolución constante son:

- *Reducir el diámetro interno de columna:* la ganancia en el tiempo de análisis es proporcional a la reducción del diámetro interno en el caso de trabajar a altas presiones; y elevada al cuadrado en el caso de trabajar a bajas presiones.
- *Utilizar hidrógeno como gas portador:* se obtiene una ganancia del 40- 60% versus helio y del 100% versus nitrógeno. Requiere de precauciones de seguridad específicas para evitar riesgo de explosiones por fugas.

4.4.1.3. Limitaciones instrumentales para un análisis de cromatografía de gases rápida

Algunas de las opciones indicadas en las estrategias descritas para reducir el tiempo de análisis de una separación cromatográfica, pueden llevarse a cabo de forma simultánea. De este modo, el proceso de optimización se convierte en un complejo juego entre diferentes parámetros en el que se ha de llegar a un ajustado compromiso entre velocidad, capacidad de muestra y resolución (Klee y Blumberg, 2002). La habilidad para optimizar la separación cromatográfica viene pues restringida por diferentes limitaciones instrumentales, entre las que destacan:

- *Elección del gas portador:* se ha demostrado que la velocidad de un análisis cromatográfico es proporcional a la difusividad molecular del soluto en el gas portador (Blumberg y Kee, 2001; Matisová y Dömötörova, 2003). En base a esta afirmación, el hidrógeno es considerado el mejor gas portador para análisis rápidos debido a sus elevados valores de coeficientes de difusión binaria (Cramer et al., 1999). La principal limitación del uso de hidrógeno se debe al posible riesgo de explosiones por fugas. Afortunadamente este riesgo es muy bajo, debido a que el flujo es de pocos mL/min y la difusión de H₂ es rápida. Situaciones críticas sólo pueden ocurrir si la fuga es considerable. De todos modos, los cromatógrafos modernos disponen de un sistema ahorrador de gas (conocido como “*gas-saver mode*”) que actúa como sistema de seguridad cerrando el paso de gas portador en el caso de una disminución inesperada de presión. Por otra parte, también se puede disponer de generadores de H₂ para evitar su almacenamiento y riesgos de manipulación (Sandra et al., 2002; Cochran et al., 2002). Todas estas ventajas han permitido que muchos métodos destinados a análisis de rutina se hayan desarrollado utilizando H₂ como gas portador (David y David, 1999; Korytár et al., 2002; Mondello et al., 2004¹; Mondello et al., 2004²; Tranchida et al., 2006).
- *Uso de reguladores de presión:* La presión puede suponer uno de los factores limitantes para la aplicación de métodos basados en la cromatografía rápida. Así, el uso de columnas cortas está limitado por un mínimo de presión en cabeza de columna requerido para que el sistema del gas portador pueda operar de forma estable. Por otro lado, el uso de columnas largas y de poro estrecho necesita en muchos casos de elevadas presiones. Los actuales cromatógrafos están equipados con unidades de control electrónico de la presión (EPC; *electronic pressure/ flow control units*) superiores a 10-12 bares. Estos valores de presión son compatibles con la mayoría de las columnas de poro estrecho disponibles en el mercado. Las unidades EPC permiten un cambio continuo de presión en cabeza de columna con los modos de flujo constante (también utilizando programa de temperatura) y flujo programado (de importancia en el caso de compuestos lábiles).
- *Sistemas de inyección:* La inyección es la etapa más crítica en CG-rápida. Para evitar el ensanchamiento de banda, el sistema de inyección ha de satisfacer el ancho de banda requerido a la entrada de columna. La forma más simple para lograr un ancho de banda inicial estrecho consiste en utilizar elevados flujos de split (van Es et al., 1992). El inconveniente de las técnicas de split son los pobres límites de detección (LOD) que se pueden obtener. La inyección splitless requiere del uso de un glass-liner con un diámetro interno pequeño para obtener tiempos de splitless aceptables a los bajos flujos de columnas de poro estrecho (Van Ysacker et al.,

- 1984). Este último es el sistema de inyección más utilizado en los análisis de trazas medioambientales (Williams et al., 1999; Reed et al., 1999; Veriotti y Sacks, 2001).
- *Elección de la columna:* El uso de columnas con un diámetro interno pequeño es la opción más lógica para el análisis por GC-rápida (Korytár et al., 2002). Aún así, su uso no está exento de problemas. La inyección en columnas de poro estrecho es crítica y los volúmenes muertos tienen que mantenerse en un mínimo. Incluso el más pequeño volumen muerto puede resultar en una significativa cola de pico debido al bajo flujo al que trabajan las columnas de poro estrecho. Otra limitación de estas columnas es su baja capacidad y problemas con el LOD. Cabría esperar que en los métodos por CG-rápida los LOD mejorasen debido a que los analitos eluyen en forma de picos más altos y estrechos. Sin embargo, a menudo el volumen de inyección tiene que ser reducido para mantener una anchura de banda de inyección a niveles aceptables. En la actualidad, las columnas de 50 - 200 μm de i.d. son ampliamente utilizadas (Chen et al., 1998; David et al., 1999; Korytár et al., 2002) en gran número de aplicaciones ofreciendo un adecuado compromiso entre tiempo de análisis y compatibilidad del instrumento.
 - *Velocidad de calentamiento del horno:* Los programas de temperatura rápidos son una opción atractiva para aumentar la velocidad de separación en muestras que contienen un número limitado de picos en un amplio rango de puntos de ebullición (Matisová y Dömötörova, 2003). Por lo tanto, la máxima velocidad de calentamiento alcanzable del horno, así como el tiempo de enfriamiento del mismo, son parámetros a tener en cuenta en CG-rápida. Como ambos dependen de las dimensiones del mismo, la reducción del tamaño del horno supone una mayor rampa de temperaturas. Las últimas generaciones de hornos de los cromatógrafos de gases permiten rangos de temperatura entre 50-100 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
 - *Velocidad de adquisición de datos:* Con respecto a la CG convencional, en CG rápida, un mayor número de picos son generados por unidad de tiempo. Esto implica que el ensanchamiento de pico causado por el detector debe ser lo suficientemente pequeño como para preservar la eficiencia de la columna. Así mismo, la frecuencia de muestreo del detector debe ser lo suficientemente grande como para proveer del orden de 15-20 puntos de datos por pico para una representación del pico más precisa (Dyson, 1999). Para picos con un ancho a línea base de 0.1 s, esto se traduce en frecuencias del orden de 50 Hz (Mondello et al., 2004¹). Los detectores más utilizados en CG-rápida son el detector de FID y el TCD (Matisová y Dömötörova, 2003).

IV. PARTE EXPERIMENTAL

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de cumplir los objetivos de esta tesis se planteó un diseño experimental basado en los siguientes cinco grupos:

- I. **METODOLOGÍA ANALÍTICA:** Puesta a punto de la metodología necesaria para la determinación cualitativa y cuantitativa del perfil de ácidos grasos en diversas muestras biológicas
- II. **CUMPLIMIENTO DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRANEA:** Evaluación del patrón de Dieta Mediterránea actual en una muestra representativa de la población catalana
- III. **COMPONENTES LIPÍDICOS PRINCIPALES DE LA DIETA MEDITERRÁNEA:**
 - III.a. **ACEITE DE OLIVA:** Evaluación del efecto del componente lipídico principal de la dieta mediterránea, el aceite de oliva, en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular
 - III.b. **PESCADO:** Evaluación del efecto del consumo de pescado en el perfil lipídico de una muestra de población europea mediterránea como es la población de Catalunya
- IV. **INCIDENCIA DE LOS PRINCIPALES ISÓMEROS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS Y DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN EL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA:** Evaluación en una muestra representativa de la población mediterránea catalana del perfil de algunos ácidos grasos considerados propios de los patrones alimentarios occidentales
- V. **ÁCIDOS GRASOS Y PATOLOGÍAS:** Estudio de la relación del perfil plasmático de ácidos grasos, los factores de riesgo cardiovascular clásicos y diferentes patologías en relación al estado nutricional en una muestra representativa de la población catalana actual

Para cumplir con el **apartado I** se desarrollaron y validaron tres métodos mediante la técnica de CG-FID en muestras de plasma y eritrócitos humanos, para la determinación del perfil de ácidos grasos totales, de fosfolípidos y de los principales isómeros del ácido linoleico conjugado (*Publicaciones 1, 2, 3*). Estos nuevos métodos se aplicaron en los apartados posteriores del diseño experimental.

Para llevar a cabo el **apartado II** se estudió una muestra representativa de la población catalana (n = 516; n = 621) participante en las Encuestas de Salud y Alimentación Catalanas 2002-2003, en donde se identificaron los alimentos que contribuyen en mayor medida al perfil lipídico de la dieta de esta población mediterránea (*Publicación 4*) y en donde se evaluó el grado de cumplimiento tanto de los actuales objetivos nutricionales nacionales y europeos (*Publicación 5*), como del patrón de “*Dieta Mediterránea Tradicional*” a través del Índice de Calidad de la Dieta Mediterránea (*Publicación 6*).

El **apartado III** se centró en el estudio de los dos principales grupos de alimentos que, desde un punto de vista del perfil de ácidos grasos, sobresalen en la Dieta Mediterránea, y que son el aceite de oliva y el pescado:

- El efecto del consumo de aceite de oliva se estudió en el contexto de la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular, gracias un estudio de intervención multicéntrico, que se llevó a cabo en una muestra de varones sanos (n = 160) de 5 poblaciones europeas (Finlandia, Dinamarca y Alemania, Italia, España) con diferentes hábitos alimentarios en el marco del proyecto europeo EUROLIVE (*Publicación 7*).
- El efecto del consumo de pescado se estudió a través del aporte dietario de AGPI-CL de la serie n-3 en una muestra representativa (n = 516) de una población europea del Mediterráneo como es la población catalana (*Publicación 8*).

Debido a la proliferación durante la última década de estilos de vida no saludables en las sociedades industrializadas, caracterizados por “patrones alimentarios occidentales”, sedentarismo, obesidad y estrés entre otros factores, el **apartado IV** se diseñó para evaluar el nivel actual de los principales isómeros *trans* de los ácidos grasos plasmáticos y del ácido linoleico conjugado en una muestra (n = 208) de la población mediterránea catalana (*Publicación 9*).

Finalmente, para llevar a cabo el **apartado V** se analizó el perfil plasmático de ácidos grasos y el estatus nutricional de 710 individuos participantes en las Encuestas de Salud y Alimentación Catalanas 2002-2003, evaluando el grado de incidencia del síndrome metabólico, los factores de riesgo cardiovascular clásicos y las principales patologías de la población mediterránea en estudio (*Publicación 10*).

2. PUBLICACIONES

2.1. METODOLOGÍA ANALÍTICA

2.1.1. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination

Título: Comparación de la cromatografía de gases convencional y rápida en la determinación de ácidos grasos en plasma humano

Autores: Isabel Bondia-Pons, Ana I. Castellote, M.Carmen López-Sabater

Año: 2004

Revista: Journal of Chromatography B

Volumen: 809

Páginas: 339-344

Resumen:

La cromatografía de gases rápida ha sido aplicada con éxito principalmente en el análisis de aceites esenciales, fármacos, alimentos y pesticidas. Sin embargo, hasta el presente estudio, no se conocía su aplicación en la determinación de ácidos grasos en muestras biológicas. Así pues, el objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un nuevo método de análisis de ácidos grasos en plasma humano utilizando la técnica de GC-rápida. El nuevo método fue validado y comparado con su método análogo por GC-convencional.

El método por GC-rápida redujo significativamente el tiempo de análisis en un factor de 5, permitiendo identificar y cuantificar 30 ácidos grasos en un tiempo total de 3.2 min., manteniendo una resolución similar a la obtenida mediante el método por GC-convencional. Su excelente reproducibilidad, tanto de datos cualitativos (tiempos de retención; 0.010 a 0.040 %; R.S.D.), como de datos cuantitativos (concentración de ácido graso; 0.31 a 4.46 %; R.S.D.) permiten la aplicación del nuevo método en análisis de rutina. Al igual que el método por GC-convencional, el nuevo método presentaba límites de detección y cuantificación en el rango de los nanogramos y factores de respuesta similares para los ácidos grasos.

Los resultados demostraron que las condiciones de GC-rápida aplicadas a la determinación de AG en plasma humano permiten reducir considerablemente el tiempo de los análisis sin afectar su calidad analítica. El nuevo método es, a su vez, útil para su aplicación en estudios clínicos en los que se requiera de una preparación simultánea de un número elevado de muestras a analizar.

Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination[☆]

Isabel Bondia-Pons, Ana I. Castellote, M. Carmen López-Sabater*

Departament de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n 08028, Barcelona, Spain

Received 22 March 2004; received in revised form 1 July 2004; accepted 5 July 2004

Available online 31 July 2004

Abstract

A fast gas chromatographic technique for the determination of fatty acids in human plasma was developed. Its validation and comparison to a conventional method are here reported. The fast method significantly reduced the time required for analysis by a factor of 5 (total time of 3.2 min) while maintaining a similar resolution. Reproducibility of qualitative and quantitative data was measured in both applications. The results demonstrated that the applied fast gas chromatography (GC) conditions do not affect the analytical quality of the assays, allowing a short analysis time.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keyword: Fatty acids

1. Introduction

The determination of fatty acids in human plasma by gas chromatography (GC) has become a useful and routine tool to understand the importance of dietary fat for human health [1].

Since the first GC application on human fatty acids, published by the end of the 1950s [2], numerous and diverse biomedical and nutritional studies have been designed to evaluate the effects of these fat biomarkers on nutritional status and to establish their relationships with some major pathologies such as cardiovascular diseases [3–7].

Plasma fatty acid content varies depending on the quality and quantity of fat in the habitual diet, the cholesterol level, the degree of fat replacement and the time period between measurements, among other factors.

The high sample throughput, that characterises this kind of population study, increases the need for a significant reduction in analysis time. Nowadays this reduction is possible thanks to instrumental developments in narrow-bore fast GC. In practical terms, this implies the use of high inlet pressures, accurate split flow control, fast oven heating rates and fast electronics [8]. This type of approach allows several replicate analyses of a sample in the same time as a single conventional GC separation.

The development of a fast GC method requires careful optimization of the experimental conditions. The fast GC method has already been proved to be successful in the field of essential oils [8,9], PCB mixtures [8,10,11], drugs and pesticides [10,12]. Excellent fast GC separations have also been obtained on fatty acid methyl esters (FAME) in complex matrices such as natural fats [13,14]. But, as far as the authors know, the fast GC determination of fatty acids in biological samples, such as plasma, has not yet been reported.

Until now, research in the field of fatty acids analysis has focussed on the optimization of the sample preparation steps, which basically consist in lipid extraction, fractionation and final derivatization normally into their corresponding fatty acid methyl esters [1,15].

[☆] Presented at the 3rd Meeting of the Spanish Association of Chromatography and Related Techniques and the European Workshop: 3rd Waste Water Cluster, Aguadulce (Almeria), 19–21 November 2003.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024 512; fax: +34 93 4035 931.

E-mail address: mclopez@ub.edu (M.C. López-Sabater).

The work presented here aims to compare conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. All other analytical steps, in the current methodology, were previously optimized.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

Boron trifluoride in methanol (20% w/v), *n*-hexane, sodium chloride and anhydrous sodium sulphate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); sodium methylate from Fluka (Buchs, Switzerland) and dry methanol from Panreac (Barcelona, Spain).

Supelco™ 37 Component Fatty Acid Methyl Esters Mix and Menhaden Oil, used for peak identification; and tridecanoic acid (C_{13:0}), used as the internal standard (IS), were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Stock standard solutions were prepared by dissolving fatty acid methyl esters standards in *n*-hexane and were stored at 4 °C until usage.

Human plasma used for the validation of the fast GC method was also purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other human plasma samples were kindly obtained from a clinical nutritional study.

2.2. Sample preparation

Plasma samples used for fatty acid analyses were stored at –80 °C, prior to analysis. One hundred microliters plasma samples were saponified in PTFE screw-capped Pyrex tubes containing 20 µg of the IS, by adding 1 ml of sodium methylate (0.5% w/v) and heating to 100 °C for 15 min. After cooling to 25 °C, samples were esterified with 1 ml of boron trifluoride-methanol reagent (also at 100 °C) for 15 min. Once the tubes were cooled, FAME were isolated by adding 500 µL of *n*-hexane. After shaking for 1 min, 1 mL of a saturated sodium chloride solution was added. Finally, the tubes were centrifuged for 8 min at 2200 × *g*. After drying with anhydrous sodium sulphate, the clear *n*-hexane top layer was transferred into an automatic injector vial equipped with a volume adapter of 300 µL.

2.3. Gas chromatography conditions

2.3.1. Conventional GC

Conventional GC analyses were performed on HP-6890 Series GC System (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany), equipped with a flame ionization detector (FID) and a HP-6890 Series Injector. Separation of FAME was carried out on a fused-silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.), coated with SP-2330 non-bonded stationary phase (poly (80% biscyanopropyl–20% cyanopropylphenyl) siloxane, 0.20 µm film thickness) from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Operating conditions were as follows: the split–splitless injector was used in split mode with a split ratio of 1:30. The injection volume of the sample was 1 µL. The injector and detector temperatures were kept at 250 °C and 270 °C respectively. The temperature program was as follows: initial temperature 160 °C, increased at 5 °C/min to 250 °C and held at this temperature for 3 min (total run time: 21 min). Helium was used as the carrier gas, with a linear velocity of 22.5 cm/s (average at 160 °C). Pressure: 100 kPa; detector gas flows: H₂: 30 ml/min; air: 350 ml/min; make-up Gas (N₂): 30 ml/min. Sampling frequency: 20 Hz. Data acquisition and processing were performed with an HP-Chemstation software for GC systems.

2.3.2. Fast GC

Fast GC analyses were performed on a Shimadzu GC-2010 Gas Chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector and a Shimadzu AOC-20i Autoinjector. Separation of FAME was carried out on a capillary column (10 m × 0.10 mm i.d.), coated with a SGE-BPX70 cross-linked stationary phase (70% cyanopropyl Polysilphenylene-siloxane, 0.20 µm film thickness) from SGE (SGE Europe Ltd., United Kingdom).

Operating conditions were as follows: the split–splitless injector was used in split mode with a split ratio of 1:100. The injection volume of the sample was 1 µL. The injector and detector temperatures were kept at 250 °C and 270 °C respectively. The temperature program was as follows: initial temperature 150 °C, increased at 25 °C/min until 250 °C (total run time: 4 min). Helium was used as the carrier gas, with a linear velocity of 59.4 cm/s (average at 150 °C). Pressure: 560.5 kPa; detector gas flows: H₂: 50 ml/min; air: 400 ml/min; make-up Gas (N₂): 50 ml/min. Sampling frequency: 50 Hz. Data acquisition and processing were performed with a Shimadzu-Chemstation software for GC systems.

2.4. Identification and quantification

The identities of sample methyl ester peaks were determined by comparison of their relative retention times with those of well-known FAME standards. Quantification was accomplished by standard normalisation.

2.5. Validation of fast GC method

Intra-assay and inter-assay precision, limit of detection and limit of quantification were the parameters determined for the validation of the fast GC method.

Intra-assay precision was assessed by the coefficient of variation relative to 10 replicates of the commercial human plasma under the same experimental conditions and carried out by the same operator. The inter-assay precision was also assessed by the relative coefficient of variation, which in this case, was determined by analysing 10 aliquots of plasma by two operators in successive days during 2 months. Triplicate determinations were performed for each aliquot.

The FAME absolute response factors (RF) were determined with a quantitative mixture of C_{10:0}–C_{22:1} (10 mg/ml in methylene chloride; Supelco (Bellefonte, PA, USA)). RF for each fatty acid methyl ester was calculated as $RF_i = (W_i \times \sum A) / (A_i \times \sum W)$ where W_i is the amount of the FAME weighed in the mixture and A_i is the measured area.

The detection and quantification limits were obtained following the USP criteria [16]. The magnitude of analytical background response was measured by analysing 10 blank samples and calculating the standard deviation of this response. The standard deviation multiplied by a factor of 3 (detection limit) or 10 (quantification limit) provided an estimate of the limit of detection and limit of quantification respectively.

2.6. Statistical analysis

All data are mean values \pm standard deviation; each sample was analysed in triplicate. Results were processed with the SPSS 11.5 statistical package (SPSS, Chicago, IL). The

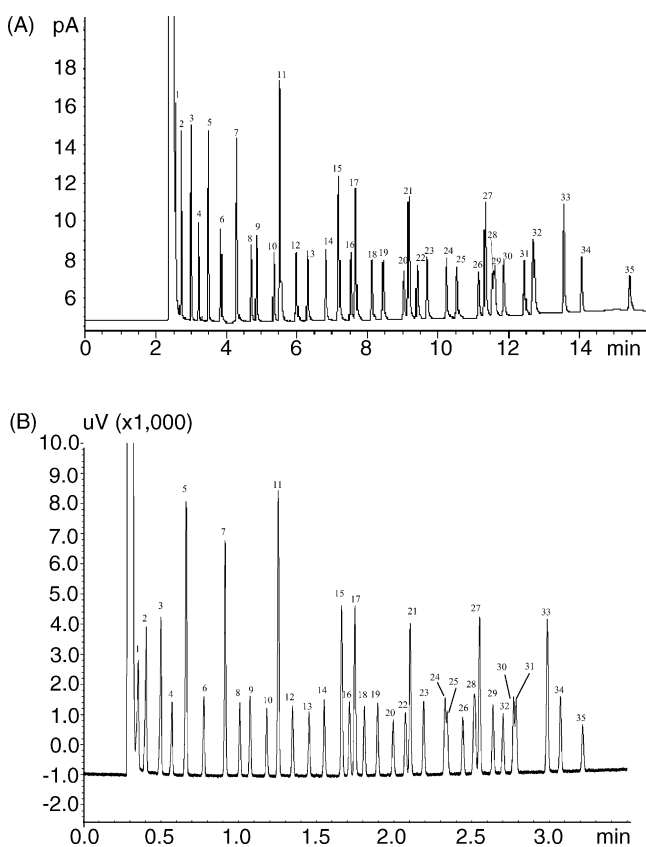


Fig. 1. (A) Conventional GC chromatogram and (B) fast GC chromatogram of a FAME37 mixture. For experimental conditions see Section 2.3. Peak identification: (1) C_{6:0}; (2) C_{8:0}; (3) C_{10:0}; (4) C_{11:0}; (5) C_{12:0}; (6) C_{13:0}; (7) C_{14:0}; (8) C_{14:1}; (9) C_{15:0}; (10) C_{15:1}; (11) C_{16:0}; (12) C_{16:1 n-7}; (13) C_{17:0}; (14) C_{17:1}; (15) C_{18:0}; (16) C_{18:1 (n-9)trans}; (17) C_{18:1 (n-9)cis}; (18) C_{18:2 (n-6)trans}; (19) C_{18:2 (n-6)cis}; (20) C_{18:3 n-6}; (21) C_{20:0}; (22) C_{18:3 n-3}; (23) C_{20:1 n-9}; (24) C_{21:0}; (25) C_{20:2 n-6}; (26) C_{20:3 n-6}; (27) C_{22:0}; (28) C_{20:4 n-6}; (29) C_{22:1 n-9}; (30) C_{22:2 n-6}; (31) C_{23:0}; (32) C_{20:5 n-3}; (33) C_{24:0}; (34) C_{24:1 n-9}; (35) C_{22:6 n-3}.

statistical analysis included the Student's test for differences between groups.

3. Results and discussion

Conventional separation of human plasma fatty acid methyl esters was obtained using a standard column (SP-2330 30 m \times 0.25 mm \times 0.20 μ m). Fast CG analysis was performed with a SGE-BPX70 (10 m \times 0.10 mm \times 0.20 μ m) narrow-bore column.

In order to choose the appropriate operational parameters, the demands of present-day nutritional trials were considered. Nowadays, technological advances enable the study of specific relative to minor fatty acids in lipids, that represent even less than 1% of the total fatty acid profile [1]. This fact, summed to the concept that the greater the stationary phase selectivity, the faster the analysis can be performed, is the reason why a SGE-BPX70 stationary phase (see Section 2) was chosen. It allows geometric and positional FAME isomers separation, and maintains a high thermal stability due to its modified silphenylene siloxane backbone in contrast with other polar columns in use.

According to Klee and Blumberg [17], any fully optimized chromatographic method is a tuned compromise between speed, sample capacity, and resolution. The limited sample capacity is one of the major drawbacks of fast GC techniques [14], which can cause the lack of detection of minor quan-

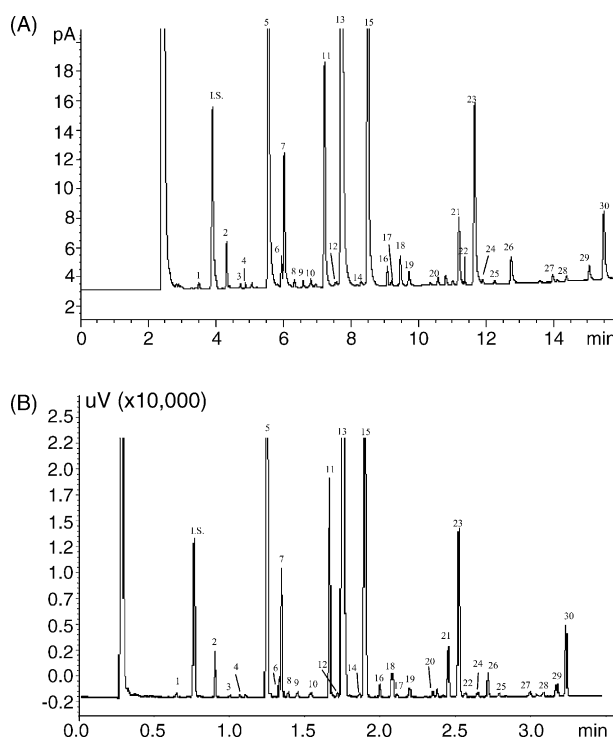


Fig. 2. (A) Conventional GC chromatogram and (B) fast GC chromatogram of a human plasma sample. For experimental conditions see Section 2.3. See Table 1 for peak identification.

Table 1

Peak identification, average retention times (min) and relative standard deviation values relative to conventional and fast GC analyses on plasma FAME

	FAME	Conventional GC		Fast GC	
		t_R	R.S.D. (%)	t_R	R.S.D. (%)
1	C _{12:0}	3.487	0.129	0.662	0.040
2	C _{14:0}	4.297	0.130	0.914	0.040
3	C _{14:1}	4.621	0.124	1.008	0.040
4	C _{15:0}	4.813	0.131	1.074	0.040
5	C _{16:0}	5.526	0.126	1.256	0.060
6	C _{16:1 n-9}	5.990	0.117	1.348	0.040
7	C _{16:1 n-7}	6.023	0.120	1.353	0.010
8	C _{16:2 n-4}	6.381	0.114	1.507	0.050
9	C _{16:3 n-4}	6.604	0.110	1.609	0.039
10	C _{16:4 n-1}	6.824	0.124	1.636	0.030
11	C _{18:0}	7.181	0.111	1.664	0.038
12	C _{18:1 (n-9)trans}	7.555	0.114	1.714	0.030
13	C _{18:1 (n-9)cis}	7.666	0.110	1.749	0.048
14	C _{18:2 (n-6)trans}	8.152	0.106	1.810	0.040
15	C _{18:2 (n-6)cis}	8.452	0.104	1.895	0.030
16	C _{18:3 n-6}	9.033	0.094	1.995	0.039
17	C _{20:0}	9.075	0.088	2.104	0.040
18	C _{18:3 n-3}	9.417	0.110	2.074	0.030
19	C _{20:1 n-9}	9.685	0.200	2.191	0.020
20	C _{20:2 n-6}	10.539	0.099	2.343	0.029
21	C _{20:3 n-6}	11.150	0.080	2.444	0.030
22	C _{22:0}	11.498	0.081	2.551	0.038
23	C _{20:4 n-6}	11.610	0.099	2.518	0.030
24	C _{22:1 n-9}	11.901	0.100	2.637	0.020
25	C _{22:2}	12.001	0.107	2.717	0.065
26	C _{20:5 n-3}	12.698	0.171	2.702	0.029
27	C _{24:0}	13.924	0.069	2.987	0.038
28	C _{22:4 n-6}	14.332	0.080	3.100	0.088
29	C _{22:5 n-3}	15.000	0.063	3.157	0.028
30	C _{22:6 n-3}	15.432	0.065	3.215	0.038

$n = 10$.

tity peaks. For this reason, the risk of band broadening, due to column overloading, was solved with a highly controlled split flow, by increasing the split ratio to 1:100 respect to the 1:30 ratio for the conventional GC approach.

Fig. 1A–B shows the chromatograms of conventional and fast FAME GC analysis for a commercial mixture of 37 fatty acids. A significant reduction in the analysis time was observed in the rapid application. The fatty acids analysed differ not only in chain length but also in the position of double bonds. The analysis with a conventional GC column took about 16 min, while the fast analysis allowed the separation of the same components in about 3.2 min with a similar resolution. Therefore, the fast GC technique performs the same separation with a significant speed gain of a factor of 5.

Also to be emphasised is the different elution order relative to a series of compounds on both columns. Three peak inversions were observed for the following analyte pairs: C_{20:0} and C_{18:3 n-3}; C_{22:0} and C_{20:4 n-6} and C_{22:2} and C_{20:5 n-3}.

As it can be observed in Fig. 1B, the fast GC application does neither achieve the total separation of C_{21:0} and C_{20:2} FAME nor of C_{23:0} and C_{22:2} FAME, whereas the same compounds separate with a good resolution in the conventional

Table 2

Intra-assay precision values

	FAME	Conventional GC		Fast GC	
		FAME (%)	R.S.D. (%)	FAME (%)	R.S.D. (%)
1	C _{12:0}	0.12	3.76	0.11	3.84
2	C _{14:0}	1.57	0.89	1.55	2.36
3	C _{14:1}	0.10	3.10	0.11	3.35
4	C _{15:0}	0.09	2.29	0.10	3.21
5	C _{16:0}	22.10	0.50	22.13	0.61
6	C _{16:1 n-9}	0.41	2.34	0.42	2.31
7	C _{16:1 n-7}	3.25	1.74	3.20	1.33
8	C _{16:2 n-4}	0.12	3.01	0.11	3.35
9	C _{16:3 n-4}	0.12	2.89	0.12	3.31
10	C _{16:4 n-1}	0.44	3.34	0.45	2.85
11	C _{18:0}	7.28	0.38	7.30	1.12
12	C _{18:1 (n-9)trans}	0.11	2.63	0.10	2.45
13	C _{18:1 (n-9)cis}	21.30	0.35	21.34	1.02
14	C _{18:2 (n-6)trans}	0.15	4.36	0.13	4.15
15	C _{18:2 (n-6)cis}	29.50	0.38	29.60	0.65
16	C _{18:3 n-6}	0.36	2.02	0.32	2.29
17	C _{20:0}	0.19	4.08	0.17	4.19
18	C _{18:3 n-3}	0.50	3.53	0.52	3.22
19	C _{20:1 n-9}	0.26	3.50	0.24	3.92
20	C _{20:2 n-6}	0.19	1.85	0.19	3.98
21	C _{20:3 n-6}	1.75	0.55	1.77	2.23
22	C _{22:0}	0.05	4.46	0.05	4.10
23	C _{20:4 n-6}	6.41	0.31	6.38	1.72
24	C _{22:1 n-9}	0.10	3.51	0.10	3.68
25	C _{22:2}	0.10	4.16	0.10	4.40
26	C _{20:5 n-3}	0.48	0.65	0.45	1.02
27	C _{24:0}	0.18	3.25	0.17	4.21
28	C _{22:4 n-6}	0.15	3.18	0.14	3.95
29	C _{22:5 n-3}	0.31	2.80	0.30	3.37
30	C _{22:6 n-3}	2.31	0.51	2.33	1.28

Average fatty acid methyl ester content in plasma samples and relative standard deviation values. $n = 10$.

application. This overlapping is irrelevant in human plasma samples due to their absence in C_{21:0} and C_{23:0}.

Once all fatty acid methyl esters were separated and identified, the same analytical conditions were applied to validate the fast GC method with human plasma matrices.

Conventional and fast GC chromatograms relative to FAME contained in the same human plasma sample are shown in Fig. 2A–B. Thirty peaks were identified in both chromatograms. As observed, the human plasma sample presented important differences in the relative abundance of their fatty acids. The five major compounds, in the range of 29.9% to 6.4% relative FAME content, were linoleic (C_{18:2 (n-6)cis}), oleic (C_{18:1 (n-9)cis}), palmitic (C_{16:0}), stearic (C_{18:0}) and arachidonic acid (C_{20:4 n-6}). Both chromatograms showed a very similar resolution and no overlapping of critical peaks occurred. Peak shapes and symmetry were also satisfactory in both applications.

For routine analyses, qualitative data (retention time values) and quantitative data (relative sample composition) should remain constant. Table 1 reports the qualitative results obtained with both columns, showing the average retention times. It is worth noting the significantly lower relative standard deviation values observed for the fast GC analysis

Table 3
Inter-assay precision values

	FAME	Fast GC	
		FAME (%)	R.S.D. (%)
1	C _{12:0}	0.12	4.01
2	C _{14:0}	1.60	2.48
3	C _{14:1}	0.10	3.71
4	C _{15:0}	0.11	3.91
5	C _{16:0}	22.34	1.61
6	C _{16:1 n-9}	0.39	3.31
7	C _{16:1 n-7}	3.20	2.33
8	C _{16:2 n-4}	0.13	3.85
9	C _{16:3 n-4}	0.10	3.62
10	C _{16:4 n-1}	0.48	3.02
11	C _{18:0}	7.10	1.25
12	C _{18:1 (n-9)trans}	0.10	3.99
13	C _{18:1 (n-9)cis}	21.08	1.75
14	C _{18:2 (n-6)trans}	0.12	4.65
15	C _{18:2 (n-6)cis}	29.92	1.00
16	C _{18:3 n-6}	0.30	2.99
17	C _{20:0}	0.14	4.55
18	C _{18:3 n-3}	0.49	3.99
19	C _{20:1 n-9}	0.26	4.02
20	C _{20:2 n-6}	0.18	4.17
21	C _{20:3 n-6}	1.74	2.85
22	C _{22:0}	0.07	4.50
23	C _{20:4 n-6}	6.35	1.95
24	C _{22:1 n-9}	0.10	3.98
25	C _{22:2}	0.09	4.40
26	C _{20:5 n-3}	0.40	1.62
27	C _{24:0}	0.18	4.45
28	C _{22:4 n-6}	0.16	4.48
29	C _{22:5 n-3}	0.40	3.95
30	C _{22:6 n-3}	2.25	1.53

Average fatty acid methyl ester content in plasma samples and relative standard deviation values relative to the fast GC method. $n = 10$.

in comparison to the conventional application. These results agree with the relative standard deviations found by other authors using a similar fast GC approach [9].

The reproducibility of quantitative data in passing from one technique to the other is shown in Table 2. The reported information regards relative average FAME content and relative standard deviation for a human plasma separation. These data show good agreement between fast and conventional results, with no significant differences. The relative standard deviation values, in the range of 0.31% to 4.46% are within the limits of acceptable variability for the analyte concentrations of this kind of samples [18].

Table 3 reports the inter-assay precision for the fast GC method, which has proven to be robust. Some minor peaks (<1% relative quantity) were those with the highest relative standard deviation values, but all values were always lower than 5%.

The values of absolute response factors for a quantitative mixture of C_{10:0}–C_{22:1 n-9} fatty acid methyl esters can be seen in Table 4. As observed, data show good agreement between fast and conventional results, giving all compounds a similar response.

Table 4
Absolute response factors (RF) of the quantitative mixture of FAME for the conventional GC method and the fast GC method

FAME	Conventional GC, RF	Fast GC, RF
C _{10:0}	1.11	1.18
C _{12:0}	1.05	1.09
C _{13:0}	1.02	1.13
C _{14:0}	1.00	1.07
C _{14:1 (n-9)cis}	1.00	1.19
C _{15:0}	1.06	0.95
C _{16:0}	1.12	1.14
C _{16:1 (n-9)cis}	0.93	1.00
C _{17:0}	1.28	1.23
C _{18:0}	1.13	1.04
C _{18:1 (n-9)trans}	0.96	0.91
C _{18:1 (n-9)cis}	0.91	0.91
C _{18:2 (n-6)cis}	0.93	0.94
C _{20:0}	1.18	1.18
C _{20:1}	0.90	1.05
C _{18:3 n-3}	0.92	0.96
C _{22:0}	1.12	1.10
C _{22:1 n-9}	0.89	1.00

Table 5
Detection (DL) and (QL) quantification limits (QL) for the conventional GC and the fast GC method

FAME	Conventional GC		Fast GC	
	DL (ng)	QL (ng)	DL (ng)	QL (ng)
C _{10:0}	4.0	16.0	3.8	12.6
C _{12:0}	3.8	15.2	3.6	12.1
C _{13:0}	3.6	14.7	3.8	12.6
C _{14:0}	3.6	14.4	3.7	12.4
C _{14:1 (n-9)cis}	3.6	14.4	3.7	12.3
C _{15:0}	3.8	15.4	4.1	13.8
C _{16:0}	4.0	16.3	3.8	12.5
C _{16:1 (n-9)cis}	3.3	13.5	3.4	11.2
C _{17:0}	4.6	18.5	5.0	16.8
C _{18:0}	4.1	16.4	4.3	14.3
C _{18:1 (n-9)trans}	3.4	13.8	3.8	12.6
C _{18:1 (n-9)cis}	3.3	13.1	3.0	10.0
C _{18:2 (n-6)cis}	3.3	13.4	3.2	10.5
C _{20:0}	4.2	17.0	4.8	16.1
C _{20:1}	3.2	12.9	3.6	12.0
C _{18:3 n-3}	3.3	13.3	3.2	10.7
C _{22:0}	4.0	16.2	4.4	14.6
C _{22:1 n-9}	3.2	12.8	3.5	11.8

Detection and quantification limits values are shown in Table 5. Both methods present limits of detection and quantification in the range of nanograms (3.0–10.0 ng; 3.2–18.5 ng). These values are in concordance with those established for gas chromatography methods [19].

4. Conclusions

The analytical results achieved indicate that the fast GC method developed in the present research allows the separation of a considerable number of fatty acid methyl esters in a short time (3.2 min).

In comparison to traditional chromatography, it has been demonstrated that fast GC conditions do not affect the analytical quality of the assays. Its application to human plasma samples has been shown to be robust and reliable for quick and correct identification in routine analysis.

Furthermore, the new developed method is useful for clinical studies wherein the simultaneous preparation of a large number of samples is always required.

Acknowledgements

This study has been supported by the grant G03/140 for the Thematic Network on Nutrition and Cardiovascular Disease from FIS - "Carlos III" Health Institute, Ministry of Health of Spain. The authors are also grateful to Robin Rycroft for the manuscript correction. Special thanks are due to the Spanish Ministry of Education for their grant to I.B.P.

References

- [1] T. Seppänen-Laakso, I. Laakso, R. Hiltunen, *Anal. Chim. Acta* 465 (2002) 39.
- [2] E.C. Horning, A. Carmen, C.C. Sweeley, *Prog. Chem. Fats Other Lipids* 7 (1964) 167.
- [3] L. Arab, *J. Nutr.* 133 (2003) 925S.
- [4] R. De Caterina, A. Zampolli, *Lipids* 36 (2001) 69.
- [5] F. Pérez-Jiménez, J. López-Miranda, P. Mata, *Atherosclerosis* 163 (2002) 385.
- [6] L. Kilander, L. Berglund, M. Boberg, B. Vessby, H. Lithell, *Int. J. Epidemiol.* 30 (2001) 1119.
- [7] A. Nkondjock, B. Shatenstein, P. Maisonneuve, P. Ghadirian, *Cancer Detect Prev.* 27 (2003) 55.
- [8] F. David, D.R. Gere, F. Scanlan, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 309.
- [9] L. Mondello, A. Casilli, P.Q. Tranchida, L. Cicero, P. Dugo, G. Dugo, *J. Agric. Food Chem.* 51 (19) (2003) 5602.
- [10] E. Matisová, M. Dömötöróvá, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 199.
- [11] P. Korytár, H.G. Janssen, E. Matisová, U.A. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 558.
- [12] T. Veriotti, R. Sacks, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3045.
- [13] L. Mondello, G. Zappia, I. Bonaccorsi, P. Dugo, G. Dugo, H.M. McNair, *J. Microcolumn Sep.* 121 (1) (2000) 41.
- [14] L. Mondello, A. Casilli, P.Q. Tranchida, R. Costa, B. Chiofalo, P. Dugo, G. Dugo, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 237.
- [15] M. Rodríguez-Palmero, M.C. López-Sabater, A.I. Castellote-Bargallo, M.C. De la Torre-Boronat, M. Rivero-Urgell, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 435.
- [16] The United States Pharmacopeia (USP XXIII), Mack Printing, Easton, 1989, 1711.
- [17] M.S. Klee, L.M. Blumberg, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 234.
- [18] W. Horwitz, *Anal. Chem.* 54 (1982) 67A.
- [19] P.Sandra, K.J. Hyver (Ed.), *High Resolution Gas Chromatography*, London, 1989, p. 22 (Chapter 4).

2.1.2. Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography

Título: Determinación de ácidos grasos de fosfolípidos en muestras biológicas por extracción en fase sólida y cromatografía de gases rápida

Autores: I. Bondia-Pons, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater

Año: 2006

Revista: Journal of Chromatography A

Volumen: 1116

Páginas: 204-208

Resumen:

El análisis de ácidos grasos de fosfolípidos (PL-AG) en muestras biológicas constituye una de las determinaciones analíticas más comunes en estudios clínicos y nutricionales. El número de muestras, cada vez mayor en este tipo de estudios, incrementa la necesidad de desarrollar nuevos métodos de separación y análisis de PL-AG que supongan una reducción considerable en el tiempo total de análisis.

Con este objetivo, el presente trabajo se basó en actualizar la metodología utilizada hasta el momento para la determinación de PL-AG en muestras de eritrocitos y plasma humano. Se revisaron y actualizaron las diferentes etapas analíticas de extracción lipídica, separación por SPE con cartuchos aminopropil, y derivatización a ésteres metílicos con trifluoruro de boro/metanol, para su aplicación en muestras biológicas. La técnica de CG-rápida fue a su vez utilizada para obtener una reducción significativa en el tiempo de análisis final en comparación con los métodos actuales en uso.

De los resultados de precisión y recuperación obtenidos se llegó a la conclusión que la combinación de SPE con la cromatografía de GC-rápida, permite la separación de 25 ácidos grasos de PL en un tiempo de análisis cromatográfico de 3.8 min. Así mismo, el método actualizado resultó ser robusto y fiable para una rápida y correcta identificación en análisis de rutina de muestras biológicas.

Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography[☆]

I. Bondia-Pons, S. Morera-Pons, A.I. Castellote,
M.C. López-Sabater*

*Departament de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA) Facultat de Farmàcia,
Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona, Spain*

Received 16 January 2006; received in revised form 2 March 2006; accepted 7 March 2006
Available online 3 April 2006

Abstract

A new method for the determination of phospholipid fatty acids in biological samples, combination of solid-phase extraction (SPE) and fast gas chromatography (GC) was developed. Its application to human plasma and human erythrocytes showed to be robust and reliable for quick and correct identification in routine analysis.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phospholipids; Fatty acids; SPE; Fast-GC

1. Introduction

Essential fatty acids and their longer chain unsaturated derivatives, the LCPUFAs, are structural components of cell membrane phospholipids and as such important determinants of membrane function [1,2]. In the last years, the LCPUFAs, primarily the arachidonic acid (AA, 20:4 $n-6$) and the docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 $n-3$), have become of emergent relevance in paediatric nutrition. Their accumulation in the brain and in the retina suggests an important role of these fatty acids in the developing fetus for optimal growth and cognitive development of the newborn [3].

The high sample throughput that characterises the present clinical studies performed in this research field increases the need to find a methodology of separation and analysis of phospholipid fatty acids in biological samples (plasma and erythrocytes) with a significant reduction in the analysis time.

Conventionally, TLC has been used to provide efficient separation of plasma lipids. However, TLC is relatively slow, produces low lipid recoveries and may result in oxidation of polyunsaturated fatty acids due to prolonged exposure to air [4]. Solid-phase extraction (SPE) by column chromatography represents an alternative to TLC for isolation of plasma lipid classes, since up to 20 specimens can be processed simultaneously, compared with typically about five by TLC.

Although commercial SPE columns are available with a wide range of chemically-bonded stationary phases, it has been shown that the most suitable phases for the separation of lipid classes are the aminopropyl bonded phases [5–7].

Kaluzny et al. [5] were among the first to apply SPE cartridges packed with aminopropyl bonded phases for separating groups of lipid classes. Twenty year after its publication, this is one of the most used methods for the determination of phospholipid fatty acids in paediatric nutrition, together with the classical TLC methodology.

The work presented here aims to update the current methodology. The analytical steps in the lipid extraction, SPE separation and derivatization processes have been revised and optimised for its application in biological samples. Furthermore, the instrumental developments in narrow-bore fast GC, which have already been proved to be successful in complex matrices such as essential oils, pesticides and natural fats, were applied here to

[☆] Presented at the 11th Meeting on Instrumental Analysis, Barcelona, 15–17 November, 2005.

* Corresponding author. Tel.: +34 934024508; fax: +34 934035931.
E-mail address: mclopez@ub.edu (M.C. López-Sabater).

obtain a significant reduction in the time analysis in comparison with the methods in use.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

Sep-Pak Vac 1 mL (100 mg) aminopropyl silica cartridges were purchased from Teknokroma (Barcelona, Spain). Dichloromethane, chloroform, 2-propanol, acetic acid, diethyl ether, methanol, and *n*-hexane were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium chloride, butylated hydroxytoluene and anhydrous sodium sulphate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Boron trifluoride in methanol (14%, w/v), 1,2-dipentadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, used as the internal standard (IS), 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, used for the recovery assay, and Supelco 37 component fatty acid methyl esters mix, used for peak identification, were purchased from Sigma (St. Louis, USA).

Human plasma and human erythrocytes samples were kindly obtained from a clinical nutritional study. All samples were stored at -80°C prior to analysis.

2.2. Lipid extraction

Before lipid extraction, 40 μL internal standard solution was added to 200 μL of biological sample (plasma or erythrocytes) in PTFE screw-capped Pyrex tubes. The IS solution consisted of 40 mg 1,2-dipentadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and 40 mg butylated hydroxytoluene dissolved in 50 mL dichloromethane/methanol (2:1). 3 mL dichloromethane/methanol 2:1 (v/v) were added for the lipid extraction and protein precipitation. After shaking vigorously during 5 min, 500 μL of a saturated sodium chloride solution were added. The tubes were centrifuged for 7 min at $2200 \times g$. The aqueous phase was removed. The organic phase collected by aspiration going carefully through the interfacial protein disc. The organic phase was transferred to a conic shaped tube and dried to dryness under N_2 .

2.3. Solid-phase extraction of phospholipids

Dry lipid extracts were dissolved in $4 \times 50 \mu\text{L}$ chloroform. Aminopropyl columns (100 mg) were placed in a SPE-Vacuum manifold from Teknokroma (Barcelona, Spain) and activated under vacuum (15 kPa) with $2 \times 1 \text{ mL}$ portion of hexane and 1 mL portion of chloroform/2-propanol (2:1). The vacuum was released immediately to prevent the cartridges from becoming completely dry. Lipid extracts were applied to the cartridges under vacuum, and the chloroform was pulled through. After loading of the sample, the column was washed first with 1 mL of chloroform/2-propanol (2:1) to remove the neutral lipids, and secondly by 1 mL of 2% acetic acid in diethyl ether to remove the free fatty acids. A new collection tubes was then placed in the collecting racks. The column was then eluted with $3 \times 0.5 \text{ mL}$ methanol to collect the phospholipids fraction.

2.4. Preparation of fatty acid methyl esters

Two millilitre trifluoride-methanol reagent was directly added to the 1.5 mL phospholipids fraction obtained from SPE. The mixer was vigorously shaken for 2 min and heated to 100°C for 2 h. After cooling to 25°C , fatty acid methyl esters (FAMES) were isolated by adding 300 μL of *n*-hexane. After shaking for 2 min, 750 μL of a saturated sodium chloride solution was added. Finally, the tubes were centrifuged for 7 min at $2200 \times g$. After drying with anhydrous sodium sulphate, the clear *n*-hexane top layer was transferred into an automatic injector vial equipped with a volume adapter of 300 μL .

2.5. Fast gas chromatography conditions

Fast GC analyses were performed on a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector and a Shimadzu AOC-20i Autoinjector. Separation of FAME was carried out on a capillary column (10 m \times 0.10 mm I.D.) coated with a Varian VF-23 ms stationary phase (high cyanopropyl phase, 0.10 μm film thickness) from Varian (Palo Alto, CA, USA).

Operation conditions were as follows: the split-splitless injector was used in split mode with a split ratio of 1:20. The injection volume of the sample was 1 μL . The injector and detector temperatures were kept at 250 and 270°C , respectively. The temperature program was as follows: initial temperature: 120°C , increased at $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until 175°C (kept 0.5 min), increased at $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until 250°C . Helium was used as the carrier gas, with a linear velocity of 59.4 cm/s (average at 120°C). Pressure: 482 kPa; detector gas flows: H_2 : 50 ml/min; air: 400 ml/min; make-up gas (N_2): 50 ml/min. Sampling frequency: 50 Hz. Data acquisition and processing were performed with a Shimadzu-Chemstation software for GC systems.

2.6. Identification and quantification

The identities of sample methyl ester peaks were determined by comparison of their relative retention times with those of well-known FAME standards. Quantification was based on the amount of the internal standard recovered. The results were expressed in absolute amounts (mg/L plasma; mg/L erythrocyte) as well as in relative amounts (% total fatty acids).

2.7. Validation parameters

Intra-assay precision was assessed by the relative standard deviation (RSD) relative to 10 replicates of plasma and 10 replicates of erythrocytes under the same experimental conditions and carried out by the same operator.

Inter-assay precision was also assessed by the RSD, which in this case, was determined by analysing 10 aliquots of each biological sample by two operators in successive days during 2 months. Triplicate determinations were performed for each aliquot.

To assess the recovery of the method, 10 plasma samples were spiked with different amounts of 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-

glycero-3-phosphocholine previous to the lipid extraction. The samples were then submitted to the complete proposed procedure.

3. Results and discussion

3.1. Lipid extraction

The classical lipid extraction proposed by Folch et al. [8] for the lipid extraction of animal tissues, based in the extractor solvent chloroform/methanol 2:1 (v/v) is the most usual option found in the bibliography for biological samples such as plasma and erythrocytes. In an attempt to optimise the lipid extraction step, we reproduced the lipid extraction methodologies proposed by Kolarovic and Fournier [9]. Three extractor solvents were tested for the lipid extraction of 200 μ L plasma. One and two extraction steps were tested for each solvent mixture [dichloromethane/methanol 2:1 (v/v), *n*-butanol-water 2:1 (v/v) and hexane/isopropanol 3:2 (v/v)]. Extractions with dichloromethane/methanol 2:1 (v/v) and the hexane/isopropanol 3:2 (v/v) presented no differences in the final amount of the analysed FAME. Therefore, the extractor dichloromethane/methanol 2:1 (v/v) was finally selected due to its easier evaporation to dryness under N₂.

3.2. Solid-phase extraction of phospholipids

The isolation of the phospholipid fraction from the lipid extract was performed by solid phase extraction with aminopropyl silica cartridges. The same solvents proposed by Kaluzny et al. [5] were used, but the capacity of the cartridge was successfully reduced to 100 mg instead of the classical cartridge of 500 mg commonly used. The reduction of the solid phase capacity consequently supposed a significant saving in the final volume of solvents from 4 to 1–1.5 mL, respectively. Savings in solvent volume resulted therefore, in savings in solvent costs.

In order to avoid interferences from the commercial solid phase in the posterior determination of the fatty acid methyl esters, it was necessary to wash the cartridge with 1 mL of chloroform/2-propanol 2:1 (v/v) after its conditioning with hexane and previous to the loading of the sample.

After removal of the neutral lipids with chloroform/2-propanol (2:1), followed by the elution of the free fatty acid fraction with 2% acetic acid in diethyl ether, phospholipids were eluted in methanol. After several trials, it was shown that the elution improved if the 1.5 mL of methanol was applied in successive volumes of 0.5 mL instead of doing it at once. The final volume of 1.5 mL was established after checking that the analysis of further elutions with methanol did not show any presence of fatty acid methyl ester. Volumes inferior to 1.5 mL were also tested, but the maximal recovery of phospholipids was obtained for this fixed volume.

3.3. Derivatization to fatty acid methyl esters

Among the individual phospholipids found in human plasma, the phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl serine are those

with the highest contents in the LCPUFAs arachidonic and docosahexaenoic acids. Its esterification with boron trifluoride-methanol to their methyl fatty acid esters is relatively fast (30 min at 100 °C). However, the amide bond linking fatty acids to sphingosine-type bases is relatively difficult to split and it is usual to carry out the methanolysis of these lipids with strong alkaline or acidic conditions for long reaction times. Morrison and Smith [10] proposed a treatment of 90 min at 100 °C with boron trifluoride-methanol to attack sphingomyelins. We modified the procedure established by Morrison, prolonging the attack of the total phospholipid fatty acids to 2 h, but without need of a previous evaporation to dryness of the methanolic fraction obtained by SPE.

3.4. Fast gas chromatography analysis

After the optimisation of the analytical steps concerning to the sample preparation, the operational parameters were set up for the new fast gas chromatographic method. Its validation was then performed with human plasma and human erythrocyte samples.

Fig. 1 shows the fast GC chromatogram of a human plasma sample. Twenty-five fatty acid methyl esters were identified. They differ not only in chain length but also in the position of double bonds. It is worth noting that the analyses time was significantly short, allowing the elution of all compounds in less than 4 min. As observed, the human plasma sample presented important differences in relative abundance of their fatty acids. The five major compounds, in the range of 28.7–6.7% relative FAME content, were palmitic (C_{16:0}), linoleic (C_{18:2(n-6)cis}), stearic (C_{18:0}), oleic (C_{18:1(n-7)+(n-9)}) and arachidonic acid (C_{20:4n-6}). Two of the major drawbacks of fast GC techniques are the limited sample capacity and the column bleed. The sample capacity can cause the lack of detection of minor quantity peaks. For this reason, the risk of band broadening, due to column overloading, was here solved with a controlled split flow, which allowed the detection of minor compounds with relative abundances inferior to 0.1%. Among the actual commercial capillary columns, the

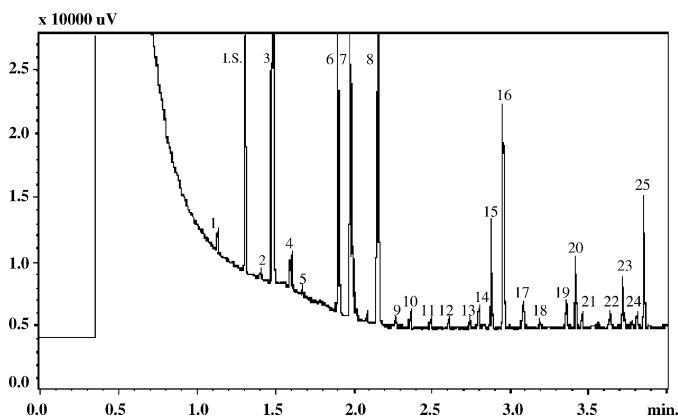


Fig. 1. Fast GC chromatogram of FAMES from phospholipid human plasma. Peak identification: (1) C_{14:0}; IS C_{15:0}; (2) C_{15:1}; (3) C_{16:0}; (4) C_{16:1}; (5) C_{17:0}; (6) C_{18:0}; (7) C_{18:1(n-7+n-9)cis}; (8) C_{18:2n-6cis}; (9) C_{18:3n-6}; (10) C_{18:3n-3}; (11) C_{20:0}; (12) C_{20:1n-9}; (13) C_{21:0}; (14) C_{20:2n-6}; (15) C_{20:3n-6}; (16) C_{20:4n-6}; (17) C_{20:3n-3}; (18) C_{22:0}; (19) C_{22:1n-9}; (20) C_{20:5n-3}; (21) C_{22:4n-6}; (22) C_{22:5n-6}; (23) C_{24:1}; (24) C_{22:5n-3}; (25) C_{22:6n-3}.

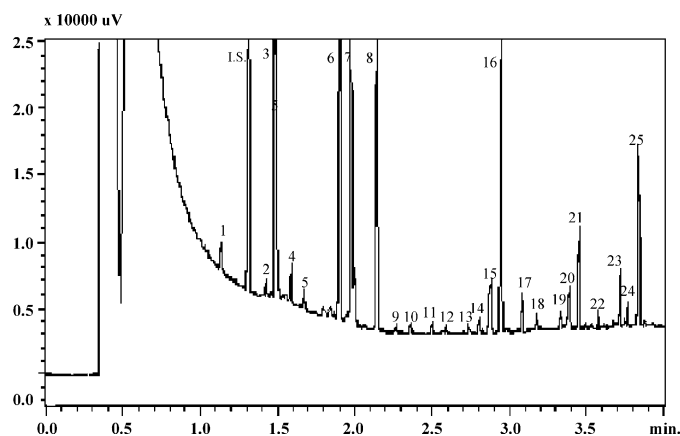


Fig. 2. Fast GC chromatogram of FAMES from phospholipid human erythrocytes. See Fig. 1 for peak identification.

high polar cyanopropyl VF-23 ms stationary phase proved to maintain a high thermal stability without bleeding effects in the range of elution of the compounds under study.

Fig. 2 shows the fast GC chromatogram of a human erythrocyte sample. The same 25 fatty acid identified in the human plasma were also found in this biological sample. In this case, the five major compounds, in the range of 28.0–13.0% relative FAME content, were palmitic ($C_{16:0}$), stearic ($C_{18:0}$), arachidonic acid ($C_{20:4n-6}$), linoleic ($C_{18:2(n-6)cis}$) and oleic ($C_{18:1(n-7)+(n-9)}$).

3.5. Validation parameters

For routine analyses, qualitative data (retention time values) and quantitative data (absolute and relative sample composition) should remain constant. Table 1 reports the qualitative results obtained with the new rapid application, showing the average retention times. The significant lower relative standard deviation values, in the range of 0.040%, agree with the relative standard deviation found in other fast GC approaches [11,12].

The reproducibility of quantitative data is confirmed by the intra-assay and inter-assay precision values for both biological samples.

Table 2 reports the intra-assay precision for human plasma samples. Results were expressed both in absolute and relative amounts of FAMES. Absolute amounts vary from 427.9 mg/L for $C_{16:0}$ to 1.4 mg/L for $C_{15:1}$. The relative standard deviation values, in the range of 1.8–6.5% for the absolute values, and in the range of 1.4–6.8% for the relative values, are within the limits of acceptable variability for the analyte concentration of this kind of samples [13].

The intra-assay precision for erythrocyte samples can be seen in Table 3. In this case the absolute amounts vary from 228.5 mg/L for $C_{16:0}$ to 0.8 mg/L for $C_{18:3n-6}$. The relative standard deviation values are very similar to those found for human plasma, ranging from 2.0 to 6.3% for the absolute values, and from 1.9 to 6.1% for the relative values.

Table 4 reports the inter-assay precision in relative amounts for both human plasma and human erythrocyte samples. The minor peaks (<0.5% relative quantity) were those with the high-

Table 1

Peak identification, average retention times (min) and relative standard deviation values relative to fast GC analyses on plasma FAMES ($n = 10$)

	FAME	t_R	RSD (%)
1	$C_{14:0}$	1.106	0.045
2	$C_{15:0}$ (IS)	1.303	0.040
3	$C_{15:1}$	1.392	0.040
4	$C_{16:0}$	1.479	0.040
5	$C_{16:1}$	1.545	0.029
6	$C_{17:0}$	1.635	0.045
7	$C_{18:0}$	1.905	0.031
8	$C_{18:1(n-7+n-9)cis}$	1.966	0.028
9	$C_{18:2n-6cis}$	2.139	0.025
10	$C_{18:3n-6}$	2.249	0.040
11	$C_{18:3n-3}$	2.352	0.040
12	$C_{20:0}$	2.522	0.038
13	$C_{20:1n-9}$	2.581	0.034
14	$C_{21:0}$	2.746	0.040
15	$C_{20:2n-6}$	2.770	0.038
16	$C_{20:3n-6}$	2.872	0.034
17	$C_{20:4n-6}$	2.942	0.029
18	$C_{20:3n-3}$	3.108	0.041
19	$C_{22:0}$	3.177	0.040
20	$C_{22:1n-9}$	3.338	0.040
21	$C_{20:5n-3}$	3.390	0.035
22	$C_{22:4n-6}$	3.483	0.037
23	$C_{22:5n-6}$	3.605	0.042
24	$C_{24:1}$	3.737	0.031
25	$C_{22:5n-3}$	3.759	0.038
26	$C_{22:6n-3}$	3.826	0.029

Table 2

Intra-assay values for plasma samples

	FAME	FAME (mg/L)	RSD (%)	FAME (%)	RSD (%)
1	$C_{14:0}$	6.0	4.44	0.45	4.71
2	$C_{15:1}$	1.4	6.52	0.12	6.29
3	$C_{16:0}$	427.9	4.12	28.70	3.98
4	$C_{16:1}$	11.7	4.89	0.79	5.08
5	$C_{17:0}$	2.2	5.75	0.15	6.01
6	$C_{18:0}$	220.0	2.15	14.21	2.09
7	$C_{18:1(n-7+n-9)cis}$	176.7	3.04	12.54	2.75
8	$C_{18:2n-6cis}$	291.9	2.85	20.24	2.46
9	$C_{18:3n-6}$	2.2	6.45	0.15	6.84
10	$C_{18:3n-3}$	4.5	5.54	0.32	5.34
11	$C_{20:0}$	3.1	5.87	0.20	5.47
12	$C_{20:1n-9}$	1.8	6.25	0.12	6.80
13	$C_{21:0}$	2.2	6.24	0.15	6.17
14	$C_{20:2n-6}$	8.8	6.01	0.64	5.91
15	$C_{20:3n-6}$	39.6	3.12	2.85	2.27
16	$C_{20:4n-6}$	95.3	1.84	6.75	1.43
17	$C_{20:3n-3}$	14.4	3.87	0.98	3.51
18	$C_{22:0}$	2.9	6.02	0.20	6.16
19	$C_{22:1n-9}$	13.2	5.12	0.90	4.75
20	$C_{20:5n-3}$	27.9	3.15	1.90	3.01
21	$C_{22:4n-6}$	6.3	4.89	0.43	4.51
22	$C_{22:5n-6}$	7.3	5.01	0.53	4.89
23	$C_{24:1}$	26.4	3.12	1.81	2.81
24	$C_{22:5n-3}$	5.1	5.11	0.35	4.89
25	$C_{22:6n-3}$	61.6	3.55	4.52	3.05

The average fatty acid methyl ester content is expressed in absolute (mg/L) and relative (%) amounts ($n = 10$).

Table 3
Intra-assay values for erythrocyte samples

		FAME (mg/L)	RSD (%)	FAME (%)	RSD (%)
1	C _{14:0}	4.0	4.89	0.50	5.01
2	C _{15:1}	2.5	6.24	0.30	6.02
3	C _{16:0}	228.5	4.51	28.00	4.21
4	C _{16:1}	11.2	5.01	1.45	4.48
5	C _{17:0}	1.6	6.01	0.20	5.89
6	C _{18:0}	122.4	2.45	15.00	2.33
7	C _{18:1(n-7+n-9)cis}	89.8	3.15	11.02	3.45
8	C _{18:2n-6cis}	106.1	3.22	12.98	2.70
9	C _{18:3n-6}	0.8	6.00	0.10	5.85
10	C _{18:3n-3}	1.2	5.74	0.15	5.12
11	C _{20:0}	0.8	6.35	0.10	5.89
12	C _{20:1n-9}	0.8	6.48	0.10	6.14
13	C _{21:0}	1.1	6.12	0.12	5.78
14	C _{20:2n-6}	3.3	6.05	0.40	5.54
15	C _{20:3n-6}	12.2	3.54	1.50	3.12
16	C _{20:4n-6}	106.1	2.01	13.00	1.87
17	C _{20:3n-3}	8.2	4.02	1.01	4.15
18	C _{22:0}	4.1	5.52	0.49	5.12
19	C _{22:1n-9}	4.0	5.85	0.50	5.71
20	C _{20:5n-3}	10.2	3.75	1.25	3.28
21	C _{22:4n-6}	24.5	3.81	2.99	3.15
22	C _{22:4n-6}	4.1	6.04	0.51	5.87
23	C _{24:1}	12.2	4.10	1.49	4.00
24	C _{22:5n-3}	4.1	5.52	0.51	5.21
25	C _{22:6n-3}	51.7	3.85	6.33	3.45

The average fatty acid methyl ester content is expressed in absolute (mg/L) and relative (%) amounts ($n = 10$).

Table 4
Inter-assay values for plasma and erythrocyte samples

		Plasma FAME (%)	RSD (%)	Erythrocytes FAME (%)	RSD (%)
1	C _{14:0}	0.43	4.96	0.48	5.25
2	C _{15:1}	0.10	6.89	0.26	7.02
3	C _{16:0}	28.50	4.12	27.55	4.55
4	C _{16:1}	0.83	5.55	1.65	5.25
5	C _{17:0}	0.16	6.45	0.21	6.22
6	C _{18:0}	14.42	2.15	14.68	2.43
7	C _{18:1(n-7+n-9)cis}	12.63	2.84	11.36	3.55
8	C _{18:2n-6cis}	20.05	2.55	13.22	2.95
9	C _{18:3n-6}	0.16	7.02	0.11	6.01
10	C _{18:3n-3}	0.31	6.01	0.14	5.74
11	C _{20:0}	0.21	6.12	0.11	6.01
12	C _{20:1n-9}	0.13	7.01	0.12	6.99
13	C _{21:0}	0.16	6.24	0.12	6.33
14	C _{20:2n-6}	0.63	6.52	0.38	6.14
15	C _{20:3n-6}	2.76	4.41	1.48	4.74
16	C _{20:4n-6}	6.88	2.01	13.32	2.25
17	C _{20:3n-3}	1.04	4.05	1.05	4.35
18	C _{22:0}	0.21	6.26	0.48	6.33
19	C _{22:1n-9}	0.92	5.10	0.50	6.12
20	C _{20:5n-3}	1.91	3.32	1.21	3.55
21	C _{22:4n-6}	0.41	4.62	2.89	4.12
22	C _{22:5n-6}	0.51	5.15	0.51	6.01
23	C _{24:1}	1.79	3.15	1.54	4.25
24	C _{22:5n-3}	0.37	5.19	0.51	5.55
25	C _{22:6n-3}	4.49	3.45	6.12	3.78

The average fatty acid methyl ester content is expressed in relative (%) amounts ($n = 10$).

Table 5

Recovery of 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine in spiked human plasma samples ($n = 10$)

Amount of PPL (C16:0) added (μ g)	Recovery mean (%)	SD (%)
10	92.3	0.4
20	97.7	0.5
40	102.5	0.4
100	102.9	0.3
150	101.9	0.4

est relative standard deviation values, but all values were lower than 8%. In reference to the major LCPUFAs, it can be seen that both AA and DHA presented low relative standard deviation values (2.0–3.8%) for both kind of samples.

The results of the recovery studies of the final method can be seen in Table 5. The results confirm the suitability of the whole method for the isolation and determination of phospholipids fatty acid methyl esters.

4. Conclusions

The analytical results achieved indicate that the combination of solid-phase extraction with the fast GC technique developed in the present research allows the separation of a considerable number of phospholipids fatty acid methyl esters in a short time (3.8 min). Its application to human plasma and human erythrocytes has been shown to be robust and reliable for quick and correct identification in routine analysis.

Acknowledgement

Special thanks are due to the Spanish Ministry of Education for their grant to I.B.P.

References

- [1] H. Vlaardingerbroek, G. Honstra, Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids 71 (2004) 367.
- [2] K.A. Youdim, A. Martin, J.A. Joseph, Int. J. Dev. Neurosci. 18 (2000) 383.
- [3] A. Ghys, E. Bakker, G. Honstra, M. van den Hout, Early Hum. Dev. 69 (2002) 83.
- [4] T.G. Bernhardt, P.A. Cannistraro, D.A. Bird, K.M. Doyle, M. Laposata, J. Chromatogr. B 675 (1996) 189.
- [5] M.A. Kaluzny, L.A. Duncan, M.V. Merrit, D.E. Epps, J. Lipid Res. 26 (1985) 135.
- [6] G. Burdge, P. Wright, A.E. Jones, S.A. Wootton, Br. J. Nutr. 84 (2000) 781.
- [7] J.J. Agren, A. Julkunen, I. Penttila, J. Lipid Res. 33 (1992) 1871.
- [8] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem. 226 (1957) 497.
- [9] L. Kolarovic, N.C. Fournier, Anal. Biochem. 156 (1986) 244.
- [10] W. Morrison, L.M. Smith, J. Lipid Res. 5 (1964) 600.
- [11] I. Bondia-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, J. Chromatogr. B 809 (2004) 339.
- [12] L. Mondello, A. Casilli, P.Q. Tranchida, L. Cicero, P. Dugo, G. Dugo, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 5602.
- [13] W. Horwitz, Anal. Chem. 54 (1982) 67A.

2.1.3. Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography

Título: Determinación de ácido linoleico conjugado en plasma humano por cromatografía de gases rápida

Autores: I. Bondia-Pons, C. Moltó, A. I. Castellote, M.C. López-Sabater

Estado: en proceso de revisión

Revista: Journal of Chromatography A

Resumen:

La determinación en plasma de los dos principales isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA), el *cis-9, trans-11 CLA* (ácido ruménico) y el *trans-10, cis-12 CLA*, interesa a la comunidad científica debido a sus potenciales efectos biológicos beneficiosos observados en estudios realizados en animales y humanos. Este interés surgió gracias a Pariza y colaboradores, que fueron los primeros en encontrar una asociación del CLA con actividad anticarcinógena en ratones. Desde entonces, diversos estudios en animales han sugerido efectos anticarcinogénicos y antiaterogénicos, así como mejora en las concentraciones de lípidos en sangre por parte del isómero *cis-9, trans-11 CLA*. Por su parte, estudios en humanos han examinado los efectos de la suplementación de los lípidos plasmáticos, principalmente debido a su interés por un posible efecto anti-obesidad del ácido linoleico conjugado.

Con el objetivo de identificar y cuantificar los principales isómeros del CLA, en el presente estudio se desarrolló y validó un nuevo método para su determinación en plasma humano y plasma de rata, mediante la técnica de cromatografía de gases rápida con detección por ionización de llama. El nuevo método presenta tres ventajas principales respecto a las metodologías actuales en uso: no requiere de una extracción lipídica previa, la separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna Rtx-2330 significativamente más corta y de diámetro interno menor que las habituales columnas altamente polares utilizadas en este campo, y finalmente la cantidad de muestra inicial requerida para llevar a cabo el análisis es menor que la utilizada en métodos de rutina vigentes.

La aplicación del nuevo método a plasma humano y plasma de rata confirmó su robustez y fiabilidad para una rápida y correcta identificación y cuantificación de los principales isómeros del CLA, así como del perfil de ácidos grasos total, en análisis de rutina.

Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography[†]

I. Bondia-Pons, C. Moltou, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater*

Department of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avenida Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain.

[†] Presented at the 6th Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Vigo, Spain, 8-10 November 2006.

*Corresponding author:

Carmen López-Sabater

Mailing address:

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy

University of Barcelona,

Avenida Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain.

Telephone number: +34-93 402 45 12

Fax number: +34-93 403 59 31

E-mail address: mclopez@ub.edu

Abstract

A new method for the determination of the main isomers of conjugated linoleic acid (CLA) in human and animal plasma was developed by fast gas chromatography coupled to flame ionization detection (fast GC-FID). The new method introduces three main advantages in comparison to the current available methodologies: firstly it does not require previous lipid extraction, secondly the chromatographic separation of CLA isomers was performed on a Rtx-2330 column significantly shorter and thinner than the typical long highly polar capillary columns in use which allows a faster analysis than in current methodologies, and thirdly the amount of sample needed to perform the analyses was substantially lower than the amount used in current routine methodologies. Its application to human plasma and rat plasma showed to be robust and reliable for quick and correct identification of the main CLA isomers in particular, and the total fatty acid profile in general, in routine analysis.

Keywords: Conjugated linoleic acid, human plasma, animal plasma, fast GC

1. Introduction

The determination of the two main isomers of conjugated linoleic acid¹ (CLA), cis-9, trans-11 CLA (rumenic acid) and trans-10, cis-12 CLA in plasma has become of increasing interest in human health due to their potential beneficial biological effects observed in several studies performed in animals and humans [1]. This current upsurge in the interest of CLA started when Pariza and collaborators first pointed out the association of conjugated linoleic acid with anticarcinogenic activity in mice [2]. Other isomers, such as cis-9 cis-11 and trans-9 trans-11, have also shown some biological effects but evidence is still very limited and need further research [3, 4].

Some animals studies suggest health benefits of cis-9, trans-11 CLA, including anticarcinogenic [5] and antiatherogenic effects [6, 7] and improvements in blood lipid concentrations [8] although most of these are unequivocally supported by consistent data from human studies [9]. This appears to be largely due to differences in the isomer blends used and biological effects of specific CLA isomers [10]. On the other hand, human studies have examined the effects of CLA supplementation on plasma lipid concentrations, the main objective of these studies being to look for the possible anti-obesity effects of conjugated linoleic acid [11, 12].

It is well-known that CLA is found in the meat, milk and milk products of ruminant animals [13]. The cis-9, trans-11 CLA isomer is the principal dietary form of CLA, accounting for as much as 85-90% of total CLA in dairy products [5]. However, the contribution of CLA to the human diet is relatively small [14] and some authors have therefore proposed to enrich food products, mainly dairy products, to naturally increase CLA contents in the human diet [10].

Global data on CLA intake widely vary from negligible contents to even 1500 mg/day. This fact justifies the need of having available data of CLA status in different populations to use as references to establish possible future CLA recommendations for human health benefits. Therefore, the more CLA analyses, the better representative and reliable data will be obtained. This is why the high sample throughput that characterises the present clinical and nutritional studies also increases the need to find methodologies of separation with a significant reduction in the analysis time.

Within the last few years, the use of silver ion (Ag^+) HPLC has become a powerful analytic tool to resolve both geometric as well as positional CLA isomers [15, 16] to complement gas chromatography for the complete analyses of the global CLA isomer profile. However, the most widely available and used method for the analysis of fatty acids in routine analyses is still the classical combination of gas chromatography and

flame ionization detection (GC-FID). The development of the 100-m highly polar cyanosilicone capillary columns allowed the determination of the main CLA isomers in several biological, natural and synthetic substrates throughout the last decade [17].

Therefore, the aim of the present work was to develop a specific, accurate, reagent- and time-saving method for the determination of main CLA isomers in two biological matrixes, human and rat plasma, which could be applied to routine analysis.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

Sodium methylate solution (0.5 M), methanolic solution of sodium hydroxide (0.5 M), sodium chloride and anhydrous sodium sulphate were purchased from Fluka (Barcelona, Spain), boron trifluoride in methanol (14% w/v) from Sigma MO (St. Louis, USA) and *n*-hexane from Merck (Darmstadt, Germany).

Standard isomers of the *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA of > 98 % purity were purchased from Larodan (Malmö, Sweden). Supelco 37 Component Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Mix and the tridecanoic acid (used as the internal standard) were purchased from Sigma. Stock standard solutions were prepared by dissolving fatty acid methyl esters standards in *n*-hexane and were stored at 4°C until usage. A commercial standard mixture of CLA isomers was kindly obtained from Loders Lipid Nutrition (Wormerveer, The Netherlands) and human and rat plasma were respectively obtained from a Spanish nutritional study and an interventional study. All samples were stored at -80°C prior to analysis.

2.2. Sample preparation

One hundred microliters human and rat plasma samples were *trans*-esterificated in PTFE screw-capped Pyrex tubes containing 10 µg of the internal standard, by adding 2.5 mL sodium methylate reagent (0.5 M) and heated to 80°C for 10 min in an electrical heater after vigorous shaking. After cooling down to 25°C, samples were esterified with 2.5 mL of boron trifluoride-methanol reagent also at 80°C for 3 min. Once the tubes were cooled, FAMEs were isolated by adding 300 µL of *n*-hexane. After shaking for 1 min, 1 mL of a saturated sodium chloride solution was added. Afterwards, the tubes were centrifuged for 10 min at 2200 g. After drying with anhydrous sodium sulphate, a 50 µL aliquot of the clear *n*-hexane top layer was transferred into an automatic injector vial equipped with a volume adapter of 300 µL. The aliquot was evaporated to dryness under nitrogen and re-diluted with 25 µL of *n*-hexane.

2.3. Fast gas chromatography conditions

Fast gas analyses were performed on HP-6890 Series GC System (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with a flame ionization detector and a HP-6890 Series Injector. Separation of FAMES was carried out on a capillary column (40 m × 0.18 mm I.D., 0.10 μm) coated with Rtx-2330 non-bonded stationary phase (poly 90% biscyanopropyl-10% cyanopropylphenyl) siloxane from Thames Restek UK (Saunderton, UK).

Operating conditions were as follows: the split-splitless injector was used in split mode with a split ratio of 1:30. The injection volume of the sample was 1 μL. The injector and detector temperatures were kept at 250°C and 270°C respectively. The temperature program was as follows: initial temperature 140°C, increased at 20°C/min to 170°C and held at this temperature for 20 min and increased at 10°C/min to 230°C and held at this temperature for 5 min (total run time: 31 min). For safety reasons Helium was used as the carrier gas, with a head pressure of 300 kPa which referred to a linear velocity of 27.5 cm/s at 140°C. Detector gas flows: H₂: 40 mL/min; make-up gas (N₂): 40 mL/min; air: 450 mL/min. Data acquisition and processing were performed with an HP-Chemstation software for GC systems.

2.4. Identification and quantification

The identities of sample methyl ester peaks were determined by comparison of their relative retention times with those of well-known FAMES standards. Quantification was based on the amount of the internal standard recovered. The results were expressed in relative amounts (% total fatty acids).

2.5. Validation parameters

Intra-assay precision was assessed by the RSD relative to 10 replicates of human plasma and 10 replicates of rat plasma under the same experimental conditions and carried out by the same operator.

Inter-assay precision was also assessed in human plasma by the RSD, which in this case was determined by analysing 10 aliquots of each biological sample by two operators in successive days over three months. Triplicate determinations were performed for each aliquot.

2.6. Application of the new method

In order to corroborate the application of the new developed and validated method to routine analysis, 25 samples of human plasma of healthy individuals following a free-chosen diet participating in a Spanish nutritional survey, as well as 20 samples of rat plasma of suckling rats supplemented with a mixture of CLA isomers, were analyzed following the new fast GC method.

2.7 Statistical analyses

All data are mean values \pm standard deviation. Results were processed with the SPSS 12.1. statistical package (SPSS, Chicago, USA). The Student t-test was used to test differences between groups for variables following normality and chi-square tests were performed for those variables not following normality.

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation

One of the advantages of the new developed fast-GC method is the fact that it does not require previous lipid extraction, either in human or rat plasma. Direct extraction/esterification methods, which bypass the procedure of lipid extraction has been successfully introduced in previous analytical methodologies developed to determine the fatty acid profile in human milk food products [18], dairy powders [19], human plasma [20] and human plasma phospholipids [21]. This kind of methodology implies a substantial reduction of total analysis time as well as a consequent saving in reagents.

It is also important to point out that due to the characteristic isomerization processes involved in CLA determination when developing a method to analyze conjugated linoleic acid isomers, the selection of the reactant of methylation, as well as the temperature and time of incubation, are critical factors to be controlled in the methylation and esterification steps in order to avoid oxidative artefacts and not desirable CLA isomers. Acid-catalyzed methods, employing HCl or H₂SO₄, favour extensive isomerization of conjugated dienes and contribute to forming allylic methoxy artefacts. These artefacts can therefore hinder the chromatographic analysis [22]. However, alkali-catalyzed methylation methods (e.g. using NaOCH₃ or KOH in methanol) are considered the most reliable for determining the distribution of CLA isomers because they do not cause significant geometrical isomerization and do not

produce methoxy artefacts [23]. **Table 1** shows the optimising tests of alkali-catalyzed methylations with different amounts of reagents at different temperatures and times of incubation performed in a commercial CLA mixture. Although the derivatization with sodium methylate 0,5 M showed the lowest values of oxidized CLA, its application to human plasma showed that it was not enough to esterify the totality of the two majority fatty acids in the sample (data not shown). The tests carried out with sodium hydroxide 0.5 M showed amounts of oxidized CLA higher than 1%. Therefore we finally selected the two step procedure which required the use of 2.5 mL sodium methylate solution (0.5 M) at 80°C for 10 min, followed by reaction of the mixture with 2.5 mL boron trifluoride-methanol reagent at 80°C for 3 min, which presented the lowest oxidized CLA levels and allowed the total derivatization to FAMES of the fatty acids from human plasma.

3.2. Fast gas chromatography analysis

The 100-m highly polar cyanosilicone capillary columns, available under different commercial names (eg. CP Sil 88, SP-2560) are currently considered the best option for trying to resolve most of the closely related isomers of CLA by GC-FID [22]. In the present work, the chromatographic separation of CLA isomers was performed on an Rtx-2330 column of 40 m × 0.18 mm i.d. × 0.10 µm film thickness. As far as the authors know, this is the first time that a column with these characteristics (shorter than the typical 100-m columns, with an internal diameter lower than the usual value of 0.25 mm and a film thickness lower than the classical value of 0.20 µm) was used for the analysis of the main CLA isomers in plasma. The selection of these specific column parameters allowed the performance of a fast GC determination by reducing the time of analysis in a substantial manner in comparison to the current methodologies in use.

It has also to be pointed out that the development of a fast GC method requires careful optimization of the experimental conditions. Any fully optimized chromatographic method is a tuned compromise between speed, sample capacity and resolution [24]. The limited sample capacity is one of the major drawbacks of fast GC techniques [25]. Therefore an accurate control of the split flow has to be taken into account in order to avoid band broadening. In the present work, we tested different split ratios with different amounts of plasma sample, concluding that a split ratio of 1:30 together with 100 µL of plasma sample was the most appropriate option. Nevertheless, the wide range in main CLA isomer contents in human and animal plasma, mainly due to different diets and CLA supplementations, justified a final step of concentration before the injection of the organic phase containing the FAMES into the gas chromatograph.

Figure 1 shows the fast GC chromatogram of a commercial mixture of 37 fatty acids spiked with low amounts of cis-9, trans-11 CLA, cis-11, trans-13 CLA, trans-10, cis-12 CLA and trans-10, trans-12 CLA. The shortest fatty acids (C4:0 to C6:0) eluted close to the solvent peak, but this was not a problem for the analyses of plasma samples due to the fact that most of the studies in which the global fatty acid profile is analysed do not take into account these short chain-fatty acids. However, if there was a need to evaluate them, the initial temperature of the oven program could be decreased to a temperature lower than 140°C, which is the established for the new method. The isomers cis-9, trans-11 CLA and cis-11, trans-13 CLA showed substantial overlap, but the peaks can be integrated separately without problems with the integration software. Furthermore, the amounts of cis-11, trans-13 CLA are generally negligible when quantifying the main CLA isomers in a plasma sample. The chromatogram zone of CLA isomers of the commercial mixture of four CLA isomers used in the methylation step optimization is presented in **Fig 2**. Therefore, the new fast GC method could also be suitable for the analyses of raw materials containing the former CLA isomers.

In the previous chromatograms, it has been shown that the elution order of CLA isomers were as follows: first the cis/trans, followed by the cis/cis, and finally the trans/trans positional isomers. For these kind of columns and for a specific positional isomer, the cis-trans elutes before its trans-cis geometric isomer [26]. A recent evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 GC columns used in the recently approved AOCS official method to determine fatty acids in animal oils and fats by capillary GC [27] warned to keep in mind that there will always be variability between and within columns and that one should always check the separation before beginning analyses to determine if small adjustments must be made to the chromatographic system to ensure proper quantification and identification of fatty acid isomers in routine analyses.

For the optimisation of the temperature program, we took into account the time of retention of CLA isomers in order to avoid overlapping with other fatty acids eluting in the same zone, which are responsible of co-elution problems in 100-m highly polar capillary columns. The critical fatty acids were the fatty acid C20:0, which closely eluted before cis-9, trans-11 CLA, and the fatty acid C20: 1n-9, which eluted after trans-10, cis-12 CLA and before trans-10, trans-12 CLA. After different tests to optimize the isothermal step of temperature program, a temperature of 170°C for 20 min was the final option to allow a good separation of all the fatty acids in that region in the minimal elution time to avoid peak overlapping.

The final optimized program not only permitted the main CLA isomers determination, but also allowed the correct identification and quantification of a global fatty acid profile from C12:0 to C22:6 n-3 in 30.5 min.

3.3. Validation parameters

After optimising the analytical steps of sample preparation and setting up the operational parameters for the new fast GC method, validation was then performed with both human and rat plasma samples.

Fig 3 and **Fig 4** respectively show the fast GC chromatograms of both a rat plasma sample and a human plasma sample. For the rat sample, we selected a chromatogram in which the peaks of the main two CLA isomers were in considerably high amounts for rat plasma. In parallel with the rat plasma, we selected a sample of human plasma with low levels of the major CLA isomer, cis-9, trans-11 CLA, to show the suitability of the new developed method in identifying and quantifying very low CLA levels in a sample. Twenty-eight fatty acid methyl esters were identified both in the rat and human plasma samples. The five major compounds in the rat sample, in the range of 26.6% -10.4% relative FAME content, were linoleic (C_{18:2(n-6) cis}), palmitic (C_{16:0}), arachidonic (C_{20:4 n-6}), oleic (C_{18:1(n-9)}) and stearic acid (C_{18:0}). For human plasma, the five major compounds were as follows: linoleic, oleic, palmitic, stearic and arachidonic acid, which were in the range of 6.4% – 23.8% relative FAME content.

For routine analyses, qualitative data (retention time values) and quantitative data (sample composition) should remain constant. **Table 2** reports the intra-assay precision values for both biological samples. The main CLA isomers varied from $1.31 \pm 0.03\%$ for cis-9, trans-11 CLA to $0.15 \pm 0.01\%$ for trans-10, cis-12 CLA in rat plasma and from $0.18 \pm 0.01\%$ for cis-9, trans-11 CLA to $0.05 \pm 0.003\%$ for trans-10, cis-12 CLA in human plasma. For the total fatty acid profile, the RSD values were in the range of 0.0% to 9.17% for rat plasma and in the range of 0.01% to 8.33% for human plasma. The former values were within the limits of acceptable variability for the analyte concentration of these kind of samples [28].

The inter-assay precision was performed with human samples. The main CLA isomers varied from $0.17 \pm 0.01\%$ for cis-9, trans-11 CLA to $0.10 \pm 0.01\%$ for trans-10, cis-12 CLA. The RSD values varied from 0.01% to 9.87% and can be seen in **Table 3**.

3.4. Application of the method in routine analysis

Table 4 and **Table 5** show the fatty acid profile results of the new developed and validated method of routine analysis in both rat and human plasma samples. The wide range in the main CLA isomers contents in human plasma is due to the different free-chosen diets of the participants involved in the nutritional study.

4. Conclusions

The application of the fast GC technique developed in the present research allows the separation of a considerable number of fatty acid methyl esters and concurrently of the main isomers of conjugated linoleic acid in a short time (30.5 min). Its application to human and rat plasma has been shown to be robust and reliable for quick and correct identification in routine analysis.

Acknowledgements

Special thanks are due to the Spanish Ministry of Education for the PhD grant to I.B.-P. The authors are thankful to Ms. Eibhlís O'Connor for the English manuscript correction.

References

- [1] Pariza MW, *Am J Clin Nutr* 79 (Suppl.) (2004) 1132S.
- [2] Pariza MW, Hargraves WA, *Carcinogenesis* 6 (1985) 591.
- [3] Tanmahasamut P, J.Liu, L.B.Hendry, N.Sidell, *J. Nutr.* 134 (2004) 674.
- [4] Lai C, Yin J, Li D, Zhao L, Chen X, *Arch Anim Nutr* 1 (2005) 41.
- [5] Lock AL, Corl BA, Barbano DM, Bauman DE, Ip C, *J. Nutr.* 134 (2004) 2698.
- [6] Kritchevsky D, Czarnecki SK, *Chimica Oggi (Chemistry Today)* 19 (2001) 26.
- [7] Kritchevsky D, Tepper SA, Wright JW, Czarnecki SK, Wilson TA, Nicolosi RJ, *Lipids* 39 (2004) 611.
- [8] Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ, *Artery* 22 (1997) 266.
- [9] Wahle KW, Keys SD, Rotondo D, *Prog Lipid Res.* 43 (2004) 553.
- [10] S.Tricon, G.C.Burdge, E.L.Jones, J.J.Russell, S.El-Khazen, E.Moretti, W.L.Hall, A.B.Gerry, D.S.Leake, R.F.Grimble, C.M.Williams, P.C.Calder, P.Yaqoob, *Am J Clin Nutr* 83 (2006) 744.
- [11] Smedman A, Vessby B, *Lipids* 36 (2001) 773.
- [12] Gaullier JM, Halse J, Haye K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, Gudmundsen O, *Am J Clin Nutr* 79 (2004) 1118.
- [13] Pariza MW, Park Y, Cook ME, *Prog Lipid Res.* 40 (2001) 283.
- [14] Lawson RE, Moss AR, Givens DI, *Nutr Res* 14 (2001) 153.

- [15] Adlof RO, *Advances in Conjugated Linoleic Acid*. American Oil Chemists' Society, Champaign IL, USA, 2003.
- [16] Delmonte P, Roach JAG, Mossoba MM, Morehouse KM, Lehmann L, Yurawecz MP, *Lipids* 39 (2004) 185.
- [17] Kramer J KG, Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Jahreis G, Dugan M ER, *Am J Clin Nutr.* 79 (suppl.) (2004) 1137S.
- [18] Destailats F, Golay P, Giuffrida F, Hug B, Dionisi F, *Lipid Technology* 16 (2004) 183.
- [19] Golay PA, Dionisi F, Hug B, Giuffrida F, Destailats F, *Food Chemistry* 101 (2006) 1115.
- [20] I.Bondia-Pons, A.I.Castellote, M.C.Lopez-Sabater, *Journal of Chromatography B* 809 (2004) 339.
- [21] I.Bondia-Pons, S.Morera-Pons, A.I.Castellote, M.C.Lopez-Sabater, *Journal of Chromatography A* 1116 (2006) 204.
- [22] De la Fuente MA, Luna P, Juárez M, *Trends in analytical chemistry* (in press) (2006).
- [23] Kramer JKG, Cruz-Hernandez C, Zhou J, *Eur J Lipid Sci Technol* 103 (2001) 600.
- [24] Klee MS, Blumberg LM, *J Chromatogr Sci.* 40 (2002) 234.
- [25] Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Costa R, Chiofalo B, Dugo P, Dugo G, *J Chromatogr A.* 2004 1035 (2004) 237.
- [26] E.J.Henriksen, M.K.Teachey, Z.C.Taylor, S.Jacob, A.Ptock, K.Kramer, O.Hasselwander, *Endocrinology and Metabolism* 285 (2003) 98.
- [27] Ratnayake WMN, Hansen SL, Kennedy MP, *JAOCS* 83 (2006) 475.
- [28] Horwitz W, *Anal. Chem.* 54 (1982) 67A.

Table 1. Optimising tests of alkali-catalyzed methylations with different amounts of reagents at different temperatures and times of incubation performed in a commercial CLA mixture. n = 3 for each group

Alkali reagent	Sodium methylate			NaOH in MeOH			Sodium methylate (0,5 M);		
	(0,5 M)			(0,5 M)			BF ₃ (14% w/v)		
T (°C)	25	60	80	80	80	80	60; 60	80; 80	80; 80
Time (min)	30	30	60	30	60	60	45 ; 15	20; 6	10; 3
Volume (mL)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	2,5	2,5; 2,5	2,5; 2,5	2,5; 2,5
CLA isomer (%)									
cis-9, trans-11	80,04±0,79	79,43±0,75	78,22±0,76	78,36±0,75	78,45±0,76	79,51±0,77	79,96±0,75	79,69±0,76	79,89±0,76
cis-11, trans-13	3,84±0,03	3,98±0,02	3,66±0,03*	3,51±0,04*	3,53±0,03*	3,21±0,03*	3,90±0,04	3,81±0,04	3,77±0,04
trans-10, cis-12	14,85±0,13	15,14±0,14	14,96±0,15	15,15±0,15	15,12±0,14	14,43±0,13*	14,82±0,14	15,00±0,15	14,96±0,15
trans-10,trans-12	1,22±0,01*	1,12±0,01*	1,46±0,01	1,45±0,01	1,45±0,03	1,45±0,04	0,99±0,01*	1,16±0,01*	1,19±0,01*
Oxidized CLA	0,05±0,00*	0,33±0,01*	1,51±0,01	1,53±0,01	1,45±0,03	1,40±0,03	0,33±0,01*	0,34±0,01*	0,19±0,00*

*Significant different (p < 0.05)

Table 2. Intra-assay precision values for rat plasma and human plasma

Fatty acid	Rat plasma				Human plasma			
	Mean	±	SD	RSD (%)	Mean	±	SD	RSD (%)
C12:0	1,19	±	0,10	9,17	0,57	±	0,04	7,02
C14:0	2,08	±	0,07	3,37	5,48	±	0,22	4,38
C14:1	1,13	±	0,08	7,48	2,95	±	0,23	7,80
C16:0	19,65	±	0,34	1,73	19,94	±	0,42	2,15
C16:1	1,10	±	0,08	7,27	2,94	±	0,22	7,48
C18:0	12,37	±	0,32	3,09	7,67	±	0,31	4,04
C18:1trans n-9	0,00	±	0,00	0,00	0,21	±	0,01	4,76
C18:1cis n-9	11,35	±	0,24	2,11	21,80	±	0,62	2,98
C18:1cis n-7	1,43	±	0,04	2,80	1,26	±	0,04	3,17
C18:2trans n-6	0,69	±	0,03	4,35	0,22	±	0,01	4,55
C18:2cis n-6	26,60	±	0,55	2,07	23,82	±	0,46	1,93
C18:3 n-6	0,36	±	0,01	2,78	0,58	±	0,01	1,72
C18:3 n-3	1,40	±	0,06	4,29	0,32	±	0,01	3,13
C20:0	0,21	±	0,01	4,76	0,13	±	0,01	7,69
cis-9, trans-11 CLA	1,31	±	0,03	2,29	0,18	±	0,01	6,11
trans-10, cis-12 CLA	0,15	±	0,01	6,67	0,05	±	0,00	6,00
C20:1 n-9	0,12	±	0,01	8,33	0,31	±	0,02	6,45
trans-10, trans-12 CLA	0,02	±	0,00	0,00	0,06	±	0,01	8,33
C20:2 n-6	0,32	±	0,00	0,00	0,20	±	0,01	5,00
C20:3 n-6	0,42	±	0,02	4,76	1,80	±	0,04	2,22
C20:4 n-6	13,69	±	0,19	1,39	6,40	±	0,11	1,72
C22:0	0,18	±	0,01	5,56	0,06	±	0,00	0,00
C22:1	0,14	±	0,01	7,14	0,16	±	0,01	6,25
C22:2	0,34	±	0,02	5,88	0,52	±	0,02	3,85
C20:5 n-3	0,00	±	0,00	0,00	0,13	±	0,00	0,00
C22:4 n-6	0,50	±	0,03	6,00	0,42	±	0,03	7,14
C22:5 n-6	0,35	±	0,02	5,71	0,39	±	0,01	2,56
C22:5 n-3	0,62	±	0,03	4,84	0,40	±	0,02	5,00
C22:6 n-3	2,28	±	0,03	1,32	1,03	±	0,02	1,94

Average fatty acid methyl ester content and RSD values. n=10

Table 3. Inter-assay precision values for human plasma

Fatty acid	Human plasma			
	Mean	±	SD	RSD (%)
C12:0	0,39	±	0,03	7,69
C14:0	4,99	±	0,24	4,81
C14:1	2,96	±	0,25	8,45
C16:0	19,7	±	0,44	2,23
C16:1	3,74	±	0,20	6,67
C18:0	8,11	±	0,35	4,32
C18:1trans n-9	0,21	±	0,02	7,62
C18:1cis n-9	21,91	±	0,68	3,25
C18:1cis n-7	1,10	±	0,06	5,45
C18:2trans n-6	0,23	±	0,01	4,35
C18:2cis n-6	23,94	±	0,55	2,32
C18:3 n-6	0,50	±	0,01	3,00
C18:3 n-3	0,34	±	0,02	5,88
C20:0	0,23	±	0,03	9,87
cis-9, trans-11 CLA	0,17	±	0,01	5,88
trans-10, cis-12 CLA	0,10	±	0,01	9,09
C20:1 n-9	0,26	±	0,025	9,26
trans-10, trans-12 CLA	0,06	±	0,01	9,33
C20:2 n-6	0,18	±	0,01	5,56
C20:3 n-6	1,75	±	0,07	4,00
C20:4 n-6	6,33	±	0,13	2,05
C22:0	0,06	±	0,00	0,00
C22:1	0,17	±	0,01	5,88
C22:2	0,49	±	0,03	6,12
C20:5 n-3	0,14	±	0,00	0,00
C22:4 n-6	0,32	±	0,03	8,13
C22:5 n-6	0,42	±	0,03	8,50
C22:5 n-3	0,33	±	0,02	6,06
C22:6 n-3	0,88	±	0,03	3,41

Average fatty acid methyl ester content and RSD values. n=10

Table 4. Fatty acid profile of a sample consisting in rat plasma of rats supplemented with a mixture of CLA isomers. n=20

Fatty acid	Mean \pm SD (%)
C12:0	0,99 \pm 0,08
C14:0	0,84 \pm 0,04
C14:1	0,88 \pm 0,06
C16:0	20,68 \pm 0,35
C16:1	0,75 \pm 0,03
C18:0	9,89 \pm 0,42
C18:1trans n-9	0,07 \pm 0,01
C18:1cis n-9	13,35 \pm 0,74
C18:1cis n-7	1,64 \pm 0,10
C18:2trans n-6	0,26 \pm 0,02
C18:2cis n-6	26,87 \pm 1,02
C18:3 n-6	0,30 \pm 0,02
C18:3 n-3	1,60 \pm 0,08
C20:0	0,11 \pm 0,01
cis-9, trans-11 CLA	1,78 \pm 0,05
cis-11, trans-13 CLA	0,03 \pm 0,00
trans-10, cis-12 CLA	0,13 \pm 0,01
C20:1 n-9	0,05 \pm 0,00
trans-10, trans-12 CLA	0,31 \pm 0,02
C20:2 n-6	0,17 \pm 0,02
C20:3 n-6	0,39 \pm 0,03
C20:4 n-6	13,76 \pm 0,77
C22:0	0,09 \pm 0,01
C22:1	0,06 \pm 0,01
C22:2	0,45 \pm 0,03
C20:5 n-3	0,38 \pm 0,03
C22:4 n-6	0,47 \pm 0,04
C22:5 n-6	0,54 \pm 0,04
C22:5 n-3	0,76 \pm 0,06
C22:6 n-3	2,28 \pm 0,14

Table 5. Fatty acid profile of a sample consisting in human plasma of healthy individuals following a free-chosen diet. n= 25

Fatty acid	Mean \pm SD		
	(%)		
C12:0	0,53	\pm	0,06
C14:0	0,25	\pm	0,34
C14:1	1,29	\pm	0,31
C16:0	19,42	\pm	0,56
C16:1	3,36	\pm	0,31
C18:0	8,59	\pm	0,45
C18:1trans n-9	0,56	\pm	0,12
C18:1cis n-9	23,63	\pm	2,81
C18:1cis n-7	1,45	\pm	0,26
C18:2trans n-6	1,03	\pm	0,21
C18:2cis n-6	25,46	\pm	2,75
C18:3 n-6	0,39	\pm	0,21
C18:3 n-3	0,32	\pm	0,22
C20:0	0,17	\pm	0,23
cis-9, trans-11 CLA	0,17	\pm	0,11
trans-10, cis-12 CLA	0,07	\pm	0,10
C20:1 n-9	0,19	\pm	0,15
trans-10, trans-12 CLA	0,06	\pm	0,14
C20:2 n-6	0,14	\pm	0,11
C20:3 n-6	1,39	\pm	0,39
C20:4 n-6	6,93	\pm	0,53
C22:0	0,06	\pm	0,10
C22:1	0,10	\pm	0,11
C22:2	0,33	\pm	0,12
C20:5 n-3	0,45	\pm	0,22
C22:4 n-6	0,14	\pm	0,13
C22:5 n-6	0,77	\pm	0,23
C22:5 n-3	0,27	\pm	0,12
C22:6 n-3	2,48	\pm	0,53

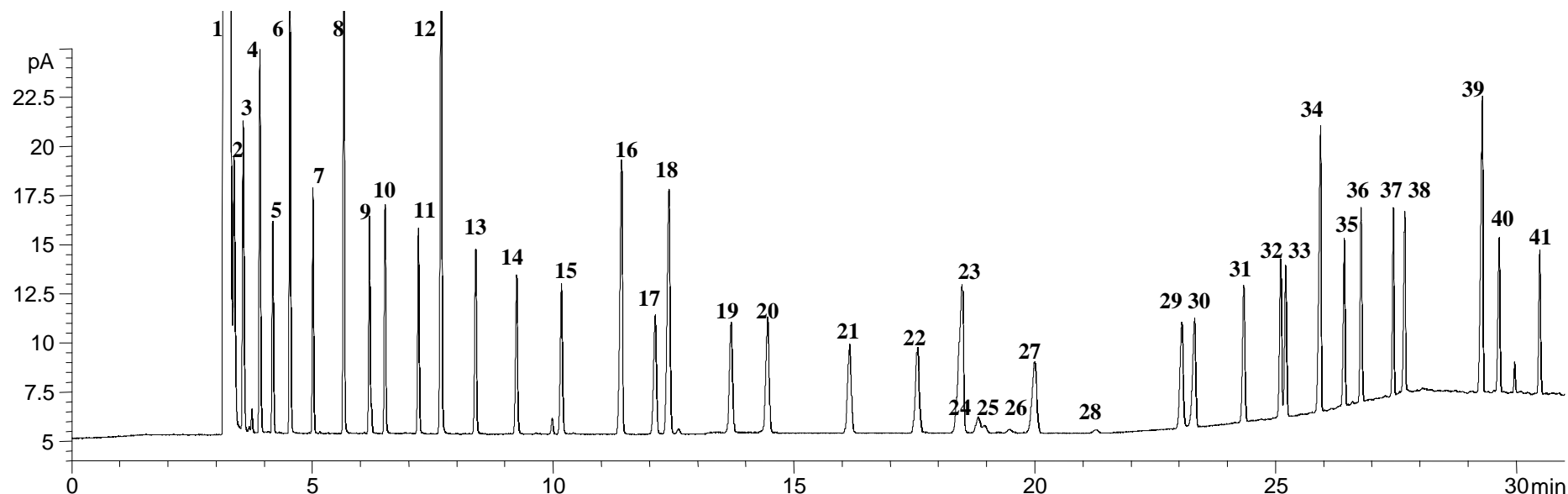


Figure 1. Fast GC chromatogram of a FAME 37 Mixture spiked with low amounts of cis-9, trans-11 CLA, cis-11, trans-13 CLA, trans-10, cis-12 CLA and trans-10, trans-12 CLA. For experimental conditions see Experimental section. Peak identification: (1) *n*-hexane and C_{4:0}; (2) C_{6:0}; (3) C_{8:0}; (4) C_{10:0}; (5) C_{11:0}; (6) C_{12:0}; (7) C_{13:0} (Internal Standard); (8) C_{14:0}; (9) C_{14:1}; (10) C_{15:0}; (11) C_{15:1}; (12) C_{16:0}; (13) C_{16:1}; (14) C_{17:0}; (15) C_{17:1}; (16) C_{18:0}; (17) C_{18:1} trans; (18) C_{18:1} (n-9) cis; (19) C_{18:2} n-6 trans; (20) C_{18:2} n-6 cis; (21) C_{18:3} n-6; (22) C_{18:3} n-3; (23) C_{20:0}; (24) C_{18:2} cis-9, trans-11; (25) C_{18:2} cis-11, trans-13; (26) C_{18:2} trans-10, cis-12; (27) C_{20:1} n-9; (28) C_{18:2} trans-10, trans-12; (29) C_{21:0}; (30) C_{20:2} n-6; (31) C_{20:3} n-6; (32) C_{20:3} n-3; (33) C_{20:4} n-6; (34) C_{22:0}; (35) C_{22:1} n-9; (36) C_{22:2}; (37) C_{23:0}; (38) C_{20:5} n-3; (39) C_{24:0}; (40) C_{24:1}; (41) C_{22:6} n-3.

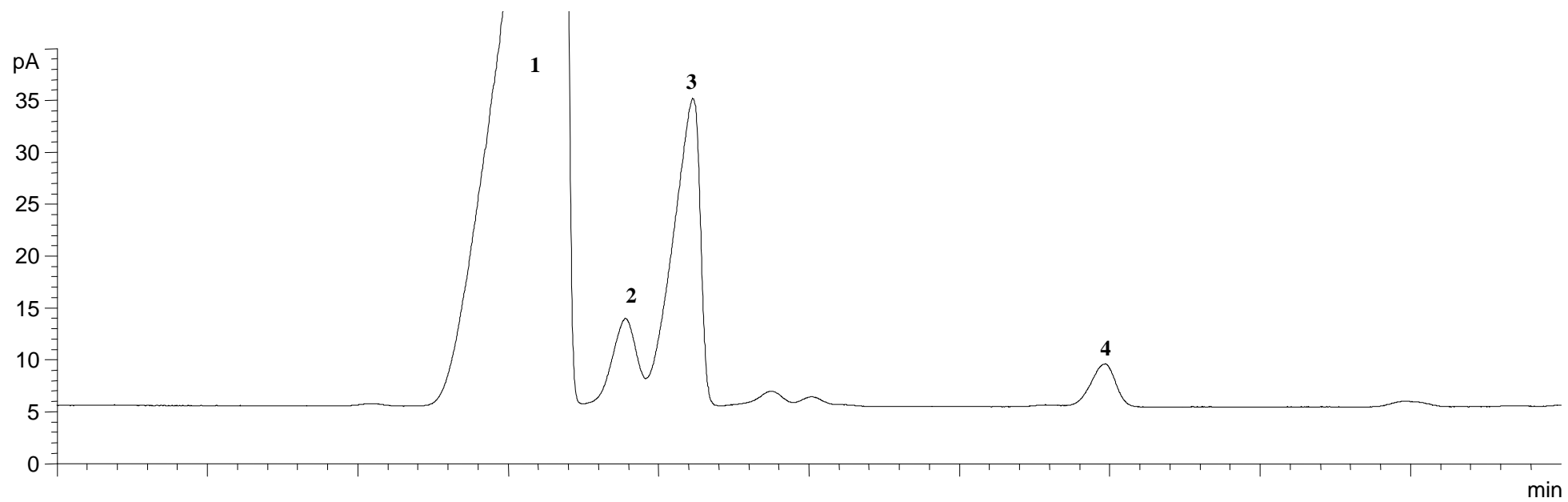


Figure 2. Fast GC chromatogram of a commercial mixture containing the following CLA isomers: (1) $C_{18:2}$ cis-9, trans-11; (2) $C_{18:2}$ cis-11, trans-13; (3) $C_{18:2}$ trans-10, cis-12; (4) $C_{18:2}$ trans-10, trans-12.

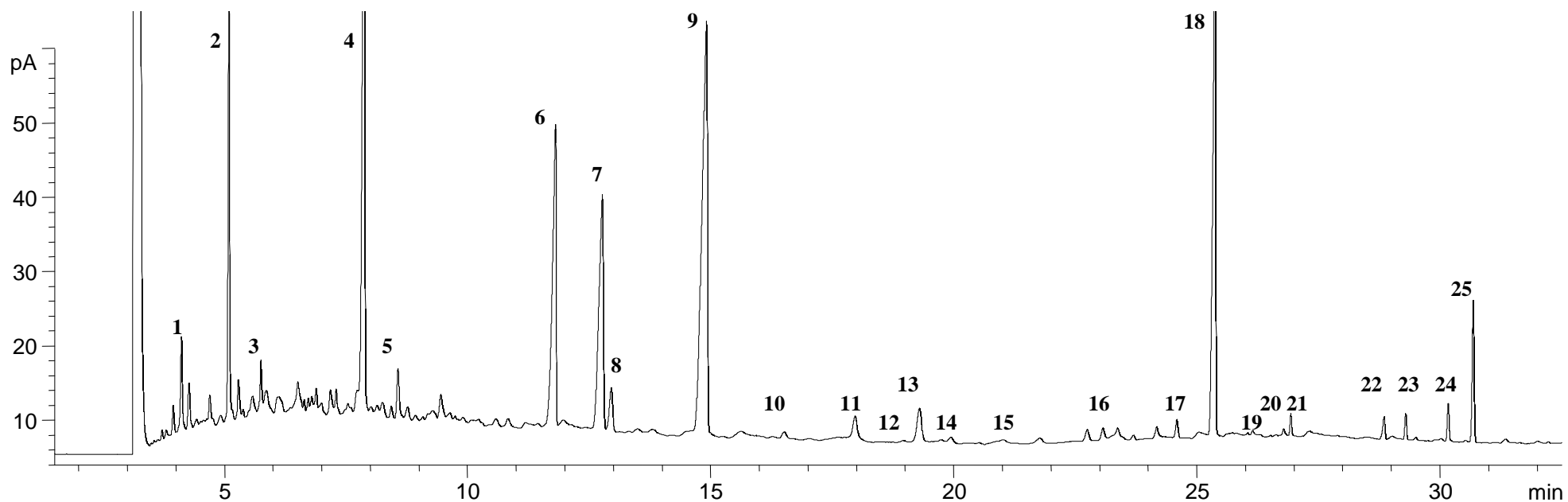


Figure 3a. Fast GC chromatogram of FAMES of a sample of rat plasma. Peak identification: (1) $C_{12:0}$; (2) $C_{13:0}$ (Internal Standard); (3) $C_{14:0}$; (4) $C_{16:0}$; (5) $C_{16:1}$; (6) $C_{18:0}$; (7) $C_{18:1}$ n-9 cis; (8) $C_{18:1}$ n-7 cis; (9) $C_{18:2}$ n-6 cis; (10) $C_{18:3}$ n-6; (11) $C_{18:3}$ n-3; (12) $C_{20:0}$; (13) $C_{18:2}$ cis-9, trans-11; (14) $C_{18:2}$ trans-10, cis-12; (15) $C_{20:1}$ n-9; (16) $C_{20:2}$ n-6; (17) $C_{20:3}$ n-6; (18) $C_{20:4}$ n-6; (19) $C_{22:0}$; (20) $C_{22:1}$ n-9; (21) $C_{22:2}$; (22) $C_{22:4}$ n-6; (23) $C_{22:5}$ n-6; (24) $C_{22:5}$ n-3; (25) $C_{22:6}$ n-3.

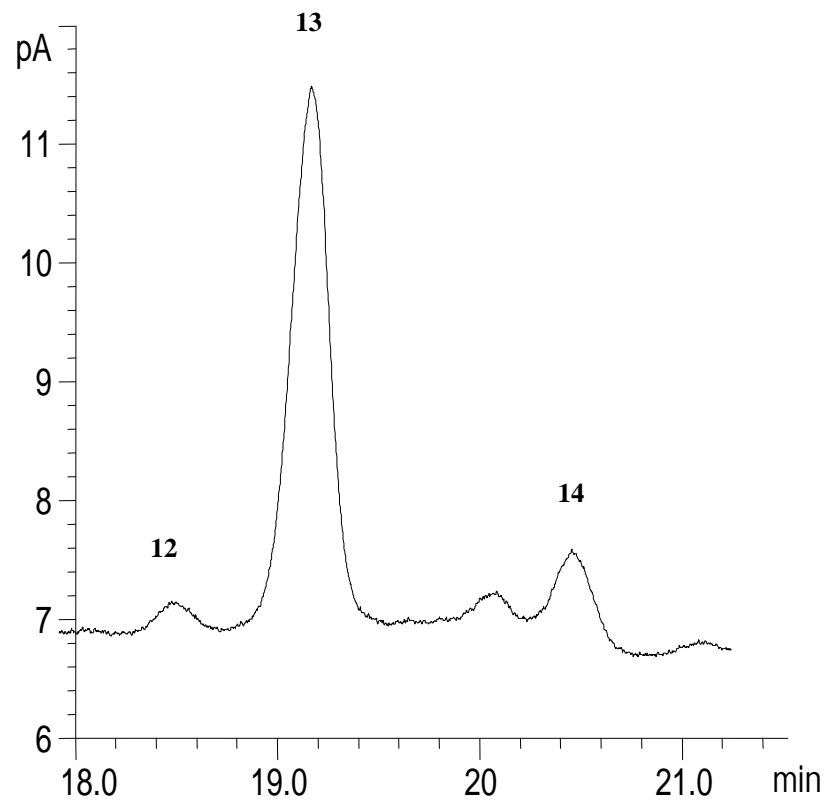


Figure 3b. Detail of the CLA isomers zone in the fast GC chromatogram of FAMES of a sample of rat plasma. For peak identification see Fig 3a.

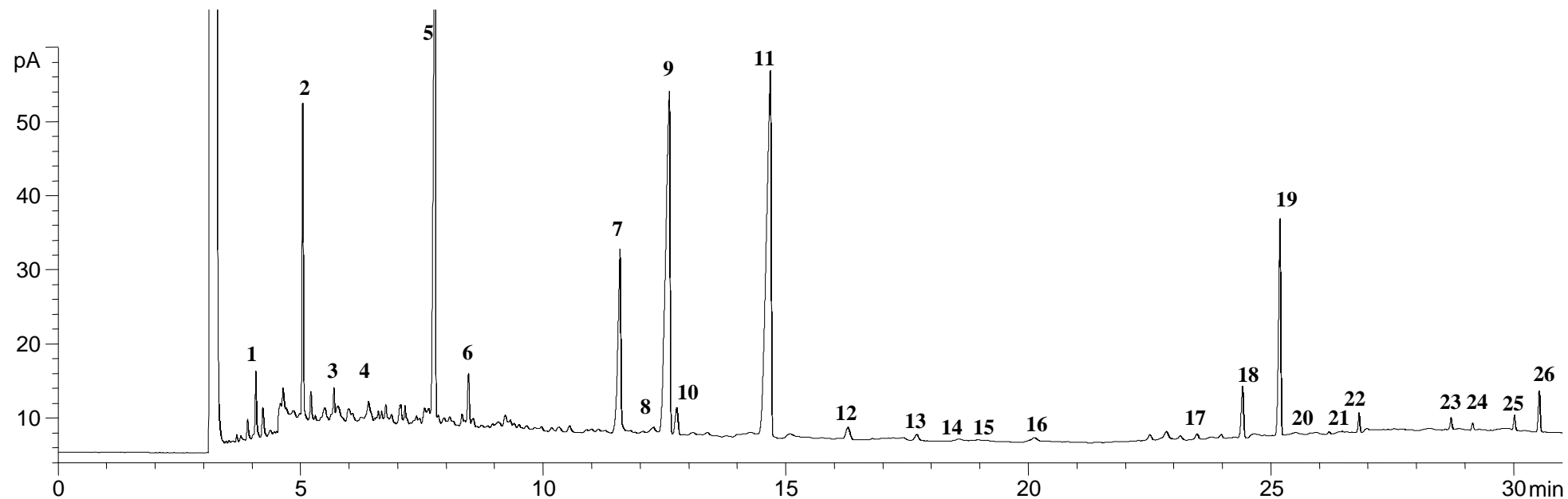


Figure 4a. Fast GC chromatogram of FAMES of a sample of human plasma. Peak identification: (1) $C_{12:0}$; (2) $C_{13:0}$ (Internal Standard); (3) $C_{14:0}$; (4) $C_{14:1}$; (5) $C_{16:0}$; (6) $C_{16:1}$; (7) $C_{18:0}$; (8) $C_{18:1}$ n-9 trans; (9) $C_{18:1}$ n-9 cis; (10) $C_{18:1}$ n-7 cis; (11) $C_{18:2}$ n-6 cis; (12) $C_{18:3}$ n-6; (13) $C_{18:3}$ n-3; (14) $C_{20:0}$; (15) $C_{18:2}$ cis-9, trans-11; (16) $C_{20:1}$ n-9; (17) $C_{20:2}$ n-6; (18) $C_{20:3}$ n-6; (19) $C_{20:4}$ n-6; (20) $C_{22:0}$; (21) $C_{22:1}$ n-9; (22) $C_{22:2}$; (23) $C_{22:4n-6}$; (24) $C_{22:5n-6}$; (25) $C_{22:5}$ n-3; (26) $C_{22:6}$ n-3.

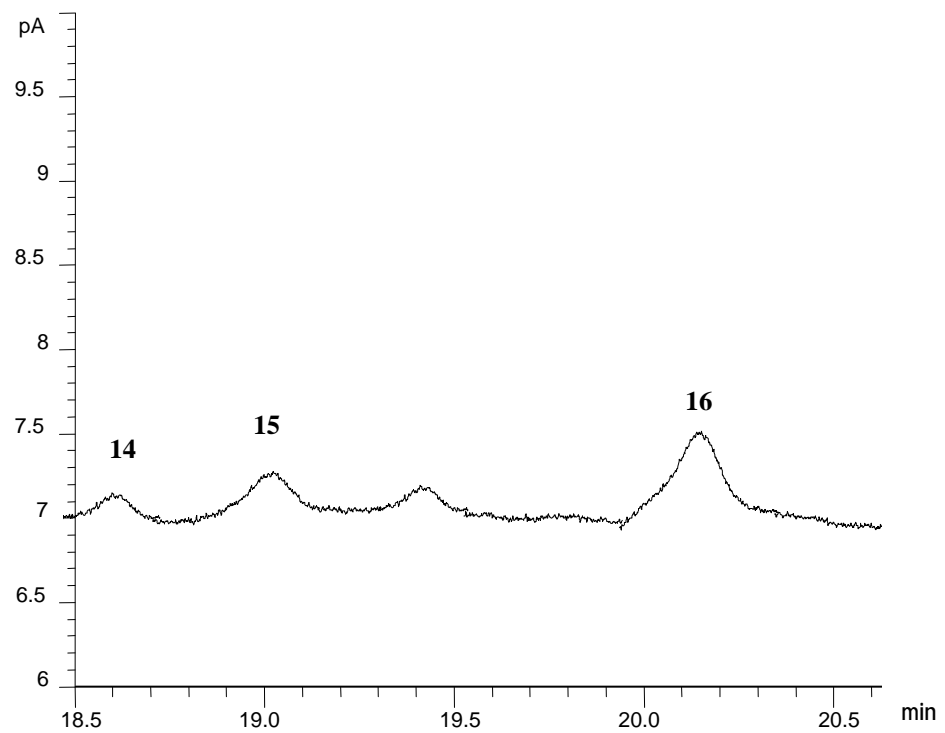


Figure 4b. Detail of the CLA isomers zone in the fast GC chromatogram of FAMES of a sample of human plasma. For peak identification see Figure 4a.

2.2. CUMPLIMIENTO DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA

2.2.1. Identification of foods contributing to the dietary lipid profile of a Mediterranean population

Título: Identificación de alimentos que contribuyen al perfil lipídico alimentario de una población mediterránea

Autores: Isabel Bondia-Pons, Lluís Serra-Majem, Ana I. Castellote, M. Carmen López-Sabater

Año: 2007

Revista: British Journal of Nutrition

Estado: *in press*

Resumen:

La identificación de los alimentos que más afectan al contenido lipídico de la dieta, independientemente de si contienen o no grasa en su composición, puede resultar una herramienta útil en el proceso de elaborar estrategias nutricionales más efectivas y acordes a las necesidades específicas de cada población.

Con este objetivo, el modelo de análisis de contribución diseñado por Block y colaboradores, así como dos modelos de regresión lineal múltiples fueron aplicados en una muestra representativa de Cataluña, comparando los resultados actuales con los encontrados en la dieta consumida hace diez años en la misma región mediterránea.

Los resultados del presente estudio mostraron que el porcentaje más elevado de energía procedente del consumo de lípidos totales en la dieta catalana fue aportado por el aceite de oliva, uno de los alimentos característicos de la dieta mediterránea tradicional. El consumo de queso fue el responsable del porcentaje más elevado debido al consumo de grasa saturada, en contraposición al consumo de leche y yogures observado en la década de los noventa. Así mismo, durante esta última década, el consumo de frutas y verduras ha aumentado en la población catalana, más en mujeres que en hombres. La carne roja sigue siendo la fuente cárnica principal en esta región, y el pescado blanco se consume en mayor cantidad que el pescado azul. Este último debería ser promovido. Una especial atención debería ser puesta en el consumo creciente de cereales del tipo “dulce”, debido a que son una fuente de grasa invisible en la dieta.

Identification of foods contributing to the dietary lipid profile of a Mediterranean population

Isabel Bondia-Pons¹, Lluís Serra-Majem², Ana I. Castellote¹, M. Carmen López-Sabater¹

¹Dept. of Food and Nutritional Science, Reference Centre in Food Technology. Faculty of Pharmacy. University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain.

²Dept. of Clinical Sciences, Center for Health Sciences. University of Las Palmas de Gran Canaria. PO Box 550, Las Palmas de Gran Canaria, E-35080 Las Palmas, Spain.

RUNNING HEAD: Fat dietary profile of a Mediterranean population

KEY WORDS: dietary lipid profile, target foods, plasma fatty acids

ABSTRACT

The identification of the target foods that most affect the fat content of a diet, independently if they contain fat or not, can be a useful tool in the process of drawing up more effective dietary guidelines with nutritional education strategies more directed at the needs of each population. With this purpose, the contribution analysis designed by Block and colleagues and multiple linear regression models were applied to a representative sample of Catalonia.

Olive oil was the food that provided the highest absolute and relative percentage of fat-derived energy intake and cheese the food that provided the highest percentage of saturated fat-derived energy intake. According to the results of the present work, during the last ten years the consumption of fruits and vegetables in Catalonia has increased, more in women than men. The intake of white fish is significantly higher than the intake of blue fish, which should be increased in both men and women and red meat is still the first meat source in this population. Special attention should be paid to the increasing sweet cereals consumption, which is a source of invisible fat to the diet.

INTRODUCTION

Obesity, hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia and insulin resistance are increasing in frequency and becoming major causes of cardiovascular diseases (1). The excess intake of energy and a sedentary lifestyle are major causes of these morbid conditions. Excess of saturated fatty acids (SFA)¹ and a relative deficiency in unsaturated fatty acids, especially n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been identified as contributing factors (2).

Total fat and SFA have been considered as common nutritional targets in public health (3). Present nutritional goals aim to limit the consumption of total fat to 30% of the daily energy intake- in the case of Mediterranean countries such as Spain, characterized by a large consume of olive oil, a maximum of 35% of energy intake has been accepted (4) - and the consumption of SFA to less than 10% (5). Both nutrients, total fat and SFA, can be considered a useful tool to identify potential target foods in the diet of different populations in order to describe consumption patterns and future food-based dietary guidelines.

Therefore the aim of the present work was to identify those food groups that had the greatest effect on the variation in the percentage of energy intake and contributed most to absolute intake supplied by total and saturated lipids in the consumption of a representative sample of the Mediterranean Catalan population.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The subjects were a subgroup of a larger sample (1600 subjects) randomly recruited in Catalonia, a Mediterranean region in north-east Spain, for a cross-sectional nutritional survey (6). The primary objective of the survey was to collect relevant information on the dietary habits of the Catalan population and assess their food consumption patterns. The sampling technique included stratification according to geographical area and municipality size, age and sex of inhabitants. The participation rate (65%) in the present study can be regarded as representative of the adult population in Catalonia. A total of 550 participants agreed to have blood drawn and underwent physiological and anthropometric measurements in a clinical session after informed consent. There were no significant differences between the dietary intake of the subjects who did not complete the clinical assessment and those who did complete it (data not shown). From the former group, 17 people under-reported their energy intake and were therefore not included for food consumption analysis. In the absence of direct measurement of basal metabolic rate (BMR), estimates of BMR were calculated from standard equations for Europeans based on weight, height, age and gender (7). Each identification of under-reported food intake was made using Goldberg cut-off (EI/BMR \geq 1.14 classified the individual as an under-reporter) (8). Of the 533 Catalans, 17 did not fast for >12 h before blood sampling and were therefore also excluded. The final sample consisted of 516 subjects, 203 men and 313 women. The study protocol was approved by the regional ethics committee, following the Declaration of Helsinki 1975 standards.

Anthropometric Measurements

The anthropometric measures used in this study were: height (m), weight (kg), body mass index (BMI, calculated as weight in kg/height² in m) waist and hip circumferences. Height was determined using a mobile anthropometer to the nearest millimeter. Body weight was determined to the nearest 100 g using a digital scale. Waist and hip circumferences were measured using a non-stretchable measuring tape. Hip circumference (HC) was measured at the tip of the hip bone in men, and at the widest point between the hips and the buttocks in women. Cut-off limits for HC determined by Aranceta-Bartrina and coworkers (9) were established for this study.

Physical activity data

The frequency of vigorous physical activity (VPA) was used to evaluate the physical activity of the participants. VPA refers to activities that caused sweating and hard breathing for at least 20 minutes on at least 3 of the 7 days preceding the survey. Vigorous physical activities include: running/jogging (5 miles/h), bicycling (>10 miles/h), swimming (freestyle laps), aerobics, walking very fast (4 miles/h), heavy yard work, weight lifting, basketball (competitive) (10). There were six categories of VPA frequency (daily, 2-3/wk, 1/wk, 2-3/month, occasionally and disabled).

Nutrition data

Data on food intake were obtained with the use of a food-frequency questionnaire (FFQ) which was previously validated (11) and applied to other studies and surveys over the Spanish population (12-14). The FFQ, which asked the subject to recall average use over the past year, consisted of 118 items. The FFQ was arranged by food type and meal pattern. Frequency categories were based on the number of times that items were consumed per day, week or month. Consumption less than once a month was considered no consumption. Daily consumption in grams was determined by dividing the reported amount of the intake by the frequency in days. The relevant period of consumption of seasonal items was also taken into account. Edible fractions of foods were recorded in the database. Food values were converted into nutrient values by validated software developed by the Centre for Superior Studies in Nutrition and Dietetics CESNID, which is based on Spanish tables of food composition (15). Foods were divided into the following groups: red meat, poultry and game, processed meat, eggs, white fish, blue fish, reduced-fat milk and yoghurt, whole-fat milk and yoghurt, cheese, sweet cereals (breakfast cereals, cakes, biscuits), savory cereals (such as pasta and rice but not bread), bread, oils, butter, margarine, green vegetables, fruit, pulses, tubers, sugars, wine and liquors. The number of portions of each food group consumed by the population was calculated.

The grams consumed of each food group were divided by the size of the standard portion for different age groups (Table 2). These standard portions have already been used in previous studies in the Spanish population (16).

Statistical analyses

The “contribution analysis” method developed by Block et al. (17) was applied to identify those top 25 foods or food groups that most contribute to the fat and saturated fat intake of the Catalan representative sample. Briefly, this procedure selects informative foods based on their average percentage contribution to absolute nutrient intake in a target population. Food items out of a comprehensive item list are then ranked according to their mean contribution to nutrient intake in the study population.

Two models of multiple linear regressions developed by Cucó *et al.* were applied (16). The first model was based on calculating the variation in the percentage of fat- and SFA-derived energy intake for a standard portion (SP) of food. This model predicts the change in percentage of fat- and SFA-derived energy intake when the consumption of a particular food group increases in an SP. The equation for the model is: Predicted percentage of energy provided by the macronutrient = $\alpha + \beta_1$ red meat + β_2 poultry and game + β_3 processed meat + β_4 eggs + β_5 white fish + β_6 blue fish + β_7 reduced- fat milk and yoghurts + β_8 whole-fat milk and yoghurts + β_9 cheese + β_{10} sweet cereals + β_{11} savory cereals + β_{12} bread + β_{13} oils + β_{14} butter + β_{15} margarine + β_{16} vegetables + β_{17} fruit pulses + β_{18} tubers + β_{19} sugars + β_{20} wine + β_{21} liquors.

The second model was applied to determine the effect of an individual’s average food consumption on the percentages of fat- and SFA-derived energy intake. Instead of using SP as the independent variable, as in the first model, the portion relative to the consumption of the population (RP) was used. This variable is the ratio between the number of SPs of a food consumed by a subject and the average number of SPs of that food consumed by the population.

All multiple regressions were applied in conditions that ensured a suitable fit. These conditions were explored using relevant residual analyses. The level of significance $P < 0.05$ for bilateral contrasts was used. Data were analyzed with the software SPSS 12.0 for Windows. The chi-square test was used to test differences between groups.

RESULTS

The anthropometric characteristics of the study participants are shown in **Table 1** as well as the prevalence of vigorous physical activity. Men showed a higher mean body weight, BMI, prevalence of risk values for WHR as well as a higher daily VPA than women. No significant differences were observed in the reported energy intake according to gender (123.1 ± 43.0 KJ/kg body weight for men versus 129.3 ± 43.5 KJ/kg body weight for women) and after stratifying the sample for obesity.

The top 25 contributors of dietary sources of fat and saturated fat are respectively shown in **Table 3** and **Table 4** according to the Block method procedure (17). Olive oil was the largest single contributor of total fat with a mean contribution of 70% of the total fat. Cheese was the second most important source, closely followed by red meat. The first five food groups explained 89% of total fat contribution in men and 93% of total fat contribution in women. Significant differences were found for the following food groups according to gender: eggs, processed meat, savory cereals, poultry, ice cream, olive oil and white fish. The previous food groups were higher in men than women except for olive oil and white fish.

According to **Table 4**, cheese was the main contributor to saturated fat in the Catalan diet, with a mean contribution of 40% of total fat. Red meat made contribution close to 20%, followed by whole fat milk and yoghurts in an order of 10%. From rank number 5 (sweet cereals), all components in the list contributed to less than 5% of saturated fat to the Catalan diet.

The variation of the relative percentage of fat-derived energy intake per standard portion of food consumed by gender is shown in **Table 5** according to the first model by Cucó and colleagues (16). Oil was the food that was associated with the greatest relative percentage of fat-derived energy intake per SP consumed, in both men and women. Margarine, butter, processed meat and red meat also related to high relative percentages of fat-derived energy intake. Oppositely, poultry and game, bread, savory cereals and reduced-fat milk and yoghurt provided a lower relative percentage of fat-derived energy intakes.

The consumption of an SP of butter provided the greatest relative percentage of SFA-derived energy intake in women and an SP of eggs in men (**Table 6**). A standard portion of white fish for women and an SP of poultry and game for men provided the lowest relative percentage of SFA-derived energy intake.

Figure 1 shows how changes in the relative portion affected the percentage of fat-derived energy intake in the diet of the Catalan population after application of the second model developed by Cucó and colleagues (16). Olive oil was the food group that was associated with the highest relative percentage of fat-derived energy intake for both sexes.

Bread was the food that contributed most to decrease the relative percentage of fat, followed by fruit. Cheese and whole-fat milk, yoghurt and red meat were the food groups related to the greatest relative percentages of SFA-derived energy intake. It is interesting to point out that oil did not contribute to increase the SFA-derived energy intake in either gender (**Figure 2**). As occurred with the total fat-derived energy intake, bread and fruits also provided the lowest relative percentages of SFA-derived energy intake. According to the second regression model the total fat intake energy was 37.1 ± 4.6 % for men and 38.3 ± 4.5 % for women in the Catalan sample. In both cases, more than 25 % of participants presented total fat intakes lower than the recommended amount for the Spanish population (18). The calculated SFA intake energy was 11.3 ± 2.3 % for men and 12.1 ± 2.4 % for women. The percentage of men with their SFA intakes within the recommended guidelines (5) was significantly higher than the percentage of women (30% men vs. 18% women). More than the half of the Catalan sample showed SFA intakes lower than 12% (65% of the men and 55% of the women).

DISCUSSION

The Block method (17) as well as two regression models designed by Cucó *et al.* (16) were used to identify the target foods that most contributed to the absolute and relative increase and decrease of the fat and SFA-content in the current diet of a representative sample of the Catalan population.

According to the outcomes from the Block method, olive, cheese and red meat are the three main food components contributing to the absolute total fat intake in the current Catalan diet. It is interesting to note that some of the more classical sources of fat, such as butter and ice cream are far down in the list of main contributors to total fat, with low contributions among Catalans. A few items, such as green vegetables and pulse made a contribution to total fat intake chiefly by virtue of additives, such as dressings, which are mainly composed by olive oil or other oils, not tabulated separately.

Not surprisingly, the ranking of foods was in general similar to that seen for total fat, although the high contribution of cheese to the total saturated fat in the range of 40% was unexpected. It is interesting to highlight that olive oil, which was the main contributor of total fat, occupied respectively the ranks 6 and 15 in the list of saturated fat contributors for men and women. This fact is related with the healthy composition in monounsaturated fats but not in saturated fat in olive oil, which is the characteristic main lipid source in the Mediterranean regions.

On the other hand, the suitability of both models designed by Cucó was confirmed by the high values obtained for the respective corrected square of the multiple regression coefficients (in the range of 0.7-0.8) for the sample under study. The first model described the effect that consuming one portion of an SP from each food group would have on the dietary fat profile of the subjects' diet. This model was useful to identify the food groups which most contribute to the relative percentage of fat and SFA. However, the diets of the subjects contained foods that, as can be expected, were consumed at a very different frequency than one portion per day. This is why the second model was applied to determine the effect of an individual's average food consumption on the relative percentages of fat and SFA-derived energy intake.

As expected for a Mediterranean region such as Catalonia, and as was previously found with the Block method, olive oil was the food that provided the highest relative percentage of fat-derived energy intake in the current Catalan diet. The same outcome was found in the Catalan diet in the 90's (16). Our results therefore confirm that during the last decade the Catalan population has still maintained one of the fundamental characteristics of the traditional Mediterranean diet. The healthy benefits derived from a regular consumption of olive oil have been widely reported (19-22). Butter and margarine are fat sources widely used in Western societies (23) but their contribution to the total fat and SFA-derived energy intake was not relevant in the Catalan diet due to the low consumption of both items.

The second food group in importance for the fat-derived energy intake was the dairy products. In Western populations with high intakes of dairy products, the consumption of these foods affect both the fat and SFA-derived energy intake (24-26). However, in the Catalan diet, this effect was only observed for the consumption of cheese. Other dairy products, such as whole-fat milk and yoghurts increased the relative SFA-derived energy intake but did not significantly increase relative fat-derived energy intake, since the subjects who usually consume more milk and yoghurts do not consume other food that is even richer in fats.

The consumption of meat has been generally related to a greater total intake of fat in many populations (16;27). In the present work, red-meat and processed meat lead to notable higher relative percentages of fat-derived energy intake, while the consumption of poultry and game had the contrary effect. However, according to the second regression model, the contribution of processed meat in the SFA-derived energy intake was not of importance in comparison of the calculation for the red meat. On the other hand, the positive contribution of poultry and game to decrease the SFA-derived energy intake was significantly higher for men than for women. This is probably due to the high consumption of poultry and game by men than by women. Red meat was the third food that contributed to increase the relative fat and SFA-derived energy intake in the Catalan sample. However, this contribution was lower than

the calculated for the Catalan diet in the 90's (16) reflecting a current trend to balance the consumption of red meat with that of poultry and game.

Cereals were the foods related to lower relative percentages of fat-derived energy intake in the Catalan sample. No significant differences were observed in the effect of consuming an SP of bread and an SP of savory cereals on the relative percentage of fat-derived energy intake. This was mainly due to the fact that bread included not only the white bread, which is the most consumed by the Spanish population, but also the brown and cereals-enriched bread. As bread was consumed more than the savory cereals, the effect of an RP of bread was significantly greater.

Interesting to point out is the consumption of invisible fat implied by the relative percentage of SFA-derived energy intake from the sweet cereals. Sweet cereal is a target group to have in mind in nutritional recommendations, mainly in children. The consumption of invisible fat has become an increasing problem in developed Western populations (28;29) and with the increasing incidence of over-weight and obese people in European countries (30-33) industrial-food with considerable amounts of invisible fat should be restricted in the diet of the new generations. According to the present study data, an increase in the consumption of savory cereals, such as rice and pasta, should be recommended in the Catalan population.

The second food group in importance to decrease the relative fat and SFA-derived energy intake was the fruits. The average intake of fruits among the Catalan sample agreed with the nutritional recommendations of consuming 2-3 portions of fruit per day. This fact was not accomplished in the last decade in Catalonia (16). The consumption of vegetables in the Catalan diet helped to decrease the relative percentage of SFA-derived energy intake, but had no contribution to decrease the total fat. This could be explained by the fact that in the Spanish population a greater consumption of vegetables usually leads to a greater intake of added fats. These added fats mainly consist in olive oil itself or as main ingredient in salad dressings. The high monounsaturated and low saturated fat content in the olive oil would indirectly be responsible of the decreasing effect of SFA-derived energy intake by the vegetables group. According to the present data, men would be recommended to increase their consumption of fruits and vegetables, at least to the levels shown by women.

The present work also confirmed the need to encourage the Catalan population to increase their fish consumption. Both men and women preferred white fish over blue fish. The average of consumption was not even a portion of blue fish per week for both genders. However, the average intake of white fish was almost of 3 portions per week for women, double that observed for men. The reduction in the relative SFA-derived energy intake of a 0.5 % per RP observed in women, together with the reported healthy properties (34-36) due to a regular consumption of fish, mainly fatty fish, should be taken into account in order to promote the consumption of fish among the Catalan population.

Some limitations of the present study must however be noted. Though FFQ is considered one of the major dietary data collection instruments and the primary instrument in epidemiology (37), no dietary method can measure dietary intake without error and it is important to be aware of the strengths and limitations of the FFQ application to our data. The FFQ by Martin-Moreno et al. used in this study (11) was developed taking into account the cultural Mediterranean background of Spain and the existing geographical differences of diet in this country. To assess the appropriateness and relevance of the food items contained in an initial extensive food list including 290 foods, two different approaches of the 24-hour recall strategy were implemented (in-person interviews and interviews by telephone, both in each of the four seasons). To identify the most important food sources of specific nutrients, all reported foods were initially ranked in terms of their contribution to total nutrient intake by all individuals and they were finally reduced to a final form of the FFQ based on 118 food items. The number of food items on a questionnaire tends to vary widely, in the range from 5 to 350, being 79 the median number (38). The non excessively high number of food items in our FFQ did not contribute to rapidly decrease marginal gain in information, which has been reported with increasing detailed questionnaires (39;40).

However, the fact that our FFQ was self-administered could have contributed to a lack of information due to incomplete answers, because some respondents tends to complete the FFQ for items that usually eat. We are aware that FFQ *per se* are hampered by the inability of individuals to accurately report their food intake retrospectively over a long period of time. Furthermore, correlation coefficients (interviewer vs. self-administered) between FFQs and reference measures are generally higher for interviewer-administered FFQ than for self-administered FFQ for fat (0.55 vs. 0.50) and energy (0.55 vs. 0.46) (38). When the conversion of frequency estimates of food intake to nutrient values was computed for our population sample, cross-check questions were used to correct for misreporting of certain food groups (mainly fruits and vegetables, which often tend to be overreported). Although the introduction of this methodology was effective for foods from plant origin, its application to fat was not significantly important, as it has been previously reported (41).

On the other hand, validation of the FFQ method is essential (42). The validation of the FFQ by Martin-Moreno was designed following the methods used by Willet et al. (43) in a sample of the Spanish population ($n = 180$) during a period of 1 year. The reproducibility of the FFQ nutrients was in the range from $r = 0.35$ to $r = 0.90$ with an average $r = 0.50$ (values expressed as Pearson correlation coefficients), values within the common range obtained in other studies (44;45). The nutrients in which our study was focused, total fat and saturated fat presented reproducibility values of $r = 0.59$ and $r = 0.51$ respectively, contributing then to the bias derived from the use of the questionnaire to assess the Catalan dietary intake.

In addition, the fact that there were no significant differences in the reported dietary intake of the participants after stratifying by obesity could imply a possible limitation of our study to detect underreporting of overweight and obese subjects. Our results are nevertheless in agreement with previous studies in other Mediterranean populations, in which this tendency of dietary intake under-reporting by obese participants has also been observed (46). Despite their limitations, the scientific evidence derived from the nutritional studies in which this FFQ and other similar FFQ have been used, confirm that it is not time to abandon this tool in nutritional studies (47).

An additional limitation of this study could also be the lack of data concerning to socioeconomic status as well as ethnical characteristics of the sample. It has been previously reported that the stratification of the population by socioeconomic factors can significantly influence the diet quality (48). Furthermore, Catalonia is one of the Spanish regions where the percentage of immigration is higher than the 10%, and therefore changes in eating patterns and food consumption introduced by the increasing multicultural population could affect the Mediterranean dietary patterns in a near future. Future surveys in the Catalan population should have this statement into account when recruiting study participants.

As Cucó *et al.* (16) suggested, more feasible strategies of food consumption by identifying and quantifying the foods that most affect the variation of the fat and the SFA intake in the diet of populations are needed. Having in mind that the characteristics of populations are nowadays in constant change, due to different factors such as immigration or ageing of population in some developed countries, the change in eating habits and food consumption should be periodically verified. According to the present study, olive oil is still the main fat source in this Mediterranean region. Furthermore, during the last decade some healthy improvements have been detected in the Catalan diet, such as the increase of the average intake of fruits, vegetables, poultry and game. A new trend in the consumption of dairy products has been also observed, being the intake of cheese responsible of the highest SFA-derived energy intake.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Public Health Division of the Department of Health of the Autonomous Government of Catalonia for providing the blood samples for the study. This study was part of the studies carried out by the Xarxa Temàtica en Nutrició (Generalitat de Catalunya) and the Nutritional Catalan Center of the Institute of Catalan Studies in relation to the Health Survey of Catalonia, ESCA 2002-2003. Many special thanks to Mr L. Moshell for the English manuscript correction.

REFERENCE LIST

- (1) Haffner S, Taegtmeier H. Epidemic Obesity and the Metabolic Syndrome. *Circulation* 2003 Sep 30;108(13):1541-5.
- (2) Wolfram G. Dietary fatty acids and coronary heart disease. *Eur J Med Res* 2003;20(8):321-4.
- (3) Tur JA., Romaguera D, Pons A. Does the diet of the Balearic population, a Mediterranean-type diet, ensure compliance with nutritional objectives for the Spanish population? *Public Health Nutr* 2005;8(3):275-83.
- (4) Serra-Majem L NdICJRLSL. Mediterranean Diet and Health: Is all the Secret in Olive Oil? *Pathophysiol Haemos Thromb* 2004;33:461-5.
- (5) WHO Regional Office for Europe. Food based dietary guidelines in the WHO European Region. 2003. Report No.: EUR/03/5045414.
- (6) Junca S, Guillen M, Aragay JM, Brugulat P, Castell C, Seculi E, et al. Methodological aspects in the evaluation of health and risk-reduction objectives of Health Plan for Catalonia for the year 2000. *Med Clin (Barc)* 2003;121(Suppl 1):10-9.
- (7) Commission of the European Communities. *Scientific Committee for Food of the European Community: Nutrients and energy intakes for the European Community*. Reports of the Scientific Committee for Food. Luxemburg; 1993. Report No.: 31st series.
- (8) Goldberg GM, Black AE, Jebb SA, Cole TJ, Murgatroyd PR, Coward WA, et al. Critical evaluation of energy physiology. Derivation of cut-off limits to identify underrecording. *Eur J Clin Nutr* 1991;45:569-81.
- (9) Aranceta-Bartrina J, Serra-Majem L, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B, Grupo Colaborativo SEEDO. Prevalence of obesity in Spain (article in Spanish). *Med Clin (Barc)* 2005;125(12):460-6.
- (10) Macera CA, Ham SA, Yore MM, Jones DA, Ainsworth BE, Kimsey CD, et al. Prevalence of physical activity in the United States: Behavioral Risk Factor Surveillance System, 2001. *Prev Chronic Dis* 2005;2(2):1-10.
- (11) Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, et al. Development and Validation of a Food Frequency Questionnaire in Spain. *International Journal of Epidemiology* 1993;22(3):512-9.
- (12) Serra-Majem L, Morales D, Domingo C, Caubet E, Ribas L, Nogués RM. Comparison of two dietary methods: 24-hour recall and semiquantitative food frequency questionnaire (article in Spanish). *Med Clin (Barc)* 1994;103:652-6.
- (13) Serra-Majem L, Armas-Navarro A, Ribas-Barba L, on behalf of the Research Group ENCA (1997-98). Nutritional Survey of Canarian Islands: Dietary habits and food consumption (in Spanish). Santa Cruz de Tenerife (Spain); 1999. Report No.: 1.
- (14) Tur JA, Romaguera D, Pons A. Adherence to the Mediterranean dietary pattern among the population of the Balearic Islands. *Br J Nutr* 2004 Oct 1;92(3):341-6.
- (15) Cervera P. Food composition tables of CESNID (The Centre for Superior Studies in Nutrition and Dietetics) (in Spanish). McGraw-Hill ed. Barcelona (Spain): 2006.
- (16) Cuco G, Fernandez-Ballart J, Marti-Henneberg C, Arija V. The contribution of foods to the dietary lipid profile of a Spanish population. *Public Health Nutr* 2002;5(6):747-55.

- (17) Block G, Dresser CM, Hartman AM, Carroll MD. Nutrient sources in the American diet: Quantitative data from the Nhanes II Survey. *Macronutrients and fats. Am J Epidemiol* 1985;122(1):27-40.
- (18) Aranceta J., Serra-Majem L, Working Party for the Development of Food-Based Dietary Guidelines for the Spanish Population. Dietary guidelines for the Spanish population. *Public Health Nutr* 2001 Dec;4(6A):1403-8.
- (19) Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2006;429-45(7):429-45.
- (20) Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* 2004 Oct 1;80(4):1012-8.
- (21) Wahle KW, Caruso D, Ochoa JJ, Quiles JL. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids* 2004;39(12):1223-31.
- (22) Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A, de la Fuente C, de Irala J, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA. Olive oil consumption and weight change: the SUN prospective cohort study. *Lipids* 2006;41(3):249-56.
- (23) Osler M, Heitmann BL, Gerdes LU, Jorgensen LM, Schroll M. Dietary patterns and mortality in Danish men and women: a prospective observational study. *Br J Nutr* 2001;85(2):219-25.
- (24) Burke SJ, Gibney MJ, O'Dwyer NA, McCarthy SN. The influence of cereal and dairy consumption on the Irish diet: implications for developing food-based dietary guidelines. *Public Health Nutr* 2005;8(3):227-37.
- (25) Flynn MA, Kearney JM. An approach to the development of food-based dietary guidelines for Ireland. *Br J Nutr* 1999; 81(Suppl 2):S77-S82.
- (26) Haraldsdottir J. Dietary guidelines and patterns of intake in Denmark. *Br J Nutr* 1999;81(Suppl 2):S43-S48.
- (27) Bamia C, Orfanos P, Ferrari P, Overvad K, Hundborg HH, Tjonneland A, et al. Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study. *Br J Nutr* 2005;94(1):100-13.
- (28) Nielsen SJ, Siega-Riz AM, Popkin BM. Trends in Food Locations and Sources among Adolescents and Young Adults. *Preventive Medicine* 2002 Aug;35(2):107-13.
- (29) Popkin BM, Siega-Riz AM, Haines PS, Jahns L. Where's the fat? Trends in U.S. diets 1965-1996. *Preventive Medicine* 2001;32:245-54.
- (30) Aranceta-Bartrina J, Serra-Majem L, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B, Grupo Colaborativo SEEDO. Prevalence of obesity in Spain. *Med Clin (Barc)* 2005;125(12):460-6.
- (31) James P. Marabou 2005: nutrition and human development. *Nutr Rev* 2006;64(5):1-11.
- (32) Malecka-Tendera E, Mazur A. Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes* 0 AD;30(S2):S1-S3.
- (33) Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A, Gomez-Gracia E, Martinez JA, Pajares RM, Martinez-Gonzalez MA. Predictors of weight gain in a Mediterranean cohort: the Seguimiento Universidad de Navarra Study I. *Am J Clin Nutr* 2006 Feb 1;83(2):362-70.
- (34) Williams CM, Burdge G. Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc* 2006;65(1):42-50.

- (35) Wakai K, Ito Y, Kojima M, Tokudome S, Ozasa K, Inaba Y, et al. Intake frequency of fish and serum levels of long-chain n-3 fatty acids: a cross-sectional study within the Japan Collaborative Cohort Study. *J Epidemiol* 2005;15(6):211-8.
- (36) Harris WS. Extending the cardiovascular benefits of omega-3 Fatty acids. *Curr Atheroscler Rep* 2005;7(5):375-80.
- (37) Dood KW, Guenther PM, Freedman LS, Subar A, Kipnis V, Midthune D, et al. Statistical Methods for Estimating Usual Intake of Nutrients and Foods: A Review of the Theory. *Journal of the American Dietetic Association* 2006;106:1640-50.
- (38) Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires-a review. *Public Health Nutr* 2002;5(4):567-87.
- (39) Willet WC. *Nutritional Epidemiology*. New York: 1998.
- (40) Pietinen P, Hartman AM, Haapa E, Rasanen L, Haapakoski J, Palmgren J. Reproducibility and validity of dietary assessment instruments. A qualitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* 1988;128:667-76.
- (41) Wolk A, Ljung H, Vessby B, Hunter D, Willet WC. Effect of additional questions about fat on the validity of fat estimates from a food frequency questionnaire. *European Journal of Clinical Nutrition* 1998;52:186-92.
- (42) Nelson GJ, Schmidt PC, Bartolini G, Kelley DS, Kyle D. The effect of dietary arachidonic acid on platelet function, platelet fatty acid composition, and blood coagulation in humans. *Lipids* 1997;32(4):421-5.
- (43) Willet W, Sampson L, Stampfer MJ, et al. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* 1985;122:51-65.
- (44) Engle A, Lynn L, Kouri K, et al. Reproducibility and comparability of a computerized, self-administered food frequency questionnaire. *Nutr Cancer* 1990;20:906-12.
- (45) Overvad K, Tjonneland A, Haraldsdottir J., et al. Development of a semiquantitative food frequency questionnaire to assess food, energy and nutrient intake in Denmark. *Inr J Epidemiol* 1991;20:900-5.
- (46) Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Stefanadis C. Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study. *Nutrition* 2006 May;22(5):449-56.
- (47) Willett WC, Hu FB. Not the time to abandon the food frequency questionnaire: point. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(10):1757-8.
- (48) Hann CS, Rock CL, King I, Drewnowski A. Validation of the Healthy Eating Index with use of plasma biomarkers in a clinical sample. *Am J Clin Nutr* 2001;74:479-86.

Table 1. Characteristics of the study sample of the Catalan population (mean \pm SD)

	<i>All (n = 516)</i>	<i>Men (n = 203)</i>	<i>Women (n = 313)</i>
Age	41.5 \pm 14.3	42.1 \pm 14.4	41.3 \pm 14.1
Body weight, kg	70,1 \pm 10.8	78.2 \pm 10.2**	64.3 \pm 11.1
BMI, kg/m ²	25.4 \pm 4.8	26.3 \pm 4.0**	24.8 \pm 5.2
Hip circumference, cm	101.5 \pm 9.7	101.8 \pm 7.4	101.5 \pm 9.7
Waist-hip ratio, WHR	0.8 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1*	0.8 \pm 0.1
WHR > cut-off limits	11.2	12.8*	10.2
Energy intake (kcal)	2024.4 \pm 561.5	2244.2 \pm 686.2*	1981.9 \pm 542.7
VPA for at least 20 min (%):			
Daily	13.0	19.9*	11.4
2-3/week	21.1	25.5*	20.1
1/week	9.0	10.7	8.6
2-3/month	9.6	9.3	10.0
Occasionally	38.0	28.4*	43.5
Disabled	6.3	6.2	6.4

Significant differences between men and women: * P < 0.001; **P < 0.01 (Chi square test)

Cut-off limits: men's WHR > 1, women's WHR > 0.90.

VPA: Prevalence of Vigorous Physical Activity.

Table 2. Size of standard portions per group of age and mean number of standard portion consumed per day and gender

<i>Food group</i>	<i>Standard portions (g)</i>		<i>Number of standard portions</i>					
	<i>Age (years)</i>		<i>Men (n = 203)</i>			<i>Women (n = 313)</i>		
	<i>18-59</i>	<i>≥ 60</i>	<i>P*₂₅</i>	<i>P₅₀</i>	<i>P₇₅</i>	<i>P₂₅</i>	<i>P₅₀</i>	<i>P₇₅</i>
Red meat	100	100	0.3	0.5	0.8	0.3	0.5	0.8
Poultry and game	100	100	0.3	0.4	0.6	0.3	0.4	0.6
Processed meat	50	50	0.2	0.3	0.6	0.1	0.2	0.4
Eggs	100	50	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2
White fish	120	100	0.1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.4
Blue fish	120	100	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.3
Reduced-fat milk and yoghurt	200	200	0.0	0.8	1.2	0.0	1.0	1.9
Whole-fat milk and yoghurt	200	200	0.0	0.2	1.0	0.0	0.1	1.0
Cheese	50	50	0.2	0.5	0.9	0.2	0.5	1.0
Sweet cereals	60	50	0.1	0.3	0.7	0.1	0.3	0.7
Savoury cereals	70	40	0.3	0.6	0.7	0.3	0.5	0.7
Bread	65	50	1.3	2.4	2.7	0.8	1.9	2.4
Oil	25	25	0.5	1.1	1.4	0.9	1.1	1.3
Butter	25	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Margarine	25	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Green vegetables	225	150	0.8	1.3	2.0	0.9	1.3	2.1
Fruit	130	130	1.0	2.1	3.7	1.5	2.4	3.4
Pulse	60	40	0.2	0.3	0.5	0.2	0.2	0.4
Tubers	350	200	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3
Sugars	15	15	0.0	0.1	0.4	0.0	0.2	0.6
Wine	100	100	0.0	0.2	1.3	0.0	0.0	0.2
Liquors	50	50	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0

P_n^* – *n*th percentile.

Table 3. Major contributors of total fat in the Catalan diet

<i>Rank</i>	<i>Food/food group</i>	<i>Men (n=203)</i>		<i>Women (n=313)</i>	
		<i>% of total fat</i>	<i>Cumulative % of fat</i>	<i>% of total fat</i>	<i>Cumulative % of fat</i>
1	Oil	67,12*	67,12	73,52	73,52
2	Cheese	9,63	76,75	9,56	83,08
3	Red meat	6,38	83,13	5,87	88,96
4	Eggs	3,47*	86,60	2,25	91,21
5	Whole-fat milk and yoghurt	2,47	89,06	2,08	93,29
7	Processed meat	1,34*	90,40	0,85	94,14
8	Savoury cereals	1,32*	91,72	0,86	95,00
9	Blue fish	1,28	93,00	1,27	96,27
10	Poultry and game	0,84*	93,85	0,58	96,85
11	Green vegetables	0,61	94,46	0,66	97,50
12	Sweet cereals	0,48	94,94	0,37	97,87
13	French fries and salty snacks	0,41	95,35	0,36	98,24
14	Pulse	0,34	95,69	0,32	98,55
15	Reduced-fat milk and yoghurt	0,31	96,01	0,39	98,95
16	White fish	0,17*	96,18	0,36	99,31
17	Sugars	0,14	96,31	0,14	99,45
18	Soups	0,09	96,41	0,08	99,53
19	Tubers	0,08	96,49	0,09	99,62
20	Cookies	0,06	96,55	0,05	99,67
21	Butter	0,03	96,59	0,02	99,69
22	Margarine	0,02	96,62	0,02	99,71
23	Ice cream	0,02*	96,64	0,01	99,72
24	Fruit	0,01	96,65	0,01	99,73
25	Bread	0,01	96,66	0,01	99,74

Significant differences between men and women: * P < 0.01 (Chi square test)

Table 4. Major contributors of total saturated fat in the Catalan diet

<i>Rank</i>	<i>Food/food groups</i>	<i>Men (n=203)</i>		<i>Women (n=313)</i>	
		<i>% of</i>	<i>Cumulative %</i>	<i>% of</i>	<i>Cumulative %</i>
		<i>total SFA</i>	<i>of SFA</i>	<i>total SFA</i>	<i>of SFA</i>
1	Cheese	39,51	39,51	43,83	43,83
2	Red meat	17,27	56,78	17,00	60,83
3	Whole-fat milk and yoghurt	11,56	68,34	11,19	72,02
4	Eggs	5,66	74,00	5,39	77,41
5	Sweet cereals	4,61	78,62	4,43	81,84
6	Oil	3,54*	83,95	0,61	84,47
7	Processed meat	2,42*	86,37	1,84	86,21
8	Sugars	1,50	87,87	1,66	87,87
9	French fries and salty snacks	1,31	89,18	1,39	89,26
10	Pulse	1,13	90,31	1,12	90,38
11	Ice cream	1,06	91,37	0,96	91,34
12	Chocolate	0,97	92,34	0,89	92,23
13	Tubers	0,86*	93,20	0,75	92,98
14	Cookies	0,75	93,95	0,72	93,70
15	Soups	0,64	94,59	0,67	94,36
16	Butter	0,23	94,82	0,23	94,59
17	Margarine	0,20	95,02	0,18	94,77
18	Savoury cereals	0,15	95,17	0,14	94,91
19	Blue fish	0,09	95,26	0,08	94,99
20	Poultry and game	0,05	95,31	0,06	95,05
21	White fish	0,02	95,33	0,02	95,07
22	Green vegetables	0,01	95,34	0,01	95,08
23	Reduced-fat milk and yoghurt	0,01	95,35	0,01	95,09
24	Bread	0,01	95,36	0,01	95,10
25	Jams and marmalade	0,01	95,37	0,01	95,11

Significant differences between men and women: * P < 0.01 (Chi square test)

Table 5. Comparison of the change in the relative percentage of fat-derived energy intake per intake of one standard portion by gender

<i>Food group</i>	<i>% fat-derived energy intake</i>					
	<i>Men (n = 203)</i>			<i>Women (n = 313)</i>		
	<i>Regression coefficient</i>	<i>95% CI</i>		<i>Regression coefficient</i>	<i>95% CI</i>	
		<i>LL</i>	<i>UL</i>		<i>LL</i>	<i>UL</i>
Red meat	2.1*	0.7	3.5	1.7	0.7	2.7
Poultry and game	-2.5*	-4.4	-0.5	-0.3	-1.8	-1.1
Processed meat	2.7*	1.0	4.5	1.9	0.6	3.1
Eggs	2.2*	1.4	5.8	0.5	4.2	3.2
White fish	-0.8*	-2.7	-1.2	-2.9	-4.5	-1.3
Blue fish	1.3*	1.4	4.0	-1.2	-3.0	-0.7
Reduced-fat MY	-1.1	-1.6	0.7	-1.0	-1.3	-0.6
Whole-fat MY	0.3	-0.2	0.8	0.3	-0.1	0.7
Cheese	1.0*	0.2	1.8	1.8	1.3	2.3
Sweet cereals	0.0**	-0.7	-0.6	-0.4	-1.2	-0.3
Savoury cereals	-1.8	-3.3	-0.2	-1.6	-2.7	-0.5
Bread	-2.0	-2.4	-1.5	-2.2	-2.6	-1.8
Oil	6.3	5.4	7.2	6.5	5.7	7.3
Butter	2.4*	1.9	10.8	2.9	0.9	6.6
Margarine	4.0	-2.4	10.3	4.1	0.3	7.8
Green vegetables	-0.1	-0.6	0.5	0.0	-0.5	0.4
Fruit	-0.8	-1.1	-0.5	-1.1	-1.4	-0.8
Pulse	-1.0*	-3.3	-4.3	-0.5	-2.6	-1.5
Tubers	2.2*	0.9	5.3	-0.9	-3.4	-1.5
Sugars	-0.1**	-1.2	-1.0	0.3	0.4	0.9
Wine	0.1	-0.3	0.5	0.2	-0.3	0.8
Liquors	-0.7	-2.1	0.7	-2.7	-5.9	0.5
Regression constant, α	36.2	34.1	38.2	38.6	37.0	40.2
cR ² x 100	73.2			70.1		

CI-confidence interval; LL-lower limit; UL-upper limit; cR² – corrected square of the multiple correlation coefficient. F of Snedecor from analysis of variance of the multiple linear regression, in men/in women *, P <0.001; **, P <0.01.

Table 6. Comparison of the change in the relative percentage of SFA-derived energy intake per intake of one standard portion by gender

<i>Food group</i>	<i>% SFA-derived energy intake</i>					
	<i>Men (n = 203)</i>			<i>Women (n = 313)</i>		
	<i>Regression coefficient</i>	<i>95% CI</i>		<i>Regression coefficient</i>	<i>95% CI</i>	
		<i>LL</i>	<i>UL</i>		<i>LL</i>	<i>UL</i>
Red meat	1.1	-0.5	1.7	1.2	-0.8	1.7
Poultry and game	-1.0*	-1.8	-0.2	-0.1	-0.7	-0.5
Processed meat	1.2**	0.5	2.0	0.8	0.3	1.3
Eggs	1.7	-0.2	3.2	1.5	-0.0	3.0
White fish	-0.5*	-1.3	-0.3	-1.6	-2.3	-1.0
Blue fish	-0.2*	-1.3	-0.9	-0.9	-1.7	-0.2
Reduced-fat MY	-0.1	-0.3	0.0	-0.0	-0.2	0.1
Whole-fat MY	1.0	-0.8	1.3	1.1	-0.9	1.3
Cheese	1.6	-1.3	2.0	1.7	-1.5	1.9
Sweet cereals	0.9	-0.6	1.2	0.8	-0.5	1.1
Savoury cereals	-0.7*	-1.4	-0.1	-0.3	-0.8	-0.2
Bread	-0.6	-0.8	0.3	-0.7	-0.9	0.6
Oil	0.1	-0.3	0.5	-0.2	-0.5	0.1
Butter	1.5*	2.0	5.1	4.6	3.1	6.2
Margarine	-0.7*	-3.4	-2.0	0.3	1.2	1.8
Green vegetables	-0.1	-0.3	0.2	-0.2	-0.4	0.0
Fruit	-0.2	-0.4	0.1	-0.4	-0.5	0.3
Pulse	-0.2*	-1.2	-0.8	-0.6	-1.4	-0.3
Tubers	-0.1*	-1.4	-1.2	-1.1	-2.1	-0.2
Sugars	0.4**	0.1	0.8	0.7	0.4	0.9
Wine	0.0	0.2	0.2	0.0	-0.2	0.3
Liquors	-0.2	-0.8	0.4	-0.3	-1.6	1.0
Regression constant, α	11.2	10.3	12.0	12.8	12.1	13.4
cR ² x 100	76.1			79.6		

CI-confidence interval; LL-lower limit; UL-upper limit; cR² – corrected square of the multiple correlation coefficient. F of Snedecor from analysis of variance of the multiple linear regression, in men/in women *, P <0.001; **, P <0.01.

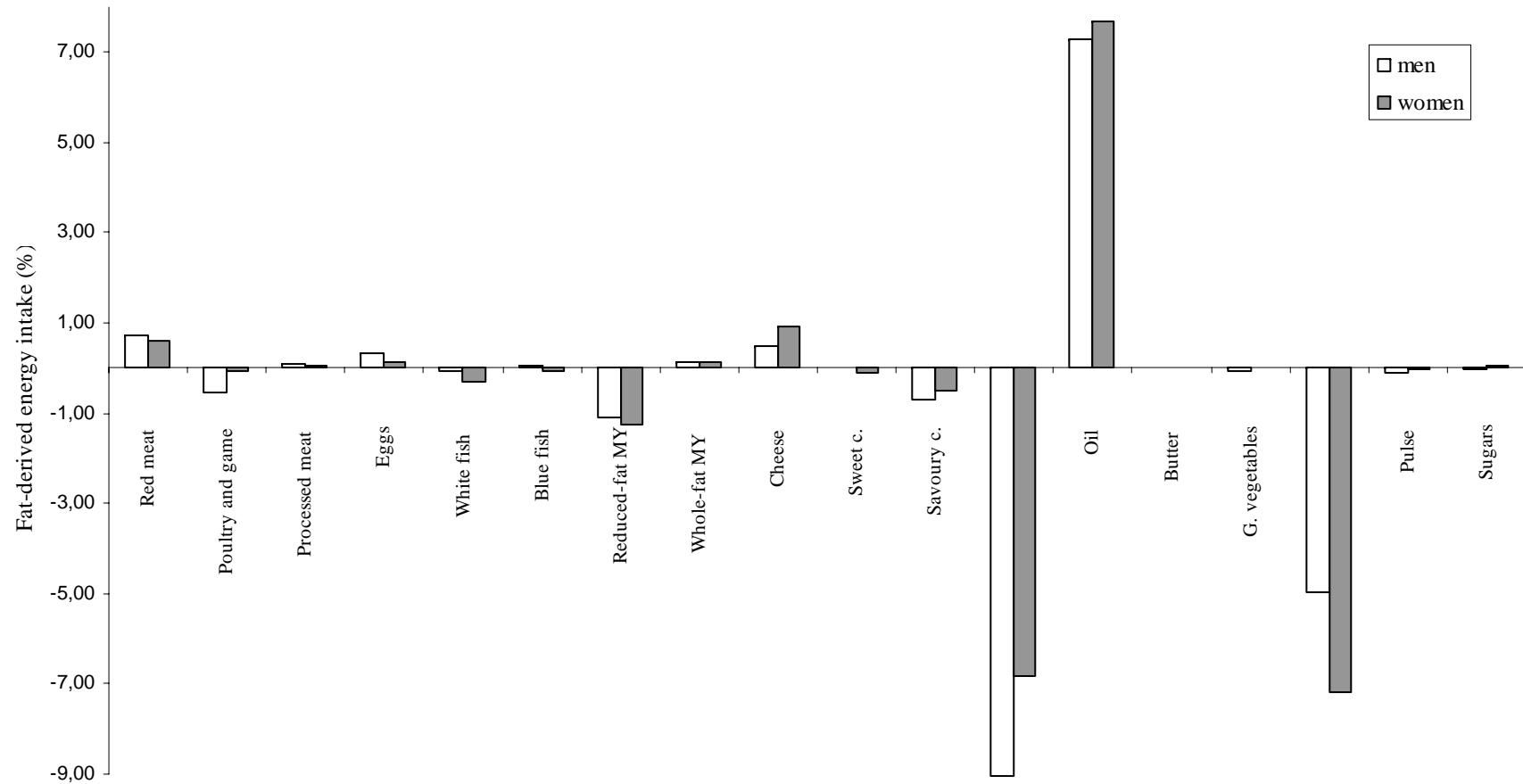


Figure 1. Change in the percentage of fat-derived energy intake per relative portion of the population intake. Number of cases: men, 203; women, 313. Men: corrected $R^2 = 0.752$; constant of regression = 36.1 . Women: corrected $R^2 = 0.701$; constant of regression = 38.7 . Reduced-fat MY- reduced-fat milk and yoghurt; Whole-fat milk - Whole-fat milk and yoghurt; Sweet c. = sweet cereals; Savoury c. = savoury c.; G. vegetables – green vegetables.

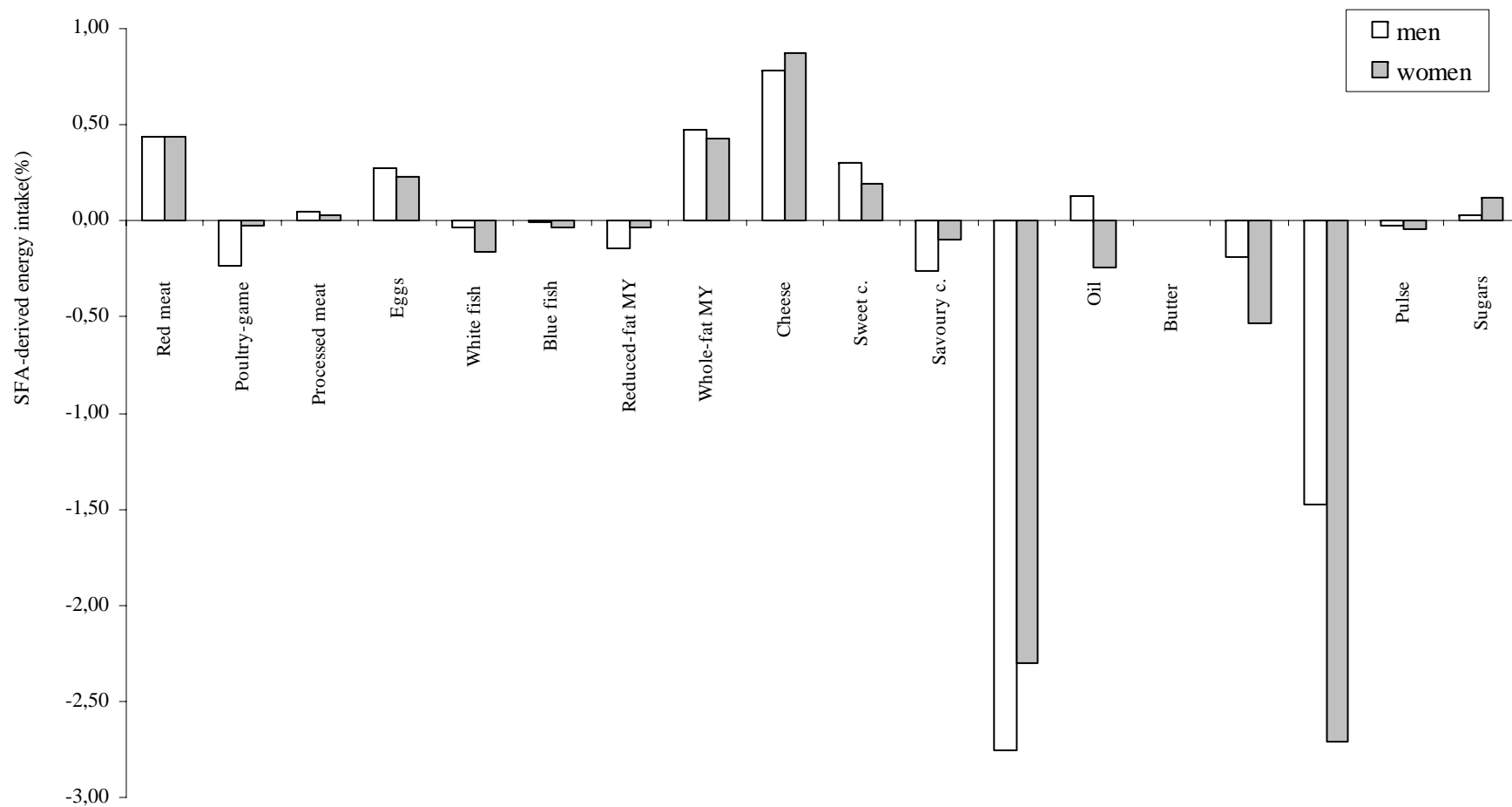


Figure 2. Change in the percentage of SFA-derived energy intake per relative portion of the population intake. Number of cases: men, 203; women, 313. Men: corrected $R^2 = 0.751$; constant of regression = 11.2. Women: corrected $R^2 = 0.795$; constant of regression = 12.8 . Reduced-fat MY- reduced-fat milk and yoghurt; Whole-fat milk - Whole-fat milk and yoghurt; Sweet c. = sweet cereals; Savoury c. = savoury c.; G. vegetables – green vegetables.

2.2.2. Compliance with the European and national nutritional objectives in a Mediterranean population

Título: Cumplimiento de los objetivos nutricionales europeos y nacionales en una población mediterránea

Autores: Isabel Bondia-Pons, Lluís Serra-Majem, Ana I. Castellote, M. Carmen López-Sabater

Año: 2007

Revista: European Journal of Clinical Nutrition

Estado: *in press* (14 Feb; 1-10)

Resumen:

La promoción de hábitos alimentarios adecuados, a través de modelos de dieta saludable tales como los aportados por la dieta mediterránea tradicional, constituye uno de los componentes principales de las estrategias de promoción de la salud. Los objetivos nutricionales para la población española se basan, por tanto, en el desarrollo de recomendaciones nutricionales dentro de un contexto mediterráneo. Sin embargo, debido a diversos factores, principalmente de tipo social, cultural y económico, el cumplimiento de estas recomendaciones debe ser verificado periódicamente.

Con este objetivo, el presente estudio se basó en analizar el grado de cumplimiento de las actuales recomendaciones nutricionales europeas y españolas en una muestra representativa de la población catalana. Adicionalmente, se examinaron las relaciones entre la dieta y la composición plasmática de ácidos grasos de los 516 adultos participantes. Los resultados mostraron diferencias en la ingesta de nutrientes en función del sexo de los participantes. Las mujeres presentaron un mejor grado de cumplimiento con las recomendaciones nutricionales para AGMI y AGPI que los hombres. Por su parte, éstos los mostraron para los AGS y los carbohidratos. Sin embargo, el ratio AGS: AGMI: AGPI fue similar para ambos sexos. En ambos casos, el mayor grado de cumplimiento se observó para los objetivos nutricionales de consumo de sodio, calcio, y frutas y verduras. El estudio también mostró que determinados ácidos grasos plasmáticos están claramente asociados con el consumo de alimentos ricos en dichos componentes. Las correlaciones más elevadas se encontraron para los AGPI-CL n-3 y el pescado azul ($r_{\text{hombres}} = 0.36$; $r_{\text{mujeres}} = 0.42$; $P < 0.001$).

A pesar de que la población catalana parece cumplir con la mayoría de los objetivos nutricionales intermedios para la población española, sería recomendable una reducción en la ingesta de AGS y un aumento en la de carbohidratos, con el fin de reducir la creciente tendencia actual de sobrepeso y obesidad en la población mediterránea.

ORIGINAL ARTICLE

Compliance with the European and national nutritional objectives in a Mediterranean population

I Bondia-Pons¹, Ll Serra-Majem², AI Castellote¹ and MC López-Sabater¹

¹Department of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain and ²Department of Clinical Sciences, Center for Health Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

Objective: To analyze compliance with the current European and Spanish nutritional objectives in a representative sample from Catalonia, a Spanish Mediterranean region; and to examine relationships between diet and plasma fatty acid composition.

Design: Cross-sectional nutritional survey.

Setting: Population based random sample derived from the Catalan Nutrition Survey.

Subjects: A total of 516 healthy adult men ($n=203$) and women ($n=313$).

Methods: Dietary habits were assessed by means of a quantitative food frequency questionnaire. A physical exam included height, weight, waist and hip circumferences, and a fasting blood draw.

Results: Gender differences were observed in nutrient and energy intakes. Women showed a better compliance with the nutritional recommendations for monounsaturated fatty acid (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA) than did men. Men showed a better compliance for saturated fatty acid (SFA) and carbohydrate than did women. However, the SFA:MUFA:PUFA ratio was similar in both gender (1.6:2.3:1.0 for men; 1.7:2.5:1.0 for women). The highest compliance was observed for nutritional goals of sodium, calcium and fruit and vegetable intakes for both genders. In addition, the present study showed that levels of certain fatty acids in plasma are clearly associated with dietary intake of foods rich in these components. The highest correlations were found for $n-3$ long chain polyunsaturated fatty acids with blue fish intake in both men and women ($r_{\text{men}}=0.36$ and $r_{\text{women}}=0.42$; $P<0.001$).

Conclusions: The diet followed in Catalonia seems to ensure compliance with most of the intermediate nutritional objectives for the Spanish population. However, a reduction in the SFA intake and an increase in the carbohydrate intake could be recommended in order to reduce the current prevalence of overweight and obesity in this Mediterranean region.

Sponsorship: This study was supported by the Catalan Department of Health, the Nutrition Catalan Centre of the Institute of Catalan Studies, and Mercadona SA.

European Journal of Clinical Nutrition advance online publication, 14 February 2007; doi:10.1038/sj.ejcn.1602662

Keywords: Spanish nutritional objectives; European nutritional objectives; plasma fatty acids; Mediterranean diet

Correspondence: Dr MC López-Sabater, Department of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, Barcelona E-08028, Spain.
E-mail: mclopez@ub.edu

Contributors: IB was responsible of the laboratory analysis, the interpretation of dietary and biochemical data, the statistical analysis, and the writing of the paper. SL participated in the study design, supervised the collection of dietary data and revised the paper providing expert advice on data interpretation. AIC supervised the laboratory analysis and quality control, and provided expert advice on data interpretation. MCL participated in the study concept and design and provided expert advice on data interpretation and in the discussion of the paper. None of the authors had any conflicts of interest in connection with this study.

Received 17 August 2006; revised 14 December 2006; accepted 18 December 2006

Introduction

Nutrition is recognized as one of the major health determinants. It is currently estimated in the scientific community that an unhealthy diet and a sedentary lifestyle may be responsible for up to one-third of the cases of cancers, and for premature deaths due to cardiovascular diseases (Kafatos and Codrington, 2003). Nutrition is also an important determinant for the prevalence of obesity, which continues to rise in the European community both among children and adults (Aranceta-Bartrina *et al.*, 2003; York *et al.*, 2004).

Promoting adequate eating habits, which follow healthy dietary models, constitutes one of the most important

components within health promotion strategies (Tur *et al.*, 2005). A clear example of a healthy dietary pattern is the 'traditional' Mediterranean diet, which has been shown to be protective against mortality for several causes and the development of coronary heart disease, stroke, hypertension and other chronic diseases (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2002; Psaltopoulou *et al.*, 2004; Sanchez-Villegas *et al.*, 2005; Trichopoulou *et al.*, 2005). The nutritional objectives for the Spanish population are therefore based in the development of dietary guidelines within a Mediterranean context (Serra-Majem and Aranceta, 2001). However, the compliance with these nutritional goals should be periodically verified. Having in mind that Catalonia is one of the Spanish regions where the percentage of immigration is higher than the 10%, changes in eating habits and food consumption introduced by the increasing multicultural population could affect the Mediterranean dietary patterns in a near future.

Therefore, the main aim of the present work was to analyze compliance with the current European and Spanish nutritional objectives in a representative sample from Catalonia, a Spanish Mediterranean region. In addition, relationships between diet and plasma fatty acid composition were examined.

Subjects and methods

Subjects

The subjects were a subgroup of a larger sample (1600 subjects) randomly recruited in Catalonia, a Mediterranean region in north-western Spain, for a cross-sectional nutritional survey (Junca *et al.*, 2003). The primary objective of the survey was to collect relevant information on the dietary habits of the Catalan population and assess their food consumption patterns. A third part of the participants agreed to have blood drawn and underwent physiological and anthropometric measurements in a clinical session after informed consent. Of these 533 Catalans, 17 did not fast for >12 h before blood sampling and were therefore excluded. The final sample consisted of 516 subjects, 203 men and 313 women. The study protocol was approved by the regional ethics committee, following the Declaration of Helsinki 1975 standards.

Anthropometric measurements

The anthropometric measures used in this study were: height (m), weight (kg), body mass index (BMI, calculated as weight in kg/height² in m) waist and hip circumferences (HC), and waist-hip ratio (WHR).

Height was determined using a mobile anthropometer to the nearest millimeter. Body weight was determined to the nearest 100 g using a digital scale. Waist and HC were measured using a non-stretchable measuring tape. Waist circumference (WC) was measured at the navel in men, and midway between the bottom of the ribs and the top of the

hip bone in women. HC was measured at the tip of the hip bone in men, and at the widest point between the hips and the buttocks in women. Prevalence of overweight and obesity was calculated according to previously described cutoff limits (Aranceta-Bartrina *et al.*, 2005).

Nutrition data

Data on food intake were obtained with the use of a quantitative food-frequency questionnaire (FFQ), which was previously validated (Martín Moreno *et al.*, 1993) and applied to other Spanish regions (Serra-Majem *et al.*, 1994, 1999; Tur *et al.*, 2004). The FFQ, which asked the subject to recall average use over the past years, consisted of 92 food items. The FFQ was arranged by food type and meal pattern. Frequency categories were based on the number of times that items were consumed per day, week or month. Consumption less than once a month was considered no consumption. Daily consumption in grams was determined by dividing the reported amount of the intake by the frequency in days. The relevant period of consumption of seasonal items was also taken into account. Edible fractions of foods were recorded in the database. Food values were converted into nutrient values by validated software developed by the Centre of Nutrition and Dietetics CESNID based on Spanish tables of food composition (Cervera, 2003).

Plasma fatty acid analysis

Blood samples were collected after fasting of the subjects for 12 h. Plasma was stored at -80°C before analyses. The fatty acid profile was determined by fast gas chromatography (fast GC) with a previous derivatization to their corresponding fatty acid methyl esters (Bondia-Pons *et al.*, 2004). Briefly, 100 µl plasma samples containing a known amount of tridecanoic acid as an internal standard were saponified with sodium methylate. After esterification with borontrifluoride-methanol, the fatty acid profile was determined by capillary fast GC. Results were expressed as relative percentages of total fatty acids.

Statistical analysis

Analyses were performed with SPSS version 12.0. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The unpaired Student's *t*-test was used to test differences between groups for variables following normality, and χ^2 tests were performed for the rest of variables. Partial correlation coefficients between food groups and plasma fatty acids were calculated for each sex, adjusting by age. From the original correlation matrix that included all possible correlations between 50 food groups and the 29 fatty acid (25 individual fatty acids plus the four fatty groups saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA), polyunsaturated fatty acid (PUFA) and long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), food item correlations were not considered when at least three of the

following conditions occurred: food group with very low fat content, very low intake of a particular food group, high heterogeneity (in terms of nutrient density and fat content) of foods within a group, correlation with $P > 0.01$ and inconsistency between the results for the two sexes.

Results

Anthropometric characteristics of study participants are shown in Table 1. The high prevalence of overweight in men agreed with their average BMI, which was higher than the recommended value of 25 kg/m^2 . Prevalence of obesity was similar between genders. Women showed a higher prevalence of risk values for WC than men, whereas men showed a higher prevalence of risk values for WHR.

Table 2 shows daily intakes of energy and nutrients in men and women. Energy intake was significantly higher in male than in female subjects, but no significant difference was observed for energy intake per kg body weight. The contribution of carbohydrate to energy was higher in men, obtaining more energy from complex carbohydrate than did women. The percentage of energy intake from animal source protein was higher for women, oppositely to the protein energy intake from vegetable source, which was higher for men. The contribution of total fat and monounsaturated fat to energy was higher for women. No significant differences were observed in saturated and polyunsaturated fat. The mineral and vitamin intake was similar for both gender, with only significant higher intakes of iron and niacin in men.

The population goals for nutrients consistent with prevention of major public health problems in the European countries (Kafatos and Codrington, 2003) and the intermediate nutritional objectives for the Spanish population (Serra-Majem and Aranceta, 2001) are shown in Table 3. The percentage of compliers in the Catalan sample with the former objectives can be seen in Table 4. Spanish inter-

mediate objectives were chosen for this comparison as 25% of the Spanish population is already supposed to meet these goals (Tur *et al.*, 2005). However, for carbohydrate and SFA, less than 25% of the subjects met the nutritional requirements. The European goals for total fat and carbohydrate intake were accomplished by less than a 10% of the Catalan sample. However, European goals for sodium and fruits and vegetables intakes were followed by more than the 75% of the Catalan participants. When comparing compliance between genders, women presented significant higher percentages of compliance for all components under study, except for the dietary fiber, total and saturated fat, carbohydrate and protein intake.

In order to examine relationships between diet and plasma fatty acid composition, partial correlation coefficients between food groups and plasma fatty acids were calculated for each gender after adjustment by age. Tables 5 and 6

Table 1 Anthropometric characteristics and prevalence of obesity and overweight of study participants (mean \pm s.d.)

	Total (n = 516)	Men (n = 203)	Women (n = 313)
BMI, kg/m^2	25.4 \pm 4.8	26.3 \pm 4.0**	24.8 \pm 5.2
Prevalence of overweight, %	35.0	47.8*	26.8
Prevalence of obesity, %	17.8	17.7	17.8
WC, cm	85.8 \pm 13.6	92.6 \pm 11.7*	81.5 \pm 12.9
WC > cutoff limits, %	30.3	21.6*	36.7
HC, cm	101.5 \pm 9.7	101.8 \pm 7.4	101.5 \pm 9.7
WHR	0.8 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1*	0.8 \pm 0.1
WHR > cutoff limits	11.2	12.8*	10.2

Abbreviations: HC, hip circumference; WC, waist circumference; WHR, waist-hip ratio.

Significant differences between men and women: * $P < 0.001$; ** $P < 0.01$.

Cutoff limits: men's WC > 102 cm, women's WC > 88 cm.

Cutoff limits: men's WHR > 1, women's WHR > 0.90.

Table 2 Daily intakes of energy and nutrients (mean \pm s.d.) in Catalan men and women

	Men (n = 203)		Women (n = 313)	
	Mean	s.d.	Mean	s.d.
Energy (kcal)	2244.2	686.2	1981.9**	542.7
Energy (MJ)	9.4	2.9	8.3**	2.3
Energy (kJ/kg body weight)	123.1	43.0	129.3	43.5
Protein (% energy)	18.3	3.0	18.9	3.1
Animal source protein (% energy)	12.5	3.2	13.5**	3.4
Vegetable source protein (% energy)	5.8	1.1	5.4**	1.1
Carbohydrate (% energy)	44.6	6.2	42.5**	5.7
Sugar (% energy)	20.4	6.2	20.6	5.5
Complex carbohydrate (% energy)	24.2	5.7	22.0**	5.5
Fiber (g)	25.4	9.0	24.0	7.6
Fiber/energy (g/MJ)	2.8	0.8	3.0	0.8
Total fat (% energy)	37.1	6.1	38.5**	5.5
SFA (% energy)	12.0	2.7	12.6	2.8
MUFA (% energy)	17.4	4.1	18.5*	3.5
PUFA (% energy)	7.6	2.5	7.4	2.4
Cholesterol (mg)	319.5	136.8	299.0	115.7
Cholesterol energy (mg/MJ)	33.8	8.7	36.1	10.0
Folate (μg)	346.4	127.6	343.1	111.6
Calcium (μg)	1043.1	500.7	1044.8	425.4
Sodium (mg)	4961.8	1748.5	4660.4	1635.3
Zinc (mg)	10.3	3.7	9.7	3.0
Phosphor (mg)	1508.7	559.2	1442.4	456.7
Iron (mg)	14.5	4.5	13.5**	3.8
Vitamin A (μg)	1237.0	818.4	1367.0	899.2
Vitamin B1 (mg)	1.4	0.5	1.4	0.4
Vitamin B2 (mg)	1.8	0.8	1.8	0.7
Vitamin B6 (mg)	2.3	0.9	2.2	0.7
Vitamin B12 (μg)	8.4	4.7	7.8	4.5
Vitamin C (mg)	167.8	88.2	175.6	76.1
Vitamin D (μg)	3.8	2.9	3.7	2.9
Vitamin E (μg)	12.9	5.6	12.6	4.9
Retinoids (μg)	438.2	471.8	445.4	514.8
Niacin (mg)	22.2	7.8	20.5**	6.5

Abbreviations: MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid.

Significant differences between men and women (* $P < 0.01$; ** $P < 0.001$) by unpaired Student's *t*-test.

Table 3 Nutritional objectives for the European and Spanish populations

	Europe ^a	Spain ^b
Dietary fiber (g/day)	>25	>22
Folate (μ g/day)	>400	>300
Calcium (mg/day)	\geq 800	—
Sodium (g/day)	<6	—
Total fat (% energy)	<30	<35
SFA (% energy)	<10	—
MUFA(% energy)	—	>20
PUFA (% energy)	4-8	5
Cholesterol (mg/day)	—	<300
Carbohydrate (g/day)	>55	>50
Fruit (g/day)	>400	>300
Vegetables (g/day)	—	>250

Abbreviations: MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid.

^aNutritional objectives consistent with the prevention of major public health problems in Europe according to (Kafatos and Codrington, 2003).

^bIntermediate nutritional objectives for the Spanish population according to (Serra-Majem *et al.*, 2003).

Table 4 Percentage of compliers in the Catalan sample with the nutritional objectives

	All (n=516)	Men (n=203)	Women (n=313)
Dietary fiber ^a	43.2	47.8	40.3
Folate ^a	27.9	27.1	28.4
Calcium ^{a,b}	65.9	61.6	68.7
Sodium ^a	78.3	73.9	81.2
Total fat ^b	29.3	35.0	25.6
Total fat ^a	7.0	11.3	4.2
SFA ^{a,b}	20.9	25.6	17.9
MUFA ^b	29.1	25.1	31.6
PUFA ^a	62.0	60.6	62.9
Carbohydrate ^b	12.0	16.3	9.3
Carbohydrate ^a	2.7	5.9	0.6
Protein ^c	11.4	14.8	9.3
Cholesterol ^b	52.9	49.8	55.0
Fruit ^b	51.0	46.8	53.7
Vegetables ^b	56.8	53.2	59.1
Fruit and vegetables ^a	76.7	72.4	79.6
Fish ^d	26.0	24.6	26.8
Olive oil ^e	43.4	42.9	43.8

Abbreviations: MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid.

All differences between gender percentages are statistically significant (χ^2 test; $P<0.05$).

^aCompliers according to the European nutritional goals.

^bCompliers according to the intermediate Spanish nutritional goals.

^cCompliers according to <15% protein daily intake.

^dCompliers according to >100 g/day of fish intake.

^eCompliers according to the cutoff point of olive oil intake for the higher quartile (>27 ml/day).

respectively show the significant correlations for men and women. The highest correlation was obtained for blue fish and the *n*-3 LC-PUFA ($r_{\text{men}}=0.36$ and $r_{\text{women}}=0.42$; $P<0.001$).

Table 5 Partial correlation coefficients (*r*) between food groups and plasma fatty acids for men, adjusted by age

Food group	Fatty acid (r, P)
Oils	
Olive oil	MUFA (0.25, 0.001), C18:1 <i>n</i> -9 c (0.25, 0.001), PUFA (−0.30, 0.001), C18:2 <i>n</i> -6 c (−0.33, 0.001)
Sunflower oil	MUFA (−0.29, 0.001), C18:1 <i>n</i> -9 c (−0.31, 0.001), PUFA (0.30, 0.01), C18:2 <i>n</i> -6 c (0.22, 0.001)
Fish and seafood	
Blue fish	<i>n</i> -3 LC-PUFA (0.36, 0.001), C20:5 <i>n</i> -3 (0.28, 0.001), C22:6 <i>n</i> -3 (0.34, 0.001)
White fish	<i>n</i> -3 LC-PUFA (0.34, 0.001), C20:5 <i>n</i> -3 (0.21, 0.001), C22:6 <i>n</i> -3 (0.36, 0.001), C22:5 <i>n</i> -3 (0.16, 0.04), C22:6 <i>n</i> -3 (0.25, 0.001)
Molluscs	<i>n</i> -3 LC-PUFA (0.25, 0.001), C20:5 <i>n</i> -3 (0.16, 0.02), C18:0 (−0.15, 0.03), C18:2 <i>n</i> -6 (−0.17, 0.01)
Crustaceans	<i>n</i> -3 LC-PUFA (0.26, 0.001), C20:5 <i>n</i> -3 (0.21, 0.02), C20:5 <i>n</i> -3 (0.21, 0.02), C22:6 <i>n</i> -3 (0.25, 0.001), C18:0 (−0.23, 0.001), C18:2 <i>n</i> -6 (−0.16, 0.02)
Meat	
Beef	PUFA (−0.20, 0.01), C16:0 (0.26, 0.001), C16:1 (0.20, 0.01), C18:2 <i>n</i> -6 c (−0.19, 0.01), C18:3 <i>n</i> -6 (0.21, 0.001)
Veal	C16:0 (0.16, 0.05), C18:1 <i>n</i> -9 (0.14, 0.04), C18:2 <i>n</i> -6 c (−0.15, 0.04)
Pork	C20:4 <i>n</i> -6 (0.17, 0.03)
Alcohol	
Red wine	C17:0 (−0.14, 0.05), C18:0 (−0.17, 0.02)

Table 6 Partial correlation coefficients (*r*) between food groups and plasma fatty acids for women, adjusted by age

Food group	Fatty acid (r, P)
Oils	
Olive oil	MUFA (0.22, 0.001), C18:1 <i>n</i> -9 c (0.19, 0.001), PUFA (−0.20, 0.001), C18:2 <i>n</i> -6 c (−0.23, 0.001)
Sunflower oil	MUFA (−0.27, 0.001), C16:1 (−0.13, 0.02), C18:1 <i>n</i> -9 c (−0.26, 0.001), PUFA (0.21, 0.01), C18:2 <i>n</i> -6 c (0.17, 0.001)
Fish and seafood	
Blue fish	<i>n</i> -3 LC-PUFA (0.42, 0.001), C20:5 <i>n</i> -3 (0.33, 0.001), C22:6 <i>n</i> -3 (0.40, 0.001)
White fish	<i>n</i> -3 LC-PUFA (0.24, 0.001), C20:5 <i>n</i> -3 (0.21, 0.001), C22:6 <i>n</i> -3 (0.21, 0.001)
Molluscs	<i>n</i> -3 LC-PUFA (0.21, 0.001), C20:5 <i>n</i> -3 (0.16, 0.02), C22:5 <i>n</i> -3 (0.15, 0.01), C22:6 <i>n</i> -3 (0.21, 0.001)
Crustaceans	<i>n</i> -3 LC-PUFA (0.16, 0.01), C20:5 <i>n</i> -3 (0.14, 0.05), C22:6 <i>n</i> -3 (0.16, 0.01)
Meat	
Beef	C18:3 <i>n</i> -6 (0.14, 0.02), C20:4 <i>n</i> -6 (0.12, 0.04)
Veal	C16:1 (−0.12, 0.05)
Pork	C20:4 <i>n</i> -6 (0.12, 0.04)
Dairy products	
Cheese	C14:0 (0.13, 0.04)

Discussion

There are certain gender differences in the intake of energy and nutrients in the Catalan population according to the present study. Women showed a better compliance with the nutritional recommendations for MUFA and PUFA than did men. For MUFA, this could be attributed to the higher olive oil intake by women (median value: 24.2 vs 22.6 ml/day; $P < 0.01$), which agreed with a higher oleic acid intake. The significantly higher white fish consumption (median value: 30.2 vs 28.3 g/day; $P < 0.01$) could explain the higher *n*-3 LC-PUFA intake in women than in men. However, less than 20% of women accomplished the nutritional goals for SFA. This is probably due to the high dairy products intake in women (median value: 414 g/day (women) vs 369 g/day (men); $P < 0.01$).

Nevertheless, the SFA:MUFA:PUFA ratio was similar for both gender (1.6:2.3:1.0 for men; 1.7:2.5:1.0 for women). Martinez-Gonzalez *et al.* (2002) considered a ratio of 1:2:1 as healthy (Capita and Alonso-Calleja, 2003). Our results suggest that a decrease in saturated fat should be recommended in the Catalan population. However, the 12% of energy derived from SFA found in the present study is still lower than the percentage found in other European populations (Slimani *et al.*, 2002; Capita and Alonso-Calleja, 2003; Waijers *et al.*, 2006) even in the Mediterranean region (Ferro-Luzzi *et al.*, 2002).

The low compliance in the carbohydrate recommendations in the Catalan sample has also to be pointed out. Less than 1% women and less than 6% men accomplished the nutritional objective of obtaining more than the 55% of energy intake from carbohydrates. The higher percentages of fat-derived energy intake in Mediterranean countries than in the rest of Europe, mainly because of their olive oil culture, should not be a reason for reducing the intake of carbohydrate in the Mediterranean region. Even reducing the nutritional goals of carbohydrate to 50% of the energy intake, only 12% of the subjects accomplished them. Particular emphasis should be therefore be placed on reaching the intermediate objectives for this macronutrient. However, this objective must be accomplished without increasing the current high intake derived from sugar. More than 45% of the carbohydrate-derived energy comes from sugar and it should be balanced with higher intakes of complex carbohydrates and fiber.

Reducing the total SFA and sugar intake could help to reduce the high prevalence of overweight people in Catalonia.

It is well known that a healthy characteristic in the 'traditional Mediterranean diet' is the high consumption of fresh fruits and vegetables. The present study confirmed that more than 75% of the Catalan people accomplish the European nutritional goals for both fruits and vegetables. It is worth noting that the current average intake of 2–3 portions of fruit per day was not achieved by Catalan in the last decade (Serra-Majem *et al.*, 1999; Cuco *et al.*, 2002). The same fact occurs nowadays in other Mediterranean regions,

where the compliance for the intake of fruits and vegetables does not even arrive to 20% (Tur *et al.*, 2004).

The high compliance of the nutritional goals found in the Catalan sample encouraged us to look for possible relationships between food groups and plasma fatty acid composition. We are concerned that the fatty acids from plasma phospholipids have been reported to reflect dietary intake data over longer time than total plasma fatty acids do (Arab, 2003). However, in the recent years, some authors have successfully found correlations when analyzing total plasma fatty acids (Amiano *et al.*, 2001, 2002; Wakai *et al.*, 2005). The easiness of the selected method of analysis (Bondia-Pons *et al.*, 2004), which combines no previous step of lipid extraction added to savings in the analysis time by fast GC, was the main reason to choose the determination of total fatty acids for our study. The coefficients of correlation (r) were not too high, but for many correlations the P -value was 0.001. Furthermore, the r -values were in the same range that those found by Fusconi *et al.* (2003) when studying the relationship between food and plasma phospholipid fatty acids in healthy Mediterranean subjects from Italy eating freely chosen diet.

Biomarkers such as plasma fatty acids can be directly influenced by the intake of certain dietary components, or there may be an indirect relationship between them because of the influence of lifestyle. Both types of association have different epidemiological and biological implications.

According to the present work, plasma MUFA levels in general, and oleic acid in particular, were significantly associated with olive oil consumption. The first time that these non-essential plasma fatty acids were related to their dietary source in a population eating a varied and freely chosen diet was observed in plasma phospholipid fatty acids in 2003 (Fusconi *et al.*, 2003). Our study suggests a similar outcome when analyzing total plasma fatty acids. It is also interesting to point out a clear inverse relation between olive oil consumption and *n*-6 PUFA levels in plasma. This fact suggests that people eat olive oil or seed oils, but not both.

Long-chain *n*-3 fatty acids were associated with fish and seafood consumption. This correlation has been widely studied in phospholipid fatty acids (Dewailly *et al.*, 2003; Laidlaw and Holub, 2003; Mozaffarian *et al.*, 2005) but little information has still been reported for total fatty acids. A recent study conducted in Japan, one of the areas with the highest fish consumption in the world, examined the association between the intake frequency of fish with long-chain *n*-3 fatty acids in serum of 1257 subjects (Wakai *et al.*, 2005) and the calculated coefficients of correlation were lower than the found in the present study. Other authors successfully examined correlations between fish intake and total fatty acids in plasma with coefficients of correlation in the range of those found in studies where phospholipid fatty acids were determined (Amiano *et al.*, 2001).

Meat consumption was not clearly associated with plasma fatty acids. Nevertheless, some reported correlations were

also observed in the present study, but all of them with levels of significance of $P < 0.05$. They were beef and C20:4n-6 (Sinclair *et al.*, 1994; Fusconi *et al.*, 2003) and veal and C18:1 n-9 (Chajès *et al.*, 2001).

Myristic acid (14:0) levels and cheese were as well correlated in women for a $P < 0.05$. Myristic acid is a ubiquitous fatty acid that also constitutes more than 12% of cow's milk fat.

Alcohol intake was inversely correlated with levels of 17:0 and 18:0 fatty acids. C17:0 is not synthesized endogenously but comes from dairy products. The mutual exclusivity of wine and milk consumption has been previously observed (Fusconi *et al.*, 2003) and the association is probably best explained by assuming that those who drink alcohol do not consume dairy products. No other significant correlations were obtained between plasma fatty acids and food groups.

To sum up, the diet followed in Catalonia seems to ensure compliance with most of the intermediate nutritional objectives for the Spanish population. However, it should be recommended a reduction in the SFA intake and an increase in the carbohydrate intake. These changes in the dietary habits, in addition to non-sedentary lifestyles, could positively influence the reduction of the prevalence of overweight and obese people in this Mediterranean region.

In addition, this study showed that levels of certain plasma fatty acids are clearly associated with dietary intake of foods rich in these components.

Acknowledgements

We are grateful to the Public Health Division of the Department of Health of the Autonomous Government of Catalonia for providing the blood samples for the study. We thank Mr L Moshell for the English paper correction. We also thank the Spanish Ministry of Education for the FPU PhD-grant to Isabel Bondia-Pons.

References

- Amiano P, Dorransoro M, de Renobales M, Ruiz de Gordoa JC, Irigoien I, EPIC Group of Spain (2001). Very-long-chain omega-3 fatty acids as markers for habitual fish intake in a population consuming mainly lean fish: the EPIC cohort of Gipuzkoa. European prospective investigation into cancer and nutrition. *Eur J Clin Nutr* **55**, 827–832.
- Amiano P, Dorransoro M, Larranaga N, Renobales M, Ruiz de Gordoa JC (2002). Very-long-chain omega-3 fatty acids as markers for habitual fish intake in Spain. *IARC Sci Publ* **156**, 201–202.
- Arab L (2003). Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr* **133**, 925S–9932S.
- Aranceta-Bartrina J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, *et al.*, Grupo colaborativo para el Estudio de la Obesidad en España (2003). Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study. *Med Clin (Barcelona)* **120**, 608–612.
- Aranceta-Bartrina J, Serra-Majem L, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B, Grupo Colaborativo SEEDO (2005). Prevalence of obesity in Spain. *Med Clin (Barc)* **125**, 460–466.
- Bondia-Pons I, Castellote AI, Lopez-Sabater MC (2004). Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J Chromatogr B* **809**, 339–344.
- Capita R, Alonso-Calleja C (2003). Intake of nutrients associated with an increased risk of cardiovascular disease in a Spanish population. *Int J Food Sci Nutr* **54**, 57–75.
- Cervera P (2003). *Food Composition Tables of CESNID (The Centre for Superior Studies in Nutrition and Dietetics) (in Spanish)*. McGraw-Hill Ed.: Barcelona, Spain, 1–256.
- Cuco G, Fernandez-Ballart J, Marti-Henneberg C, Arija V (2002). The contribution of foods to the dietary lipid profile of a Spanish population. *Public Health Nutr* **5**, 747–755.
- Chajès V, Elmstahl S, Martínez-García C, Van Kappel AL, Bianchini F, Kaaks R *et al.* (2001). Comparison of fatty acid profile in plasma phospholipids in women from Granada (southern Spain) and Malmö (southern Sweden). *Int J Vitam Nutr Res* **71**, 237–242.
- Dewailly E, Blanchet C, Gingras S, Lemieux S, Holub BJ (2003). Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Quebec (Canada). *Lipids* **38**, 359–365.
- Ferro-Luzzi A, James WP, Kafatos A (2002). The high-fat Greek diet: a recipe for all? *Eur J Clin Nutr* **56**, 796–809.
- Fusconi E, Pala V, Riboli E, Vineis P, Sacerdote C, Del Pezzo M *et al.* (2003). Relationship between plasma fatty acid composition and diet over previous years in the Italian centers of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Tumori* **89**, 624–635.
- Junca S, Guillen M, Aragay JM, Brugulat P, Castell C, Seculi E *et al.* (2003). Methodological aspects in the evaluation of health and risk-reduction objectives of health plan for Catalonia for the year 2000. *Med Clin (Barcelona)* **121**, 10–19.
- Kafatos AG, Codrington CA (2003). The EURODIET initiative and health promotion prospects: the case of Greece. *Forum Nutr* **56**, 106–118.
- Laidlaw M, Holub BJ (2003). Effects of supplementation with fish oil-derived. *Am J Clin Nutr* **77**, 37–42.
- Martín Moreno JM, Boyle P, Gorgojo PM, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, Willet WC (1993). Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol* **22**, 512–519.
- Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Marti A, Martinez JA, Martin-Moreno JM (2002). Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr* **41**, 153–160.
- Mozaffarian D, Bryson CL, Lemaitre RN, Burke GL, Siscovick DS (2005). Fish intake and risk of incident heart failure. *J the Am Coll Cardiol* **45**, 2015–2021.
- Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A (2004). Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* **80**, 1012–1018.
- Sanchez-Villegas A, Bes-Rastrollo M, Martinez-Gonzalez MA, Serra-Majem L (2005). Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: the SUN cohort. *Int J Obes Relat Metab Disord* **30**, 350–358.
- Serra-Majem L, Aranceta J, on behalf of the SENC Working Group on Nutritional Objectives for the Spanish Population, Spanish Society of Community Nutrition (2001). Nutritional objectives for the Spanish population. Consensus from the Spanish society of community nutrition. *Public Health Nutr* **4**, 1409–1413.
- Serra-Majem L, Armas-Navarro A, Ribas-Barba L, on behalf of the research group ENCA 1997–1998 (1999). Nutritional survey of the Canary Islands. *Dietary Habits and Intake of Food (in Spanish)* vol. 1. Canarian Health Service Report: Santa Cruz de Tenerife. pp 1–244.
- Serra-Majem L, de la Cruz JN, Ribas L, Tur JA (2003). Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr* **57**, S2–S7.

- Serra-Majem L, Morales D, Domingo C, Caubet E, Ribas L, Nogués RM (1994). Comparison of two dietary methods: 24-h recall and semiquantitative food frequency questionnaire. *Med Clin (Barcelona)* **103**, 652–656.
- Serra-Majem L, Ribas L, Ramon JM (1999). Compliance with dietary guidelines in the Spanish population. Results from the Catalan Nutrition Survey. *Br J Nutr* **81** (Suppl 2), s105–s112.
- Sinclair AJ, Johnson L, O'Dea K, Holman RT (1994). Diets rich in lean beef increase arachidonic acid and long-chain omega 3 polyunsaturated fatty acid levels in plasma phospholipids. *Lipids* **29**, 337–343.
- Slimani N, Fahey M, Welch AA, Wirfalt E, Stripp C, Bergstrom E *et al.* (2002). Diversity of dietary patterns observed in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) project. *Public Health Nutr* **5**, 1311–1328.
- Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D (2005). Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch Intern Med* **165**, 929–935.
- Tur JA, Romaguera D, Pons A (2004). Food consumption patterns in a Mediterranean region: does the Mediterranean diet still exist? *Ann Nutr Metab* **48**, 193–201.
- Tur JA, Romaguera D, Pons A (2005). Does the diet of the Balearic population, a Mediterranean-type diet, ensure compliance with nutritional objectives for the Spanish population? *Public Health Nutr* **8**, 275–283.
- Waijers PM, Ocke MC, van Rossum CT, Peeters PH, Bamia C, Chloptsios Y *et al.* (2006). Dietary patterns and survival in older Dutch women. *Am J Clin Nutr* **83**, 1170–1176.
- Wakai K, Ito Y, Kojima M, Tokudome S, Ozasa K, Inaba Y, *et al.*, JACC Study Group (2005). Intake frequency of fish and serum levels of long-chain *n*-3 fatty acids: a cross-sectional study within the Japan Collaborative Cohort Study. *J Epidemiol* **15**, 211–218.
- York DA, Rossner S, Caterson I, Chen CM, James WPT, Kumanyika S *et al.* (2004). Prevention conference VII: obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: group I: worldwide demographics of obesity. *Circulation* **110**, e463–e470.

2.2.3. *A priori* approach of the Mediterranean Diet in a population sample from coastal north-east Spain

Título: Aproximación metodológica *a priori* de la Dieta Mediterránea en una muestra de la población de la costa noreste de España

Autores: Isabel Bondia-Pons, Lluís Serra-Majem, Ana I. Castellote, Abel Mariné, M. Carmen López-Sabater

Estado: en revisión

Resumen:

El Índice de Calidad de la Dieta Mediterránea (M-DQI) consiste en una aproximación metodológica *a priori* utilizada para evaluar el grado de adherencia de una población al Patrón de Dieta Mediterránea.

El objetivo principal de este trabajo se basó en aplicar este M-DQI a una muestra representativa de la población catalana. El valor medio de dicho índice obtenido para la muestra (n = 621; 42% hombres y 58% mujeres) fue de 6.6 ± 2.3 (valor de la mediana = 7). Un 10% de los individuos mostraron una alta adherencia a la Dieta Mediterránea, mientras que tan sólo un 5% de los participantes fue incluido en la categoría de menor adherencia según los criterios de Gerber et al.

Se encontraron correlaciones significativas entre el M-DQI y la ingesta de diversas vitaminas, minerales y macronutrientes. Así mismo, el perfil lipídico de ácidos grasos, progresó de forma regular a través de las diferentes categorías del índice. EPA y DHA mostraron correlaciones negativas significativas con el M-DQI ($r = -0.410$ para EPA y -0.360 para DHA; $p < 0.01$). Paralelamente, se observó un aumento significativo de los ácidos oleico y α -linoléico plasmáticos, así como un descenso también significativo de los ácidos linoleico y araquidónico con el aumento de adherencia a la Dieta Mediterránea.

Finalmente se calcularon los valores de la mediana del M-DQI de acuerdo con las características clínicas de la muestra catalana estudiada, encontrándose un valor de 6.5 para los individuos sanos. Los fumadores presentaron el valor de mediana más elevado (7.1), mientras que los pacientes con artritis reumatoide mostraron el valor de mediana del M-DQI más bajo (6.0) entre los individuos con patologías diagnosticadas.

***A priori* approach of the Mediterranean Diet
in a population sample from coastal north-east Spain***

Isabel Bondia-Pons¹, Lluís Serra-Majem², Ana I. Castellote¹, Abel Mariné¹,
M. Carmen López-Sabater¹.

¹Dept. of Nutrition and Food Science, Reference Centre in Food Technology, Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain.

²Dept. of Clinical Sciences, Center for Health Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria,
PO Box 550, Las Palmas de Gran Canaria, E-35080 Las Palmas, Spain.

Corresponding author:

M. Carmen López-Sabater, PhD
Dept. of Nutrition and Food Science.
Faculty of Pharmacy. University of Barcelona
Av. Joan XXIII, s/n
E-08028 Barcelona, Spain.
Telephone number: +34-93 402 45 12
Fax number: +34-93 403 59 31
e-mail address: mclopez@ub.edu

* Study supported by Mercadona S.A. and the Centre Català de la Nutrició de l'Institut d'Estudis Catalans. The PhD-grant F.P.U. to Isabel Bondia-Pons has been given by the Spanish Ministry of Education.

Running title: The Mediterranean Dietary Quality Index in north-east Spain.

STRUCTURED ABSTRACT

Objective: To assess the quality of the current Mediterranean diet in the population from a coastal region from north-east Spain by applying the Mediterranean Diet Quality Index.

Design: Cross-sectional nutrition survey

Setting: Population based random sample derived from the Catalan Nutrition Survey

Subjects: A total of 621 healthy adults (42% men and 58% women)

Results: The Catalan representative sample presented a Mediterranean Diet Quality Index (M-DQI) mean value of $6,6 \pm 2,3$ (median value of 7). Ten percent of subjects showed high adherence to the Mediterranean diet, while only 5% were categorized as poorest adherence. Significant correlations were found between M-DQI and the intake of some macro and micronutrients. Furthermore, the plasma fatty acid profile progressed with perfect regularity throughout the index ranges. Both EPA and DHA presented significant correlation to the M-DQI ($r = -0.410$ for EPA and -0.360 for DHA; $p < 0.01$).

A significant increase in oleic and α -linoleic acid and a significant decrease in linoleic and arachidonic acid content were also observed while increasing the adherence to the Mediterranean diet pattern. The median values for the M-DQI, according to the clinical characteristics of the Catalan sample, were also calculated. The Mediterranean index of 6.5 obtained for the healthy subjects was taken as reference. Catalan smokers were those with the highest median value (7.1). Patients with rheumatoid arthritis showed the lowest median value among the participants suffering from the reported diagnosed diseases (6.0).

Conclusions: The current diet followed in Catalonia seems to agree with the main Mediterranean Diet characteristics according to the M-DQI standards.

KEY WORDS: Mediterranean diet quality index, plasma fatty acids, Mediterranean region, Nutritional Survey

¹**Abbreviations used:** CVD, cardiovascular disease; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentanoic acid; FFQ, food-frequency questionnaire; FV, fruits and vegetables; M-DQI, Mediterranean Dietary Quality Index, MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid.

INTRODUCTION

The Mediterranean diet is an eating pattern characterized by a lifestyle and culture that has been reported to contribute to better health and quality of life for those who adhere to it (1-6). Among its advantages, recent findings from large European cohort studies suggest that a high degree of adherence to the Mediterranean diet is associated with a significant reduction in mortality (7;8). The main components characterising this dietary pattern are a high intake of vegetables, fruits, pulse, olive oil, and non-refined cereals; a low intake of meat and saturated fats; a moderately high intake of fish, depending on the proximity to the sea; a low-to-moderate intake of dairy products; and a regular but moderate intake of wine, generally during meals.

Unfortunately, epidemiological evidence also suggests that dietary patterns in Mediterranean countries are changing rapidly, with increased consumption of animal products and saturated fat to the detriment of vegetable foodstuffs (9-11). A departure from the traditional diet might therefore be accompanied by the loss of its protective effects on health and a rise in diet-related diseases in the future (12-14). This hypothesis justifies the extensive work done by several authors in devising instruments based on current dietary guidelines for measuring an overall diet quality that reflects a risk gradient for major diet-related chronic diseases (7;15;16). With this purpose, Gerber and colleagues successfully devised a dietary quality index suitable for the evaluation of the Mediterranean dietary pattern (17). This index, known as the Mediterranean Dietary Quality Index (M-DQI), was

performed with the well-known Mediterranean Diet Score developed in the 90's by Trichopoulou *et al.* (18) in mind. One of the advantages of the M-DQI versus other *a priori* approaches was its validation with five biological markers (two vitamins and two fatty acids) in a representative population sample from the French Mediterranean. The index, applied in representative samples of the French (19); and the Croatian population(20), has not yet been applied to a Spanish Mediterranean population to the authors' knowledge.

Therefore, the aim of this study was to assess the quality of the diet of Catalonia, a Spanish coastal region, by using the M-DQI. In addition, taking into account the fatty acids used by Gerber *et al.* for the M-DQI validation, the global fatty acid profile was additionally examined along the different scores of the index in the Catalan sample.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The subjects were a subgroup of a larger sample (1600 subjects) randomly recruited in Catalonia, a coastal Mediterranean region in north-east Spain, for a cross-sectional nutritional survey (21). The primary objective of the survey was to collect relevant information on the dietary habits of the Catalan population and assess their food consumption patterns. The sampling technique included stratification according to geographical area and municipality size, age and sex of inhabitants. The participation rate (65%) in the present study can be regarded as representative of the adult population in Catalonia. Blood analysis and physiological and anthropometric measurements were obtained from 670 participants in a clinical session after informed consent. Only people who did not under-report their energy intake ($EI/BMR \geq 1.14$) were considered for food consumption analysis. Of these 641 Catalans, 20 did not fast for >12 h before blood sampling and were therefore excluded. The final sample consisted of 621 subjects, 261 men and 360 women. The study protocol was approved by the regional ethics committee, following the Declaration of Helsinki 1975 standards.

Lifestyle assessment and anthropometry

Smoking status was assessed by questionnaire during a face-to-face interview. Height (m) weight (kg), waist and hip circumferences (cm) were measured during the clinical session and the body mass index was calculated as weight (kg)/height (m²). The cut-off limits proposed by the International Diabetes Federation for the metabolic syndrome definition in relation to waist and hip circumference, blood pressure and HDL cholesterol were applied to the present work (22;23).

Only those diseases previously diagnosed and treated by a physician were taken into account for the evaluation of the clinical characteristics of the Catalan sample. For this study, healthy participants were defined as disease-free subjects with anthropometric values in the normal ranges.

Nutrition data

Data on food intake were obtained with the use of a food-frequency questionnaire (FFQ) which was previously validated (24) and applied to other studies on and surveys of the Spanish population (25-27). The FFQ, which asked the subject to recall average use over the past year, consisted of 92 items. The FFQ was arranged by food type and meal pattern. Frequency categories were based on the number of times that items were consumed per day, week or month. Consumption less than once a month was considered no consumption. Daily consumption in grams was determined by dividing the reported amount of the intake by the frequency in days. The relevant period of consumption of seasonal items was also taken into account. Edible fractions of foods were recorded in the database. Food values were converted into nutrient values by validated software developed by the Centre for Superior Studies in Nutrition and Dietetics CESNID, which is based on Spanish tables of food composition (28).

Mediterranean Diet Quality Index

The M-DQI is an adaptation of the “Diet Quality Index” to evaluate the MDP. In the M-DQI a score from 0 to 2 is assigned to each of the 7 food/nutrient groups (SFA, cholesterol, meat, olive oil, fish, cereals, and vegetables and fruits) according to the recommendations, when existing, or otherwise using the population intake tertiles to assign cut-off points. An explanation for the selection of variables has been previously reported (17). For the fish variable, both white and fatty fish were included. The cereal group consisted of all kinds of bread, pasta and breakfast cereals. Both cooked and raw red, yellow and green vegetables and all fresh fruit form the fruit and vegetables (FV) group. Other evaluated food groups, which are not components of the M-DQI were: alcohol (including beer, wine, liquor and spirits), pastries (including all kind of cakes, cookies and sweets) and dairy products (including all types of milk and yogurts, but not cheese, which was considered another food group on its own).

Plasma fatty acid analysis

Blood samples were collected after the subjects had fasted for 12 hours. Plasma was stored at -80°C before being analyzed. The fatty acid profile was determined by fast gas chromatography (fast-GC) with a previous derivatization to their corresponding fatty acid

methyl esters in total plasma (29) and in half of the sample plasma phospholipids (30). Results were expressed as relative percentages of total fatty acids.

Statistical Analysis

Analyses were performed with SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data are presented as means \pm SD. K-S tests were carried out to check normality of variables. General linear models were used to test differences between groups for variables following normality; Chi-square tests were performed for the rest of variables. Correlations were carried out using the Spearman rank correlation. For all analyses, 2-sided significance was determined at $P < 0.01$.

RESULTS

The mean age of the Catalan sample was $45,8 \pm 15,3$. Of the participants, 15% were older than 65y and a 17% were younger than 30y. There were higher percentages of men than women with overweight, type II diabetes and low HDL cholesterol levels (**Table 1**). On the contrary, women suffer more from thyroid, depression and rheumatoid arthritis than did men.

Table 2 shows the scores for the seven components of the M-DQI, together with those for the food groups of dairy products, cheese, pastries and alcohol beverages. The lower the M-DQI component score, the better adherence to the Mediterranean diet. In the Catalan sample, better scores were significantly observed for olive oil, fish and meat in women and for cereals in the case of men. The SFA intake was the component with the highest score for both genders, while cholesterol showed the lowest value.

The mean M-DQI value was $6,7 \pm 2,3$ for men and $6,5 \pm 2,3$ for women. The curve for the distribution of subjects according to score for the M-DQI (**Figure 1**), which is set to the centre, showed that the M-DQI median value was 7 for both genders, a total of 64% of subjects falling into the 0-7 score range, 62% of them being female. Neither the possible lowest (score 0) nor the highest score (score 14) was observed in any of the gender groups. According to Gerber et al. criteria, nearly 10% of both men and women presented the healthiest diet (score range 1-3) and 4% of women and 6% of men showed the poorest diet (score range 11-13).

Correlation coefficients with the M-DQI were calculated for the intake of macro and micronutrients (**Table 3**). Significant correlations were found for all macronutrients except for the PUFA intake. Vitamin C, E and folic acid and calcium, potassium, magnesium and iron were the vitamins and minerals significantly correlating with the M-DQI. The

correlation coefficients were in the range or even higher than other reported values (20). The coefficients of correlations for the five food group components of the index were as follows: -0.460 for olive oil; -0.600 for FV; -0.494 for fish; 0.346 for meat; and -0.302 for cereals (A $p < 0.001$ was observed in all cases). In addition, pulse (-0.270 ; $p < 0.001$), cheese ($r = 0.181$; $p < 0.01$) and pastries intake ($r = 0.230$; $p < 0.01$) significantly correlated with the M-DQI, but not dairy products or alcohol beverages.

Gerber and colleagues used the amount of eicosapentanoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) in erythrocytes to validate the M-DQI. As expected, when analyzing both long chain n-3 fatty acids in both plasma and phospholipids, EPA and DHA significantly increased the lower the M-DQI range was (**Table 4**). The same occurred with the oleic and α -linoleic acids. Linoleic and arachidonic acid variation was also significant but contrary to the aforementioned fatty acids. No other significant changes were observed for the rest of the plasma fatty acid profile. According to the age of the Catalan sample and for both genders, the older the subjects, the better M-DQI they had. Participants younger than 30y presented a M-DQI mean value of 7.7 ± 2.2 and those Catalans older than 65y a mean value of 5.6 ± 2.1 .

The M-DQI value for subjects of 31-50y did not differ significantly from that calculated for the youngest age group. However, it was significantly higher than the MDQ-I value for subjects aged 51-65y, which was in the same range as the index found for the elderly group.

Figure 2 shows the median values for the M-DQI according to the clinical characteristics of the Catalan sample. The Mediterranean index of 6.5 obtained for the healthy subjects was taken as reference. Catalan smokers were those with the highest median value. Patients with rheumatoid arthritis showed the lowest median value among the participants suffering from the reported diagnosed diseases.

DISCUSSION

The assessment of the quality of the Mediterranean diet in a coastal region from north-east Spain was evaluated by applying the Mediterranean Diet Quality Index. The Catalan sample presented a M-DQI mean value of $6,6 \pm 2,3$ (median value of 7), which according to the index developed by Gerber and co-workers is supposed to be the borderline value of classification for a good adherence to the Mediterranean diet (17). This *a priori* approach suggests that the current Catalan population still follows the Mediterranean dietary pattern. Recent studies have shown that adherence to the traditional Mediterranean diet is inversely associated with BMI and obesity (31;32).

This statement agrees with the results obtained for the Catalan sample, which interestingly presented more than half with a BMI higher than the value considered as normal (22). Together with the scores derived from the M-DQI components, we also examined the intake of other food groups of interest. The recent DAFNE databank study considers pulse as a characteristic food group of the Mediterranean diet, with Southern European countries recording considerable intakes (33). However, the consumption in the Catalan sample was only modest. Dairy products, cheese and pastries could be components contributing to the SFA intake, which was slightly higher to the recommended 10% of the total energy intake. According to Kant, most of the diet indexes tend to relate positively to the intake of critical micronutrients, while the association with the fat intake does not always go in the expected direction (12). In the present study, fat correlated positively to the index, as well as most of the macronutrients, vitamins, and minerals. It is interesting to point out the opposite correlation with the M-DQI of the protein intake, depending on its origin. While vegetable source was related to a better adherence to the Mediterranean pattern, the higher the animal source protein the higher the scores of M-DQI. The paradoxical positive association between calcium and M-DQI could be explained by the indirect relation among SFA intake and calcium derived from dairy products, cheese and pastries.

It is also noteworthy that the plasma fatty acid profile progressed with perfect regularity throughout the index ranges. Both EPA and DHA presented significant correlation with the M-DQI by analysing the total plasma lipid profile ($r = -0.410$ for EPA and -0.360 for DHA; $p < 0.01$) as well as a representative sample of the plasma phospholipids. These results agree with those observed by Gerber et al for both n-3 fatty acids in erythrocytes. Furthermore, our results also showed a significant increase in the oleic acid and α -linoleic acid and a significant decrease in the linoleic and arachidonic acid profiles while increasing the adherence to the Mediterranean diet pattern. The fact that Spain has always been characterized by a traditionally high intake of olive oil (1;34) and 92% of the MUFA present in foods is oleic acid (60-80% of oleic acid intake coming from olive oil (35) could be an explanation to this outcome. The nut intake, which beneficial effects for human health have been reported (36-38), is also characteristic of the Catalan population, a fact that could explain the increasing α -linoleic acid contents throughout the M-DQI categories. Our results also agree with the trend among the youngest generations to deviate from the healthy traditional Mediterranean dietary habits (39). Taking into account that childhood obesity is unfortunately one of the pandemics of the twenty-first century (40) and that inappropriate weight gain during early age has been reported to have an unhealthy impact on adulthood (41), young-aged groups of the population should be a priority target for nutrition interventions and new health dietary policies to eradicate and prevent a rise in obesity rates and diet-related diseases.

Some hypotheses were derived from the results found in relation to the M-DQI obtained according to diagnosed diseases in the Catalan sample. The fact that diabetic, hypertension and rheumatoid arthritic patients showed M-DQI values lower than healthy subjects could be explained, among other non-nutritional related factors, by the physicians' advice of increasing the adherence of the patients to the a healthy dietary pattern. Scientific evidence corroborates the healthy benefits derived from the adherence of diabetic patients to the traditional Mediterranean dietary pattern (42), as well as from the significant blood pressure reduction by changes in the consumption of fat by increasing the MUFA versus SFA intake in the adult population (43) and by increasing the intake of fruits and vegetables (44). Improvement of the health in patients from rheumatoid arthritis has been also associated with olive oil and fish supplementation (45) and with adherence to the MDP (46;47). In the Catalan sample, patients suffering from hypertension and from rheumatoid arthritis showed a significantly higher intake of olive oil than the rest of the subjects, while diabetics showed higher intakes of fruits and vegetables and nuts. In our opinion, and being aware of the complex factors that are involved in each of the aforementioned diseases as well as of the limitations of *a priori* approaches, our results support the statement that some diseases might be largely preventable by an appropriate lifestyle in which nutrition can play a powerful role (48). Recent data showing reduced prevalence of obesity (31), reduced CVD risk factors (49-51) and reduced mortality (2) in people adhering to a Mediterranean diet encourage the application of *a priori* approaches in order to control and identify those components which could play a more important role in the Mediterranean health status.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Public Health Division of the Department of Health of the Autonomous Government of Catalonia for providing the blood samples for the study. This study was supported by Mercadona S.A. and is part of the studies carried out by the Xarxa Temàtica en Nutrició (Generalitat de Catalunya) and the Centre Català de la Nutrició de l'Institut d'Estudis Catalans in relation to the Health Survey of Catalonia, ESCA 2002-2003. Special thanks to Mr. Moshell for the manuscript correction; and to the Spanish Ministry of Education for their PhD-grant to IB-P.

REFERENCES

- (1) Serra-Majem L, de la Cruz JN, Ribas L, Tur JA. Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr* 2003 Sep;57(Suppl 1):S2-S7.
- (2) Trichopoulou A. Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly: a review. *Public Health Nutr* 2004 Oct;7(7):943-7.

- (3) Sanchez-Villegas A, Bes-Rastrollo M, Martinez-Gonzalez MA, Serra-Majem L. Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: the SUN cohort. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2005 Oct 11;30(2):350-8.
- (4) Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Salas-Salvado J, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI, et al. Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2006 Jul 4;145(1):1-11.
- (5) Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, et al. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2006 Sep 5;145(5):333-41.
- (6) Bondia-Pons I, H.Schröder, M.I.Covas, A.I.Castellote, J.Kaikkonen, H.E.Poulsen, et al. A moderate consumption of olive oil in European healthy men reduced the systolic blood pressure in non-Mediterranean participants. *J Nutrition* 2007;137(1):84-7.
- (7) Knoops KT., Groot de LC, Fidanza F, Alberti-Fidanza A, Kromhout D, van Staveren W. Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *Eur J Clin Nutr* 2006 Jan 18;18:1-10.
- (8) Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* 2004 Oct 1;80(4):1012-8.
- (9) Tur JA., Romaguera D, Pons A. Does the diet of the Balearic population, a Mediterranean-type diet, ensure compliance with nutritional objectives for the Spanish population? *Public Health Nutr* 2005;8(3):275-83.
- (10) Moreno LA., Sarria A, Popkin BM. The nutrition transition in Spain: a European Mediterranean country. *Eur J Clin Nutr* 2002 Oct;56(10):992-1003.
- (11) Trichopoulou A. Mediterranean diet: the past and the present. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11(S4):1-4.
- (12) Kant AK. Dietary patterns and health outcomes. *Journal of the American Dietetic Association* 2004 Apr;104(4):615-35.
- (13) Serra-Majem L, La Vecchia C, Ribas-Barba L, Prieto-Ramos F, Lucchini F, Ramon JM, et al. Changes in diet and mortality from selected cancers in southern Mediterranean countries, 1960-1989. *Eur J Clin Nutr* 1993;47(Suppl 1):S25-S34.
- (14) Serra-Majem L NdlCJRLSL. Mediterranean Diet and Health: Is all the Secret in Olive Oil? *Pathophysiol Haemos Thromb* 2004;33:461-5.

- (15) Bach A, Serra-Majem L, Carrasco JL, Roman B, Ngo J, Bertomeu I, et al. The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review. *Public Health Nutr* 2006;9(1A):132-46.
- (16) Gerber M. Qualitative methods to evaluate Mediterranean diet in adults. *Public Health Nutr* 2006;9(1A):147-51.
- (17) Gerber M., Scali J, Michaud A, Durand MD, Astre CM, Dallongeville J, et al. Profiles of a Healthful Diet and its Relationship to Biomarkers in a Population Sample from Mediterranean Southern France. *Journal of the American Dietetic Association* 2000 Oct;100(10):1164-71.
- (18) Trichopoulou A., Kouris-Blazos A, Vassilakou T, Gnardellis C, Venizelos M, Ligiou P, et al. Diet and survival of elderly Greeks: a link to the past. *Am J Clin Nutr* 1995;61(Sup. 6):1346S-50S.
- (19) Scali J., Richard A., Gerber M. Diet profiles in a population sample from Mediterranean southern France. *Public Health Nutrition* 2006; 4(2 (10)):173-82.
- (20) Satalic Zvonimir, Colic Baric Irena, Keser Irena, Maric Bernard. Evaluation of diet quality with the mediterranean dietary quality index in university students. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2004;55(8):589-95.
- (21) Junca S, Guillen M, Aragay JM, Brugulat P, Castell C, Seculi E, et al. Methodological aspects in the evaluation of health and risk-reduction objectives of Health Plan for Catalonia for the year 2000. *Med Clin (Barc)* 2003;121(Suppl 1):10-9.
- (22) Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059-62.
- (23) Aranceta-Bartrina J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, et al. Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study. *Med Clin (Barc)* 2003;120(16):608-12.
- (24) Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, et al. Development and Validation of a Food Frequency Questionnaire in Spain. *International Journal of Epidemiology* 1993;22(3):512-9.
- (25) Serra-Majem L, Morales D, Domingo C, Caubet E, Ribas L, Nogués RM. Comparison of two dietary methods: 24-hour recall and semiquantitative food frequency questionnaire (article in Spanish). *Med Clin (Barc)* 1994;103:652-6.
- (26) Serra-Majem L, Armas-Navarro A, Ribas-Barba L, on behalf of the Research Group ENCA (1997-98). Nutritional Survey of Canarian Islands: Dietary habits and food consumption (in Spanish). Santa Cruz de Tenerife (Spain); 1999.

- (27) Tur JA, Romaguera D, Pons A. Adherence to the Mediterranean dietary pattern among the population of the Balearic Islands. *Br J Nutr* 2004 Oct 1;92(3):341-6.
- (28) Cervera P. Food composition tables of CESNID (The Centre for Superior Studies in Nutrition and Dietetics) (in Spanish). McGraw-Hill ed. Barcelona (Spain): 2006.
- (29) Bondia-Pons I, Castellote AI, Lopez-Sabater MC. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *Journal of Chromatography B* 2004 Oct 5;809(2):339-44.
- (30) Bondia-Pons I, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater MC. Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 2006 May 26;1116(1-2):204-8.
- (31) Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Stefanadis C. Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study. *Nutrition* 2006 May;22(5):449-56.
- (32) Schroder H, Marrugat J, Vila J, Covas MI, Elosua R. Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a Spanish population. *J Nutr* 2006 Dec 1;134(12):3355-61.
- (33) Naska A, Fouskakis D, Oikonomou E, Almeida MDV, Berg MA, Gedrich K, et al. Dietary patterns and their socio-demographic determinants in 10 European countries: data from the DAFNE databank. *Eur J Clin Nutr* 2005 Nov 9;60(2):181-90.
- (34) Jaen. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation* 2005;35(7):421-4.
- (35) Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Mata P. Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis* 2002 Aug;163(2):385-98.
- (36) Jiang R, Jacobs DR, Mayer-Davis E, Szklo M, Herrington D, Jenny NS, et al. Nut and seed consumption and inflammatory markers in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am J Epidemiol* 163, 222-231. 2006.
- (37) Griel AE, Ruder EH, Kris-Etherton PM. The Changing Roles of Dietary Carbohydrates. From Simple to Complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Jun 22;01.
- (38) Ros E, Mataix J. Fatty acid composition of nuts - implications for cardiovascular health. *Br J Nutr* 2006 Nov;96 : 2006;96(Suppl 2):S29-S35.
- (39) Serra-Majem L, Trichopoulou A, Ngo de la Cruz J, Cervera P, Garcia Alvarez A, La Vecchia C, et al. Does the definition of the Mediterranean diet need to be updated? *Public Health Nutr* 2004;7(7):927-9.

- (40) Malecka-Tendera E, Mazur A. Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes* 2006;30(S2):S1-S3.
- (41) Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, et al. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006 Jul 4;114(1):82-96.
- (42) Rodriguez Y, Giri M, Rottiers R, Christophe AB. Obese type 2 diabetics and obese patients have comparable plasma phospholipid fatty acid compositions deviating from that of healthy individuals. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2004 Nov;71(5):303-8.
- (43) Rasmussen BM, Vessby B, Uusitupa M, Berglund L, Pedersen E, Riccardi G, et al. Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006 Feb 1;83(2):221-6.
- (44) Bes-Rastrollo M, Martinez-Gonzalez MA, Sanchez-Villegas A, de la Fuente Arrillaga C, Martinez JA. Association of fiber intake and fruit/vegetable consumption with weight gain in a Mediterranean population. *Nutrition* 2006 May;22(5):504-11.
- (45) Berbert AA, Kondo CRM, Almendra CL, Matsuo T, Dichi I. Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* 2005 Feb;21(2):131-6.
- (46) Skoldstam L, Hagfors L, Johansson G. An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(3):208-14.
- (47) Hagfors L, Nilsson I, Skoldstam L, Johansson G. Fat intake and composition of fatty acids in serum phospholipids in a randomized, controlled, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. *Nutr Metab (Lond)* 2005;10(2):26.
- (48) Zyriax BC, Boeing H, Windler E. Nutrition is a powerful independent risk factor for coronary heart disease in women[mdash]The CORA Study: a population-based case-control study. *Eur J Clin Nutr* 2005 Jul 20;59(10):1201-7.
- (49) Vincent-Baudry S., Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, et al. The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr* 2005 Nov 1;82(5):964-71.
- (50) Ambring A, Johansson M, Axelsen M, Gan L, Strandvik B, Friberg P. Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006 Mar 1;83(3):575-81.
- (51) Alonso A, Beunza JJ, Delgado-Rodriguez M, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA. Low-fat dairy consumption and reduced risk of hypertension: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *Am J Clin Nutr* 2006 Nov;82(5):972-9.

Table 1. Anthropometric and clinical characteristics as percentage or as mean \pm SD.

<i>Clinical characteristics</i>	<i>Men (n = 261)</i>	<i>Women (n = 360)</i>	<i>P-value</i>
Age (y)	46.3 \pm 14.7	45.5 \pm 15.5	0.132
BMI \geq 25 kg/m ²	69%	48%	<0.0001
WHR > 1.0 in men; >0.90 in women	12.8%	10.2%	<0.0001
Blood pressure \geq 130/85 diagnosed and treated hypertension	51%	41%	0.028
Type II diabetes	9%	3%	0.011
HDL-C <1.0mmol/l (<40mg/dl) men; <1.3mmol/l (<50mg/dl) women	64%	33%	<0.0001
Current smokers	35%	30%	0.287
Depression	11%	21%	0.003
Thyroid	1%	5%	0.001
Rheumatoid arthritis	19%	28%	0.027
Asthma	6%	4%	0.414
Bronchitis	8%	5%	0.218

Table 2. Score for the M-DQI components and other food groups according by sex (mean \pm SD).

<i>M-DQI Component</i>	<i>Men (n =261)</i>	<i>Women (n =360)</i>	<i>P value</i>
SFA	1.13 \pm 0.74	1.24 \pm 0.75	0.108
Cholesterol	0.73 \pm 0.70	0.59 \pm 0.73	0.042
Olive oil	0.91 \pm 0.78	0.77 \pm 0.77	0.044
Fish	1.09 \pm 0.82	0.82 \pm 0.84	0.019
Meat	1.06 \pm 0.81	0.89 \pm 0.80	0.024
Fruits and vegetables	0.94 \pm 0.81	0.84 \pm 0.81	0.155
Cereals	0.79 \pm 0.81	1.21 \pm 0.80	<0.0001
<i>Non M-DQI Component</i>			
Pulse	0.85 \pm 0.79	0.92 \pm 0.77	0.281
Dairy products	0.89 \pm 0.83	1.07 \pm 0.80	0.011
Cheese	0.91 \pm 0.79	1.00 \pm 0.80	0.199
Pastries	0.91 \pm 0.83	0.91 \pm 0.82	0.977
Alcohol beverages	1.12 \pm 0.77	0.76 \pm 0.76	<0.0001

Tertile limits for the M-DQI: SFA = <10, 10-13, >13; Cholesterol = <300, 300-400, >400; Olive oil = <16.8, 16.8-27, >27; Fish = < 53, 53-85, >85; Meat = < 94, 94-138, >138; FV = < 445, 445-665, >665; Cereals = <125, 125-179, >179; Pulse = < 11.4, 11.4-22.8, >22.8; Dairy products = < 250, 250-462, >462; Cheese = < 14.3, 14.3-40, >40; Pastries = < 14.8, 14.8- 37.1, >37.1; Alcohol beverages = < 11.5, 11.5-102, >102

Table 3. Correlation coefficients (r) of macro and micronutrients with the M-DQI.

<i>Variable</i>	<i>r value</i>
<i>Macronutrients:</i>	
Carbohydrate (% energy)	-0.280*
Protein (% energy)	0.158*
Vegetal source protein (% energy)	-0.340*
Animal source protein (% energy)	0.150*
Fat (% energy)	0.210*
SFA (% energy)	0.528*
MUFA (% energy)	-0.148*
PUFA (% energy)	0.089
Dietary fibre (g)	-0.435*
<i>Vitamins:</i>	
Vitamin A (µg)	-0.080
Vitamin B1 (mg)	-0.050
Vitamin B2 (mg)	0.059
Vitamin B12 (µg)	0.055
Vitamin C (mg)	-0.302*
Vitamin E (µg)	-0.200*
Folic acid (µg)	-0.325*
<i>Minerals:</i>	
Calcium (mg)	0.038*
Iron (mg)	-0.216*
Potassium (mg)	-0.198*
Magnesium (mg)	-0.250*
Phosphorus (mg)	0.001
Zinc (mg)	0.026

* P< 0.001

Table 4. Plasma fatty acid profile (% of total fatty acids) across the M-DQI categories

<i>Fatty acid</i>	<i>0-3</i>	<i>4-7</i>	<i>8-11</i>	<i>12-14</i>
C14:0	0.52 ± 0.31	0.63 ± 0.32	0.63 ± 0.42	0.64 ± 0.38
C16:0	20.78 ± 2.23	20.88 ± 2.00	19.84 ± 1.95	19.66 ± 1.48
C16:1	1.65 ± 0.64	1.67 ± 0.61	1.68 ± 0.60	1.46 ± 0.53
C17:0	0.33 ± 0.25	0.33 ± 0.27	0.35 ± 0.25	0.33 ± 0.22
C18:0	6.38 ± 0.92	6.58 ± 0.72	6.75 ± 0.95	6.77 ± 0.97
C18:1	25.40 ± 4.47	24.48 ± 4.44	23.83 ± 4.18	22.56 ± 2.07
C18:2n-6	32.21 ± 5.23	32.84 ± 5.62	33.91 ± 5.05	35.77 ± 1.96
C18:3n-6	0.43 ± 0.18	0.42 ± 0.17	0.40 ± 0.14	0.38 ± 0.16
C18:3n-3	0.34 ± 0.13	0.32 ± 0.11	0.29 ± 0.12	0.26 ± 0.11
C20:0	0.11 ± 0.28	0.12 ± 0.29	0.13 ± 0.29	0.14 ± 0.15
C20:1	0.13 ± 0.09	0.13 ± 0.07	0.13 ± 0.07	0.14 ± 0.02
C20:2	0.20 ± 0.17	0.21 ± 0.31	0.21 ± 0.16	0.23 ± 0.18
C20:3n-6	1.42 ± 0.38	1.43 ± 0.34	1.45 ± 0.39	1.48 ± 0.40
C20:4n-6	6.37 ± 1.44	6.58 ± 1.53	7.34 ± 1.40	7.44 ± 0.84
C22:0	0.03 ± 0.11	0.03 ± 0.48	0.04 ± 0.16	0.06 ± 0.19
C24:0	0.12 ± 0.07	0.13 ± 0.29	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.08
C22:5n-6	0.36 ± 0.13	0.34 ± 0.12	0.33 ± 0.11	0.33 ± 0.15
C20:5n-3	0.75 ± 0.36	0.58 ± 0.40	0.53 ± 0.33	0.36 ± 0.31
C22:5n-3	2.45 ± 0.53	2.29 ± 0.62	2.01 ± 0.63	1.83 ± 0.79

Different letters mean significant differences at $P < 0.01$.

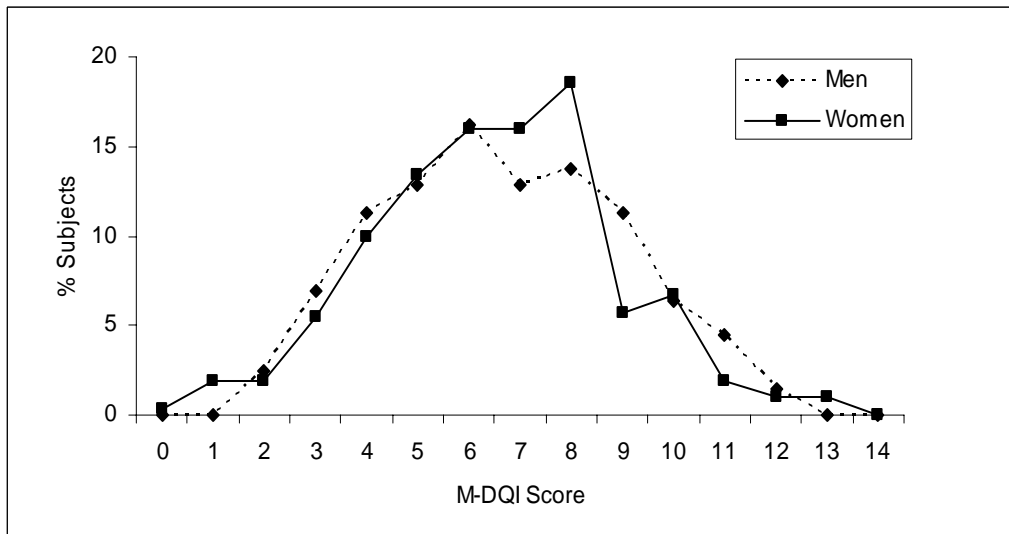


Figure 1. Distribution of subjects according to the score for the M-DQI (% subjects)

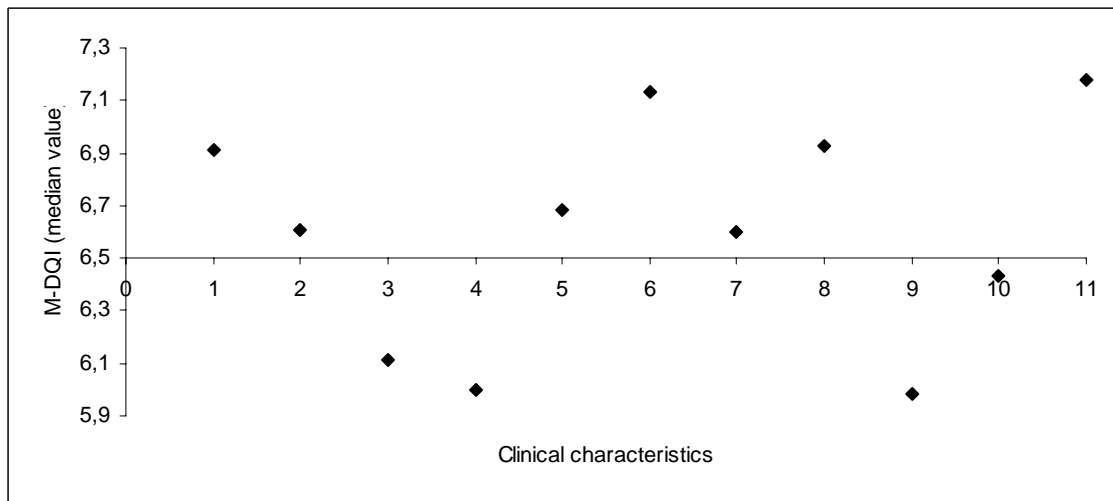


Figure 2. Median values for the M-DQI according to the clinical characteristics of the Catalan sample (1: BMI ≥ 25 kg/m²; 2: WHR > 1.0 in men; >0.90 in women; 3: hypertension, 4: Type II diabetes; 5:HDL-C <1.0mmol/l (<40mg/dl) in men; <1.3mmol/l (<50mg/dl) in women; 6: smokers; 7: depression; 8: thyroid;9: rheumatoid arthritis;10: asthma; 11:bronchitis)
Reference value: 6,5 (Healthy subjects)

2.3. COMPONENTES LIPÍDICOS PRINCIPALES DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

2.3.1. Moderate Consumption of Olive Oil by Healthy European Men Reduces the Systolic Blood Pressure in Non-Mediterranean Participants

Título: Un consumo moderado de aceite de oliva en hombres europeos sanos reduce la presión sanguínea sistólica en los participantes no mediterráneos.

Autores: Isabel Bondia-Pons, Helmut Schröder, María-Isabel Covas, Ana I. Castellote, Jari Kaikkonen, Henrik E. Poulsen, Antonio V. Gaddi, Anja Machowetz, Holger Kieseewetter, M.Carmen López-Sabater

Año: 2007

Revista: The Journal of Nutrition

Volumen: 137

Páginas: 1-4

Resumen:

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de un consumo moderado de aceite de oliva en el perfil lipídico, índice de masa corporal y presión sanguínea en una muestra de 160 hombres sanos procedentes de cinco países de tres regiones europeas diferentes: Norte de Europa (n = 50; Finlandia y Dinamarca), Europa Central (n = 60; Alemania) y Sur de Europa (n = 45; Italia y España).

El estudio, aleatorio y cruzado, presentaba tres periodos de intervención de tres semanas y dos periodos de lavado de dos semanas. Durante los periodos de intervención, se administraron a todos los participantes 25 mL/día de tres aceites de oliva que únicamente se diferenciaban en su contenido en compuestos fenólicos. Los niveles plasmáticos de ácido oleico se vieron aumentados de forma significativa (2-3%; $P < 0.05$) en aquellos individuos procedentes de poblaciones menos expuestas a un consumo habitual de aceite de oliva. La aplicación de modelos generales lineales mostró que la administración de aceite de oliva fue la responsable de la disminución de la presión sanguínea sistólica (-3.0%; $P < 0.05$) pero no de la presión sanguínea diastólica. Ninguno de los grupos mostró variación significativa alguna en el perfil lipídico debido a la intervención con aceite de oliva tras el análisis estadístico multivariante. Los resultados del estudio sugieren que una administración moderada de aceite de oliva podría ser una herramienta útil para reducir la presión sanguínea de hombres sanos procedentes de poblaciones europeas sin una cultura tradicional de consumo de aceite de oliva. Sin embargo, convendría diseñar estudios de mayor duración para corroborar las conclusiones obtenidas en el presente trabajo.

Moderate Consumption of Olive Oil by Healthy European Men Reduces Systolic Blood Pressure in Non-Mediterranean Participants¹

Isabel Bondia-Pons,² Helmut Schröder,³ María-Isabel Covas,³ Ana I. Castellote,² Jari Kaikkonen,⁴ Henrik E. Poulsen,⁵ Antonio V. Gaddi,⁶ Anja Machowetz,⁷ Holger Kieseetter,⁸ and M. Carmen López-Sabater^{2*}

²Department of Nutrition and Food Science, Centre of Reference in Technology of Food, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, s/n E-08028 Barcelona, Spain; ³Lipids and Cardiovascular Epidemiology Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, 08003 Barcelona, Spain; ⁴Oy Jurilab Ltd., Microkato 1, F-70210 Kuopio, Finland; ⁵Department Clinical Pharmacology, Rigshospitalet, University Hospital Copenhagen, DK-2200 Copenhagen, Denmark; ⁶Atherosclerosis Center CG Descovich, Bologna University, IT-41038, Bologna, Italy; ⁷Department Intervention Studies, German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, D-14558 Nuthetal, Germany; and ⁸Charité-University of Medicine of Berlin, D-10117 Berlin, Germany

Abstract

We evaluated the effects of a moderate consumption of olive oil on lipid profile, BMI, and blood pressure (BP) in a group of 160 healthy men from non-Mediterranean regions [Northern Europe ($n = 50$; Finland and Denmark) and Central Europe ($n = 60$; Germany)] and Mediterranean regions [Southern Europe ($n = 45$; Italy and Spain)]. The study was a randomized, cross-over trial with 3 intervention periods of 3 wk and 2 wash-out periods of 2 wk. At the intervention periods, 3 similar olive oils (25 mL/d), differing only in their phenolic concentration, were administered to the healthy volunteers. Plasma oleic acid levels increased 2–3% ($P < 0.05$) in men from populations with lower habitual olive oil intakes (Northern and Central Europe). General linear models showed that the administration of the sequence of the 3 olive oils was responsible for a 3% decrease in systolic BP (SBP) ($P < 0.05$), but not in diastolic BP, in the non-Mediterranean subjects. Multivariate analysis indicated that the lipid profile did not change in either Mediterranean or non-Mediterranean men due to the olive oil intervention. The results of this study suggest that a moderate consumption of olive oil may be used as an effective tool to reduce SBP of healthy men who do not typically consume a Mediterranean diet. However, additional longer trials are necessary for confirmation. *J. Nutr.* 137: 84–87, 2007.

Introduction

Since the Seven Countries Study was initiated in the 1950s by Ancel Keys (1,2), public interest in the Mediterranean diet, which is high in monounsaturated fatty acids (MUFA)⁹ and natural antioxidants, has increased due to its wide range of health benefits and possible prevention of cardiovascular risk. This healthy eating pattern obtains the majority of energy from foods of vegetable origin and the intake of SFA and cholesterol remains low (3). When saturated or trans unsaturated fats are replaced with MUFA from vegetable oils, like olive oil, plasma LDL cholesterol (LDL-C) primarily decreases (4). This replacement is associated with a considerable reduction in coronary heart disease

risk, without reduction of plasma HDL cholesterol (HDL-C) or an increase in triglycerides (TG) (3,4).

Furthermore, it has also been reported that the adherence to a Mediterranean diet increases the likelihood of controlling arterial blood pressure (BP) (5,6). Although genetic factors seem to be responsible for as much as 20–40% of BP variations in the general population (7), epidemiologic data suggest that lifestyle factors, such as dietary habits, are a major contributor to the high prevalence of hypertension (8,9). Olive oil intake, per se, has been inversely associated with both systolic BP (SBP) and diastolic BP (DBP) (5).

Because cardiovascular mortality is much lower in Mediterranean populations than in those from North European and Western countries (10), a shift in the dietary habits of the Northern European population to the traditional Mediterranean pattern likely would be desirable. However, changing well-established dietary patterns is not always easy. There are numerous factors that can markedly influence dietary intake, such as differences in culture, ethnicity, religion, availability of specific foods, and economic development among others (11). Therefore, it may be practical to gradually encourage healthier dietary patterns, beginning with the introduction of small changes.

¹ Supported by grant QLK1-CT-2001-00287 from EU Commission, the EUROLIVE (The Effect of Olive Oil on Oxidative Damage in European Populations) Study. Special thanks are due to the Spanish Ministry of Education for their PhD grant to Isabel Bondia-Pons.

⁹ Abbreviations used: BP, blood pressure; CVD, cardiovascular heart disease; DAFNE, Data Food Networking; DBP, diastolic blood pressure; fast-GC, fast gas chromatography; GLM, general linear models; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; MUFA, monounsaturated fatty acid; SBP, systolic blood pressure; TC, total cholesterol; TG, triglycerides.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: mclopez@ub.edu.

Our objective was to analyze the effects of a moderate consumption of olive oil in healthy men from non-Mediterranean regions [Northern Europe (Finland and Denmark) and Central Europe (Germany)] and Mediterranean regions [Southern Europe (Italy and Spain)].

Subjects and Methods

Subjects. A total of 160 healthy men aged 33.3 ± 11.1 y were recruited from 6 centers in 5 European countries (Finland, Denmark, Germany, Italy, and Spain). All subjects were considered healthy on the basis of a complete physical examination and routine biochemical and hematological laboratory determinations. Exclusion criteria were: smoking; use of antioxidant supplements, aspirin, or drugs with established antioxidant properties; hyperlipidemia; obesity; diabetes; hypertension; intestinal disease; or any other disease or condition that would impair adherence.

The subjects were divided into 3 groups according to the region they were from (North, Central, and South Europe). The protocol was fully explained to all participants. All subjects provided written informed consent. The local institutional Ethic Committees¹⁰ approved the protocol.

Study design. The study was a randomized, cross-over trial with 3 intervention periods of 3 wk and 2 wash-out periods of 2 wk. During the intervention periods, 3 similar olive oils (25 mL/d), differing only in their phenolic concentration (low, 2.7 mg/kg olive oil; medium, 164 mg/kg; and high, 366 mg/kg), were consumed by the men. Daily doses of olive oil were prepared without knowledge of contents in containers delivered to the participants at the beginning of each intervention period. The α -tocopherol concentration for the 3 oils was 111.9 mg/kg. The fatty acid composition was the same for the 3 oils (Table 1). Subjects were examined at baseline and at the end of the study. They recorded their habitual diet for 3 consecutive days at baseline and the end of the study period. Food consumption was converted into corresponding nutrient intake with validated nutrition software from each country (Denmark: DanKost 3000 software, Dankost A/S; Finland: NUTRICA@ version 2.5. software; Germany: PRODI version 4.5. LE 2001; Italy: Dieta ragionata release 3.0. della ESI Stampa Medica SrL; Spain: MediSystem 2000, Conacyte).

Blood sampling and biochemical determinations. Venous blood (2 mL) was collected in tubes containing 1 g/L EDTA at baseline and endpoint. Plasma was obtained by centrifugation of blood at $1500 \times g$; 20 min at 4°C. Aliquots (500 μ L) of the plasma samples were mixed with 100 μ mol/L 3,5-ditert-butyl-4-hydroxytoluene to avoid auto-oxidation and were stored at -80°C until analyzed. We performed all biochemical and analytical determinations in duplicate.

Plasma total cholesterol (TC), HDL-C, and TG concentrations were measured using enzymatic methods (Roche Diagnostics) (12–14). We calculated LDL-C using the Friedewald formula and measured plasma fatty acids by fast GC after transforming them into methyl esters (15).

BP and BMI measurements. BP was measured with a mercury sphygmomanometer after a minimum of 10 min rest in the seated position; the mean of 2 measurements was used for analysis. An easy-calibration precision scale was used to measure body wt (in underwear). Subjects weighed 75.8 ± 9.7 kg, their height was 1.78 ± 0.06 m, and their BMI was 23.8 ± 2.5 kg/m².

Statistical analysis. Data are presented as means \pm SD. A Levene test was performed to check homogeneity of variance. Paired *t* tests were used for intra-group comparisons and 1-factor ANOVA for inter-group comparisons. Tukey's post hoc tests were performed for multiple comparisons between groups. For performing a more powerful multivariate analysis, general linear models were used to analyze the effect of a

TABLE 1 Fatty acid composition of the olive oils used for the study

Fatty acid	g/100 g
Myristic acid (14:0)	0.02
Palmitic acid (16:0)	11.78
16:1(n-7)	1.05
17:0	0.06
17:1	0.13
Stearic acid (18:0)	2.59
Oleic acid [18:1(n-9)]	75.65
Linoleic acid [18:2(n-6)]	7.17
20:0	0.39
α -Linolenic acid [18:3(n-3)]	0.70
20:1(n-9)	0.29
22:0	0.10

moderate consumption of olive oil in the lipid profile and BP values. For each model, the dependent variable was defined as the difference between the endpoint and the baseline values of each of the variables (SBP, DBP, TC, HDL-C, LDL-C, and TG) and the independent variable was the plasma oleic acid level at the end of the study, considered as a biomarker of the olive oil intake. Because age and BMI affect plasma lipid concentrations and BP, they were included in each model as covariates, as were the baseline plasma oleic acid level, the baseline value of each variable under study, the European region the participants were from, the phenolic concentration of the participants' plasma at baseline and at the end of the study, and the sequence in which the men received oil treatments. For all analyses, 2-sided significance was determined at the $P < 0.05$ level. Analyses were performed using the SPSS statistical software package (version 12.0).

Results

The men's BMI and body weight did not change throughout the study.

Dietary records. At baseline, energy intake from fat was significantly lower in men from Northern Europe than in those from the other 2 regions (Table 2). While SFA provided the highest percentage of fat in the men from the northern and central regions, in men from the Mediterranean area, around one-half of the energy derived from fat was due to MUFA intake. The amount of cholesterol consumed was significantly higher for men from Central Europe, whereas those from Northern and Southern Europe had intakes that did not differ. Compared with the other 2 groups, baseline vitamin E intake was significantly lower in men from Northern Europe, vitamin A intake was significantly lower in men from Southern Europe, and vitamin B-12 intake was significantly lower in men from Central Europe.

As expected, the dietary percentage of MUFA increased due to the consumption of olive oil in participants from all 3 regions (the endpoint data in Table 2 include supplemental olive oil), although the increase was only of borderline significance ($P = 0.07$) for the men from Southern Europe. In addition, a significant decrease in the SFA and PUFA intake occurred for men from both non-Mediterranean regions.

Plasma fatty acid composition. Baseline plasma oleic acid levels were significantly higher in the Mediterranean men than in the non-Mediterranean volunteers (Table 3). Subjects from Southern Europe had lower plasma palmitic and linoleic acid levels than those from Northern and Central Europe. Men from Northern Europe had lower plasma arachidonic acid levels than men from both other groups.

¹⁰ University of Kuopio, Finland; Rigshospitalet University Hospital, Copenhagen, Denmark; German Institute of Human Nutrition, Postdam-Rehbruecke, Germany; Charité-University of Medicine of Berlin, Germany; Centro per lo Studio dell'Arteriosclerosi e delle Malattie Dismetaboliche "GC Descovich," Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna, Italy; and the Municipal Institute for Medical Research, Barcelona, Spain.

TABLE 2 Daily energy and nutrient intakes of men from the 3 regions at baseline and after consuming olive oil for 9 wk¹

	Northern Europe, n = 50		Central Europe, n = 60		Southern Europe, n = 45	
	Baseline	Endpoint	Baseline	Endpoint	Baseline	Endpoint
Energy, kJ/d	10.0 ± 0.1	10.2 ± 0.1	10.1 ± 0.1	10.3 ± 0.1	9.9 ± 0.1	10.0 ± 0.1
Protein, % energy	17.8 ± 2.8	16.3 ± 3.2	15.8 ± 3.8	14.9 ± 3.7	16.3 ± 3.2	16.1 ± 3.2
Carbohydrates, % energy	50.9 ± 8.0	50.9 ± 7.6	49.2 ± 7.2	49.3 ± 7.2	47.9 ± 7.5	47.0 ± 7.2
Fat, % energy	31.2 ± 6.3 ^b	32.8 ± 6.6 ^y	34.9 ± 5.4 ^a	35.9 ± 5.9 ^x	35.8 ± 6.2 ^a	36.9 ± 6.3 ^x
SFA, % energy	14.1 ± 2.4 ^b	11.6 ± 2.2 ^{*y}	15.9 ± 2.6 ^a	13.3 ± 2.2 ^{*x}	11.7 ± 2.2 ^c	11.6 ± 2.3 ^y
MUFA, % energy	11.5 ± 2.4 ^b	16.1 ± 2.4 ^{*y}	12.9 ± 2.5 ^b	17.3 ± 2.6 ^{*y}	18.7 ± 2.6 ^a	20.0 ± 2.7 ^x
PUFA, % energy	5.6 ± 0.1 ^b	5.0 ± 0.1 [*]	6.1 ± 0.2 ^a	5.3 ± 0.1 [*]	5.4 ± 0.1 ^b	5.4 ± 0.1
Cholesterol, mg/d	312.7 ± 62.3 ^b	301.4 ± 64.5	367.4 ± 66.2 ^a	320.5 ± 64.3 [*]	298.3 ± 62.1 ^b	298.1 ± 63.0
Vitamin E, mg/d	8.5 ± 3.2 ^b	10.0 ± 3.6 ^{*y}	10.6 ± 3.4 ^a	12.8 ± 3.5 ^{*x}	10.6 ± 3.3 ^a	11.3 ± 3.5 ^y
Vitamin A, mg/d	1.3 ± 0.7 ^a	1.1 ± 0.6 ^x	1.3 ± 0.8 ^a	1.2 ± 0.8 ^x	0.3 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.1 ^y
Vitamin B-6, mg/d	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.3
Vitamin B-12, mg/d	6.5 ± 0.5 ^a	6.2 ± 0.4 ^x	4.7 ± 0.5 ^b	4.6 ± 0.5 ^y	7.3 ± 0.7 ^a	7.1 ± 0.4 ^x
Vitamin C, mg/d	108.4 ± 11.1	103.7 ± 10.9	115.5 ± 12.0	123.9 ± 12.5	99.2 ± 10.1	97.2 ± 10.2
β-Carotene, mg/d	2.8 ± 0.6	2.9 ± 0.7	3.3 ± 0.8	3.4 ± 0.6	3.1 ± 0.8	3.3 ± 0.7

¹ Values are means ± SD. Means at a time with superscripts without a common letter differ, $P < 0.05$. * Different from baseline, $P < 0.05$.

Plasma lipid concentrations. Baseline plasma HDL-C was significantly higher and LDL-C and TC concentrations significantly lower in men from Southern Europe than in those from Northern and Central Europe. Plasma TC and LDL-C concentrations decreased significantly in the non-Mediterranean participants after 9 wk of olive oil treatment (t test, **Table 4**). However, after adjusting for the covariates listed in statistical methods, plasma lipids were not affected by olive oil in any of the groups.

BP. SBP and DBP significantly decreased after the 9 wk of olive oil consumption for men from the non-Mediterranean regions (**Table 5**). After adjusting for all covariates, however, only SBP was significantly decreased in the non-Mediterranean men ($P = 0.002$).

TABLE 3 Relative composition of the 5 major fatty acids in plasma of men from the 3 regions at baseline and after consuming olive oil for 9 wk¹

	n	Fatty acids	Baseline, %	Endpoint, %
Northern Europe	50	16:0	25.4 ± 0.7 ^a	23.9 ± 0.8 ^x
		18:0	7.8 ± 0.4	7.6 ± 0.3
		18:1(n-9)	24.8 ± 1.6 ^b	27.2 ± 1.7 ^{*x}
		18:2(n-6)	35.3 ± 1.8 ^a	34.6 ± 1.7 ^x
		20:4(n-6)	6.7 ± 0.6 ^b	6.7 ± 0.4 ^y
Central Europe	60	16:0	25.0 ± 0.6 ^a	23.5 ± 0.7 ^x
		18:0	8.1 ± 0.3	8.1 ± 0.4
		18:1(n-9)	23.0 ± 1.4 ^b	25.5 ± 1.3 ^{*y}
		18:2(n-6)	36.0 ± 1.7 ^a	35.0 ± 1.7 ^x
		20:4(n-6)	7.9 ± 0.4 ^a	8.0 ± 0.7 ^x
Southern Europe	45	16:0	21.8 ± 0.6 ^b	21.5 ± 0.6 ^y
		18:0	7.4 ± 0.4	7.6 ± 0.5
		18:1(n-9)	29.7 ± 1.5 ^a	30.4 ± 1.4 ^x
		18:2(n-6)	33.0 ± 1.6 ^b	32.6 ± 1.5 ^y
		20:4(n-6)	8.1 ± 0.6 ^a	7.9 ± 0.5 ^x

¹ Values are means ± SD. Means at a time with superscripts without a common letter differ, $P < 0.05$. * Different from baseline, $P < 0.05$.

Discussion

A moderate consumption of 2.5 mL of olive oil significantly reduced SBP in the study participants from Northern and Central Europe. In contrast, these effects did not occur in men from Southern European regions.

The daily baseline dietary records showed different dietary habits in Mediterranean and non-Mediterranean countries. A recent study describing the dietary patterns of 10 European countries and their social-demographic determinants, using the comparable inter-country DAFNE (Data Food Networking) data (16), showed that olive oil is the added fat of choice in the Mediterranean region, whereas the Central European and Scandinavian populations have higher intakes of other vegetable oils and animal fats.

It is interesting to note some outcomes of the moderate consumption of olive oil. We expected that plasma oleic acid levels would increase after daily supplementation in all subjects. This increase, however, was not significant in the Italian and Spanish subjects ($P = 0.071$) due to their habitually high intake of olive oil (10,11), which was clearly reflected in their baseline

TABLE 4 Plasma lipid concentrations in men from the 3 regions at baseline and after consuming olive oil for 9 wk¹

	n		Baseline	Endpoint
			mmol/L	
Northern Europe	50	Triglycerides	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.7
		Total cholesterol	4.8 ± 0.7 ^a	4.6 ± 0.6 [*]
		LDL cholesterol	3.1 ± 0.5 ^a	2.9 ± 0.6 [*]
Central Europe	60	HDL cholesterol	1.2 ± 0.7 ^b	1.3 ± 0.6 [*]
		Triglycerides	0.9 ± 0.5	0.9 ± 0.6
		Total cholesterol	4.8 ± 0.8 ^a	4.7 ± 0.7 [*]
Southern Europe	45	LDL cholesterol	3.2 ± 0.5 ^a	2.9 ± 0.5 [*]
		HDL cholesterol	1.2 ± 0.6 ^b	1.3 ± 0.6 [*]
		Triglycerides	0.9 ± 0.6	0.9 ± 0.6
		Total cholesterol	4.7 ± 0.8 ^b	4.7 ± 0.7
		LDL cholesterol	2.8 ± 0.5 ^b	2.7 ± 0.6
		HDL cholesterol	1.3 ± 0.7 ^a	1.3 ± 0.7

¹ Values are means ± SD. Means at a time with superscripts without a common letter differ, $P < 0.05$. * Different from baseline, $P < 0.05$.

TABLE 5 SBP and DBP of men from the 3 regions at baseline and after consuming olive oil for 9 wk¹

	<i>n</i>		Baseline	Endpoint
			<i>mm Hg</i>	
Northern Europe	50	SBP	126.7 ± 2.6 ^a	122.5 ± 2.4*
		DBP	80.6 ± 3.3 ^a	78.4 ± 3.1 ^x
Central Europe	60	SBP	124.2 ± 2.4 ^a	119.8 ± 2.5*
		DBP	78.6 ± 3.2 ^a	75.7 ± 3.0 ^x
Southern Europe	45	SBP	122.0 ± 2.4 ^b	119.6 ± 2.3
		DBP	74.0 ± 3.1 ^b	72.6 ± 2.9 ^y

¹ Values are means ± SD. Means at a time with superscripts without a common letter differ, $P < 0.05$. *Different from baseline, $P < 0.05$.

oleic acid levels. The MUFA to SFA dietary lipid ratio also remained significantly higher in men from Southern Europe than in men from Northern and Central Europe.

Although the participants were allowed to continue their habitual diets, most of the non-Mediterranean volunteers reduced their SFA and PUFA intakes in an attempt to balance their total fat intake. This resulted in a healthier lipid profile at the end of the study. The health benefits of olive oil used to recruit volunteers for the study, together with its ease of use and pleasant incorporation into their habitual meals, could have encouraged the non-Mediterranean subjects to change the quality of their fat intakes.

It has recently been reported that changing the proportions of dietary fat by decreasing SFA and increasing MUFA decreases BP in healthy subjects (17). These results agree with SBP outcomes in the non-Mediterranean participants of this work. In addition, Rasmussen et al. (17) observed that the beneficial effect on BP induced by fat quality was negated by high total fat intake. In our study, the non-Mediterranean participants had high total fat intakes at the beginning of the study and after consuming supplemental olive oil for 9 wk ($\geq 34.9\%$ energy). However, despite the high total fat intake, they had lower SBP at the end of the study.

In conclusion, the outcomes of our study suggest that moderate administration of olive oil could be used as an effective tool to reduce SBP of healthy men in those European populations where the Mediterranean diet is not typically consumed. The introduction of olive oil into non-Mediterranean diets should be accompanied by a reduction in saturated fat to improve lipid profiles. Nevertheless, a longer study should be conducted to verify that small changes or modifications in the diet can be made, which would hopefully become habitual.

Acknowledgments

The authors thank the scientific assistance of the following EUROLIVE investigators: J.T. Salonen, Oy Jurilab Ltd, Kuopio, Finland; P.R. Hillestron, University Hospital Copenhagen, Copenhagen, Denmark; S. Nascetti, Agenzia Regionale Emilia Romagna, Bologna, Italy; F. Zunft, German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, Nuthetal, Germany; H. Baumler,

Charité-University of Medicine of Berlin, Berlin, Germany; J. Marrugat, M. Fitó, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain; R.M. Lamuela-Raventós, and K. De Torre, University of Barcelona, Barcelona, Spain. Special thanks to R. Alarcon for her technical assistance and to E. O'Connor and L. Moshell for the English correction of the manuscript.

Literature Cited

- Keys AB. Seven Countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge (MA): Harvard University Press; 1980.
- Kromhout D, Keys A, Aravanis C. Food consumption patterns in the 1960s in seven countries. *Am J Clin Nutr.* 1989;49:889–94.
- Pérez-Jiménez F, López-Miranda J, Mata P. Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis.* 2002;163:385–98.
- Sacks FM, Katan M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med.* 2002;113 Suppl 9B:S13–24.
- Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1012–8.
- Panagiotakos DB, Pitsavos CH, Chrysohoou C. Status and management of hypertension in Greece: role of the adoption of a Mediterranean diet: the Attica study. *J Hypertens.* 2003;21:1483–9.
- Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension, pathophysiology, diagnosis and management.* New York: Raven Press; 1990. p. 81–100.
- Hermansen K. Diet, blood pressure and hypertension. *Br J Nutr.* 2000; 83 Suppl 1:S113–9.
- Perona J, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem.* 2006;17:429–45.
- Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr.* 2005; 44:121–7.
- Trichopoulou A. Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly: a review. *Public Health Nutr.* 2004;7:943–47.
- Siedel J, Hägele EO, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem.* 1983;29:1075–80.
- Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulphated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem.* 1995;41:717–23.
- Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem.* 1973;19:476–82.
- Bondia-Pons I, Castellote AI, López-Sabater MC. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J Chromatogr B.* 2004;809:339–44.
- Naska A, Fouskakis D, Oikonomou E, Almeida MDV, Berg MA, Gedrich K, Moreiras O, Nelson M, Trygg K, et al. Dietary patterns and their socio-demographic determinants in 10 European countries: data from the DAFNE databank. *Eur J Clin Nutr.* 2006;60:181–90.
- Rasmussen BM, Vessby B, Uusitupa M, Berglund L, Pedersen E, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell L, Hermansen K. Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:221–6.

2.3.2. Long-chain n-3 fatty acids and classical cardiovascular disease risk factors among the Catalan population

Título: Ácidos grasos de cadena larga de la serie n-3 y factores de riesgo clásicos de la enfermedad cardiovascular entre la población catalana

Autores: Isabel Bondia-Pons, Lluís Serra-Majem, Ana I. Castellote, M. Carmen López-Sabater

Estado: en revisión

Resumen:

El efecto protector en la enfermedad cardiovascular de los AGPI-CL n-3 ha sido demostrado en poblaciones con un elevado consumo de pescado. El patrón alimentario de los países mediterráneos se ha caracterizado tradicionalmente con un consumo de pescado apreciable, principalmente en las regiones costeras. Sin embargo, la tendencia hacia patrones alimentarios y estilos de vida menos saludables también ha sido descrita durante las últimas décadas.

El presente estudio se basó en examinar la ingesta actual de pescado y marisco de una muestra representativa de una población mediterránea como es la catalana, así como en evaluar la relación entre la ingesta de pescado, los niveles plasmáticos de EPA y DHA y algunos factores de riesgo cardiovascular clásicos.

La muestra analizada consistió en 516 individuos de edades comprendidas entre los 18-77 años, que participaron en las Encuestas de Salud y Alimentación de la Generalitat de Catalunya 2002-2003.

La ingesta media de pescado y marisco fue de 78.8 ± 11.3 g/día, mientras que las concentraciones plasmáticas de EPA y DHA fueron respectivamente de 0.48% y 1.95% del total de AG. Las concentraciones de TG en plasma se asociaron negativamente con ambos AGPI-CL n-3, al igual que EPA con los niveles de colesterol total y de insulina. No se observaron diferencias significativas entre ambos AG y los niveles de LDL, HDL o la presión sanguínea.

Según la muestra de población estudiada, la ingesta de pescado azul, que es el más abundante en EPA y DHA, es actualmente del orden de sólo una ración por semana en la población catalana, implicando una necesidad futura de promover un incremento del mismo.

Long-chain n-3 fatty acids and classical cardiovascular disease risk factors among the Catalan population*

Isabel Bondia-Pons¹; Lluís Serra-Majem²; Ana I. Castellote¹; M. Carmen López-Sabater¹

¹Dept. of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain.

²Dept. of Clinical Sciences, Center for Health Sciences. University of Las Palmas de Gran Canaria, PO Box 550, Las Palmas de Gran Canaria, E-35080 Las Palmas, Spain.

Corresponding author:

Carmen Lopez-Sabater, PhD

Mailing address:

Dept. of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy

University of Barcelona

Av. Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain.

Telephone number: +34-93 402 45 08

Fax number: +34-93 403 59 31

e-mail address: mclopez@ub.edu

* Supported by Mercadona S.A. and the Centre Català de la Nutrició de l'Institut d'Estudis Catalans. The PhD-grant F.P.U. to Isabel Bondia-Pons has been given by the Spanish Ministry of Education.

Running title: Fish intake, n-3 LC-PUFA and CVD in Catalonia

STRUCTURED SUMMARY

Background: The protective cardiovascular effect of long chain n-3 fatty acids has been firmly established in populations with high fish consumption. The diet followed in the Mediterranean countries has largely been characterized by a considerable fish intake, mainly in the regions with close proximity to the sea. However, a shift away from traditional lifestyles has been observed in the Mediterranean region since the original “traditional” Mediterranean diet was discovered.

Aim of the study: To examine the current fish consumption in a representative sample from Catalonia, a Mediterranean region, and to evaluate its relationship with plasma concentrations of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) and some classical cardiovascular disease risk factors.

Methods: Data were obtained from 516 Catalans aged 18-77 y who participated in the cross-sectional 2002-2003 Catalan Nutritional Survey. Plasma fatty acid profile was determined by fast gas chromatography.

Results: Mean fish and seafood intake was 78.8 ± 11.3 g/day. Mean plasma concentrations of EPA and DHA were respectively 0.48% and 1.95% of total fatty acids. Both fatty acids were inversely associated with triacylglycerol concentrations. EPA was also negatively associated with total cholesterol and insulin. There were no significant associations between long-chain n-3 fatty acids and LDL, HDL or blood pressure.

Conclusions: The oily fish intake, which is the richest in EPA and DHA, is currently at an order of only 1 serving per week in the Catalan population and its increase should therefore be promoted.

KEY WORDS: Long chain n-3 fatty acids, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, fish intake, cardiovascular disease.

INTRODUCTION

The protective cardiovascular effect of fish consumption has been firmly established during the last years by numerous scientific studies [1-3]. High intakes of the long chain n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) have been found to be associated with reduced coronary artery disease risk through several potential mechanisms [4]. They include antithrombotic [5] and anti-arrhythmic effects [6;7], reduced inflammatory responses [8;9] decreased heart rate variability [10;11], reduced blood pressure [12], decreased triglycerides (TG) concentrations [13;14] and increased insulin sensitivity [15] among others [16].

International associations recommend a fish intake of at least two times a week for healthy adults. For patients with documented coronary heart disease (CHD), 1g of EPA and DHA per day is desirable [17;18]. But if cardiac effects of fish consumption are primarily related to effects of n-3 LC-PUFA, then associations may vary depending not only on the quantity but also on the type of fish meal consumed [19], as n-3 PUFA content can vary by an order of magnitude comparing fatty fish to lean fish.

A recent review [20], in which the 25 major studies investigating associations between fish or long-chain n-3 fatty acids and CVD were revised, concluded that long-chain n-3 fatty acid consumption should be promoted for all individuals, especially those at risk of developing

CVD. It suggests that there is a wide gap between current intakes of long-chain n-3 PUFA and many of the recommendations given from international organizations.

Nowadays a shift away from traditional lifestyles and diets in several populations, especially among young people, is being associated with an increased prevalence of risk factors for CVD, such as high blood pressure, elevated blood lipids, diabetes, and obesity [21;22].

This fact must be also taken into account in populations with healthy dietary patterns as those followed in the Mediterranean area. There is therefore a need of verifying and promoting their main characteristic food components, such as the fish and seafood group.

The aim of this study was to examine the current marine derived n-3 fatty acid status of a representative sample of the adult population in Catalonia, a Mediterranean region; and to evaluate the relationship of the current Catalan fish intake with plasma concentrations of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) and some classical cardiovascular disease risk factors.

SUBJECTS AND METHODS

Study Design

A cross-sectional nutritional survey among the Catalan adult population (n = 1600; 18-80 y) was carried out in 2002-2003 [23]. Its primary objective was to collect relevant information on the dietary habits of the Catalan population and assess their food consumption patterns. Dietary habits were assessed by means of a quantitative food frequency questionnaire. 516 participants aged 18-77y, underwent physiological and anthropometric measurements in a clinical session after informed consent. The study protocol was approved following the Declaration of Helsinki 1975 standards.

Laboratory measurements

Blood samples were collected after the subjects had fasted for 12 hours. Plasma was stored at -80°C before being analyzed. Standardized enzymatic methods were used for the analysis of serum lipids [23]. The fatty acid (FA) profile in total plasma and in plasma phospholipids was determined by fast gas chromatography (fast-GC) with two different methods [24;25] in the first 300 samples. In the rest of the samples only total plasma fatty acid profile was determined. This was due to the fact that the Pearson coefficients of correlation (r) between EPA and DHA determined by both methods were high enough to ensure reliable results with total plasma FA determination. The calculated r was 0.91 (p < 0.001) for EPA and 0.83 for DHA (p < 0.001). Results were expressed as relative percentages of total FA.

Lifestyle assessment and anthropometry

Smoking status was assessed by questionnaire during a face-to-face interview. Height, weight, and waist and hip circumference were measured during the clinical session. Waist circumference was measured by positioning the measuring tape horizontally at the level of noticeable waist narrowing and recording the circumference to the nearest centimeter. The mean (\pm SD) body mass index (BMI; in kg/m^2) of the subjects was 25.4 ± 4.8 and their mean waist circumference was 85.8 ± 13.6 cm. In this study, the accumulation of adipose tissue in the abdominal area as measured by waist circumference was used to measure abdominal obesity. A waist circumference ≥ 102 cm for men and ≥ 88 cm for women was defined as abdominal obesity.

Dietary assessment

Data on food intake were obtained with the use of a quantitative food-frequency questionnaire (FFQ), which was previously validated [26] and applied to other Spanish regions [27-29]. The FFQ, which asked the subject to recall average use over the past year, consisted of 92 food items. The FFQ was arranged by food type and meal pattern. Frequency categories were based on the number of times that items were consumed per day, week or month. Consumption less than once a month was considered no consumption. Daily consumption in grams was determined by dividing the reported amount of the intake by the frequency in days. The relevant period of consumption of seasonal items was also taken into account. Edible fractions of foods were recorded in the database.

Marine food was categorized in 6 groups. Examples of the species were included for each group in the diet questionnaire, as well as the amount of the raw edible serving size. Categories were established as: freshwater fish (trout; 150-180 g/portion); saltwater lean fish (haze, sole, angler fish, grouper, sea bream; 150 g/portion); saltwater oily fish (mackerel, sardine, tuna, anchovy, bonito; 120 g/portion); cephalopods (octopus, cuttlefish, squid; 120-150 g/portion); mollusc seafood (mussel, clam, razor shell; 60-70 g/portion) and crustacean seafood (prawn, king prawn; 70 g/portion). Food values were converted into nutrient values by validated software developed by the Centre of Nutrition and Dietetics CESNID based on Spanish tables of food composition [30].

Statistical analysis

The statistical distribution of plasma fatty acid concentrations was checked and was found to be skewed. Therefore, geometric means were used to describe FA concentrations. Pearson

correlations were used to compare EPA and DHA fatty acid values in total plasma and in plasma phospholipids. Analysis of variance (ANOVA) on the logarithm of plasma FA was used to determine effect comparisons among groups. Mean daily intakes of marine foods and mean values of CVD risk factors were calculated according to age and sex. The potential interaction effect of age and sex was checked by using a two-factor ANOVA with an interaction term. The associations between the plasma concentrations of EPA and DHA and values for CVD risk factors were assessed by use of multiple linear regression analysis. Variables with a skewed distribution were logarithmically transformed. The regression analyses were conducted for subjects who were not taking prescribed drugs for hypercholesterolemia, high blood pressure, or diabetes.

The CVD risk factor values were considered as the dependent variables and the relative concentrations of EPA and DHA in plasma as the predictor variables. Adjustments were made for potential confounding effects of age, sex, waist circumference, body mass index, SFA intake, MUFA intake, and smoking. We also calculated conditional odds ratios to examine association between the prevalence of high HDL concentrations and quartiles of the ratio EPA to AA in plasma. Logarithmic regression was performed to control for the same confounding variables as described above and excluded the same subjects. All results were processed with the SPSS 12.0 statistical package (SPSS; Chicago IL). Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$.

RESULTS

EPA and DHA accounted for 78% of total plasma n-3 fatty acids (**Table 1**). 97% of the sample had a ratio of plasma PUFA/SFA > 1.0. The n-6 to n-3 ratio of total plasma FA was 13.1/1. Mean energy intake per kg body weight was $126,7 \pm 43,2$ KJ/kg. The mean contribution of the total fat intake to energy was $38,1 \pm 5,6$ %. According to the gender of the sample, no significant differences were observed in SFA intake ($12,4 \pm 2,7\%$ of total energy) and PUFA intake ($7,5 \pm 2,4\%$ of total energy). However, the MUFA intake was higher for women than men ($18,5 \pm 3,5\%$ vs. $17,4 \pm 4,1\%$; $P < 0.01$).

Table 2 summarizes the relation between relative concentrations of n-3 fatty acids and characteristics of the Catalan population. Concentrations of EPA, DHA, EPA+DHA and the ratios of EPA to AA and of n-3 to n-6 fatty acids varied significantly according to age, with those aged > 40 y having higher values than subjects aged 18-39 y. Long chain n-3 fatty acid concentrations did not vary significantly according to sex, but they did according to the smoking status. Non smokers had higher concentrations of EPA, DHA, EPA+DHA and a higher ratio of EPA to AA than did smokers and occasionally smokers. Subjects with normal waist circumference showed higher concentrations of EPA and higher EPA to AA ratio than

subjects with elevated WC. Higher concentrations of EPA and higher ratios of n-3 to n-6 and EPA to AA were observed in subjects medicated for hypertension but no significant differences were found in those who were diabetic or used medications for CVD problems than in nonusers.

Daily intakes of the different marine foods, by sex and age, can be shown in **Table 3**. Mean marine food consumption was 78.8 ± 11.3 g/day. Quantitatively the most popular variety of fish consumed by the sample was saltwater lean fish. Saltwater lean fish and oily fish constitute 71% of the total marine source consumption in the Catalan sample. Saltwater lean fish daily intake was significantly higher in women than in men. People aged > 40 y were those with the highest saltwater lean fish intake, while people aged 18-39 y showed the highest cephalopods intake.

Table 4 shows the EPA and DHA content in plasma according to each category of marine food consumption. Plasma EPA content significantly increased according to the frequency of saltwater lean fish and saltwater oily fish consumption, but not for other kind of marine source. In the case of DHA, significant differences in plasma DHA were found according to the frequency of consumption of saltwater lean fish, oily fish and mollusks.

The mean concentrations of TC did not vary according to sex but significantly increased with age (**Table 5**). The mean LDL-C concentration was higher in men and increased with age, which was also seen for the ratio of total to HDL-C. The mean HDL-C concentration was higher in women, but did not vary significantly with age. Mean concentrations of TG and glucose also vary according to sex and age, both values being higher in men and in subjects < 40 y. No significance variation was observed in the insulin levels of the sample. Both systolic and diastolic blood pressures were higher in men than in women and increased with age.

Table 6 shows the regression coefficients from the multiple linear regression analysis. EPA was negatively associated with the TC, TG and insulin concentrations. However, DHA did not show any significant association with any of the CVD risk factors under study. Neither long chain n-3 FA was associated with DBP or SBP.

Additional analyses were performed to examine the association between the prevalence of low HDL-C concentrations and quartiles of the ratio of EPA to AA by using conditional odd ratios and comparing subjects in quartiles 2-4 with those in quartile 1. When modeling the probability of HDL-C concentrations < 0.9 mmol/L, the odds ratio for the group with the highest ratio of EPA to AA was 0.38 (95% CI: 0.18, 0.69) (**Figure 1**). The threshold value of the ratio of EPA to AA (in the highest quartile) that afforded this protective effect was 0.33.

DISCUSSION

Fish is one of the characteristic food groups of the healthy Mediterranean dietary patterns, which has traditionally been followed in Catalonia [31;32], possibly being one of the factors contributing to the mortality rates for CVD being relatively low in Spain compared with that in other developed countries [21].

The mean daily fish and shellfish intake in Catalonia (78.8 ± 11.3 g/day) was in the same range of the data reported for the Spanish population six years ago. However, the EPA+DHA median concentration (0.65 g) was lower due the higher intake of saltwater lean fish intake (46%) than of oily fish (25%) in the Catalan population.

DHA and EPA intakes in the Catalan sample are not as high as those recommended by the Spanish dietary guidelines and other international associations [33-35]. However, the fish intake is higher than in other Spanish regions and other countries [29]; [36-38].

When comparing EPA and DHA concentrations according to the characteristics of the sample a higher content of both LC-PUFA was found in people older than 40 y. This finding agreed with the data reported from the food-frequency questionnaire. This factor should be taken into account in order to evaluate possible changes in dietary habits in the Catalan young people.

Women declared significant higher daily intakes of lean fish than men, but it seemed that this intake was not high enough to cause significant differences in plasma EPA, DHA or total n-3 fatty acid contents according to sex. The high intake of saltwater lean fish in women could be compensated by the intakes of the rest of marine sources in men, or it could mean that saltwater lean fish intake does not contribute to the increase of plasma levels of EPA and DHA if the frequency of consumption is not higher than 2 servings a week.

According to the results, smoking status showed significantly lower levels of EPA and DHA fatty acids in smokers than in non smokers. Having in mind that smokers fish intakes ($77,1 \pm 11.8$ g/day) did not significantly differ from those of non smokers, the lower n-3 FA levels could be explained by the high free radical levels involved in body oxidation processes in smokers.

Levels of EPA were found to be elevated in subjects medicated for hypertension compared to healthy subjects in concordance with the clinical advice of increasing their n-3 fatty acid

status as a risk population, which was reflected in their fish consumption being higher than in the rest of participants.

It is interesting to point out that only the consumption of saltwater oily and lean fish was responsible for changes in the plasma levels of long-chain n-3 fatty acids, but in a different pattern. While EPA and DHA plasma contents remained constant with saltwater lean fish intakes in the range of 1 serving a month to 2 servings a week, oily fish intake showed a gradual increase in both fatty acids along greater frequencies of consumption. Shellfish and freshwater fish consumption was not reflected in plasma concentrations of EPA and DHA probably due to their low intake among the population under study.

Classical CVD risk factors showed differences according to sex and age in the Catalan sample. Women and younger participants presented the healthiest lipoprotein profiles and the lowest BP values. EPA was negatively associated to total cholesterol and insulin concentrations, while DHA was only significantly associated to TG concentration. Although some studies showed that omega-3 PUFA tend to lower plasma cholesterol and LDL, there are others showing no evidence for any association between fish consumption and total cholesterol or LDL cholesterol levels [39] [40]. Long chain n-3 FA also may slightly increase plasma HDL levels as observed in a cross-sectional study with healthy European men [41], in which the fish consumption was associated with decreased heart rate and in which HDL cholesterol was significantly higher among fish consumers than among non consumers. But it seems likely that the range of fish intake of the Catalan sample was not high enough to see a beneficial effect of EPA+DHA on the HDL profile. On the other hand, in a critical review about fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans it was concluded that total and LDL cholesterol levels are usually not affected unless compared to a diet in saturated fat, in which case they will decrease, while LDL cholesterol levels are often increased by 5-10% with fish oil supplementation [39].

Most studies that targeted healthy individuals with no clinical manifestation of hypertension did not detect a hypotensive effect of n-3 FA on BP [42]. In our study, nearly half of the sample suffered from diagnosed hypertension. It is possible that the n-3 LC-PUFA intake of the hypertensive patients was not high enough to show a significant relationship with the blood pressure.

The effect of n-3 FA on glycemia, insulinemia, and type 1 and 2 diabetes is not clear. A prospective study provided evidence for an inverse association between fish and LC-PUFA n-3 intake, and risk of CHD and total mortality among diabetic women. It finally concluded that regular fish consumption should be considered as part of a healthy diet for diabetic management [43]. Other authors have also found positively associated high plasma n-3 FA

with plasma glucose [13], but the weak associations found in this study do not allow for conclusions towards any trend referring to this issue to be formed.

However, our results showed a protective effect of the ratio EPA to AA on plasma HDL-C. In our study, a threshold value of 0.33 for the ratio of EPA to AA afforded this protective effect. In contrast, DHA was negatively associated with the ratio of total to HDL-C. The explanation of the observed relation between the ratio of EPA to AA and the ratio of total to HDL-C is unclear because the association between EPA and the ratio of total to HDL-C was not significant (data not shown). The decrease of HDL-C after n-3 fatty acid intake is positively related with changes of plasma EPA concentrations and negatively related with the increase of DHA. Hence, it seems that when plasma concentrations of AA are taken into account, the beneficial effect of EPA on the ratio of total to HDL-C is more easily detected.

It would be therefore recommendable to look for public health strategies to promote and increase the fish intake among the Catalan population in the context of the “traditional” Mediterranean Diet and healthy lifestyle habits. Special attention should be given to oily fish, which, according to the present study, is currently consumed only once a week.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Public Health Division of the Department of Health of the Autonomous Government of Catalonia for providing the blood samples for the study. Special thanks to Mr. Lindsey Moshell for the manuscript correction.

REFERENCES

1. Geleijnse JM, Brouwer IA, Feskens EJ (2006) Risks and benefits of omega 3 fats: Health benefits of omega 3 are in doubt. *British Journal of Nutrition* 332:915
2. Breslow JL (2006) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 83:S1477-S1482
3. Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, Jordan HS, Lau J (2006) n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 84:5-17
4. Iso H, Kobayashi M, Ishihara J, Sasaki S, Okada K, Kita Y, Kokubo Y, Tsugane S, for the JPHC Study Group (2006) Intake of Fish and n3 Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease Among Japanese: The Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation* 113:195-202
5. Schmidt EB (2003) Marine n-3 fatty acids and thrombosis. *Thrombosis Research* 111:9-10

6. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM (1989) Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* Sep 30:8666-757
7. Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D et al. on behalf of the GISSI-Prevenzione Investigators (2002) Early Protection Against Sudden Death by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids After Myocardial Infarction: Time-Course Analysis of the Results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105:1897-1903
8. 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. *J Nutr* 134:1806-1811
9. Calder PC (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83:1505S-1519S
10. Christensen JH, Christensen MS, Dyerberg J, Schmidt EB (1999) Heart rate variability and fatty acid content of blood cell membranes: a study with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 70:331-337
11. Mori TA, Beilin LJ (2001) Long-chain omega 3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr Opin Lipidol* 12:11-17
12. Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders AR, Kok FJ (2002) Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens* 20:1493-1499
13. Dewailly E, Blanchet C, Lemieux S, Sauve L, Gingras S, Ayotte P, Holub BJ (2001) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik. *Am J Clin Nutr* 74:464-473
14. Din JN, Newby DE, Flapan AD (2004) Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease--fishing for a natural treatment. *BMJ* 328:30-35
15. Christensen JH, Skou HA, Madsen T, Torring I, Schmidt EB (2001) Heart rate variability and n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine* 249:545-552
16. De Caterina R, Massaro M (2005) Omega-3 fatty acids and the regulation of expression of endothelial pro-atherogenic and pro-inflammatory genes. *J Membr Biol* 206:103-116
17. Psota TL, Gebauer SK, Kris-Etherton P (2006) Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk. *The American Journal of Cardiology* 98:3-18
18. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M et al. (2006) Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114:82-96
19. Mozaffarian D, Lemaitre RN, Kuller LH, Burke GL, Tracy RP, Siscovick DS (2003) Cardiac Benefits of Fish Consumption May Depend on the Type of Fish Meal Consumed: The Cardiovascular Health Study. *Circulation* 107:1372-1377

20. Calder PC (2004) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)* 107:1-11
21. Moreno LA., Sarria A, Popkin BM (2002) The nutrition transition in Spain: a European Mediterranean country. *Eur J Clin Nutr* 56:992-1003
22. Hibbeln JR, Nieminen LR, Blasbalg TL, Riggs JA, Lands WE (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nutr* 83:S1483-S1493
23. Junca S, Guillen M, Aragay JM, Brugulat P, Castell C, Seculi E, Medina A, Tresserras R. (2003) Methodological aspects in the evaluation of health and risk-reduction objectives of Health Plan for Catalonia for the year 2000. *Med Clin (Barc)* 121:10-19
24. Bondia-Pons I, Castellote AI, Lopez-Sabater MC (2004) Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *Journal of Chromatography B* 809:339-344
25. Bondia-Pons I, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater MC (2006) Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1116:204-208
26. Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, Willett WC (1993) Development and Validation of a Food Frequency Questionnaire in Spain. *International Journal of Epidemiology* 22:512-519
27. Serra-Majem L, Morales D, Domingo C, Caubet E, Ribas L, Nogués RM (1994) Comparison of two dietary methods: 24-hour recall and semiquantitative food frequency questionnaire (article in Spanish). *Med Clin (Barc)* 103:652-656
28. Serra-Majem L, Armas-Navarro A, Ribas-Barba L, and on behalf of the Research Group ENCA (1997-98). Nutritional Survey of Canarian Islands: Dietary habits and food consumption (in Spanish). Health Nutrition Service from Canarian Islands. 1, 1-244. 1999. Santa Cruz de Tenerife (Spain).
29. Tur JA, Romaguera D, Pons A. (2004) Adherence to the Mediterranean dietary pattern among the population of the Balearic Islands. *Br J Nutr* 92:341-346
30. Cervera P (2006) Food composition tables of CESNID (The Centre for Superior Studies in Nutrition and Dietetics) (in Spanish). Barcelona (Spain), 1-256
31. Cuco G, Fernandez-Ballart J, Marti-Henneberg C, Arijia V (2002) The contribution of foods to the dietary lipid profile of a Spanish population. *Public Health Nutr* 5:747-755
32. Serra-Majem L, de la Cruz JN, Ribas L, Tur JA. (2003) Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr* 57:S2-S7
33. WHO Regional Office for Europe. Food based dietary guidelines in the WHO European Region. World Health Organization. EUR/03/5045414, 1-38. 2003

34. Cunnane S. on behalf of the International Society for the Study of Fatty Acids & Lipids. Recommendations for intake of polyunsaturated fatty acids in healthy adults. ISSFAL. Board of ISSFAL, 1-13. 2004. Brighton.
35. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J (2006) Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2186-2191
36. Harrington KE, McGowan MJ, Kiely M, Robson PJ, Morrissey PA, Gibney MJ (2001) Macronutrient intakes and food sources in Irish adults: findings of the North/South Ireland Food Consumption Survey. *Public Health Nutrition* 4:105-161
37. Sioen IA, Pynaert I, Matthys C, De Backer G, Van Camp J, De Henauw (2006) Dietary intakes and food sources of fatty acids for Belgian women, focused on n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 41:415-422
38. Welch A, Bingham SA, Ive J, Friesen MD, Wareham NJ, Riboli E, Khaw KT (2006) Dietary fish intake and plasma phospholipid n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations in men and women in the European Prospective Investigation into Cancer-Norfolk United Kingdom cohort. *Am J Clin Nutr* 84:1330-1339
39. Harris WS (1997) n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 65:1645S-1654S
40. Sidhu KS (2003) Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regul Toxicol Pharmacol* 38:336-344
41. Dallongeville J, Yarnell J, Ducimetiere P, Arveiler D, Ferrieres J, Montaye M, Luc G, Evans A, Bingham A (2003) Fish Consumption is associated with lower heart rates. *Circulation* 108:820-825
42. Covington MB (2004) Omega-3 Fatty Acids. *American Family Physician* 70:133-140
43. Hu FB, Cho E, Rexrode KM, Albert CM, Manson JE (2003) Fish and Long-Chain {omega}-3 Fatty Acid Intake and Risk of Coronary Heart Disease and Total Mortality in Diabetic Women. *Circulation* 107:1852-1857

Table 1. Relative concentrations of plasma fatty acids in the sample population
(% by wt of total fatty acids)

<i>Fatty acids</i>	<i>Geometric mean</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
SFA	28.55	19.12	38.75
C16:0	20.38	11.79	27.89
C18:0	6.55	3.39	11.47
MUFA	26.05	15.65	43.27
C18:1	23.73	14.38	40.84
PUFA	44.60	24.33	58.74
<i>Total n-6</i>	40.85	21.33	55.15
C18:2 n-6	33.21	19.12	48.31
C20:4 n-6	6.70	1.24	12.76
<i>Total n-3</i>	3.12	0.92	7.11
EPA	0.48	0.07	2.55
DHA	1.95	0.13	4.37
n-6/n-3	13.08	7.76	23.18
EPA/AA	0.07	0.06	0.40

Table 2. Relative concentrations of n-3 fatty acids in plasma according to characteristics of the sample population

<i>Potential confounding variables</i>	<i>EPA</i>	<i>DHA</i>	<i>EPA+DHA</i>	<i>EPA:AA</i>	<i>n-3:n-6</i>
Sex					
Men (n = 203)	0.47 ± 0.17	1.87 ± 0.30	2.40 ± 0.41	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.003
Women (n = 313)	0.49 ± 0.17	2.00 ± 0.34	2.53 ± 0.43	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.002
P	0.061	0.062	0.102	0.497	0.325
Age					
18-39 y (n = 192)	0.38 ± 0.11	1.87 ± 0.35	2.29 ± 0.58	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.003
≥ 40 y (n = 324)	0.54 ± 0.19	1.99 ± 0.39	2.59 ± 0.55	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.002
P	0.0001	0.0630	0.0001	0.0001	0.0001
Waist circumference					
Elevated (n = 261)	0.53 ± 0.14	1.94 ± 0.34	2.52 ± 0.54	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.003
Normal (n = 255)	0.46 ± 0.12	1.95 ± 0.37	2.46 ± 0.60	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.003
P	0.016	0.843	0.490	0.006	0.587
Smoking status					
Smoker (n = 142)	0.42 ± 0.13	1.76 ± 0.35	2.25 ± 0.59	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.003
Occasionally smoker (n = 22)	0.42 ± 0.13	1.86 ± 0.37	2.47 ± 0.59	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.002
Nonsmoker (n = 348)	0.50 ± 0.13	2.02 ± 0.36	2.58 ± 0.52	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.002
P	0.011	0.001	0.001	0.006	0.002
Medication for hypertension					
Yes (n = 199)	0.61 ± 0.14	2.11 ± 0.37	2.78 ± 0.55	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.003
No (n = 317)	0.46 ± 0.15	1.93 ± 0.34	2.45 ± 0.56	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.004
P	0.002	0.094	0.160	0.0001	0.001
Medication for CVD problems					
Yes (n = 73)	0.56 ± 0.11	2.06 ± 0.35	2.68 ± 0.56	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
No (n = 443)	0.47 ± 0.11	1.94 ± 0.32	2.47 ± 0.56	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02
P	0.124	0.397	0.198	0.070	0.098
Diabetic					
Yes (n = 30)	0.51 ± 0.14	1.78 ± 0.33	2.35 ± 0.52	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.004
No (n = 486)	0.48 ± 0.17	1.96 ± 0.35	2.49 ± 0.53	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.004
P	0.513	0.177	0.412	0.098	0.181

Geometric mean ± SE. P by one-way ANOVA.

Table 3. Daily intakes of marine foods, EPA and DHA in the sample population by sex and age, according to the food-frequency questionnaire

<i>Marine food category</i>	<i>Men</i> (<i>n</i> = 203)	<i>Women</i> (<i>n</i> = 313)	<i>18-39 y</i> (<i>n</i> = 192)	<i>40 y</i> (<i>n</i> = 324)	<i>All</i> (<i>n</i> = 516)
1	4.48 ± 0.67	4.45 ± 0.65	3.91 ± 0.71	5.41 ± 0.62	4.47 ± 0.63
2	30.19 ± 4.92	43.3 ± 5.01 ^a	32.64 ± 4.40	38.84 ± 4.21 ^b	36.11 ± 4.59
3	20.25 ± 4.71	19.53 ± 4.36	19.49 ± 4.45	20.36 ± 4.82	19.72 ± 5.42
4	11.20 ± 2.56	10.06 ± 2.45	11.62 ± 1.47	9.85 ± 1.81 ^b	10.49 ± 2.45
5	3.71 ± 1.20	3.61 ± 1.36	3.85 ± 1.25	3.54 ± 1.52	3.65 ± 1.42
6	4.79 ± 1.35	4.38 ± 1.25	4.38 ± 1.14	4.82 ± 1.25	4.46 ± 1.14

Mean value (g/day) ± SE.

^a Significantly different from men (two-factor ANOVA): P ≤ 0.05

^b Significantly different from 18-39 y (two-factor ANOVA): P ≤ 0.05

Marine food category: (1) freshwater fish, (2) saltwater lean fish, (3) saltwater oily fish, (4) cephalopods, (5) mollusks, (6) crustaceans.

Table 4. EPA and DHA plasma content (%) according to the frequency of marine food intake

<i>Marine food category</i>		<i>> 2 per week</i>	<i>2 per week</i>	<i>1 per week</i>	<i>2-3 per month</i>	<i>1 per month</i>	<i>Never</i>	<i>P</i>
1	EPA	-	0.78 ± 0.15	0.71 ± 0.12	0.60 ± 0.11	0.57 ± 0.12	0.57 ± 0.15	0.477
	DHA	-	2.04 ± 0.32	2.10 ± 0.31	2.23 ± 0.29	2.13 ± 0.31	2.03 ± 0.34	0.325
	n	0	9	17	35	68	337	
2	EPA	0.75 ± 0.17 ^a	0.53 ± 0.15 ^b	0.55 ± 0.14 ^b	0.52 ± 0.11 ^b	0.61 ± 0.12 ^b	0.42 ± 0.11 ^c	0.0001
	DHA	2.31 ± 0.36 ^a	2.05 ± 0.30 ^b	2.03 ± 0.29 ^b	1.99 ± 0.29 ^b	2.04 ± 0.31 ^b	1.88 ± 0.32 ^c	0.012
	n	76	122	149	61	32	26	
3	EPA	0.88 ± 0.21 ^a	0.75 ± 0.17 ^b	0.58 ± 0.14 ^c	0.47 ± 0.18 ^d	0.42 ± 0.13 ^d	0.42 ± 0.17 ^d	0.0001
	DHA	2.45 ± 0.38 ^a	2.28 ± 0.35 ^b	2.08 ± 0.35 ^c	2.10 ± 0.37 ^c	1.81 ± 0.29 ^d	1.71 ± 0.32 ^d	0.0001
	n	35	73	164	83	56	55	
4	EPA	0.90 ± 0.22	0.57 ± 0.18	0.60 ± 0.15	0.56 ± 0.15	0.55 ± 0.17	0.54 ± 0.17	0.313
	DHA	2.60 ± 0.41	2.16 ± 0.39	2.13 ± 0.36	2.07 ± 0.36	2.01 ± 0.32	1.96 ± 0.33	0.062
	n	6	26	126	131	108	69	
5	EPA	-	0.72 ± 0.17 ^a	0.57 ± 0.15	0.57 ± 0.15	0.56 ± 0.16	0.55 ± 0.18	0.075
	DHA	-	2.44 ± 0.41 ^a	2.07 ± 0.36 ^b	2.11 ± 0.35 ^b	2.08 ± 0.31 ^b	1.94 ± 0.33 ^b	0.010
	n	0	17	105	116	127	101	
6	EPA	0.87 ± 0.22 ^a	0.68 ± 0.17	0.63 ± 0.18	0.57 ± 0.21	0.54 ± 0.21	0.54 ± 0.21	0.379
	DHA	2.44 ± 0.40 ^a	2.11 ± 0.36	2.14 ± 0.35	2.06 ± 0.35	2.06 ± 0.34	1.99 ± 0.37	0.061
	n	3	10	92	114	157	90	

Mean value (%) ± SE.

Values in the same row with different superscript letters are significantly different. P < 0.05

Marine food category:

(1) freshwater fish, (2) saltwater lean fish, (3) saltwater oily fish, (4) cephalopods, (5) mollusks, (6) crustaceans.

Table 5. Values of cardiovascular disease risk factors in the sample population, by sex and age

<i>CVD risk factors</i>	<i>Men</i>	<i>Women</i>	<i>18-39 y</i>	<i>> 40 y</i>	<i>total</i>	<i>P for sex X age</i>
TC (mmol/L)	4.69 ± 0.46	4.58 ± 0.46	4.40 ± 0.58 ^b	4.78 ± 0.57	4.62 ± 0.46	0.373
LDL-C (mmol/L)	2.97 ± 0.26 ^a	2.74 ± 0.34	2.64 ± 0.31 ^b	2.97 ± 0.29	2.83 ± 0.28	0.353
HDL-C (mmol/L)	1.19 ± 0.21 ^a	1.44 ± 0.22	1.39 ± 0.22	1.31 ± 0.34	1.34 ± 0.22	0.344
TG (mmoL/L)	1.15 ± 0.10 ^a	0.85 ± 0.11	1.08 ± 0.11 ^b	0.81 ± 0.13	0.97 ± 0.12	0.182
Glucose (mmol/L)	5.71 ± 1.71 ^a	5.03 ± 1.04	5.59 ± 1.56 ^b	4.78 ± 1.60	5.21 ± 1.26	0.038
Insulin (mg/dL)	13.31 ± 7.77	11.96 ± 7.65	11.30 ± 8.22	13.37 ± 7.54	12.49 ± 7.99	0.330
SBP (mm Hg)	127.36 ± 19.08 ^a	118.84 ± 22.02	112.61 ± 12.76 ^b	129.30 ± 22.05	122.24 ± 15.76	0.274
DBP (mm Hg)	80.99 ± 11.44 ^a	77.47 ± 10.88	75.04 ± 9.66 ^b	81.69 ± 11.32	78.87 ± 8.39	0.356

Mean value ± SE. TC, total cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

^a Significant different from women (two-factor ANOVA): P < 0.0001

^b Significant different from > 40 y (two-factor ANOVA): P < 0.0001

Table 6. Standardized regression coefficients from the multiple linear regression analysis.

<i>CVD risk factors</i>	β (Log EPA)	<i>p</i>	β (Log DHA)	<i>p</i>
TC	- 0.71	0.050	- 0.42	0.191
LDL-C	- 0.65	0.080	- 0.01	0.555
HDL-C	2.10	0.080	0.01	0.305
Log TG	- 1.15	0.001	- 0.16	0.040
Insulin	- 0.80	0.027	- 0.06	0.462
SBP	- 0.40	0.205	- 0.40	0.127
DBP	- 0.41	0.302	- 0.39	0.205

Each model included the CVD risk factor as the dependent variables, the relative concentrations of plasma FA as the predictor variable; and age, sex, waist circumference, body mass index, SFA intake, MUFA intake and smoking status as fixed and covariate variables.

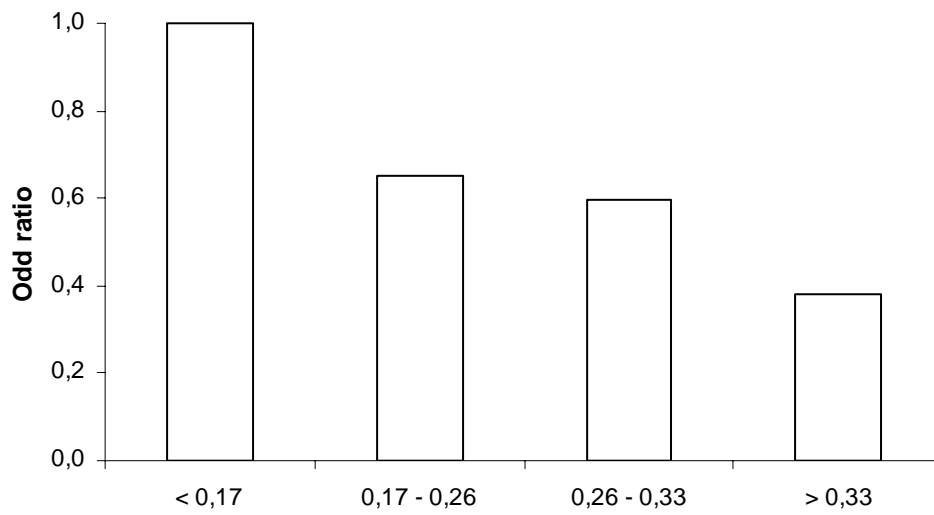


Figure 1. Odd ratios of a prevalent high-risk concentration of plasma HDL-C by quartiles of the plasma ratio of EPA to AA.

**2.4. INCIDENCIA DE LOS PRINCIPALES ISÓMEROS
DE LOS ÁCIDOS GRASOS *TRANS* Y DEL ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO EN EL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA**

2.4.1. Evaluation of the main isomers of conjugated linoleic acid and *trans* fatty acids in a sample from Mediterranean north-east Spain

Título: Evaluación del contenido de los principales isómeros del ácido linoleico conjugado y de los ácidos grasos *trans* en una muestra de una población mediterránea del noreste de España

Autores: Isabel Bondia-Pons, Lluís Serra-Majem, Ana I. Castellote, M. Carmen López-Sabater

Estado: pendiente de enviar

Resumen:

El objetivo principal de este estudio se centró en evaluar los contenidos plasmáticos de los dos isómeros mayoritarios de ácidos grasos *trans* (*trans* 18:1 n-9 y *trans* 18:2 n-6) y del ácido linoleico conjugado (*cis*-9, *trans*-11 C18:2 n-6 and *trans*-10, *cis*-12 C18:2 n-6) en una muestra representativa de la población catalana. Paralelamente se evaluó la correlación existente entre las principales fuentes alimentarias de ambas familias de AG con los contenidos plasmáticos anteriores.

La muestra analizada consistió en 621 individuos de edades comprendidas entre los 18-77 años, que participaron en las Encuestas de Salud y Alimentación de la Generalitat de Catalunya 2002-2003. El perfil lipídico y los ácidos grasos plasmáticos *trans* se determinaron en la totalidad de los participantes, y los dos isómeros del CLA en una submuestra de 208 individuos.

Los resultados obtenidos mostraron algunas diferencias significativas en el consumo de determinados alimentos en función del sexo. Los isómeros de los TFA analizados se hallaron en un 2.4% del total de los AG, mientras que el porcentaje de los dos isómeros del CLA sólo supuso un 0.5%. El ácido elaidico se correlacionó significativamente con el grupo de los dulces y pastas, pero no con el resto de alimentos considerados fuentes de TFA. Así mismo, el *cis*-9, *trans*-11 C18:2n-6 se correlacionó positivamente con los productos lácteos, queso y la carne de rumiantes. El ratio LDL: HDL, considerado marcador del riesgo CVD, también se asoció positivamente con los niveles plasmáticos del ácido elaidico (β value = 1.24, $p < 0.001$) después del ajuste de variables confusoras. Los niveles plasmáticos de los isómeros de TFA y CLA analizados sugieren que la dieta catalana no se ve seriamente afectada por la influencia de patrones alimentarios occidentales. Sin embargo, sería recomendable una reducción en la ingesta de SFA en dicha población.

Evaluation of the main isomers of conjugated linoleic acid and *trans* fatty acids in a sample from Mediterranean north-east Spain*

Isabel Bondia-Pons¹, Lluís Serra-Majem², Ana I. Castellote¹, M. Carmen López-Sabater¹.

Affiliation:

¹Dept. Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain.

²Dept. of Clinical Sciences, Center for Health Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, PO Box 550, Las Palmas de Gran Canaria, E-35080 Las Palmas, Spain.

Corresponding author:

M.C. López-Sabater

Mailing address:

Dept. of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy

University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n

E-08028 Barcelona, Spain.

Telephone number: +34-93 402 45 12

Fax number: +34-93 403 59 31

E-mail address: mclopez@ub.edu

* Study supported by Mercadona S.A. and the Centre Català de la Nutrició de l'Institut d'Estudis Catalans. The PhD-grant F.P.U. to Isabel Bondia-Pons has been given by the Spanish Ministry of Education.

STRUCTURED ABSTRACT

Objective: To evaluate the current plasma levels of the major two CLA and TFA isomers in a representative sample of Catalonia, a Spanish Mediterranean region, and to evaluate their correlation with their main food sources and the LDL: HDL ratio, considered a strong marker of cardiovascular risk.

Design: Cross-sectional nutritional survey.

Setting: Population based random sample derived from the Catalan Nutrition Survey.

Subjects: A total of 621 adult participants; men (n = 261) and women (n = 360).

Methods: Anthropometric characteristics and blood pressure measure were obtained from entire participants in a clinical session. Dietary habits were assessed by means of a validated quantitative food frequency questionnaire. Serum lipid profile and plasma fatty acid profile were carried out for the entire sample, except for the conjugated linoleic acid (CLA) isomers, which were determined in a subsample of 208 volunteers.

Results: Some gender differences were observed in nutrient and energy intakes. The two major *trans* fatty acids (TFA) isomers (*trans* 18:1 n-9 and *trans* 18:2 n-6) accounted for 2.4% of the total plasma fatty acids, while the two major CLA isomers (*cis*-9, *trans*-11 C18:2 n-6 and *trans*-10, *cis*-12 C18:2 n-6) represented less than 0.5% of the plasma fatty acids. Elaidic acid significantly correlated with the sweets and pastries food group, but not with the rest of main TFA sources in the diet. The *cis*-9, *trans*-11 C18:2n-6 significantly correlated with dairy products, milk, cheese and ruminant meat. The LDL: HDL ratio was positively associated with the plasma levels of elaidic acid (β value = -1.24, $p < 0.001$) after adjusting for confounding variables.

Conclusions: MUFAs appear to be the main dietary fat source in the Catalan population thanks to their habitual olive oil consumption. The obtained plasma levels of the main two TFA and two CLA suggest that the Catalan diet is not at present strongly influenced by the occidental dietary patterns. However, a reduction in the Catalan diet's SFA intake should be recommended.

Sponsorship: Supported by the Catalan Department of Health, the Nutrition Catalan Centre of the Institute of Catalan Studies, and Mercadona S.A.

Keywords: Conjugated linoleic acid, *trans* fatty acids, human plasma, Mediterranean diet.

Abbreviations: *trans* fatty acids (TFA); Conjugated linoleic acid (CLA); Mediterranean dietary pattern (MDP); prudent dietary pattern (PDP); occidental dietary pattern (ODP).

INTRODUCTION

Growing scientific evidence suggests that some dietary patterns can positively influence the risk factors of some diseases such as cardiovascular disease (Zyriax et al., 2005; Mark, 2006; Licht et al., 2006). People following the healthy Mediterranean dietary pattern (MDP), which is rich in monounsaturated fat, obtain the majority of energy from foods of vegetable origin, and maintain low intake of saturated fat and cholesterol.

During the last years the increase of obesity, hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia in the European countries (York et al., 2004, Stoeckli et al., 2004; Malecka-Tendera et al., 2006) could imply a significant deviation from “prudent dietary patterns” (PDP) to “occidental dietary patterns” (ODP) among the population.

The ODP is characterized by an excess intake of energy, with frequent intakes of red meat, refined carbohydrates, sweets and dairy products rich in saturated fat (Wang et al., 2003). According to this fact, the fatty acid profile of the Mediterranean populations could suffer a reduction in its MUFA and LC-PUFA n-3 levels, mainly obtained through the consumption of olive oil and fish, in response to an increase of SFA and *trans* fatty acids. One of the food groups of interest to consider is dairy products. Despite its beneficial calcium contribution to body bone health, the frequency, type and amount of dairy products intake should be periodically controlled because of being a source of SFA and *trans* fatty acids (TFA).

However, it is well-known that the conjugated linoleic acid (CLA) is also naturally found in milk and milk products, but only of ruminant animals (Pariza et al., 2004). The *cis*-9, *trans*-11 CLA isomer (rumenic acid) is the principal dietary form of CLA, accounting for as much as 85-90% of the total CLA content in dairy products (Palmquist et al., 2005). Although several animal studies, and to a less extent some human studies, have provided beneficial effects of conjugated linoleic acid on health-related outcomes such as blood lipid profile, body composition, insulin sensitivity and immune function (Tricon et al., 2005), there is still a gap in the CLA levels of the general population. Available data from the CLA world population levels widely vary from negligible contents to even 1500 mg/day (McGuire et al., 1999). This fact justifies the need to evaluate CLA status in different populations that will be used as references to establish future CLA recommendations for human health benefits, since these benefits were consistently confirmed.

Therefore the objective of the present work was to evaluate the current plasma levels of the main CLA and TFA isomers in a representative sample of Catalonia, a Spanish region traditionally adherent to the Mediterranean Diet lifestyle, and to evaluate their correlation with their main food sources and the LDL: HDL ratio, considered a strong marker of cardiovascular risk.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The subjects were a subgroup of a larger sample (1600 subjects) randomly recruited in Catalonia, a Mediterranean region in north-western Spain, for a cross-sectional nutritional survey (Junca *et al.*, 2003). The primary objective of the survey was to collect relevant information on the dietary habits of the Catalan population and assess their food consumption patterns. The sampling technique included stratification according to geographical area and municipality size, age and sex of inhabitants.

Blood analysis and physiological and anthropometric measurements were obtained from 670 participants in a clinical session after informed consent. Only people who did not under-report their energy intake ($EI/BMR \geq 1.14$) were considered for food consumption analysis. Of these 641 Catalans, 20 did not fast for >12 h before blood sampling and were therefore excluded. The final sample consisted of 621 subjects (18-77 y), 261 men and 360 women. The study protocol was approved by the regional ethics committee, following the Declaration of Helsinki 1975 standards.

Anthropometric Measurements

The anthropometric measures used in this study were: height (m), weight (kg), body mass index (BMI, calculated as weight in kg/height² in m) waist and hip circumferences, and waist-hip ratio (WHR). Height was determined using a mobile anthropometer to the nearest millimeter. Body weight was determined to the nearest 100g using a digital scale. Waist and hip circumferences were measured using a non-stretchable measuring tape. Waist circumference (WC) was measured at the navel in men, and midway between the bottom of the ribs and the top of the hip bone in women. Hip circumference (HC) was measured at the tip of the hip bone in men and at the widest point between the hips and the buttocks in women. Prevalence of overweight and obesity was calculated according to previously described cut-off limits (Aranceta-Bartrina *et al.*, 2005).

Nutrition data

Data on food intake were obtained with the use of a quantitative food-frequency questionnaire (FFQ), which was previously validated (Martín-Moreno *et al.*, 1993) and applied to other Spanish regions (Serra-Majem *et al.*, 1994; Serra Majem *et al.*, 1999; Tur *et al.*, 2004). The FFQ, which asked the subject to recall average use over the past year, consisted of 92 food items. The FFQ was arranged by food type and meal pattern. Frequency categories were based on the number of times that items were consumed per day, week or month. Consumption less than once a month was considered no consumption. Daily consumption in grams was determined by dividing the reported amount of the intake by the frequency in days. The relevant period of consumption of seasonal items was also taken into account. Edible fractions of foods were recorded in the database. Food values were converted into nutrient values by validated software developed by the Centre of Nutrition and Dietetics CESNID based on Spanish tables of food composition (Cervera, 2003).

Serum lipid profile and plasma fatty acid analysis

Blood samples were collected after the subjects fasted for 12 hours. Plasma was stored at -80°C before analyses. Standardized enzymatic methods were used for the analysis of serum lipids (Junca et al., 2003). The TFA profile was determined by fast gas chromatography (fast GC) with a previous derivatization to their corresponding fatty acid methyl esters (Bondia-Pons *et al.*, 2004) in the entire sample (n = 621). The conjugated linoleic acid isomers were determined in 208 participants by a modified method of Pariza and colleagues (Pariza et al., 2001). Results were expressed as relative percentages of total fatty acids.

Statistical Analysis

All values are presented as mean \pm SD. The unpaired Student t-test was used to test differences between groups for variables following normality and chi-square tests were performed for the rest of the variables. Partial correlation coefficients between TFA and CLA food groups and plasma elaidic acid and *cis-9, trans-11* C18:2n-6 were calculated adjusting for sex and age. Multivariable models were used to analyze the effect of the two major plasma TFAs in the lipid profile of the Catalan participants. The LDL: HDL cholesterol ratio was defined as the dependent variable and the plasma 18:1 n-9 *trans* and 18:2 n-6 *trans* acid logarithmic concentration were the independent variables after adjusting by age, BMI, blood pressure, smoking status, SFA intake, alcohol use, diabetes and cardiovascular medication. For all analyses, two-sided significance was determined at the $P < 0.05$ level. Analyses were performed with SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

The significantly high BMI of men agreed with their higher waist to hip ratio (WHR) in comparison to women (**Table 1**). Classical CVD risk factors also showed differences according to sex. After adjustment by age, women presented the healthiest lipoprotein and triglyceride profiles and the lowest blood pressure values.

Nutritional data showed a higher total energy intake in males than in females, but no significant differences were observed for energy intake per kg body weight (**Table 2**). The contribution of carbohydrates to energy was higher in men, obtaining also more energy from complex carbohydrate than did women (24.4 ± 5.8 (men) *vs* 22.0 ± 5.6 (women); values in % of total energy; $p < 0.001$). Protein intake was similar for both genders except for the energy intake from animal source protein, which was higher for women (13.5 ± 3.5 (women) *vs* 12.5 ± 3.2 (men); values in % of total energy; $p < 0.001$).

Women presented the highest fat intake. Significantly higher MUFA intakes (17.8 ± 3.9 (men) versus 20.2 ± 3.6 (women); values in % of total energy; $p < 0.0001$) were observed in women, but not in relation to either PUFA or SFA intake. Among the main MDP food groups, olive oil and fish were those with significantly higher intakes in women than men. Men showed the highest mean intakes of red meat and sweets and pastries, which are characteristic food groups of occidental dietary patterns.

Table 3 shows the plasma fatty acid profile of the Catalan sample. Palmitic acid was the SFA with the highest plasma contents (75% of total plasma SFA). More than 90% of the total plasma MUFA was oleic acid, while linoleic acid represented 70% of the total PUFA. The plasma n-6/n-3 PUFA ratio was 15,6. The two major TFA isomers accounted for 2.4% of the total plasma fatty acids, while the two major CLA isomers represented less than 0.5% of the plasma fatty acids. The distribution of the plasma CLA content, adjusted by age and sex (**Figure 1**), showed a median CLA value of 0.4% of the total fatty acids.

The major TFA isomer (elaidic acid) significantly correlated with the sweets and pastries food group, but not with the rest of main *trans* fatty acid sources in the diet (**Table 4**). The main CLA isomer (*cis-9, trans-11* C18:2 n-6) significantly correlated with dairy products, milk, cheese and ruminant meat in the Catalan sample (**Table 5**). After adjusting for confounding variables, the LDL: HDL ratio, considered a strong marker of cardiovascular risk (Ascherio, 2006), was positively associated with the plasma levels of elaidic acid (β value = -1.24, $p < 0.001$), but not with those of *trans* 18:2 n-6.

DISCUSSION

According to the present study, the plasma levels of the two major TFAs (18:1 n-9 *trans*, 18:2 n-6 *trans*) are $2.4 \pm 0.5\%$ of the total plasma fatty acids. There is few available data from *trans*-fatty acid levels in human plasma. However, the Catalan intake of *trans* fatty acid levels and SFA is lower than that found by other authors of studies in other European populations (Bamia et al., 2005; Leth et al., 2006; Matthys et al., 2006; Czernichow et al., 2006; Welch et al., 2006; Aro, 2006)

Among the food sources traditionally considered rich in TFA, margarines made with partially hydrogenated vegetable oils are known to be widely consumed in Western societies (Lindahl et al., 2003; Pedersen et al., 2004; Bolte et al., 2005). Interestingly, a recent New Zealand study concluded that the home use of margarine can be used as an important determinant of TFA exposure after using plasma phospholipid *trans* fatty acid composition as a surrogate measure of exposure (Skeaff et al., 2006). However, those contributions similar to margarine or butter to the diet of the Mediterranean region have traditionally been insignificant (Serra-Majem et al., 2004).

According to our results, the current Catalan population diet still agrees with this fact, having very low margarine intake and olive oil, rich in MUFA, as its main fat source.

The intake of fat from snacks, bakery products, meat and meat products is also considered a potential TFA source. Nevertheless, only the groups of sweets and pastries and red meat were weakly, but significantly, associated with plasma elaidic acid composition. The low consumption observed for the other TFA food sources could be the reason for a lack of more associations. Furthermore, the total *trans* fatty acid intake is difficult to determine using dietary assessment because food composition databases are incomplete for TFA. Moreover, hidden fats in other manufactured foods may be the predominant source of *trans* fatty acids in the diet. This could be also a reason for the low values of the correlation coefficients for those associations that were significant.

It is well-known that TFA intakes are associated with a higher risk of cardiovascular disease (Koletzko et al., 1997; Denke, 2006; Harris et al., 2007). High intakes of these fatty acids can adversely affect endothelial function, which might partially explain why the positive relation between *trans* fat and cardiovascular risk is greater than one would predict based solely on its adverse effects on the lipid profile (Lopez-Garcia et al., 2005). Being aware of this, we decided to determine whether the levels found in the Catalan participants for the two major TFAs could be high enough to show a significant relationship between the CVD risk factor marker of LDL: HDL ratio and both fatty acids. It has been previously reported that when a mixture of TFA isomers is used to replace oleic acid, there is a dose-dependent increase in the LDL: HDL ratio. The relationship between amount of TFA as % of energy and the increase in the LDL: HDL ratio appears to be approximately linear with the slope twice as steep as that observed by replacing oleic with saturated fats. We notice that the average impact of TFA induced changes in the LDL: HDL ratio has been reported to be responsible for tens of thousands of premature deaths in industrialized populations (Ascherio, 2006). However, this effect is substantially smaller than the increase in cardiovascular mortality associated with TFA intake in epidemiological studies, suggesting that other mechanisms are likely to contribute to the toxicity of TFA. According to our results, only the most abundant *trans* fatty acid was positively associated with the cardiovascular risk factor, probably due to its higher intake through the diet and its higher amounts in plasma than that found for the *trans*-C18:2 n-6.

Due to stronger negative effects on human health than those found for the TFA, the SFA intake in the diet must be also considered. The MDP has been largely characterized by its low SFA contents (Serra Majem et al., 2004; Trichopoulou, 2004). However, the overwhelming increase of obesity, diabetes and insulin resistance during the last decade, not only in adults but also in children, shows the need to control the SFA food sources and their levels in the human body.

All SFA, with the notable exception of stearic acid, raise low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels (Wahrburg, 2004). Myristic acid, one of the most atherogenic SFA, which can be formed both endogenously and exogenously, accounted for less than 0.02% of the SFA plasma levels in the Catalan sample. The role of the stearic acid in relation to the lipid profile effects is still not clearly evaluated (Thijssen et al., 2005), but its levels in the Catalan participants were not too high in relation to other reported data (Stender et al., 2004). Interesting to point out are the objectives of the recently reported French TRANSFACT project design (Chardigny et al., 2006), which will evaluate and compare the effects on the lipid profile and cardiovascular risk factors of industrial and natural sources of TFA coming from milk fat, dairy products and ruminant meat in a sample of healthy volunteers. In fact, the naturally low level of TFA in milk fat is one of the limitations found when trying to evaluate the effects of all the TFA food sources in the diet. In our study, we were not able to find any clear association between the TFA plasma levels and the dairy products intake of the Catalan sample. Nevertheless, the major CLA isomer, which was found in very low amounts, accounting for only a quarter of the amount of *trans* fatty acids was significantly correlated with dairy products and ruminant meat in the Catalan participants. The *t-10,c-12* C18:2 n-6, whose plasma concentration was a third the amount of *c-9, t-11* C18:2 n-6 was, on the contrary, not significantly correlated with any CLA food source (data not shown). As it has been reported that CLA neither raise nor lower cholesterol concentrations of lipoproteins (Tricon et al., 2006), we decided not to perform any multivariate model with the low CLA contents found in our sample.

Although dietary composition remains an important, modifiable predictor of dyslipidemia, over-consumption of any form of dietary energy may replace any excess of saturated fat intake as the primary factor that increases lipid and lipoprotein levels. According to the present study, the Catalan population seems to maintain a “Mediterranean lipid profile”. Despite a higher total fat intake than that recommended by the current national and European nutritional guidelines (Lichtenstein et al., 2006), most likely due to the olive oil intake which characterizes MUFA as the main Catalan fat source, Catalan levels of TFAs are relatively low in comparison to those of other European populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Public Health Division of the Department of Health of the Autonomous Government of Catalonia for providing the blood samples for the study. Special thanks to Mr. Robin Rycroft for the manuscript correction; and to the Spanish Ministry of Education for their PhD-grant to Isabel Bondia-Pons.

REFERENCES

- Aranceta-Bartrina J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, Tur Mari J, Mataix Verdu J, Llopis Gonzalez J et al. (2003) Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study. *Med Clin (Barc)* 120: 608-612.
- Ascherio A (2006) Trans fatty acids and blood lipids. *Atheroscler Suppl* 7: 25-27.
- Bamia C, Orfanos P, Ferrari P, Overvad K, Hundborg HH, Tjønneland A, Olsen A, Kesse E, Boutron-Ruault MC et al. (2005) Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study. *Br J Nutr* 94: 100-113.
- Bolte G, Winkler G, Holscher B, Thefeld W, Weiland SK & Heinrich J. (2005) Margarine consumption, asthma, and allergy in young adults: results of the German National Health Survey 1998. *Ann Epidemiol* 15: 207-213.
- Bondia-Pons, I., Castellote, A. I. & Lopez-Sabater, M. C. (2004) Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *Journal of Chromatography B* 809: 339-344.
- Cantwell, M. M., Flynn, M. A. T., Cronin, D., O'Neill, J. P. & Gibney, M. J. (2005) Contribution of foods to trans unsaturated fatty acid intake in a group of Irish adults. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 18: 377-385.
- Cervera P. (2003) Food composition tables of CESNID (The Centre for Superior Studies in Nutrition and Dietetics) (in Spanish). McGraw-Hill Ed., Barcelona (Spain), 1-256.
- Chardigny JM, Malpuech-Brugere C, Dionisi F, Bauman DE, German B, Mensink RP, Combe N, Chaumont P & et al. (2006) Rationale and design of the TRANSFACT project phase I: a study to assess the effect of the two different dietary sources of trans fatty acids on cardiovascular risk factors in humans. *Contemp Clin Trials* 27: 364-373.
- Czernichow S, Bruckert E, Oppert JM, Bertrais S, Paillard F & et al (2005) Intake of added oils and fats among middle-aged French adults: relationships with educational level and region of residence. *J Am Diet Assoc* 105: 1889-1894.
- Haffner, S. & Taegtmeier, H. (2003) Epidemic Obesity and the Metabolic Syndrome. *Circulation* 108: 1541-1545.
- Harris WS, Reid KJ, Sands SA & Spertus JA (2007) Blood omega-3 and trans Fatty acids in middle-aged acute coronary syndrome patients. *Am J Cardiol* 99: 154-158.
- Junca S, Guillen M, Aragay JM, Brugulat P, Castell C, Seculi E, Medina A & Tresserras R. (2003) Methodological aspects in the evaluation of health and risk-reduction objectives
- Leth T, Jensen HG, Mikkelsen AA & Bysted A (2006) The effect of the regulation on trans fatty acid content in Danish food. *Atheroscler Suppl* 7: 53-56
- Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W. S. et al. (2006) Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114: 82-96.

Lindahl B, Stegmayr B, Johansson I, Weinehall L & Hallmans G (2003) Trends in lifestyle 1986-99 in a 25- to 64-year-old population of the Northern Sweden MONICA project. *Scand J Public Health Suppl* 61: 31-37.

Malecka-Tendera, E. & Mazur, A. (2006) Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes* 30: S1-S3.

Mark, A. L. (2006) Dietary therapy for obesity is a failure and pharmacotherapy is the future: a point of view. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33: 857-862.

Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, Willett WC (1993) Development and Validation of a Food Frequency Questionnaire in Spain. *International Journal of Epidemiology* 22:512-519

Matthys C, De Henauw S, Bellemans M, De Maeyer M & De Backer G. (2006) Sources of saturated fatty acids in Belgian adolescents' diet: implications for the development of food-based dietary guidelines. *Br J Nutr.* 95: 546-554

Pariza MW, Park Y, Cook ME, The biologically active isomers of conjugated linoleic acid *Prog Lipid Res.* 40 (2001) 283.

Pariza MW, *Am J Clin Nutr* 79 (Suppl.) (2004) Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid 1132S

Pedersen JI, Tverdal A & Irkhus B. (2004) Diet changes and the rise and fall of cardiovascular disease mortality in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen* 124: 1532-1536.

Serra-Majem L, Morales D, Domingo C, Caubet E, Ribas L, Nogués RM (1994) Comparison of two dietary methods: 24-hour recall and semiquantitative food frequency questionnaire (article in Spanish). *Med Clin (Barc)* 103:652-656

Serra-Majem L, Armas-Navarro A, Ribas-Barba L, and on behalf of the Research Group ENCA (1997-98). Nutritional Survey of Canarian Islands: Dietary habits and food consumption (in Spanish). Health Nutrition Service from Canarian Islands. 1, 1-244. 1999. Santa Cruz de Tenerife (Spain).

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

Sioen IA, Pynaert I, Matthys C, De Backer G, Van Camp J & De Henauw S (2006) Dietary intakes and food sources of fatty acids for Belgian women, focused on n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 41: 415-422.

Skeaff CM & Gowans S (2006) Home use of margarine is an important determinant of plasma trans fatty acid status: a biomarker study. *Br J Nutr.* 96: 377-383.

Stoeckli R; Keller, U. (2004) Nutritional fats and the risk of type 2 diabetes and cancer. *Physiology & Behavior* 83: 611-615. of Health Plan for Catalonia for the year 2000. *Med Clin (Barc).* 121: 10-19.

Stender S & Dyerberg J (2004) Influence of trans Fatty Acids on Health. *Am Nutr Metab* 48: 61-66

- Thijssen MA & Mensink RP (2005) Fatty acids and atherosclerotic risk. *Handb Exp Pharmacol* 170: 194.
- Trichopoulou A. Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly: a review. *Public Health Nutr.* 2004 Oct;7:943-7.
- Tricon, S., Burdge, G. C., Jones, E. L., Russell, J. J., El-Khazen, S., Moretti, E., Hall, W. L., Gerry, A. B., Leake, D. S. et al. (2006) Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 83: 744-753.
- Tur JA, Romaguera D & Pons A. (2004) Adherence to the Mediterranean dietary pattern among the population of the Balearic Islands. *Br J Nutr.* 92: 341-346
- York, D. A., Rossner, S., Caterson, I., Chen, C. M., James, W. P. T., Kumanyika, S., Martorell, R. & Vorster, H. H. (2004) Prevention Conference VII: Obesity, a Worldwide Epidemic Related to Heart Disease and Stroke: Group I: Worldwide Demographics of Obesity. *Circulation* 110: e463-e470.
- Wang C, Harris WS, Chung M et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006;84:5-17
- Welch, A. A., Bingham, S. A., Ive, J., Friesen, M. D., Wareham, N. J., Riboli, E. & Khaw, K. T. (2006) Dietary fish intake and plasma phospholipid n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations in men and women in the European Prospective Investigation into Cancer-Norfolk United Kingdom cohort. *Am J Clin Nutr* 84: 1330-1339.
- Zyriax, B. C., Boeing, H. & Windler, E. (2005) Nutrition is a powerful independent risk factor for coronary heart disease in women[mdash]The CORA Study: a population-based case-control study. *Eur J Clin Nutr* 59: 1201-1207.

Table 1. Anthropometric and clinical characteristics of the representative Catalan sample according by sex (values expressed as mean \pm SD).

	<i>Men (n = 261)</i>	<i>Women (n = 360)</i>
Age (y)	46.3 \pm 14.7	45.5 \pm 15.5
<i>Anthropometric characteristics</i>		
BMI (kg/m ²)	26.3 \pm 4.0 ^a	24.8 \pm 5.2
Waist to hip ratio, WHR	0.9 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.1
<i>Clinical characteristics</i>		
LDL-C (mmol/L)	3.14 \pm 0.29 ^a	2.61 \pm 0.35
HDL-C (mmol/L)	0.88 \pm 0.21 ^a	1.74 \pm 0.22
TG (mmol/L)	1.35 \pm 0.13 ^a	0.77 \pm 0.15
SBP (mm Hg)	128.12 \pm 19.15 ^a	115.84 \pm 22.31
DBP (mm Hg)	82.33 \pm 11.43 ^a	77.34 \pm 11.33

^a Significant different from women (adjusted by age) P < 0.001

Table 2. Nutritional characteristics of the representative Catalan sample

	<i>Men (n = 261)</i>	<i>Women (n = 360)</i>
Energy (kcal)	2244.2±556.5 ^a	1981.9±532.1
<i>Daily intake of macronutrients</i>		
Carbohydrates (%)	44.5±6.2 ^a	42.2±5.8
Protein (%)	18.5±3.0	19.3±3.1
Fat (%)	37.0±6.1 ^a	38.5±5.5
Cholesterol (mg)	315.5±132.8 ^a	293.0±112.1
<i>Daily intake of food groups</i>		
<i><u>Mediterranean dietary pattern components</u></i>		
Olive oil (ml)	22.6±12.0 ^a	24.5±11.0
Fruits and vegetables (g)	636.7±330.0	641.2±284.0
Fish and seafood (g)	75.2±51.7 ^a	80.7±51.3
Pulse (g)	18.0±11.4 ^a	15.4±10.0
Nuts (g)	6.0±9.0	5.0±8.0
<i><u>Occidental dietary pattern components</u></i>		
Red meat (g)	119.0±47.0 ^a	117.23±42.4
Dairy products (g)	370.1±279.0 ^a	414.7±259.4
Sweet and pastries (g)	34.0±42.5 ^a	28.4±29.0
<i><u>Other food groups</u></i>		
Ruminant meat (g)	39.9±18.8 ^a	35.3±15.9
Poultry (g)	38.6±23.12 ^a	32.75±22.41
Snacks and chips (g)	22,7±11.17 ^a	17,7±13.21
Margarine (g)	0.33±1.17 ^a	0.31±1.15

Values expressed as percentage or as mean ± SD.

^a Significant different from women (adjusted by age) P < 0.001

Table 3. Plasma fatty acid levels of interest for the present study

<i>Fatty acid</i>	<i>Mean</i>	\pm	<i>SD</i>
SFA	27.1	\pm	4.51
Myristic acid (C14:0)	0.52	\pm	0.31
Palmitic acid (C16:0)	20.28	\pm	2.23
Stearic acid (C18:0)	6.12	\pm	0.92
MUFA	27.12	\pm	4.48
Oleic acid (C18:1 <i>cis</i> n-9)	24.8	\pm	4.47
Elaidic acid (C18:1 <i>trans</i> n-9)	1.34	\pm	0.58
PUFA	45.78	\pm	6.31
Serie n-6 FA	42.97	\pm	5.93
Linoleic acid main isomers:			
<i>C18:2 cis n-6</i>	32.21	\pm	5.23
<i>C18:2 trans n-6</i>	1.05	\pm	0.66
<i>Cis-9. trans-11 C18:2 n-6</i>	0.31	\pm	0.28
<i>Trans-10. cis-12 C18:2 n-6</i>	0.12	\pm	0.11
Linolenic acid (C18:3n-6)	0.43	\pm	0.18
C20:3n-6	1.42	\pm	0.38
Arachidonic acid (C20:4n-6)	6.37	\pm	1.44
Serie n-3 FA	2.81	\pm	0.84
α -Linolenic acid (C18:3n-3)	0.34	\pm	0.13
Eicosapentanoic acid (C20:5n-3)	0.75	\pm	0.36
Docosahexaenoic acid (C22:6n-3)	2.45	\pm	0.53

(values expressed as % of total fatty acids. adjusted by sex and age)

Table 4. Coefficients of correlation between main TFA food sources and *trans* C18:1 n-9 fatty acid in the Catalan sample (n=621)

<i>Food/Food group</i>	<i>Coefficient of correlation (r)</i>
Margarine	0.17
Snacks and chips	0.15
Sweet and pastries	0.31 ^a
Red meat	0.28 ^a

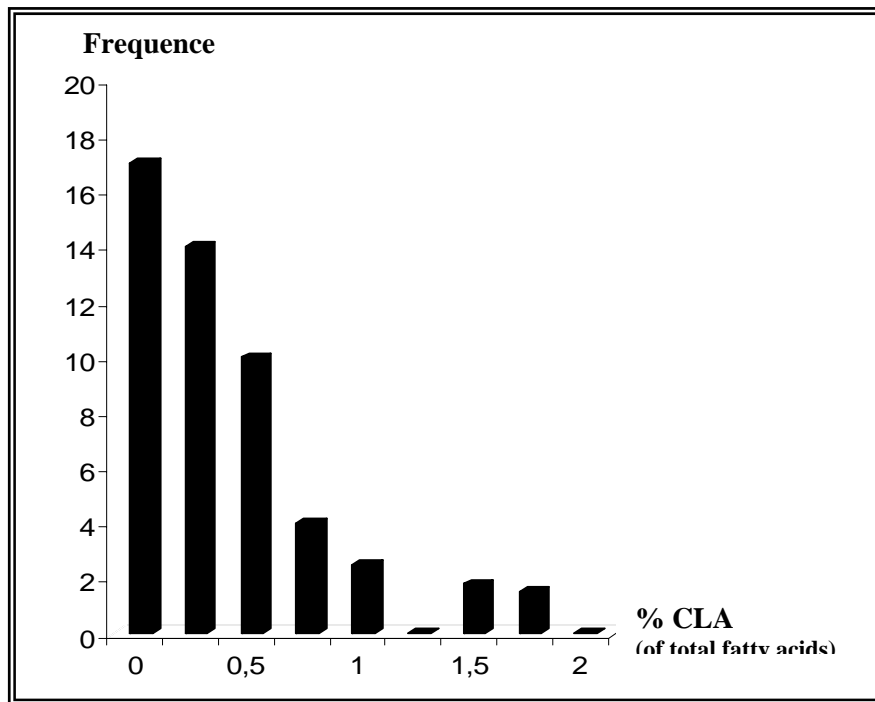
(Significant *P* value: ^a*P* value < 0.01)

Table 5. Coefficients of correlation between main CLA food sources and *cis*-9, *trans*-11 C18:2 n-6 fatty acid in the Catalan sample (n=208)

<i>Food/Food group</i>	<i>Coefficient of correlation (r)</i>
Dairy products	0.38 ^a
Milk	0.40 ^a
Iogurts	0.20
Cheese	0.35 ^a
Red meat	0.22
Ruminant meat	0.45 ^a

(Significant *P* value: ^a*P* value < 0.01)

Figure 1. Distribution of the plasma CLA content in 208 participants of the Catalan sample (adjusted by age and sex).



2.5.ÁCIDOS GRASOS Y PATOLOGÍAS

2.5.1. Fatty acid and diseases: does the current Catalan population follow the medical nutritional advice?

Título: Ácidos grasos y patologías: ¿sigue la población catalana actual las recomendaciones médicas nutricionales?

Autores: Isabel Bondia-Pons, Lluís Serra-Majem, Ana I. Castellote, M. Carmen López-Sabater

Estado: en revisión

Resumen:

Un estilo de vida inapropiado, incluido un estatus nutricional deficiente entre otros factores como el consumo de tabaco, la inactividad física o el estrés psico-social, han contribuido a aumentar durante la última década la incidencia de enfermedades tales como las de origen cardiovascular, mental y respiratorio en los países desarrollados.

Actualmente y en base a la evidencia científica de notables beneficios para la salud humana de diversos nutrientes, alimentos y patrones dietarios saludables en la prevención y tratamiento de diversas patologías, ha hecho que la comunidad médica, que tiende a confiar en un mayor grado en el tratamiento farmacológico también muestre cada vez un interés creciente en el uso de la nutrición como una herramienta más de trabajo.

El presente estudio se basó en examinar el grado de cumplimiento de los consejos nutricionales médicos en relación a diversas patologías en una muestra representativa de la población mediterránea catalana (n = 710, 40% hombres, edad: 18-77 años) a través del estudio de su perfil en ácidos grasos plasmáticos y de su estatus nutricional. Las enfermedades diagnosticadas que se evaluaron fueron: diabetes, depresión, artritis reumatoide, asma y bronquitis; así como los componentes del síndrome metabólico, que se hallan relacionado con el riesgo de enfermedad cardiovascular. La evaluación nutricional se llevó a cabo a través de un cuestionario de frecuencia alimentaria validado y ampliamente utilizado en estudios de la población española.

Entre los ácidos grasos estudiados, los AGPI-CL n-3, EPA y DHA fueron asociados de forma significativa con pacientes diabéticos y no depresivos, mientras que los pacientes de artritis reumatoide presentaron los niveles más elevados de ácido oleico entre la población con patologías, que se relacionó positivamente con el consumo de aceite de oliva por parte de este colectivo.

Fatty acids and diseases: does the Catalan population follow the medical nutritional advice?

Isabel Bondia-Pons¹, Lluís Serra-Majem², Ana I. Castellote¹, M. Carmen López-Sabater¹.

¹Dept. of Nutrition and Food Science. Reference Center in Food Technology. Faculty of Pharmacy.
University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain.

²Dept. of Clinical Sciences. Center for Health Sciences. University of Las Palmas de Gran Canaria. PO Box
550, Las Palmas de Gran Canaria, E-35080 Las Palmas, Spain.

Short title: Fatty acids and common diseases in Catalonia

Non standard abbreviations: CVD, cardiovascular disease; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentanoic acid; FFQ, food-frequency questionnaire; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid.

Address for correspondence:

Carmen López-Sabater, PhD
Dept. of Nutrition and Food Science.
Faculty of Pharmacy. University of Barcelona
Av. Joan XXIII, s/n
E-08028 Barcelona, Spain.
Telephone number: +34-93 402 45 08
Fax number: +34-93 403 59 31
e-mail address: mclopez@ub.edu

ABSTRACT

Background and aims: An inappropriate lifestyle including nutrition status has contributed to increase the prevalence of some major diseases such as cardiovascular, mental and respiratory diseases during the last decade in developed countries. The aim of this study was to assess the degree of compliance of the general medical nutritional advice in relation to dietary intake and some common diseases in the adult population of Catalonia, a Mediterranean region, by evaluating their fatty acid profile and their nutritional status.

Methods: The diseases under study in the representative Catalan sample (710 subjects, 40% men, 18-77 y) were diabetes, depression, rheumatoid arthritis and respiratory diseases (asthma and bronchitis). The metabolic syndrome and its components were also evaluated. Nutritional data were obtained with the use of a validated food frequency questionnaire for the Spanish population. Anthropometry and life-style assessment were obtained in a clinical session. Plasma fatty acid profile was determined by fast gas chromatography.

Results: Significant differences in the prevalence of common diseases and in the consumption of some food groups were found in the Catalan sample according to sex. The application of general linear models showed some significant variations in the plasma fatty acid content according to the diseases. Oleic acid and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids were significantly higher in patients suffering from rheumatoid arthritis and diabetes than healthy subjects. Patients suffering asthma showed significantly higher levels of the main saturated fatty acids.

Conclusions: Although diseases are the result of complex factors, many of the patients could benefit from by an appropriate lifestyle in which food rich in oleic acid and n-3 LC-PUFA can play a powerful role.

KEY WORDS: plasma fatty acids, diseases, dietary intake, metabolic syndrome, Mediterranean population.

INTRODUCTION

An inappropriate lifestyle including nutrition among other factors like smoking, physical activity or psychosocial stress has contributed to increase the prevalence of some major diseases such as cardiovascular, mental and respiratory diseases during the last decade in developed countries (1). It is still common practice to rely mostly on drug treatment to prevent diseases of this kind, although healthy nutrition may prevent most premature cardiovascular events (2) and it could also reduce the detrimental effects of some common diseases.

Nowadays physicians and nutritionists are well aware that appropriate nutrition can contribute to the prevention and treatment of most common diseases. Increasing efforts are being made to give appropriate nutritional advice to patients in order to improve the efficiency of their treatments. Extensive research in recent years has established that long-chain polyunsaturated fatty acids n-3 (n-3 LC-PUFA), EPA and DHA have a beneficial role in human health, mostly in combating cardiovascular and mental diseases (3-6).

Oleic acid, the main MUFA found in foods, has been associated with benefits in relation to rheumatoid arthritis (7, 7, 8). Both n-3 LC-PUFA and oleic acid are respectively the main fatty acids in fish and olive oil, two food groups that have been largely identified with the Mediterranean diet (9, 10). Numerous studies have confirmed the protective role of this dietary pattern in human health (11-14). Given the increasing rates of overweight, obesity and metabolic syndrome components, not only in the adult population but also in children and adolescents (15), greater adherence to the traditional Mediterranean diet might reduce the prevalence of some diet-related diseases in future (16, 17).

Catalonia is a Mediterranean region, in which the Mediterranean diet is followed (18). In the present study we assess the degree of compliance of medical nutritional advice among patients of several common diseases in Catalonia through the evaluation of their global fatty acid profile and their nutritional status.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The subjects were a subgroup of a larger sample (1600 subjects) randomly recruited in Catalonia, a coastal Mediterranean region in north-east Spain, for a cross-sectional nutritional survey (19). The primary objective of the survey was to collect relevant information on the dietary habits of the Catalan population and assess their food consumption patterns. The sampling technique included stratification according to geographical area and municipality size, age and sex of inhabitants. The participation rate (65%) in the present study can be regarded as representative of the adult population in Catalonia. Blood analysis and physiological and anthropometric measurements were obtained from 730 participants in a clinical session after informed consent. Only people who did not under-report their energy intake were considered for food consumption analysis. Of these 730 Catalans, 20 did not fast for >12 h before blood sampling and were therefore excluded. The final sample consisted of 710 subjects, 284 men and 426 women. The study protocol was approved by the regional ethics committee.

Lifestyle assessment and anthropometry

Smoking status was assessed by questionnaire during a face-to-face interview. Height (m) weight (kg), waist and hip circumferences (cm) were measured during the clinical session and the body mass index was calculated as weight (kg)/height (m²). The cut-off limits proposed by the International Diabetes Federation for the metabolic syndrome definition in relation to waist and hip circumference, blood pressure and HDL cholesterol were applied to the present work (20). Only those diseases previously diagnosed and treated by a physician during at least 2 years were taken into account for the evaluation of the clinical and nutritional characteristics of the Catalan sample. For this study, healthy participants were defined as disease-free subjects with anthropometric values in the normal ranges.

Nutrition data

Data on food intake were obtained with the use of a food-frequency questionnaire (FFQ) which was previously validated (21). The FFQ, which asked the subject to recall average use over the past year, consisted of 92 items. The FFQ was arranged by food type and meal pattern. Frequency categories were based on the number of times that items were consumed per day, week or month. Consumption less than once a month was considered no consumption. Daily consumption in grams was determined by dividing the reported amount of the intake by the frequency in days. The relevant period of consumption of seasonal items was also taken into account. Edible fractions of foods were recorded in the database. Food values were converted into nutrient values by validated software developed by the CESNID, which is based on Spanish tables of food composition (22).

Plasma fatty acid analysis

Blood samples were collected after the subjects had fasted for 12 h. Plasma was stored at -80°C before being analyzed. The FA profile was determined by fast gas chromatography (fast-GC) with a previous derivatization to their corresponding fatty acid methyl esters in total plasma (23). Results were expressed as relative percentages of total FA.

Statistical Analysis

Analyses were performed with SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Data are presented as means \pm SD. K-S tests were carried out to check normality of variables. General linear models (GLM) were used to analyze the effects of the diseases on the plasma fatty acid profile. There were as many models as combinations of analyzed fatty acids and diseases were possible. For each model, the dependent variable was the fatty acid content in plasma, and the independent variable was the disease. Covariates were: age, sex, waist circumference, BMI, LDL-C, HDL-C, SBP, DBP, TG, the rest of diseases, SFA intake, MUFA intake, PUFA intake and smoking. The effect of metabolic syndrome in the plasma fatty acid profile was also evaluated by GLM. First, we grouped the metabolic syndrome components in a single category. All components were given a +1 score if they accomplished the IDF criteria and a 0 score if they did not. All scores were summed for each participant (values from 0 to 5). According to the IDF, the definition for the metabolic syndrome implies the presence of central obesity plus at least two other components. Therefore, a final total score ≥ 3 was considered as presence of metabolic syndrome. The GLM consisted of a dependent variable (plasma fatty acid level), an independent variable (the final metabolic syndrome score) and covariables (age, sex, the rest of pathologies, SFA intake, MUFA intake, PUFA intake and smoking). For all analyses, 2-sided significance was determined at $P < 0.01$.

RESULTS

The mean age of the Catalan sample was 45.8 ± 15.11 . 66% of the participants were 30-65 y. The number of participants older than 65 y was the same as the number of participants younger than 30 y ($n = 120$ in each age group). **Table 1** shows the number of participants with the values of the components of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation (20). Among these participants, WHR and diagnosed diabetes were the components with the fewest participants, while the rest of variables had percentages of prevalence $\geq 45\%$. Among the diagnosed pathologies, the respiratory diseases were found in approximately 5% of the Catalan representative sample. Women suffered more from depression and rheumatoid arthritis than did men.

The nutritional profile of the total sample can be seen in **Table 2**. The percentage of energy derived from fat was higher than the 30-35% recommended for the Spanish population (24) and significantly higher in women than men. Mean PUFA intake was 7% for both sexes, while SFA intake was slightly higher than the recommended 10% of total energy. There were also some significant differences in the consumption of some food groups according to sex. Women consumed higher amounts of olive oil, fish and seafood and dairy products than did men. In contrast, the intake of red meat, poultry and sweet and pastries was significantly higher in men than in women.

Table 3 shows the plasma fatty acid profile of the 710 participants. The application of GLM showed some significant variations in the plasma fatty acid content according to the diagnosed diseases. Oleic acid was significantly higher in patients suffering from rheumatoid arthritis ($28.12 \pm 3.21\%$ of total fatty acids; $p < 0.001$) and diabetes ($27.25 \pm 4.12\%$ of total fatty acids; $p < 0.001$). Mean n-3 LC-PUFA (EPA plus DHA) was $3.15 \pm 0.42\%$ of total fatty acids for the 710 participants. This value was significantly higher than the mean plasma EPA+DHA levels found in patients suffering from depression ($2.71 \pm 0.33\%$ of total FA; $p < 0.01$). In contrast, arthritic patients ($4.04 \pm 0.43\%$ of total fatty acids; $p < 0.001$) and diabetic patients ($4.44 \pm 0.40\%$ of total fatty acids; $p < 0.001$) showed significantly higher n-3 LC-PUFA levels.

The GLM applied to the metabolic syndrome found that asthmatic patients presented significantly higher plasma C14:0 levels ($1.12 \pm 0.12\%$ of total fatty acids; $p < 0.001$) as well as significantly higher plasma C16:0 levels ($23.35 \pm 2.47\%$ of total fatty acids; $p < 0.001$) than the rest of participants. No other significant variations were found in the plasma fatty acid levels according to diagnosed diseases.

DISCUSSION

The total fatty acid profile and the nutritional data determined for a representative sample of Catalonia, a Mediterranean region, were used to assess the degree of compliance of the general medical nutritional advice in relation to some common diseases. The two main long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids, EPA and DHA, as well as oleic, myristic and palmitic acid were significantly associated with some of the diseases under study.

Some differences in the prevalence of common diseases were observed among the Catalan sample. We notice that the presence of depression in women doubled the presence of depression found in men (21% of women vs. 11% of men). The percentage of women suffering from rheumatoid arthritis was also significantly higher to that found in men (28% of women vs. 19% of men). As women also showed higher smoking habits than men and presented higher BP values, we raised the hypothesis that women might have a general worse nutritional status than men, which would be reflected in their plasma fatty acid profile. The use of GLM concluded that among the participants suffering from any of the diagnosed diseases, those suffering from rheumatoid arthritis showed high oleic acid plasma levels, and concretely women showed the highest 18:1n-9 plasma levels. This outcome, together with the fact that women had a significantly higher intake of olive oil, which is rich in oleic acid, supported the idea that Catalan patients suffering from arthritis follow the medical nutritional advice of increasing their daily consumption of olive oil. According to our data, it seems that women are better compliers with this nutritional advice than men. Scientific evidence corroborates the healthy benefits derived from oleic acid and olive oil in the treatment of rheumatoid arthritis. When MUFAs are present in the diet, they generally replace n-6 PUFA, and therefore they reduce the competition between n-6 PUFA and n-3 PUFA, having as a result an increase in the n-3 PUFA incorporation in the membrane phospholipids (7). Additionally, the metabolism of oleic acid produces eicosatrienoic acid, which like EPA, competes with n-6 PUFA. As olive oil is one of the richest natural sources of oleic acid, several studies have been focused on evaluating the effects of this characteristic food of the Mediterranean diet pattern in the treatment of rheumatoid arthritis (25-27). It is interesting to point out the results obtained in a recent study by Berbert and colleagues. This study showed a synergic role of both extra-virgin olive oil and fish rich in PUFA n-3 in the treatment of arthritic patients. A significantly higher improvement of the typical clinical parameters in the evaluation of the process of the former disease were obtained in patients treated with both food groups than in patients who were in the intervention group of fish (8). The beneficial effects derived from the studies focused on n-3 LC-PUFA and rheumatoid arthritis (28, 29) must also be pointed out.

The intervention studies with fish and/or fish oil have shown significant improvement in the inflammatory status of patients suffering from rheumatoid arthritis (7, 30-33), and an increase of n-3 LC-PUFA intake has also been associated with healthy benefits for these patients (34). Furthermore, some studies have also shown an improvement in the quality of life of patients suffering from rheumatoid arthritis with a higher adherence to the Mediterranean dietary pattern (29, 35). The outcomes of the present study agree with the previous scientific evidence, due to the fact that both positive associations between rheumatoid arthritis and olive oil and fish intake were found. We are aware of the several complex factors involved in the rheumatoid arthritis but bearing in mind that conventional treatments of this disease are rarely totally effective and some pharmacologic therapies have potential secondary effects as gastro-intestinal bleeding, body bone mass loss and anti-nutrient effects (30, 36) our results support the use of nutrition (37) as an additional tool of health improvement in this pathology to take into account for the medical community. The fact that Spain has always been characterized by a traditionally high intake of olive oil (17, 38) and 92% of the MUFA present in foods is oleic acid (60-80% of oleic acid intake coming from olive oil (39), as well as the predisposition among the Catalan population to regularly eat fish, due to its privileged seaside location among other social and Mediterranean cultural factors, could be one of the explanations of the correct compliance with the medical nutritional advice in rheumatoid arthritic patients found in the present study.

Diabetic patients also showed a positive association with their n-3 LC-PUFA plasma levels. According to their nutritional status, they also showed a significantly higher intake of fish and seafood than the rest of participants, as well as a significantly higher intake of fruits, vegetables and nuts. Some studies have also corroborated the healthy benefits derived from the adherence of diabetic patients to the traditional Mediterranean dietary pattern (40). During the last few years, the scientific community has also shown an increasing interest in the possible influence of nutritional factors in the development and symptomatology of depression (41, 42). N-3 LC-PUFA and concretely eicosapentanoic acid have been considered as potential agents in the treatment of the former disease since the pioneers studies carried out by Hibbeln and Salem (5, 6, 43-45). Due to the fact that approximately the 20% of the dried weight of the human brain is constituted by PUFA, and that one of three fatty acids in the central nervous system is of polyunsaturated origin, several scientists have postulated that for some individuals, an inadequate n-3 LC-PUFA intake can imply neuropsychological consequences (46, 47). Some epidemiologic and controlled double-blind studies support a relationship between fish and seafood intake and n-3 LC-PUFA with a low prevalence of depression (48). However, it is important to point out that some factors such as cultural, economic and social factors must be considered as confounder variables to accept the previous hypothesis (6).

Individual with the highest fish and seafood intake are in general those who follow healthier lifestyles, including regular physical activity and stress control (46). Our study showed that depressed individuals showed significantly lower n-3 LC-PUFA plasma levels, which was associated with the lower intake of fish and seafood. Paradoxically, women had higher prevalence of depression but at the same time consumed higher intakes of fish and seafood than men. An explanation to this could be that not only the amount of fish was important, but also the type of fish. It is well known that the Catalan population have a higher preference for white fish than for blue fish (18) and the lower n-3 LC-PUFA contents in white fish in comparison to blue fish could be the reason for our outcomes in the female group.

Patients suffering from asthma showed significantly higher plasma levels of the main saturated fatty acids, myristic and palmitic. Although the scientific literature in relation to asthma and fatty acids is also more focused on the potential effects of the n-3 LC-PUFA (49, 50) some studies have examined the role of SFA on respiratory diseases. In the present study, asthma patients showed higher intakes of dairy products and pastries, which are rich sources of SFA. Therefore, this seems to be the group of patients that should be taken into account for strong medical nutritional advice to improve their dietary patterns.

Although the diseases mentioned here are the result of complex factors, many of the patients could benefit from by an appropriate lifestyle in which nutrition can play a powerful role. The present study encourages the application of medical nutritional advice in order to identify and control those food components which could improve health.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Public Health Division of the Department of Health of the Autonomous Government of Catalonia for providing the blood samples for the study. This study was supported by Mercadona S.A. and it is part of the studies carried out by the Xarxa Temàtica en Nutrició from the Catalan Government and the Catalan Centre of Nutrition of l'Institut d'Estudis Catalans in relation to the Catalan Health and Nutrition Survey, ESCA 2002-2003. Special thanks to Mr. Robin Rycroft for the English manuscript correction; and to the Spanish Ministry of Education and Science for the F.P.U. PhD-grant to Isabel Bondia-Pons.

IBP carried out the study, the sample analysis, the data analysis and the statistical analyses and drafted the manuscript. LSM conceived of the study, and participated in its design and coordination. AC supervised the laboratory analysis and the quality control and provided advice on data interpretation. CLS participated in the design of the study and provided expert advice on data interpretation. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Califf, R. M., Harrington, R. A., Madre, L. K., Peterson, E. D., Roth, D. & Schulman, K. A. (2007) Curbing The Cardiovascular Disease Epidemic: Aligning Industry, Government, Payers, And Academics. *Health Aff* 26: 62-74.
2. Zyriax, B. C., Boeing, H. & Windler, E. (2005) Nutrition is a powerful independent risk factor for coronary heart disease in women[mdash]The CORA Study: a population-based case-control study. *Eur J Clin Nutr* 59: 1201-1207.
3. Deckelbaum, R. J. & Akabas, S. R. (2006) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: navigating toward recommendations. *Am J Clin Nutr* 84: 1-2.
4. von Schacky C & Harris WS (2007) Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovasc Res.* 73: 310-315.
5. McNamara, R. K. (2006) The emerging role of omega-3 fatty acids in psychiatry. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75: 223-225.
6. Sontrop, J. & Campbell, M. K. (2006) [omega]-3 polyunsaturated fatty acids and depression: A review of the evidence and a methodological critique. *Preventive Medicine* 42: 4-13.
7. Darlington LG & Stone TW (2001) Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr* 85: 251-269.
8. Berbert, A. A., Kondo, C. R. M., Almendra, C. L., Matsuo, T. & Dichi, I. (2005) Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* 21: 131-136.
9. Serra-Majem L, de la Cruz JN, Ribas L & Tur JA. (2003) Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr.* 57: S2-S7.
10. Trichopoulou A, Bamia C & Trichopoulos D (2005) Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch Intern Med* 165: 929-935.
11. Knoops KT., Groot de LC, Fidanza F, Alberti-Fidanza A, Kromhout D & van Staveren W (2006) Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *Eur J Clin Nutr.* 18: 1-10.
12. Vincent-Baudry S., Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, Portugal H, Planells R, Grolier P et al. (2005) The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr.* 82: 964-971.
13. Ambring, A., Johansson, M., Axelsen, M., Gan, L., Strandvik, B. & Friberg, P. (2006) Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 83: 575-581.

14. Alonso A, Beunza JJ, Delgado-Rodriguez M, Martinez JA & Martinez-Gonzalez MA. (2006) Low-fat dairy consumption and reduced risk of hypertension: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *Am J Clin Nutr.* 82: 972-979.
15. Malecka-Tendera, E. & Mazur, A. (2006) Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes* 30: S1-S3.
16. Kant, A. K. (2004) Dietary patterns and health outcomes. *Journal of the American Dietetic Association* 104: 615-635.
17. Serra-Majem L, N. d. I. C. J. R. L. S. L. (2004) Mediterranean Diet and Health: Is all the Secret in Olive Oil? *Pathophysiol Haemos Thromb* 33: 461-465.
18. Cuco G, Fernandez-Ballart J, Marti-Henneberg C & Arija V (2002) The contribution of foods to the dietary lipid profile of a Spanish population. *Public Health Nutr.* 5: 747-755.
19. Junca S, Guillen M, Aragay JM, Brugulat P, Castell C, Seculi E, Medina A & Tresserras R. (2003) Methodological aspects in the evaluation of health and risk-reduction objectives of Health Plan for Catalonia for the year 2000. *Med Clin (Barc).* 121: 10-19.
20. Alberti KGMM, Zimmet P & Shaw J (2005) The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet* 366: 1059-1062.
21. Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S & Willett WC (1993) Development and Validation of a Food Frequency Questionnaire in Spain. *International Journal of Epidemiology* 22: 512-519.
22. Cervera P (2003) Food composition tables of CESNID (The Centre for Superior Studies in Nutrition and Dietetics) (in Spanish)., McGraw-Hill ed., Barcelona (Spain).
23. Bondia-Pons, I., Castellote, A. I. & Lopez-Sabater, M. C. (2004) Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *Journal of Chromatography B* 809: 339-344.
24. Serra-Majem L, Aranceta J & on behalf of the SENC Working Group on Nutritional Objectives for the Spanish Population. Spanish Society of Community Nutrition. (2001) Nutritional objectives for the Spanish population. Consensus from the Spanish Society of Community Nutrition. *Public Health Nutr.* 4: 1409-1413.
25. Linos A, Kaklamanis E, Kontomerkos A, Koumantaki Y, Gazi S, Vaiopoulos G, Tsokos GC & Kaklamanis P (1991) The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis--a case control study. *Scand J Rheumatol.* 20: 419-426.
26. Linos, A., Kaklamani, V. G., Kaklamani, E., Koumantaki, Y., Giziaki, E., Papazoglou, S. & Mantzoros, C. S. (1999) Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables? *Am J Clin Nutr* 70: 1077-1082.
27. Brzeski M, Madhok R & Capell HA (1991) Evening primrose oil in patients with rheumatoid arthritis and side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Rheumatol* 30: 370-372.

28. Metcalf RG, James MJ, Mantzioris E & Cleland LG (2003) A practical approach to increasing intakes of n-3 polyunsaturated fatty acids: use of novel foods enriched with n-3 fats. *Eur J Clin Nutr* 57: 1605-1612.
29. Hagfors L, Nilsson I, Skoldstam L & Johansson G (2005) Fat intake and composition of fatty acids in serum phospholipids in a randomized, controlled, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. *Nutr Metab (Lond)* 10: 26.
30. Kremer JM (2005) Selective costimulation modulators: a novel approach for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 11: S55-S62.
31. James, M. J., Gibson, R. A. & Cleland, L. G. (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 71: 343S-348.
32. Volker D, Fitzgerald P, Major G & Garg M (2000) Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27: 2343-2346.
33. Calder PC & Zurier RB (2001) Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 42: 115-121.
34. Rennie KL, Hughes J, Lang R & Jebb SA (2003) Nutritional management of rheumatoid arthritis: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet.* 16: 97-109.
35. Skoldstam, L., Hagfors, L. & Johansson, G. (2003) An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62: 208-214.
36. Sarzi-Puttini P, Comi D, Boccassini L, Muzzupappa S, Turiel M, Panni B & Salvaggio A (2000) Diet therapy for rheumatoid arthritis. A controlled double-blind study of two different dietary regimens. *Scand J Rheumatol.* 29: 302-307.
37. Danao-Camara TC & Shintani TT (1999) The dietary treatment of inflammatory arthritis: case reports and review of the literature. *Hawaii Med J* 58: 126-131.
38. Jaen (2005) International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation* 35: 421-424.
39. Perez-Jimenez, F., Lopez-Miranda, J. & Mata, P. (2002) Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis* 163: 385-398.
40. Rodriguez-Villar C, Perez-Heras A, Mercade I, Casals E & Ros E (2004) Comparison of a high-carbohydrate and a high-monounsaturated fat, olive oil-rich diet on the susceptibility of LDL to oxidative modification in subjects with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 21: 142-149.
41. Horrobin DF (2002) Food, micronutrients, and psychiatry. *Int Psychogeriatr.* 14: 331-334.
42. Schachter HM, Kourad K, Merali Z, Lumb A, Tran K & Miguelez M (2005) Effects of omega-3 fatty acids on mental health. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 116: 11.
43. Colin A, Reggers J, Castronovo V & Ansseau M (2003) Lipids, depression and suicide (article in French). *Encephale.* 29: 49-58.

44. Bourre JM (2005) Dietary omega-3 Fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J Nutr Health Aging*. 9: 31-38.
45. Reis, L. C. & Hibbeln, J. R. (2006) Cultural symbolism of fish and the psychotropic properties of omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75: 227-236.
46. Logan AC (2004) Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional. *Lipids Health Dis*. 2004 Nov 9;3:25 9: 1-8.
47. Hibbeln, J. R., Nieminen, L. R., Blasbalg, T. L., Riggs, J. A. & Lands, W. E. (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nutr* 83: S1483-S1493.
48. Parker, G., Gibson, N. A., Brotchie, H., Heruc, G., Rees, A. M. & Hadzi-Pavlovic, D. (2006) Omega-3 Fatty Acids and Mood Disorders. *American Journal of Psychiatry* 163: 969-978.
49. Mickleborough TD & Rundell KW (2005) Dietary polyunsaturated fatty acids in asthma- and exercise-induced bronchoconstriction . *Eur J Clin Nutr* 59: 1335-1346.
50. Devereux G & Seaton A (2005) Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 115: 1109-1117.

Table 1. Anthropometric and clinical profile of the Catalan sample; results expressed as number of participants and % of the total sample (n=710)

<i>Clinical characteristics</i>	<i>Men</i> (n = 284)	<i>Women</i> (n = 426)	<i>% of the total sample</i> (n=710)
BMI \geq 25 kg/m ²	196	204	56
WHR > 1.0 in men; >0.90 in women	36	43	11
Blood pressure \geq 130/85 diagnosed and treated hypertension	145	175	45
Type II diabetes	32	15	7
HDL-C <1.0mmol/l (<40mg/dl) in men; <1.3mmol/l (<50mg/dl) in women	182	141	45
Current smokers	100	141	34
Depression	31	90	17
Rheumatoid arthritis	54	120	25
Asthma	17	17	5
Bronchitis	23	22	6

Table 2. Nutritional profile of the Catalan sample (n=710)

	<i>Men (n = 261)</i>	<i>Women (n = 360)</i>
Energy (kcal)	2244.2±556.5 ^a	1981.9±532.1
Carbohydrates (%)	44.5±6.2 ^a	42.2±5.8
Protein (%)	18.5±3.0	19.3±3.1
Fat (%)	37.0±5.1 ^a	38.5±5.3
SFA (%)	12.0±2.7	12.2±2.8
MUFA (%)	18.0±4.2 ^a	19.5±4.6
PUFA (%)	7.0±2.6	6.8±2.4
Cholesterol (mg)	314.5±132.8 ^a	294.0±112.1
Olive oil (ml)	22.8±11.3 ^a	24.7±11.5
Fruits and vegetables (g)	642.7±330.5	638.2±284.2
Fish and seafood (g)	75.0±51.7 ^a	80.8±51.4
Red meat (g)	118.6±47.0 ^a	117.0±42.0
Poultry (g)	38.2±23.10 ^a	32.5±22.40
Dairy products (g)	368.1±279.0 ^a	411.3±259.5
Sweet and pastries (g)	33.7±42.5 ^a	28.8±29.0

Values expressed as percentage or as mean ± SD.

^a Significant different from women (adjusted by age) P < 0.001

Table 3 . Plasma fatty acid profile (% of total fatty acids)

<i>Fatty acid</i>	<i>Mean value</i> <i>(%total FA)</i>		
C14:0	0,43	±	0,30
C16:0	21,88	±	2,22
C16:1	1,65	±	0,66
C17:0	0,33	±	0,20
C18:0	6,41	±	0,82
C18:1n-9	25,44	±	4,45
C18:2n-6	31,22	±	5,21
C18:3n-6	0,44	±	0,15
C18:3n-3	0,34	±	0,10
C20:0	0,11	±	0,32
C20:1	0,13	±	0,10
C20:2	0,2	±	0,13
C20:3n-6	1,43	±	0,35
C20:4n-6	6,37	±	1,40
C22:0	0,03	±	0,14
C24:0	0,12	±	0,05
C22:5n-6	0,32	±	0,15
C20:5n-3	0,73	±	0,35
C22:6n-3	2,42	±	0,50

3. DISCUSIÓN GENERAL

3. DISCUSIÓN GENERAL

La discusión general de los resultados derivados de esta tesis se presenta a continuación estructurada en base al diseño experimental que se estableció para cumplir los objetivos propuestos a su inicio.

Así, en la primera parte de este apartado se discutirá sobre la metodología analítica que ha sido desarrollada, validada y aplicada a las muestras de población que fueron posteriormente objeto de estudio de esta tesis. La segunda parte versará sobre la evaluación del cumplimiento del Patrón de Dieta Mediterránea en la muestra representativa de la población catalana estudiada. En el tercer apartado se discutirán los resultados obtenidos en el estudio de intervención multicéntrico llevado a cabo en cinco poblaciones europeas para evaluar el efecto del consumo de aceite de oliva en el contexto de la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular. A continuación se comentarán los resultados derivados del estudio del efecto del consumo de pescado en los factores de enfermedad cardiovascular clásicos en la muestra catalana. En el cuarto apartado se examinará la incidencia de los dos principales ácidos grasos *trans* y del ácido linoleico conjugado sobre el patrón alimentario en una submuestra de la anterior población catalana. Y finalmente se comentará la relación hallada entre determinados ácidos grasos y algunas patologías.

3.1. SOBRE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Tal y como se ha recogido en la parte bibliográfica de esta tesis, hasta la fecha la determinación del perfil de ácidos grasos en diferentes tejidos y fluidos del organismo humano parece ser la herramienta más objetiva para poder evaluar la ingesta lipídica. Por ello, la cromatografía de gases se ha convertido en una técnica analítica indispensable y de rutina en numerosos estudios clínicos y nutricionales.

Los métodos comúnmente aplicados en este campo se caracterizan por una inversión de tiempo considerable tanto en las etapas de preparación de la muestra como en las de separación. En base a este hecho se decidió desarrollar y validar tres métodos analíticos, que basados en los principios de la técnica de la cromatografía de gases rápida, permitieran un análisis rápido, pero a la vez sensible y reproducible del perfil de ácidos grasos en muestras de plasma humano.

Hasta el momento, la técnica de CG-rápida ha sido aplicada con éxito principalmente en el análisis de aceites esenciales, fármacos, alimentos y pesticidas. Sin embargo, no se conocía su aplicación en la determinación de ácidos grasos en muestras biológicas.

Así pues, el trabajo de puesta a punto y validación de los tres métodos analíticos descritos en el apartado *IV.2.1* de esta tesis, se basó en aplicar estrategias de reducción del tiempo total de análisis en función de las diferentes etapas que comporta el análisis del perfil de ácidos grasos:

- *Preparación de la muestra:* dos de las metodologías desarrolladas (*Publicación 1* y *publicación 3*) permiten el análisis de ácidos grasos sin etapa previa de extracción lipídica, suponiendo un ahorro no sólo de tiempo sino de reactivos y material.
- *Fraccionamiento o aislamiento de componentes lipídicos:* la metodología desarrollada para la determinación de ácidos grasos de fosfolípidos (*Publicación 2*) se basó en la extracción en fase sólida, que en comparación con la técnica clásica de cromatografía en capa fina, supuso una reducción considerable del tiempo de fraccionamiento de la muestra y un aumento del rendimiento de muestras analizadas.
- *Derivatización a ésteres metílicos:* la elección de los reactivos, así como la optimización de las temperaturas de reacción fueron factores críticos a tener en cuenta para reducir el tiempo de los análisis. La metodología desarrollada para la determinación de ácidos grasos de fosfolípidos (*Publicación 2*) presenta un mayor tiempo de derivatización debido a la dificultad de romper el enlace amida de las bases de esfingosina.
- Análisis por CG-rápida: para la optimización del tiempo de análisis cromatográfico final se utilizaron algunas de las opciones de las estrategias descritas en el apartado bibliográfico *III. 4.4.1.2* de esta tesis, que fueron principalmente:
 - *Minimización de la resolución:* mediante la selección de columnas cortas (10m versus 30m de las columnas convencionales en el caso de las *publicaciones 1* y *2*; y 40 m versus 100 m en el caso de la *publicación 3*) de grosor de película reducido (0,10 μm versus 0,20 μm), el aumento de la velocidad del gas portador respecto a las metodologías convencionales (59,4cm/s versus 22,5cm/s en la *publicación 1*), la optimización de la temperatura inicial de análisis (150°C, 120°C y 140°C respectivamente), así como el uso de incrementos de temperatura del orden de 25-35 °C/min.
 - *Maximización de la selectividad:* mediante la elección de las fases estacionarias más selectivas disponibles en el mercado. Así por ejemplo, en el método para determinar los isómeros mayoritarios del CLA, la

columna utilizada presenta la máxima polaridad de la que se dispone actualmente en el mercado de la fase estacionaria (poli 90% biscianopropil-20% cianopropilfenil).

- *Desarrollo de un método que reduzca el tiempo de análisis a una resolución constante:* mediante la elección de columnas capilares con diámetros internos de 0,10 y 0,18 mm.

La sinergia de estas estrategias permitió la separación cromatográfica de 30 AG en tan sólo 3.2 minutos, de 25 AG-PPL en tan sólo 3.8 minutos y de los isómeros cis-9, trans-11 CLA y trans-10, cis-12 CLA en un tiempo inferior a 20 minutos.

Así mismo, cabe destacar que la validación de los métodos desarrollados mostró buenos resultados de repetibilidad y reproducibilidad (tanto de datos cualitativos como de datos cuantitativos) y de límites de detección y cuantificación, permitiendo a su vez que puedan ser utilizados en análisis de rutina y en estudios en los que el número de muestras a analizar es elevado.

3.2. SOBRE EL CUMPLIMIENTO DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA

Como se ha comentado en el apartado bibliográfico *III.3.*, el Patrón de Dieta Mediterránea se caracteriza por la combinación de una serie de nutrientes y alimentos característicos que lo definen, y que actuando de forma sinérgica, le confieren propiedades beneficiosas sobre la salud humana. Estos beneficios, que han sido avalados por numerosos estudios científicos desde que en la década de los 60 el Prof. Grande Covian y colaboradores pusieran de manifiesto la baja incidencia cardiovascular de los individuos de la región mediterránea, son un incentivo a la hora de elaborar estrategias para preservar y promover los hábitos alimentarios característicos de la Dieta Mediterránea Tradicional.

Nuestro objetivo se basó en evaluar el patrón alimentario de una muestra representativa de la población catalana adulta participante en la Encuestas de Salud y Alimentación Catalanas 2002-2003, aplicando herramientas que el campo de salud pública utiliza para promover hábitos alimentarios adecuados como los derivados del Patrón de Dieta Mediterráneo. Entre ellas destacan las recomendaciones dietéticas y los objetivos nutricionales. Debido a diversos factores, como los de tipo social, cultural y económico, conviene que el cumplimiento de los objetivos nutricionales sea verificado periódicamente en las poblaciones y con este fin, se llevó a cabo un análisis nutricional, con especial atención en la composición lipídica, en la muestra catalana.

Una primera evaluación permitió identificar los alimentos que contribuyen en mayor medida al perfil lipídico de la dieta de esta población mediterránea (*Publicación 4*). El aceite de oliva y el queso fueron respectivamente los alimentos responsables de los porcentajes absolutos y relativos más elevados de la ingesta energética derivada de los lípidos totales y de los AGS, corroborándose la elección del aceite de oliva frente a otro tipo de aceites en la población catalana. Este estudio permitió comparar de manera general las tendencias alimentarias actuales con las de la pasada década en Catalunya, mostrando un aumento en el consumo de alimentos de origen vegetal y un mantenimiento del consumo de carne roja como principal alimento de origen animal durante estos últimos años. A su vez este trabajo pone de manifiesto la necesidad de incrementar el consumo de pescado azul en la población catalana, así como la de vigilar la ingesta de dulces como fuente de grasa invisible en la dieta.

Una vez identificadas las principales fuentes del perfil lipídico de la dieta catalana, se evaluó el grado de cumplimiento de los actuales objetivos nacionales y europeos (*Publicación 5*). La muestra estudiada sugiere que la población catalana actual cumple con la mayoría de los objetivos nutricionales intermedios, encontrándose ciertas diferencias en la ingesta de determinados nutrientes en función del sexo de los participantes. No obstante, el ratio AGS: AGMI: AGPI fue muy similar entre hombres y mujeres, siendo la media del ratio de 1.7:2.4:1.0. Al igual que el anterior estudio, la evaluación del cumplimiento de los objetivos nutricionales puso de manifiesto principalmente dos recomendaciones. La primera es la de una reducción en la ingesta de AGS y la segunda la de un aumento en la ingesta de carbohidratos no glucémicos. Así mismo, este estudio mostró que determinados ácidos grasos plasmáticos están claramente asociados con el consumo de alimentos ricos en dichos componentes, como es el caso del pescado y los AGPI-CL de la serie n-3.

Finalmente, se evaluó el grado de adherencia de la población catalana al Patrón de Dieta Mediterránea a través del cálculo del *Mediterranean Dietary Quality Index* desarrollado por Gerber y colaboradores a partir del conocido *Mediterranean Diet Score* de Trichopoulou et al. (*Publicación 6*). Esta aproximación metodológica *a priori* mostró que, según los criterios del M-DQI, la actual población catalana sigue el Patrón de Dieta Mediterránea, aunque tan sólo un 10% de la muestra representativa catalana presentó una alta adherencia a la DM. Aunque por otra parte conviene destacar también que tan sólo un 5% presentaba valores bajos de adhesión a la DM. Adicionalmente, este estudio sugiere que el perfil plasmático total de los ácidos grasos puede utilizarse como marcador de seguimiento y validación de índices alimentarios, al igual que otros marcadores de la ingesta lipídica más extensamente utilizados como son los AG de fosfolípidos plasmáticos o los AG de eritrocitos.

3.3. SOBRE LOS COMPONENTES LIPÍDICOS PRINCIPALES DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

Los dos principales grupos de alimentos que sobresalen en la Dieta Mediterránea desde un punto de vista del perfil de ácidos grasos son el aceite de oliva y el pescado, el primero de ellos por su alto contenido en ácido oleico y el segundo por ser una fuente mayoritaria de los AGPI-CL de la serie n-3. Ambos alimentos, así como sus otros componentes de interés, han sido objeto de numerosos estudios de la comunidad científica, en los que se han puesto de manifiesto diversos beneficios para la salud humana, entre los que destacamos el efecto protector en la enfermedad cardiovascular.

Teniendo en cuenta que la enfermedad cardiovascular es la primera causa de mortalidad en las poblaciones industrializadas, nos planteamos evaluar, desde un punto de vista centrado en el perfil lipídico, los efectos sobre los factores de riesgo cardiovascular clásicos de:

- un consumo moderado de aceite de oliva en individuos con hábitos alimentarios diferentes, que se llevó a cabo mediante el estudio de intervención multicéntrico europeo (*Publicación 7*)
- el consumo actual de pescado en individuos de una población típicamente mediterránea como es la catalana, que se llevó a cabo mediante los datos analizados de la Encuestas de Salud y Alimentación de la Generalitat de Catalunya 2002-2003 (*Publicación 8*).

En ambos estudios los factores de riesgo cardiovascular clásicos que se determinaron fueron la presión sanguínea, la concentración de triglicéridos plasmáticos, el colesterol total, el colesterol-LDL y el colesterol-HDL.

El primero de ellos (*Publicación 7*) permitió demostrar que un consumo moderado de aceite de oliva de 25 ml/día en hombres europeos sanos podría ser una herramienta útil y sencilla para reducir y controlar la presión sanguínea sistólica de europeos no mediterráneos con hábitos alimentarios diferentes a los ofrecidos por el PDM observado en el Sur de Europa. Los niveles plasmáticos de ácido oleico sirvieron así mismo como marcadores del consumo de aceite de oliva, viéndose aumentados de forma significativa en aquellos individuos procedentes de poblaciones menos expuestas a un consumo habitual de aceite de oliva. El resto de factores de riesgo cardiovascular estudiados no mostró ninguna variación significativa, hecho que podría deberse en parte a la duración limitada del estudio de intervención. Es por ello que convendría diseñar estudios de mayor duración para corroborar las conclusiones obtenidas.

Por su parte, el segundo estudio (*Publicación 8*) permite sugerir una necesidad de promover un mayor consumo de pescado azul entre la población catalana, ya que según los datos que se obtuvieron, el consumo del mismo es del orden de tan sólo una ración por semana. El pescado blanco sigue siendo la fuente marina preferida por la población catalana, principalmente entre la población femenina y la de edad superior a 40 años. En cuanto a los factores de riesgo CVD estudiados, los resultados del trabajo mostraron que las concentraciones plasmáticas de ambos AGPI-CL n-3 de la muestra de población catalana solamente se vieron asociados de forma significativa en el caso de los niveles plasmáticos de triglicéridos y en el de los niveles de colesterol e insulina por parte del EPA pero no del DHA. En este caso, la no observación de diferencias significativas entre ambos ácidos grasos y el resto de factores de riesgo cardiovascular clásicos (los niveles de LDL, de HDL y la presión sanguínea SBP y DBP) podría deberse en parte a las limitaciones propias de la metodología utilizada (como son las limitaciones intrínsecas de los cuestionarios de frecuencia alimentaria (FFQ) como herramientas de evaluación del estado de salud) y en parte a que los niveles de ambos ácidos grasos resultantes podrían no ser lo suficientemente elevados como para producir los efectos beneficiosos protectores descritos en la bibliografía en torno a la enfermedad cardiovascular.

3.4. SOBRE LA INCIDENCIA DE LOS PRINCIPALES ISÓMEROS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS Y DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN EL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEO

Una vez estudiado el perfil total de los ácidos grasos en plasma de la muestra representativa de la población catalana, se decidió determinar sus niveles plasmáticos de los dos principales ácidos grasos *trans* (*18:1 n-9 trans* y *18:1 n-6 trans*) con el fin de evaluar una posible influencia de patrones alimentarios occidentales en la población mediterránea catalana. Entre las características de los patrones alimentarios occidentales cabe destacar ingestas de AGS y AG *trans* en proporciones elevadas, contrario a los patrones alimentarios prudentes, y en concreto, el PDM, caracterizados por un aporte lipídico superior de AGMI y de AGPI-CL n-3. Entre los grupos de alimentos, cabe destacar los derivados lácticos como fuentes alimentarias importantes tanto de AGS como de AG *trans*. El consumo de ambas familias de AG debe tenerse en cuenta debido a su carácter aterogénico y consecuente contribución al aumento del riesgo cardiovascular. Es por ello que el tipo y frecuencia de consumo de los productos lácteos debería ser periódicamente verificado en la población en general, con especial atención en niños y ancianos, que son los grupos de población que necesitan un mayor aporte de calcio, el cual se suministra en mayor medida a través de la leche y sus derivados. Teniendo en cuenta que este grupo de alimentos también son fuente del ácido linoleico conjugado (CLA), se decidió aplicar la metodología desarrollada previamente (*Publicación 1 y 3*) para evaluar los niveles plasmáticos no sólo de los dos AG *trans* mayoritarios sino también de los dos

isómeros de CLA predominantes en plasma humano (*cis-9, trans-11* 18:2 n-6 y *trans-10, cis-12* 18:2 n-6), los cuales han dado lugar a un considerable número de estudios científicos durante los últimos años debido a sus posibles efectos beneficiosos para la salud humana. Los resultados del estudio (*Publicación 9*) sugieren que la población catalana todavía mantiene los rasgos principales del PDM desde un punto de vista lipídico, siendo el aceite de oliva la fuente principal de AGMI. Si bien, y como se ha comentado en el apartado anterior, los niveles de AGPI-CL n-3 podrían ser superiores si se promoviera un mayor consumo de pescado azul entre la población catalana. En cuanto a los ácidos grasos *trans* mayoritarios en plasma humano, el ácido eláidico, correlacionado significativamente con el grupo de dulces y pastas, fue el único que presentó una asociación positiva con el ratio LDL: HDL, considerado un marcador del riesgo cardiovascular. El hecho que el *trans* C18:2n-6 no presentara una asociación significativa con este parámetro podría deberse a que su contenido en la muestra de la población catalana no era lo suficientemente elevado como para permitir observar una asociación definida. Este hecho, sumado a su vez a los bajos niveles obtenidos del isómero *trans-10, cis-12* 18:2 n-6 del ácido linoleico conjugado, sugieren que la población catalana adulta no se encuentra altamente influenciada por el patrón alimentario occidental. Sin embargo, cabe seguir promoviendo la reducción de grasas saturadas y *trans* en los hábitos de alimentación de la población, con el fin de reducir la cada vez mayor prevalencia de sobrepeso, que según algunos autores ha sido considerada como un mal pandémico de las actuales sociedades industrializadas. Considerando que España presenta una de las tasas de obesidad infantil más elevadas de Europa, conviene elaborar estrategias nutricionales alcanzables en el contexto de la Dieta Mediterránea Tradicional ya desde las primeras etapas de la vida.

3.5. SOBRE ÁCIDOS GRASOS Y PATOLOGÍAS

La parte bibliográfica *III.2.6.* ha mostrado mediante la evidencia científica actual que determinados ácidos grasos se hallan relacionado de forma directa con algunas de las patologías más comunes en la poblaciones actuales.

En base a los notables beneficios en la prevención y tratamiento de diversas patologías descritos para la salud humana de diversos patrones dietarios saludables, determinados grupos de alimentos y nutrientes, y en concreto del perfil de ácidos grasos de éstos, decidimos examinar el grado de cumplimiento de los consejos nutricionales médicos en relación a diversas patologías en la muestra representativa de la población mediterránea catalana (n = 710, 40% hombre, edad: 18-77 años) a través del estudio de su perfil en ácidos grasos plasmáticos y de su estatus nutricional.

Las enfermedades diagnosticadas que se evaluaron fueron: diabetes, depresión, artritis reumatoide, asma y bronquitis; así como los componentes del síndrome metabólico, que se hallan relacionado con el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Entre los ácidos grasos estudiados, los AGPI-CL n-3, EPA y DHA fueron asociados de forma significativa con pacientes diabéticos y no depresivos, mientras que los pacientes de artritis reumatoide presentaron los niveles más elevados de ácido oleico entre la población con patologías, que se relacionó positivamente con el consumo de aceite de oliva por parte de este colectivo, demostrando así que no sólo el tratamiento farmacológico ha de ser tenido en cuenta a la hora de prevenir y paliar los síntomas de las patologías que afectan a nuestra sociedad.

Asimismo, según los resultados obtenidos, los pacientes asmáticos catalanes deberían ser un grupo de la población a vigilar en cuanto a su ingesta dietaria de ácidos grasos saturados para evitar en un futuro una proliferación de la enfermedad cardiovascular en estos individuos.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de este estudio se resumen a continuación:

- Se ha desarrollado y validado un método para la determinación del perfil de ácidos grasos totales mediante la técnica de cromatografía de gases rápida acoplada a la detección por ionización de llama en plasma humano. El nuevo método permite identificar y cuantificar 30 ácidos grasos en un tiempo total de 3.2 min.
- Se ha desarrollado y validado un método para la determinación de los ácidos grasos de fosfolípidos de plasma y de eritrocitos humanos mediante la extracción en fase sólida y la técnica de cromatografía de gases rápida acoplada a la detección por ionización de llama. El nuevo método permite la separación de 25 ácidos grasos en un tiempo de análisis cromatográfico de 3.8 min.
- Se ha desarrollado y validado un método para la determinación de los dos principales isómeros del ácido linoleico conjugado, el *cis-9, trans-11 CLA* (ácido ruménico) y el *trans-10, cis-12 CLA*, mediante la técnica de cromatografía de gases rápida acoplada a la detección por ionización de llama en muestras de plasma humano.
- Se han identificado los alimentos que contribuyen en mayor medida al perfil lipídico de la dieta de una muestra representativa de la población mediterránea catalana:
 - El aceite de oliva es el alimento de la dieta catalana actual que aporta un mayor porcentaje de energía debido al consumo de grasa total.
 - El queso es el alimento que aporta el porcentaje más elevado debido al consumo de grasa saturada, en contraposición al consumo de leche y yogures observado en la década de los noventa.
- La dieta actual de la población catalana adulta cumple con la mayoría de los objetivos nutricionales intermedios establecidos para la población española y europea. Sería recomendable un aumento de la ingesta de

carbohidratos, ya que sólo un porcentaje inferior al 3% cumple los objetivos referentes a este macronutriente.

- Determinados ácidos grasos presentes en el plasma humano han sido claramente asociados con la ingesta de alimentos de los que son fuente (ácido oleico y aceite de oliva; EPA y DHA y pescado).
- El valor medio del *Índice de Calidad de la Dieta Mediterránea* determinado para la población catalana adulta es de $6,6 \pm 2,3$, sugiriendo una adherencia aceptable al patrón de dieta mediterráneo.
- Una administración moderada de aceite de oliva de 25 ml/día podría ser una herramienta útil para reducir la presión sanguínea de hombres sanos procedentes de poblaciones europeas sin una cultura tradicional de consumo de aceite de oliva.
- Las concentraciones plasmáticas de los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico determinadas en la población catalana no fueron suficientemente elevadas como para mostrar un efecto beneficioso del consumo de pescado actual en la mayoría de los factores de riesgo cardiovascular clásicos.
- La ingesta de pescado azul es actualmente del orden de sólo una ración por semana en la población catalana, implicando una necesidad futura de promover un incremento del mismo.
- Los niveles plasmáticos de los dos isómeros mayoritarios de ácidos grasos *trans* sugieren que la dieta catalana no se ve seriamente afectada por la influencia de patrones alimentarios occidentales.
- Los niveles plasmáticos de los dos isómeros mayoritarios del ácido linoleico conjugado determinados en la población catalana adulta son bajos. Sin embargo fueron suficientes como para observar una correlación positiva entre el *cis-9, trans-11* C18:2n-6 y los productos lácteos y la carne de rumiantes.
- El perfil plasmático de ácidos grasos de la muestra de la población mediterránea ha permitido sugerir relaciones entre determinadas patologías y el aporte de determinados alimentos y nutrientes.

VI. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abu Ghazaleh AA, Schingoethe DJ, Hippen AR. (2001) Conjugated linoleic acid and other beneficial fatty acids in milk fat from cows fed soybean meal, fish meal, or both. *J Dairy Sci.*; 84(8):1845-50.
- Aderka D (1996) The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7:231-240.
- Agostoni C, Verduci E, Bruzzese MG, Lammardo AM, Giovannini M. (2001) Lípidos y ácidos grasos, En: Tratado de Nutrición Pediátrica. Ed. R. Tojo. Barcelona. Doyma S.L..
- Agren JJ, Julkunen A, & Penttila I. (1992), Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column., *J Lipid Res.*, vol. 33, no. 12, pp. 1871-1876.
- Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willet WC, Ruskin JN, Manson JE (1998) Fish consumption and risk of sudden cardiac death, *JAMA*, 279:23-28.
- Albert CM, Campos H, Stampfer MJ et al. (2002) Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med*;346:1113-8.
- Albert CM, Oh K, Whang W, Manson JE, Chae C, Stampfer MJ, Willet WC, Hu F. (2005) Dietary alpha-linolenic acid intake and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease. *Circulation* 112: 3232-3238.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2005) The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet* 366:1059-1062
- Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S et al. (2004) Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev*. 44:509-38.
- Alkaabi, J. K., Ho, M., Levison, R., Pullar, T. & Belch, J. J. F. (2003) Rheumatoid arthritis and macrovascular disease. *Rheumatology* 42: 292-297.
- Allman-Farinelli MA & Dawson B (2005) Diet and aging: bearing on thrombosis and hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 31: 111-117.
- Alonso A, Beunza JJ, Delgado-Rodriguez M, Martinez JA & Martinez-Gonzalez MA. (2006) Low-fat dairy consumption and reduced risk of hypertension: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *Am J Clin Nutr*. 82: 972-979.
- Alonso A, Ruiz-Gutierrez V, Martinez-Gonzalez MA. (2006) Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutr.*; 9(2):251-7
- Ambring, A., Johansson, M., Axelsen, M., Gan, L., Strandvik, B. & Friberg, P. (2006) Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 83: 575-581.
- Amiano P, Dorransoro M, de Renobales M, Ruiz de Gordo JC, Irigoien I & EPIC Group of Spain (2001) Very-long-chain omega-3 fatty acids as markers for habitual fish intake in a population consuming mainly lean fish: the EPIC cohort of Gipuzkoa. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Eur J Clin Nutr*. 55: 827-832.
- Anderson SD, Kippelen P (2005) Exercise-induced bronchoconstriction: pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Resp*. 5:116-122.
- Anderson JT, Keys A, Grande F. (1957) The effects of different food fats on serum cholesterol concentration in man. *J Nutr*;62:421-4.
- Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A & Robinson K (2000) Homocysteine and risk of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 9: 13-21.
- Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER 3rd & et al. (2005) Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. *JAMA* 294: 2455-2464.

Arab L. (2003) Biomarkers of Fat and Fatty Acid Intake. *J Nutr.* 133:925S-932.

Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. (1997) Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*;65:1419-26.

Arterburn LM, Hall EB, Oken H. (2006) Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.*; 83(6 Suppl):1467S-1476S

Ascherio A, Katan MB, Zock PL, Stampfer MJ, Willett WC. (1999) Trans Fatty Acids and Coronary Heart Disease. *The New England Journal of Medicine*; 340:1994-8.

Ascherio A. (2002) Epidemiologic Studies on Dietary Fats and Coronary Heart Disease. *The American Journal of Medicine*;113:9S-12S.

B

Badimon L. (1995) Implicaciones del colesterol en el desarrollo y complicación de la placa de ateroma. *Alim Nutr Salud*;2:3-11.

Badimon L, Badimon JJ, Vilahur G, Segales E, Llorente V. (2002) Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications. *Pathophysiol Haemost Thromb*;32:225-31.

Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP (2004) Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 79:969-73.

Bakewell L, Burdge GC, Calder PC. (2006) Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets. *Br J Nutr*;96:93-9.

Bamia C, Orfanos P, Ferrari P, Overvad K, Hundborg HH, Tjønneland A, Olsen A, Kesse E, Boutron-Ruault MC et al. (2005) Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study. *Br J Nutr.* 94: 100-113.

Barham JB, Edens MB, Fonteh AN, Johnson MM, Easter L, Chilton FH. (2000) Addition of Eicosapentaenoic Acid to {gamma}-Linolenic Acid-Supplemented Diets Prevents Serum Arachidonic Acid Accumulation in Humans. *J Nutr*;130:1925-31.

Baro L, Fonolla J, Pena JL, Martinez-Ferez A, Lucena A, Jimenez J, Boza JJ, Lopez-Huertas E. (2003) N-3 Fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin Nutr.*; 22(2):175-82.

Basile J (2006) Management of global risk across the continuum of hypertensive heart disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 8: 21-30.

Battino M & Ferreiro MS (2004) Ageing and the Mediterranean diet: a review of the role of dietary fats. *Public Health Nutrition* 7: 953-958.

Bauch A, Lindtner O, Mensink GBM, Niemann B. (2006) Dietary intake and sources of long-chain n-3 PUFAs in German adults. *Eur J Clin Nutr*;60:810-2.

Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL. (2006) Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J Dairy Sci.*; 89(4):1235-43.

Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. (2002) Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr*;76:750-7.

Becker N, Illingworth DR, Alaupovic P, Connor WE, Sundberg EE. (1983) Effects of saturated, monounsaturated, and omega-6 polyunsaturated fatty acids on plasma lipids, lipoproteins, and apoproteins in humans. *Am J Clin Nutr*;37:355-60.

Belch JJ & Muir A (1998) n-6 and n-3 essential fatty acids in rheumatoid arthritis and other rheumatic conditions. *Proc Nutr Soc.* 57: 563-569.

- Benetos A, Rudnichi A, Safar M, Guize L. (1998) Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension*, 32:560-4.
- Benetou, V., Bamia, C., Trichopoulos, D. & Trichopoulou, A. (2006) Associations of anthropometric characteristics with blood cholesterol fractions among adults. The Greek EPIC study. *Eur J Clin Nutr*.
- Benjafeld A, Wang X, Morris BJ (2001) Tumor necrosis factor receptor 2 gene in genetic basis of coronary artery disease. *J Mol Med*, 79: 109-115.
- Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostoni RB et al. (1998) Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 98:946-52.
- Berbert, A. A., Kondo, C. R. M., Almendra, C. L., Matsuo, T. & Dichi, I. (2005) Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* 21: 131-136.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2001) *Lipids and Cell Membranes*. Biochemistry. New York: W.H.Freeman and Co.
- Berger J, Moller DE. (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*;53:435.
- Bernhardt TG, Cannistraro PA, Bird DA, Doyle KM, & Laposata M (1996), "Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography.", *J Chromatogr B Biomed Appl.*, vol. 675, no. 2, pp. 189-196.
- Bes-Rastrollo, M., Martinez-Gonzalez, M. A., Sanchez-Villegas, A., de la Fuente Arrillaga, C. & Martinez, J. A. (2006) Association of fiber intake and fruit/vegetable consumption with weight gain in a Mediterranean population. *Nutrition* 22: 504-511.
- Bibbins-Domingo K, Lin F, Vittinghoff E et al. (2005) Effect of hormone therapy on mortality rates among women with heart failure and coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*;95:289-91.
- Bilenko N, Fraser D, Vardi H, Shai I & Shahar D (2005) Mediterranean diet and cardiovascular diseases in an Israeli population. *Preventive Medicine* 40: 299-305.
- Binkoski, A. E., Kris-Etherton, P. M., Wilson, T. A., Mountain, M. L. & Nicolosi, R. J. (2005) Balance of Unsaturated Fatty Acids Is Important to a Cholesterol-Lowering Diet: Comparison of Mid-Oleic Sunflower Oil and Olive Oil on Cardiovascular Disease Risk Factors. *Journal of the American Dietetic Association* 105: 1080-1086.
- Birberg-Thornberg U, Karlsson T, Gustafsson PA, Duchon K. (2006) Nutrition and theory of mind--The role of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the development of theory of mind. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;75:33-41.
- Bittner V, Simon JA, Fong J, Blumenthal RS, Newby K, Stefanick ML. (2000) Correlates of high HDL cholesterol among women with coronary heart disease. *Am Heart J*;139:288-96.
- Bizzozero OA, Zuniga G, & Lees MB (1991), "Fatty acid composition of human myelin proteolipid protein in peroxisomal disorders.", *J Neurochem.*, vol. 56, no. 3, pp. 872-878.
- Bligh EG. & Dyer WJ. (1959), "A rapid method of total lipid extraction and purification", *Can J Biochem Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911-917.
- Blumberg LM & Klee MS (2001), "Elution parameters in constant-pressure, single-ramp temperature-programmed gas chromatography", *J Chromatogr A*, vol. 918, no. 1, pp. 113-120.
- Bocio, A., Domingo, J. L., Falco, G. & Llobet, J. M. Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in fish and seafood from the Catalan (Spain) market: Estimated human intake. *Environment International* In Press, Corrected Proof.
- Bodennec, J., Koul, O., Aguado, I., Brichon, G., Zwingelstein, G. & Portoukalian, J. (2000) A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *J. Lipid Res.* 41: 1524-1531.
- Bonanome A, Grundy SM. (1988) Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med*;12:19-1244.

- Bonanome A, Biasia F, De Luca M et al. (1996) n-3 fatty acids do not enhance LDL susceptibility to oxidation in hypertriacylglycerolemic hemodialyzed subjects. *Am J Clin Nutr*;63:261-6.
- Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR (2005) Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. *Pediatrics* 115:e290-e296
- Bourre JM. (2004) Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J Nutr Health Aging*;8:163-74.
- Bourre JM. (2005) Dietary omega-3 Fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J Nutr Health Aging*;9:31-8.
- Boursier V. Metabolic syndrome (2006) *J Mal Vasc.* 31:190-201.
- Bouzan, C., Cohen, J. T., Connor, W. E., Kris-Etherton, P. M., Gray, G. M., Konig, A., Lawrence, R. S., Savitz, D. A. & Teutsch, S. M. (2005) A Quantitative Analysis of Fish Consumption and Stroke Risk. *American Journal of Preventive Medicine* 29: 347-352.
- Brand FN, Kannel WB, Evans J, Larson MG & Wolf PA (1998) Glucose intolerance, physical signs of peripheral artery disease, and risk of cardiovascular events: the Framingham Study. *Am Heart J.* 136: 919-927.
- Bray GA, Paeratakul S, Popkin BM. (2004) Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiology & Behavior*;83:549-55.
- Breslow JL. (2006) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*;83:S1477-S1482.
- Brouwer, I. A., Heeringa, J., Geleijnse, J. M., Zock, P. L. & Witteman, J. C. M. (2006) Intake of very long-chain n-3 fatty acids from fish and incidence of atrial fibrillation. The Rotterdam Study. *American Heart Journal* 151: 857-862.
- Brown AJ, Jupe S, Briscoe CP. (2005) A family of fatty acid binding receptors. *DNA Cell Biol*;24:54-61.
- Brown MD. (2003) Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol* ;88:645-58.
- Brown MS, Goldstein JL. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*;234:34-47.
- Brzeski M, Madhok R, Capell HA. (1991) Evening primrose oil in patients with rheumatoid arthritis and side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Rheumatol*;30:370-2.
- Burdge GC, Wright P, Jones AE, & Wootton SA (2000), "A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction.", *Br J Nutr.*, vol. 84, no. 5, pp. 781-787.
- Burdge GC, Jones AE, Wootton SA. (2002) Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr*;88:355-63.
- Burdge GC, Calder PC. (2005) Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev*;45:581-97.
- Burdge GC. (2006) Metabolism of [alpha]-linolenic acid in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;75:161-8.
- Burke SJ, Gibney MJ, O'Dwyer NA & McCarthy SN. (2005) The influence of cereal and dairy consumption on the Irish diet: implications for developing food-based dietary guidelines. *Public Health Nutr.* 8: 227-237.
- Burr GO, Burr MM. (1929) A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem*;82:345-67.
- Burr GO, Burr MM. (1930) On the nature of fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem*;86:587-621.
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF et al. (1989) Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet Sep*;30:8666-757.
- Busse, W. W. & Lemanske, R. F. (2001) Asthma. *The New England Journal of Medicine* 344: 350-362.

C

- Cairns SR & Peters TJ (1983) Micromethods for quantitative lipid analysis of human liver needle biopsy specimens. *Clin Chim Acta* 7: 373-382.
- Calder PC, Zurier RB. (2001) Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*;42:115-21.
- Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. (2002) Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr*;87:S31-S48.
- Calder PC. (2004) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)*;107:1-11.
- Calder PC. (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*;83:1505S-19S.
- Calder PC. (2006) Polyunsaturated fatty acids and inflammation. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids;75:197-202.
- Campos H, Blijlevens E, McNamara JR et al. (1992) LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb*;12:1410-9.
- Cantwell MM, Flynn MAT, Cronin D, O'Neill JP, Gibney MJ. (2005) Contribution of foods to trans unsaturated fatty acid intake in a group of Irish adults. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*;18:377-85.
- Carrero JJ, Lopez-Huertas E, Salmeron LM, Baro L, Ros E. (2005) Daily supplementation with (n-3) PUFAs, oleic acid, folic acid, and vitamins B-6 and E increases pain-free walking distance and improves risk factors in men with peripheral vascular disease. *J Nutr*;135(6):1393-9.
- Chalon S. (2006) Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids;75:259-69.
- Cheatham CL, Colombo J, Carlson SE. (2006) N-3 fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations. *Am J Clin Nutr*;83:1458S-66S.
- Chia DJ & Boston BA (2006) Childhood obesity and the metabolic syndrome. *Adv Pediatr*. 53: 23-53.
- Chong E, SinclairAJ, Guymer RH. (2006) Facts on fats. *Clinical and Experimental Ophthalmology*;34:464-71.
- Chouinard PY, Corneau L, Butler WR, Chilliard Y, Drackley JK, Bauman DE. (2001) Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J Dairy Sci*; 84(3):680-90
- Christensen JH, Christensen MS, Dyerberg J, Schmidt EB. (1999) Heart rate variability and fatty acid content of blood cell membranes: a dose-response study with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr*;70:331-7.
- Christensen, J. H., Skou, H. A., Fog, L., Hansen, V. E., Vesterlund, T., Dyerberg, J., Toft, E. & Schmidt, E. B. (2001) Marine n-3 Fatty Acids, Wine Intake, and Heart Rate Variability in Patients Referred for Coronary Angiography. *Circulation* 103: 651-657.
- Christensen, J. H., Skou, H. A., Madsen, T., Topping, I. & Schmidt, E. B. (2001) Heart rate variability and n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine* 249: 545-552.
- Christie WW (1992), "Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids," in *Advances in Lipid Methodology*, Ed. W.W. Christie, Oily Press, Ayr. edn, Christie WW, ed., pp. 1-17.
- Christie WW (2006) Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids. In: *Advances in Lipid Methodology* (Christie WW ed.), pp. 1-17.
- Chrysohoou C, Panagiotakos D, Pitsavos C. (2004) Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults. The ATTICA Study. *J Am College Cardiol*. 44:152-8.

- Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF et al. (2000) Genetic Disruption of Ptgs-1, as well as of Ptgs-2, Reduces Intestinal Tumorigenesis in Min Mice. *Cancer Res*;60:4705-8.
- Cleland, J. G. F., Freemantle, N., Coletta, A. P. & Clark, A. L. (2006) Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE. *European Journal of Heart Failure* 8: 105-110.
- Cochran JW (2002), "Fast gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry of polychlorinated biphenyls and other environmental contaminants", *J Chromatogr Sci*, vol. 40, no. 5, pp. 254-268.
- Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR, Liu K (2002) Colorectal cancer mortality and factors related to the insulin resistance syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:385-391
- Colin A, Reggers J, Castronovo V, Ansseau M. (2003) Lipids, depression and suicide(article in French). *Encephale*;29:49-58.
- Connor WE. (2000) Importance of n-3 fatty acids in health and disease1. *Am J Clin Nutr*;71:171S-175.
- Connor, W. E. (2004) Will the dietary intake of fish prevent atherosclerosis in diabetic women? *Am J Clin Nutr* 80: 535-536.
- Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen N, Dietz W (2003) Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157:821-827
- Cooke JP. (2000) The endothelium: a new target for therapy. *Vasc Med*;5:49-53.
- Cooke JP. (2005) ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med*;10:S11-S17.
- Corrao G, Rubbiati L, Bagnardi V, Zambon A & Poikolainen K (2000) Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. *Addiction* 95: 1505-1523.
- Corrocher R, Pagnan A, Ambrosio GB et al. (1992) Effects induced by olive oil-rich diet on erythrocytes membrane lipids and sodium-potassium transports in postmenopausal hypertensive women. *J Endocrinol Invest*;15:369-76.
- Cott, JE. & Hibbeln, J. R. (2001) Lack of Seasonal Mood Change in Icelanders. *American Journal of Psychiatry* 158: 328.
- Couch SC & Daniels SR (2005) Diet and blood pressure in children. *Curr Opin Pediatr.* 17: 642-647.
- Covas, M. I., de la Torre, K., Farre-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fito, M., Lopez-Sabater, C., Pujadas-Bastardes, M. A., Joglar, J., Weinbrenner, T. et al. (2006) Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 40: 608-616.
- Covas, M. I., Nyyssonen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H. J., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J. et al. (2006) The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 145: 333-341.
- Covington MB. (2004) Omega-3 Fatty Acids. *American Family Physician*;70:133-40.
- Cowey S, Hardy RW (2006) The Metabolic Syndrome: A High-Risk State for Cancer? *Am J Pathol* 169:1505-1522
- Craig-Schmidt MC. (2006) World-wide consumption of trans fatty acids. *Atherosclerosis Supplements*;7:1-4.
- Cramers CA, Janssen HG, van Deursen MM, & Leclercq PA (1999), "High-speed gas chromatography: an overview of various concepts", *J Chromatogr A.*, vol. 856, pp. 315-329.
- Cramers CA & Leclercq PA (1999), "Strategies for speed optimisation in gas chromatography: an overview", *J Chromatogr A.*, vol. 842, pp. 3-13.

Crowe, F. L., Skeaff, C. M., Green, T. J. & Gray, A. R. (2006) Serum fatty acids as biomarkers of fat intake predict serum cholesterol concentrations in a population-based survey of New Zealand adolescents and adults. *Am J Clin Nutr* 83: 887-894.

Cunnane, S. C. (2004) Metabolism of polyunsaturated fatty acids and ketogenesis: an emerging connection. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70: 237-241.

Curtis CL, Rees SG, Cramp J et al. (2002) Effects of n-3 fatty acids on cartilage metabolism. *Proc Nutr Soc*;61:381-9.

D

Daae LN & Bremer J 1970, "The acylation of glycerophosphate in rat liver. A new assay procedure for glycerophosphate acylation, studies on its subcellular and submitochondrial localization and determination of the reaction products", *Biochim Biophys Acta.*, vol. 9, no. 210, pp. 92-104.

Danao-Camara TC, Shintani TT. (1999) The dietary treatment of inflammatory arthritis: case reports and review of the literature. *Hawaii Med J*;58:126-31.

Darlington LG, Stone TW. (2001) Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr*;85:251-69.

Dart AM, Silagy C, Dewar E, Jennings GL, McNeil J. Aortic distensibility and left ventricular structure and function in isolated systolic hypertension. *Eur Heart J*, 14:1465-70.

Das UN. (1999) Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;61:157-63.

Das, U. N. (2000) Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 63: 351-362.

Dastani Z, Engert JC, Genest J, Marcil M. (2006) Genetics of high-density lipoproteins. *Curr Opin Cardiol*;21:329-35.

David F, Gere DR, Scanlan F, & Sandra P (1999), "Instrumentation and applications of fast high-resolution capillary gas chromatography", *J Chromatogr A.*, vol. 842, no. 1-2, pp. 309-319.

De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, et al. (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practise. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease: Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J* 24:1601-1610

De Caterina R, Zampolli A. (2001) n-3 fatty acids: antiatherosclerotic effects. *Lipids* (2001);36 Suppl:S69-78;36:S69-S78.

De Caterina R, Madonna R, Massaro M. (2004) Effects of omega-3 fatty acids on cytokines and adhesion molecules. *Curr Atheroscler Rep*;6:485-91.

De Caterina, R. & Massaro, M. (2005) Omega-3 fatty acids and the regulation of expression of endothelial pro-atherogenic and pro-inflammatory genes. *J Membr Biol*. 206: 103-116.

De Caterina R, Zampolli A, Del Turco S, Madonna R, Massaro M. (2006) Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*;83:421S-426.

Deckelbaum, R. J. & Akabas, S. R. (2006) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: navigating toward recommendations. *Am J Clin Nutr* 84: 1-2.

de Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifal N (2003) Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 110:2494-2497.

DeFilippis, A. P. & Sperling, L. S. (2006) Understanding omega-3's. *American Heart Journal* 151: 564-570.

- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. (1999) Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction : Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*;99:779-85.
- de Jager MW, Gooris GS, Dolbnya IP, Ponc M, Bouwstra JA. (2004) Novel Mixtures Based on Synthetic Ceramides Reproduce the Unique Stratum Corneum Lipid Organization. *J Lipid Res*;45:923-32.
- de Roos NM, Schouten EG, Katan MB. (2003) Trans fatty acids, HDL-cholesterol, and cardiovascular disease. Effects of dietary changes on vascular reactivity. *Eur J Med Res*;8:355-7
- de Roos NM, Bots ML, Katan MB (2001) Replacement of dietary SFA by trans fatty acids lowers serum LDL cholesterol and impairs endothelial function in healthy men and women, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1233-7.
- DeFilippis AP, Sperling LS. (2006) Understanding omega-3's. *American Heart Journal*;151:564-70.
- Dessein PH, Tobias M, Veller MG (2006) Metabolic Syndrome and Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 33:1-8
- Dewailly E, Blanchet C, Gingras S et al. (2001) Relations between n-3 fatty acid status and cardiovascular disease risk factors among Quebecers. *Am J Clin Nutr*;74:603-11.
- Dewailly E, Blanchet C, Lemieux S et al. (2001) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik. *Am J Clin Nutr*;74:464-73.
- Dewailly E, Blanchet C, Gingras S, Lemieux S, Holub BJ. (2003) Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Quebec (Canada). *Lipids*;38:359-65.
- Diehr, P. & Beresford, S. A. A. (2003) The relation of dietary patterns to future survival, health, and cardiovascular events in older adults. *Journal of Clinical Epidemiology* 56: 1224-1235.
- Dietschy JM, Woollett LA, Spady DK. (1993) The interaction of dietary cholesterol and specific fatty acids in the regulation of LDL receptor activity and plasma LDL-cholesterol concentrations. *Ann N Y Acad Sci*;15:11-26.
- Dietschy JM. (1998) Dietary Fatty Acids and the Regulation of Plasma Low Density Lipoprotein Cholesterol Concentrations. *J Nutr*;128:444S.
- Dijck-Brouwer DAJ, Hadders-Algra M, Bouwstra H et al. (2005) Lower fetal status of docosahexaenoic acid, arachidonic acid and essential fatty acids is associated with less favorable neonatal neurological condition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;72:21-8.
- Din JN, Newby DE, Flapan AD. (2004) Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease--fishing for a natural treatment. *BMJ*;328:30-5.
- Djousse L, Pankow JS, Eckfeldt JH et al. (2001) Relation between dietary linolenic acid and coronary artery disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr*;74:612-9.
- Djousse L, Folsom AR, Province MA, Hunt SC, Ellison RC. (2003) Dietary linolenic acid and carotid atherosclerosis: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr*;77:819-25.
- Djousse L, Arnett DK, Carr JJ et al. (2005) Dietary Linolenic Acid Is Inversely Associated With Calcified Atherosclerotic Plaque in the Coronary Arteries: The National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Circulation*;111:2921-6.
- Dolecek TA. (1992) Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the multiple risk factor intervention trial. *Proc Soc Exp Biol Med*;200:177-82.
- Dommels YEM, Haring MMG, Keestra NGM, Alink GM, van Bladeren PJ, van Ommen B. (2003) The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE2 synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*;24:385-92.
- Doege H, Stahl A. (2006) Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)*; 21:259-68

Domanski MJ, Davis BR, Pfeffer MA, Kastanin M, Mitchell GF (1999) Isolated systolic hypertension. Prognostic information provided by pulse pressure. *Hypertension* 34:375-80.

Dougherty RM, Galli C, Ferro-Luzzi A, Iacono JM. (1987) Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA. *Am J Clin Nutr* 1987;45:443-55.

Dubois, M., Pattou, F., Kerr-Conte, J., Gmyr, V. & Vandewalle, B. (2000) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 43: 1165.

Dwyer J. (1995) Overview: dietary approaches for reducing cardiovascular disease risks. *J Nutr*;125:656S-65S.

Dyerberg J, Eskesen DC, Andersen PW et al. (2004) Effects of trans- and n-3 unsaturated fatty acids on cardiovascular risk markers in healthy males. An 8 weeks dietary intervention study. *Eur J Clin Nutr*;58:1062-70.

Dyerberg J, Christensen JH, Eskesen D, Astrup A, Stender S. (2006) Trans, and n-3 polyunsaturated fatty acids and vascular function--A yin yang situation? *Atherosclerosis Supplements*;7:33-5.

Dyerberg J, Bang HO (1978) Dietary fat and thrombosis. *Lancet*, 1:152-156.

Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane J (1978) Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*, 2:117-9.

E

Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D. (1998) Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *Journal of Affective Disorders*;48:149-55.

Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S (1999) Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med.* 131(5):363-75.

Elias SL, Innis SM. (2002) Bakery foods are the major dietary source of trans-fatty acids among pregnant women with diets providing 30 percent energy from fat. *J Am Diet Assoc*;102:46-51.

Engler MM, Engler MB. (2006) Omega-3 fatty acids: role in cardiovascular health and disease. *J Cardiovasc Nurs.*; 21(1):17-24, quiz 25-6.

Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Paolo C. (2004) Effects of a Mediterranean style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome. A randomized trial. *J Am Med Assoc.* 292:1440-6.

Esrey KL, Joseph L, Grover SA. (1996) Relationship between dietary intake and coronary heart disease mortality: Lipid Research Clinics Prevalence Follow-Up Study. *Journal of Clinical Epidemiology*;49:211-6.

Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D., Salas-Salvado, J., Ruiz-Gutierrez, V., Covas, M. I., Fiol, M., Gomez-Gracia, E., Lopez-Sabater, M. C. et al. (2006) Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 145: 1-11.

Expert Panel on Detection EaToHBCiA (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* 285:2485-2497

Expert Panel on Detection EaToHBCiA. (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*;16:19-2486.

F

- Falk E, Zhou J & Moller J (2001) Homocysteine and atherosthrombosis. *Lipids* 36: 3-11.
- Fang JL, Vaca CE, Valsta LM, Mutanen M. (1996) Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. *Carcinogenesis*;17:1035-40.
- Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF. (1997) Relation of Plaque Lipid Composition and Morphology to the Stability of Human Aortic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;17:1337-45.
- Fernandes G, Lawrence R, Sun D. (2003) Protective role of n-3 lipids and soy protein in osteoporosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;68:361-72.
- Fernandez-Vergel R, Penarrubia-Maria MT, Rispau-Falgas A, Espin-Martinez A, Gonzalo-Miguel L & Pavon-Rodriguez F (2006) Do we really follow the Mediterranean diet? *Aten Primaria* 37: 148-153.
- Ferro-Luzzi A, James WP & Kafatos A (2002) The high-fat Greek diet: a recipe for all? *Eur J Clin Nutr.* 56: 796-809.
- Fidanza F, Fidanza Alberti A (1968) Dietary surveys in connection with the epidemiology of heart disease: reliability, sources of variation and other data from 9 surveys in Italy. In: Den Hartog C, Buzina K, Fidanza F, Keys A, Roine P (eds) *Dietary Studies and Epidemiology of Heart Diseases*. The Hague: The Sticing, pp 77-86
- Finnegan YE, Howarth D, Minihane AM et al. (2003) Plant and Marine Derived (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Do Not Affect Blood Coagulation and Fibrinolytic Factors in Moderately Hyperlipidemic Humans. *J Nutr*;133:2210-3.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957), "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues", *J.Biol.Chem.*, vol. 226, pp. 497-509.
- Ford ES, Abbasi F, Reaven GM (2005) Prevalence of insulin resistance and the metabolic syndrome with alternative definitions of impaired fasting glucose. *Atherosclerosis* 181:143.
- Francis, G. A., Fayard, E., Picard, F. & Auwerx, J. (2003) NUCLEAR RECEPTORS AND THE CONTROL OF METABOLISM. *Annual Review of Physiology* 65: 261-311.
- Francois H, Coffman TM. (2004) Prostanoids and blood pressure: which way is up? *J Clin Invest* Sep;114(6):757-9 2004;114:757-9.
- Freeman MP, Hibbeln JR, Wisner KL, Brumbach BH, Watchman M, Gelenberg AJ. (2006) Randomized dose-ranging pilot trial of omega-3 fatty acids for postpartum depression. *Acta Psychiatr Scand*;113:31-5.
- Freemantle E, Vandal M, Tremblay-Mercier J et al. (2006) Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;75:213-20.
- Frost L, Vestergaard P (2005) N-3 fatty acids consumed from fish and risk of atrial fibrillation of flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Am J Clin Nutr* 81: 50-54
- Fung, T. T., McCullough, M. L., Newby, P. K., Manson, J. E., Meigs, J. B., Rifai, N., Willett, W. C. & Hu, F. B. (2005) Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 82: 163-173.
- Funk CD. (2001) Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*;294:1871-5.
- Fusconi E, Pala V, Riboli E et al. (2003) Relationship between plasma fatty acid composition and diet over previous years in the Italian centers of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Tumori*;89:624-35.
- Fuster V, Moreno PR. (2005) Atherothrombosis as a systemic, often silent, disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*; 2(9):431.
- Fuster V. (2006) Conferencia magistral ofrecida en el Acto de Entrega del Premio *Grande Covián* al Dr. V. Fuster. Fundación Dieta Mediterránea, Saló de Cent del Excmo. Ayuntamiento de Barcelona, 14 Diciembre de (Barcelona).

G

- Galli C, Marangoni F. (2006) N-3 fatty acids in the Mediterranean diet. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids; 75:129-33.
- Gardner CD, Kraemer HC. (1995) Monounsaturated Versus Polyunsaturated Dietary Fat and Serum Lipids : A Meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;15:1917-27.
- Garg A, Grundy SM, Koffler M. (1992) Effect of high carbohydrate intake on hyperglycemia, islet function, and plasma lipoproteins in NIDDM. *Diabetes Care*;15:1572-80.
- Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM. (2006) n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr. Jun*;83(6 Suppl):1526S-1535S.
- Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders AR, Kok FJ. (2002) Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens*;20:1493-9.
- Geleijnse, J. M., Brouwer, I. A. & Feskens, E. J. M. (2006) Risks and benefits of omega 3 fats: Health benefits of omega 3 fats are in doubt. *BMJ* 332: 915.
- Gerber M., Scali, J., Michaud, A., Durand, M. D., Astre, C. M., Dallongeville, J. & Romon, M. (2000) Profiles of a Healthful Diet and its Relationship to Biomarkers in a Population Sample from Mediterranean Southern France. *Journal of the American Dietetic Association* 100: 1164-1171.
- Gerber M. (2006) Qualitative methods to evaluate Mediterranean diet in adults. *Public Health Nutr.* 9: 147-151.
- Gidding SS (2006) Cardiovascular risk factors in adolescents. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 8: 269-275.
- Giltay, E. J., Gooren, L. J., Toorians, A. W., Katan, M. B. & Zock, P. L. (2004) Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. *Am J Clin Nutr* 80: 1167-1174.
- Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, Covas MI, Farre M, de la Torre-Boronat MC, Lopez-Sabater MC. (2002) Effect of ingestion of virgin olive oil on human LDL protein composition. *Eur J Clin Nutr* 56. 114-20.
- Gonzalez C, Argilaga S, Agudo A, Amiano P, Barricarte A, Beguiristain JM & et al (2002) Sociodemographic differences in adherence to the Mediterranean dietary pattern in Spanish population. *Gaceta Sanitaria* 16: 214-221.
- Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, Jones CJH, Lewis MJ. (2000) Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Cardiology*;35:265-70.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR (1977) Diabetes, blood lipids, and the role of obesity in coronary heart disease risk for women. The Framingham study. *Ann Intern Med* 87:393-397.
- Graf C, Dordel S, Tokarski W & Predel HG (2006) Overweight and Obesity in Childhood and Adolescence. Is Prevention Possible? (Artículo en alemán). *Herz* 31: 507-513.
- Graham B. (2004) Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 7:137-144.
- Griffiths G, Morse N. (2006) Clinical Applications of C₁₈ AND C₂₀ Chain Length Polyunsaturated Fatty Acids and Their Biotechnological Production in Plants . *JAOCS*;83:171-85.
- Grimaldi PA. (2001) Fatty acid regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*;4:433-7.
- Grimm H, Mayer K, Mayser P, Eigenbrodt E. (2002) Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr*;87:S59-S67.
- Grundey SM, Cleeman JL, Daniels SR, et al. (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive Summary. *Circulation* 112:e285-e290

H

- Haffner S, Taegtmeier H. (2003) Epidemic Obesity and the Metabolic Syndrome. *Circulation*;108:1541-5.
- Hagfors L, Nilsson I, Skoldstam L, Johansson G. (2005) Fat intake and composition of fatty acids in serum phospholipids in a randomized, controlled, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. *Nutr Metab (Lond)*;10:26.
- Han SN, Lekaa LS, Lichtenstein AH et al. (2002) Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lip Res*, 43:445-52.
- Handelman GJ, Epstein WL, Machlin LJ, van Kuijk FJ, Dratz EA. (1988) Biopsy method for human adipose with vitamin E and lipid measurements. *Lipids* ;23:598-604.
- Hara A & Radin NS (1979), "Simple procedures for the rapid cleavage of ester lipids and for the large-scale isolation from brain of cerebroside sulfate", *Anal Biochem*, vol. 100, no. 2, pp. 364-370.
- Harper CR, Jacobson TA. (2005) Usefulness of Omega-3 Fatty Acids and the Prevention of Coronary Heart Disease. *The American Journal of Cardiology*;96:1521-9.
- Harper CR, Edwards MJ, DeFilipis AP, Jacobson TA. (2006) Flaxseed Oil Increases the Plasma Concentrations of Cardioprotective (n-3) Fatty Acids in Humans. *J Nutr*;136:83-7.
- Harris WS. (1997) N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*;65:1645S-54S.
- Harris WS. (2005) Extending the cardiovascular benefits of omega-3 Fatty acids. *Curr Atheroscler Rep*;7:375-80.
- Harsha, D. W., Sacks, F. M., Obarzanek, E., Svetkey, L. P., Lin, P. H., Bray, G. A., Aickin, M., Conlin, P. R., Miller, E. R., III & Appel, L. J. (2004) Effect of Dietary Sodium Intake on Blood Lipids: Results From the DASH-Sodium Trial. *Hypertension* 43: 393-398.
- Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. (2004) Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Research Reviews*;45:104-14.
- Haugen MA, Kjeldsen-Kragh J, Bjerve KS, Hostmark AT, Forre O. (1994) Changes in plasma phospholipid fatty acids and their relationship to disease activity in rheumatoid arthritis patients treated with a vegetarian diet. *Br J Nutr*;72:555-66.
- Hauner H, Bender M, Haastert B, Hube F (1998) Plasma concentrations of soluble TNF-alpha receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 7: 231-240.
- Hayes KC. (2000) Dietary fatty acids, cholesterol, and the lipoprotein profile. *Br J Nutr*;84:397-9.
- Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. (1965) Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr*;17:281-95.
- Heller A and Koch T. (2000) "Immunonutrition with omega-3-fatty acids. Are new anti-inflammatory strategies in sight?" *Zentralbl Chir*. 125.2: 123-36.
- Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. (2003) Maternal Supplementation With Very-Long-Chain n-3 Fatty Acids During Pregnancy and Lactation Augments Children's IQ at 4 Years of Age. *Pediatrics*;111:e39-e44.
- Helland IB, Saugstad OD, Saarem K, Van Houwelingen AC, Nylander G, Drevon CA. (2006) Supplementation of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation reduces maternal plasma lipid levels and provides DHA to the infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*;19:397-406.
- Heller AR, Theilen HJ, Koch T. (2003) Fish or Chips? *News Physiol Sci*;18:50-4.
- Hennion MC (1999) Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A* 24: 3-54.

- Hibbeln J., Salem Jr N (1995) Dietary PUFA and depression: when cholesterol does not satisfy. *Am J Clin Nutr.* 62:1-9.
- Hibbeln J. (1998) Fish consumption and major depression. *Lancet*;351:1213.
- Hibbeln JR. (2002) Seafood consumption, the DHA content of mothers' milk and prevalence rates of postpartum depression: a cross-national, ecological analysis. *Journal of Affective Disorders*;69:15-29.
- Hibbeln JR, Nieminen LR, Blasbalg TL, Riggs JA, Lands WE. (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nutr*;83:S1483-S1493.
- Higdon JV, Du SH, Lee YS, Wu T, Wander RC. (2001) Supplementation of postmenopausal women with fish oil does not increase overall oxidation of LDL ex vivo compared to dietary oils rich in oleate and linoleate. *J Lipid Res*;42:407-18.
- Hiramatsu K, Nozaki H, & Arimori S (1980), "Lipid content of human platelets quantitated by thin-layer chromatography in combination with flame ionization detection.", *J Chromatogr.*, vol. 182, no. 3-4, pp. 301-309.
- Hodge W, Barnes D, Schachter HM, Pan Y, Lowcock EC, Zhang L, Sampson M, Morrison A, Tran K, Miguelez M, Lewin G. (2005) Effects of omega-3 fatty acids on eye health. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*;(117):1-6
- Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. (2003) Association studies for asthma and atopic diseases; a comprehensive review of the literature. *Resp Res* 4:14-26.
- Hoffjan S, Nicolae D, Ostrovnya I, Roberg K et al. (2005) Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the first year of life. *Am J Hum Genet.* 76:696-704.
- Hoffmann, K., Zyriax, B. C., Boeing, H. & Windler, E. (2004) A dietary pattern derived to explain biomarker variation is strongly associated with the risk of coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 80: 633-640.
- Hofman A, Grobbee DE, de Jang PT et al. (1991) Determinants of disease and disability in the elderly: the Rotterdam Elderly Study. *Eur J Epidemiol* 7:403-22.
- Holub, D. J. & Holub, B. J. (2004) Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Molecular and Cellular Biochemistry* 263: 217-225.
- Holvoet P, Harris TB, Tracy RP, Verhamme P, Newman AB et al. (2003) Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: findings from the Health, Aging, and Body Composition study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 8:1444-8.
- Honstra G. (2000) Essential fatty acids in mothers and their neonates. *Am J Clin Nutr*;71:1262S-9S.
- Hooper L, Thompson RL, Harrison RA et al. (2006) Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. *BMJ*;332:752-60.
- Horrobin DF. (2002) Food, micronutrients, and psychiatry. *Int Psychogeriatr*;14:331-4.
- Horton JD, Shimomura I. (1999) Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol*;10:143-50.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*;109:1125-31.
- Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR[gamma]) and its ligands: A review. *Domestic Animal Endocrinology*;22:1-23.
- Howard, B. V., Rodriguez, B. L., Bennett, P. H., Harris, M. I., Hamman, R., Kuller, L. H., Pearson, T. A. & Wylie-Rosett, J. (2002) Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Writing Group I: Epidemiology. *Circulation* 105: e132-e137.
- Howe P, Meyer B, Record S, Baghurst K. (2006) Dietary intake of long-chain [omega]-3 polyunsaturated fatty acids: contribution of meat sources. *Nutrition*;22:47-53.

- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE et al. (1997) Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*;337:1491-9.
- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE et al. (1999) Dietary intake of {alpha}-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr*;69:890-7.
- Hu FB, Manson JE, Willett WC. (2001) Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review. *J Am Coll Nutr*;20:5-19.
- Hu FB, Bronner L, Willet WC, Stampfer MJ, Rexrode KM, Albert CM, Hunter D, Manson JE (2002) Fish and omega-3 PUFA intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA*, 287: 1815-1821.
- Hu FB, Cho E, Rexrode KM, Albert CM, Manson JE. (2003) Fish and Long-Chain {omega}-3 Fatty Acid Intake and Risk of Coronary Heart Disease and Total Mortality in Diabetic Women. *Circulation*;107:1852-7.
- Hulthe J, Fagerberg B. (2002) Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.22(7):1162-7.
- Hulley S, Grady D, Bush T et al. (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*;19:605-13.
- Hulshof KF, van Erp-Baart MA, Anttolainen M et al. (1999) Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. *Eur J Clin Nutr*;53:143-57.
- Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ. (2005) Long-chain conversion of [13C]linoleic acid and {alpha}-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res*;46:269-80.

I

- Innis SM. (1991) Essential fatty acids in growth and development. *Progress in Lipid Research*;30:39-103
- Innis SM, Green TJ, Halsey TK. (1999) Variability in the Trans Fatty Acid Content of Foods within a Food Category: Implications for Estimation of Dietary Trans Fatty Acid Intakes. *J Am Coll Nutr*;18:255-60.
- Innis, S. M. (2003) Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Pediatrics* 143: 1-8.
- Innis SM. (2005) Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta*;26:S70-S75.
- Iribarren C, Go AS, Husson G, Sidney S, Fair JM, Quertermous T, Hlatky MA, Fortmann SP (2006) Metabolic Syndrome and Early-Onset Coronary Artery Disease: Is the Whole Greater Than Its Parts? *Journal of the American College of Cardiology* 48:1800-1807
- Iso H, Sato S, Umemura U, Kudo M, Koike K. (2002) Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke. *Stroke*;33:2086-93.
- Iso, H., Kobayashi, M., Ishihara, J., Sasaki, S., Okada, K., Kita, Y., Kokubo, Y., Tsugane, S. & for the JPHC Study Group (2006) Intake of Fish and n3 Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease Among Japanese: The Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation* 113: 195-202.

J

- Jacobson, T. A. (2006) Secondary Prevention of Coronary Artery Disease with Omega-3 Fatty Acids. *The American Journal of Cardiology* 98: 61-70.
- Jones EL, Shingfield KJ, Kohen C, Jones AK, Lupoli B, Grandison AS, Beever DE, Williams CM, Calder PC, Yaqoob P. (2005) Chemical, physical, and sensory properties of dairy products enriched with conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci.*; 88(8):2923-37
- Jump DB, Clarke SD. (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr.* ;19:63-90.
- Jump DB. (2002) The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Biol Chem*;277:8755-8.

K

- Kabashima, K. & Narumiya, S. (2003) The DP receptor, allergic inflammation and asthma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 69: 187-194.
- Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M (2005) The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 28:2289-2304
- Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, & Epps DE (1985), "Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns.", *J Lipid Res.*, vol. 26, no. 1, pp. 135-140.
- Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ et al. (1998) Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol* 82:2N-9N.
- Kant, A. K. (2004) Dietary patterns and health outcomes. *Journal of the American Dietetic Association* 104: 615-635.
- Katan MB. (2000) Trans fatty acids and plasma lipoproteins. *Nutr Rev*;58:188-91.
- Kaufman F (2002) Type 2 diabetes mellitus in children and youth: a new epidemic. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15:737-744
- Keys A, Aravanis C, Sdrin H (1968) The diets of middle-aged men in two rural areas of Greece. In: *Dietary Studies and Epidem of Heart Disease*, ed. C Den Hartog. 57-68. The Hague: The Stichting.
- Keys A, Menotti A, Karvonen M et al. (1986) The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol*;124:903-15.
- Kim, H. Y. & Salem, N., Jr. (1990) Separation of lipid classes by solid phase extraction [published erratum appears in *J Lipid Res* 1993 Jan;34(1):166]. *J. Lipid Res.* 31: 2285-2289.
- Kipnis, V., Subar, A. F., Midthune, D., Freedman, L. S., Ballard-Barbash, R., Troiano, R. P., Bingham, S., Schoeller, D. A., Schatzkin, A. & Carroll, R. J. (2003) Structure of Dietary Measurement Error: Results of the OPEN Biomarker Study. *Am. J. Epidemiol.* 158: 14-21.
- Klee MS & Blumberg LM (2002), "Theoretical and practical aspects of fast gas chromatography and method translation", *J Chromatogr Sci.*, vol. 40, no. 5, pp. 234-247.
- Knapp HR. (1997) Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. *Am J Clin Nutr*;65:1687S-98S.
- Knoops K, De Groot L, Kromhout D, Perrin A, Moreiras-Varela O, Menotti A & et al. (2004) Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women. *Journal of the American Medical Association* 292: 1433-1439.
- Knoops KT., Groot de LC, Fidanza F, Alberti-Fidanza A, Kromhout D & van Staveren W (2006) Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *Eur J Clin Nutr.* 18: 1-10.

- Kohlmeier L. (1995) Future of dietary exposure assessment . Am J Clin Nutr;61:702S-9S.
- Kok F, Kromhout D. (2004) Atherosclerosis. Epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. Eur J Nutr (Supl.1)43:1/2-1/5.
- Kolarovic L & Fournier NC (1986), "A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources", *Anal Biochem.*, vol. 156, no. 1, pp. 244-250.
- Kontogianni MD, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Stefanadis C. (2006) Modelling dairy intake on the development of acute coronary syndromes: the CARDIO2000 study. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.;13(5):791-7
- Kontogianni MD, Zampelas A, Tsigos C. (2006) Nutrition and inflammatory load. Ann N Y Acad Sci.;1083:214-38.
- Korytár P, Janssen HG, Matisová E, & Brinkman U (2002), "Practical fast gas chromatography: methods, instrumentation and applications", *Trends in analytical chemistry*, vol. 21, no. 9+10, pp. 558-571.
- Kovacs L, Zalka A, Dobo R, & Pucsok J (1986), "One-dimensional thin-layer chromatographic separation of lipids into fourteen fractions by two successive developments on the same plate.", *J Chromatogr.*, vol. 31, no. 382, pp. 308-313.
- Kratz M, Cullen P, Kannenberg F et al. (2002) Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein. Eur J Clin Nutr;56:72-81.
- Kris-Etherton PM, Yu S. (1997) Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. Am J Clin Nutr 1;65:1628S-44S.
- Kris-Etherton PM, Eckel R, Howard B et al. (2001) Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step 1 Dietary pattern on CVD. Circulation 103:1823-5.
- Kristensen SD, Iversen AM, Schmidt EB. (2001) n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary thrombosis. Lipids;36:S79-S82.
- Kroes R, Schaefer EJ, Squire RA, Williams GM. (2003) A review of the safety of DHA45-oil. Food and Chemical Toxicology;41:1433-46.
- Kurukulaaratchy RJ, Mathews S, Arschad SH. (2004) Does environment mediate earlier onset of the persistent childhood asthma phenotype? Pediatrics 113:345-50.
- L
- La Rovere MT, Bigger JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ for the ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. (1998) Baroreflex sensibility and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. Lancet, 351: 478-84.
- Lafay L, Mennen L, Basdevant A et al. (2000) Does energy intake underreporting involve all kinds of food or only specific food items? Results from the Fleurbaix Laventie Ville Sante (FLVS) study. Int J Obes Relat Metab Disord;24:1500-6.
- Lands WE. (2005) Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease. Ann N Y Acad Sci;1055:179-92.
- Lapointe, A., Goulet, J., Couillard, C., Lamarche, B. & Lemieux, S. (2005) A Nutritional Intervention Promoting the Mediterranean Food Pattern Is Associated with a Decrease in Circulating Oxidized LDL Particles in Healthy Women from the Quebec City Metropolitan Area. J. Nutr. 135: 410-415.
- Lapointe A, Couillard C, Lemieux S. (2006) Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. The Journal of Nutritional Biochemistry;17:645-58.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. (2004) Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. Am J Clin Nutr;79:935-45.

- Lasheras, C., Fernandez, S. & Patterson, A. M. (2000) Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am J Clin Nutr* 71: 987-992.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. (2001) The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res*;40:1-94.
- Lawson RE, Moss AR, Givens DI, (2001) *Nutr Res* 14:153-57.
- Leaf A. The electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of polyunsaturated fatty acids (2001) *Eur Heart J*, 22:D98-D105.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. (2002) Cyclooxygenase-2 Inhibition by Celecoxib Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Angiogenic Endothelial Cells in Vivo. *Cancer Res*;62:625-31.
- Lefevre, M., Kris-Etherton, P. M., Zhao, G. & Tracy, R. P. (2004) Dietary fatty acids, hemostasis, and cardiovascular disease risk. *Journal of the American Dietetic Association* 104: 410-419.
- Lefevre M, Champagne CM, Tulley RT, Rood JC, Most MM.(2005) Individual variability in cardiovascular disease risk factor responses to low-fat and low-saturated-fat diets in men: body mass index, adiposity, and insulin resistance predict changes in LDL cholesterol. *Am J Clin Nutr*. 82(5):957-63
- Leigh-Firbank EC, Minihane AM, Leake DS et al. (2002) Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oils: differential associations with lipid responses. *Br J Nutr*;87:435-45.
- Lemaitre RN, King IB, Mozaffarian D et al. (2006) Plasma Phospholipid Trans Fatty Acids, Fatal Ischemic Heart Disease, and Sudden Cardiac Death in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Circulation*;114:209-15.
- Lemaitre RN, King IB, Raghunathan TE et al. (2002) Cell membrane trans fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Circulation* 105:697-701
- Lemanske, J. & Busse, W. W. (2003) 6. Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 502-519.
- Lemanske, J. & Busse, W. W. (2006) 6. Asthma: Factors underlying inception, exacerbation, and disease progression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117: S456-S461.
- Lewis 1990
- Lewin GA, Schachter HM, Yuen D, Merchant P, Mamaladze V, Tsertsvadze A. (2005) Effects of omega-3 fatty acids on child and maternal health. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*;118:11.
- Li D, Mann NJ, Sinclair AJ. (2006) A significant inverse relationship between concentrations of plasma homocysteine and phospholipid docosahexaenoic acid in healthy male subjects. *Lipids*.; 41(1):85-9.
- Li Y, Choi M, Cavey G et al. (2005) Crystallographic Identification and Functional Characterization of Phospholipids as Ligands for the Orphan Nuclear Receptor Steroidogenic Factor-1. *Molecular Cell*;17:491-502.
- Libby, P. & Ridker, P. M. (2006) Inflammation and Atherothrombosis: From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. *Journal of the American College of Cardiology* 48: A33-A46.
- Licata G, Argano C, Di Chiara T, Parrinello G & Scaglione R (2006) Obesity: a main factor of metabolic syndrome? *Panminerva Med*. 48: 77-85.
- Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W. S. et al. (2006) Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114: 82-96.
- Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W. S. et al. (2006) Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations Revision (2006). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2186-2191.

- Lichtman SW, Pisarska K, Berman ER et al. (1992) Discrepancy between self-reported and actual caloric intake and exercise in obese subjects. *N Engl J Med*;31:27-1893.
- Linos A, Kaklamani E, Kontomerkos A et al. (1991) The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis--a case control study. *Scand J Rheumatol*;20:419-26.
- Linos A, Kaklamani VG, Kaklamani E et al. (1999) Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables? *Am J Clin Nutr*;70:1077-82.
- Liu J, Li Y, Pan D, Hopfinger AJ. (2005) Predicting permeability coefficient in ADMET evaluation by using different membranes-interaction QSAR. *International Journal of Pharmaceutics*;304:115-23.
- Liu Z, Patterson DG Jr, & Needham LL (1994), "Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the fast separation and determination of pesticides extracted from human serum.", *Anal Chem.*, vol. 1, no. 66, pp. 3086-3092.
- Lock AL, Horne CA, Bauman DE, Salter AM. (2005) Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *J Nutr.*; 135 (8):1934-9
- Logan AC. (2003) Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression. *Altern Med Rev*;8:410-25.
- Logan AC. (2004) Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional. *Lipids Health Dis*; 3(25):1-8.
- Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE et al. (2004) Consumption of (n-3) Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Activation in Women. *J Nutr*;134:1806-11.
- Lopez-Garcia, E., Schulze, M. B., Meigs, J. B., Manson, J. E., Rifai, N., Stampfer, M. J., Willett, W. C. & Hu, F. B. (2005) Consumption of Trans Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction. *J. Nutr.* 135: 562-566.
- Lovejoy JC. (1999) Dietary fatty acids and insulin resistance. *Curr Atheroscler Rep*;1:215-20.

M

- Macala LJ, Yu RK, & Ando S (1983), "Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry.", *J Lipid Res.*, vol. 24, no. 9, pp. 1243-1250.
- MacLean CH, Mojica WA, Morton SC et al. (2004) Effects of omega-3 fatty acids on lipids and glycemic control in type II diabetes and the metabolic syndrome and on inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, renal disease, systemic lupus erythematosus, and osteoporosis. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*; 89:1-4.
- MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA et al. (2006) Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA*;295:403-15.
- Maes M, Smith RS. (1998) Fatty acids, cytokines, and major depression (Editorial). *Biological Psychiatry*;43:313-4.
- Malecka-Tendera, E. & Mazur, A. (2006) Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes* 30: S1-S3.
- Malpuech-Brugere C, Verboeket-van de Venne WP, Mensink RP, Arnal MA, Morio B, Brandolini M, Saebo A, Lassel TS, Chardigny JM, Sebedio JL, Beaufriere B. (2004) Effects of two conjugated linoleic Acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obes Res.*;12(4):591-8
- Mamalakis G, Kafatos A, Manios Y, Kalogeropoulos N, Andrikopoulos N. (2002) Abdominal vs buttock adipose fat: relationships with children's serum lipid levels. *Eur J Clin Nutr*;56:1081-6.
- Mann NJ, Ponnampalam EN, Yep Y, Sinclair AJ. (2003) Feeding regimes affect fatty acid composition in Australian beef cattle. *Asia Pac J Clin Nutr*;12:S38.

- Manolio TA, Pearson TA, Wenger NK, Barrett-Connor E, Payne GH, Harlan WR. (1992) Cholesterol and heart disease in older persons and women. Review of an NHLBI workshop. *Ann Epidemiol*;2:161-76.
- Manson JE, Hsia J, Johnson KC et al. (2003) Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. *The New England Journal of Medicine*;349:523-34.
- Maradit-Kremers H, Nicola PH, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE (2005) Cardiovascular death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52:722-732
- Marchioli R, Barzi F, Bomba E et al. (2002) Early Protection Against Sudden Death by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids After Myocardial Infarction: Time-Course Analysis of the Results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation*;105:1897-903.
- Mark, A. L. (2006) Dietary therapy for obesity is a failure and pharmacotherapy is the future: a point of view. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33: 857-862.
- Martinez M (2001) Restoring the DHA levels in the brains of Zellweger patients. *J Mol Neurosci* 16: 309-316.
- Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Marti, A., Martinez, J. A. & Martin-Moreno JM (2002) Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *European Journal of Nutrition* 41: 153-160.
- Martinez-Gonzalez MA & Sanchez-Villegas A. (2004) The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern? *Eur J Epidemiol.* 19: 9-13.
- Masulli, M., Riccardi, G., Galasso, R. & Vaccaro, O. (2006) Relationship between smoking habits and the features of the metabolic syndrome in a non-diabetic population. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 16: 364-370.
- Mataix J. (2002) Lípidos. In: Ergon, ed. *Nutrición y Alimentación Humana. Volumen I.* Madrid:.
- Mataix J. (2002) Aterosclerosis y trombosis. In: Ergon, ed. *Nutrición y Alimentación Humana. Volumen II.* Madrid:.
- Matisová E & Dömötörova M (2003), "Fast gas chromatography and its use in trace analysis", *J Chromatogr A.*, vol. 1000, pp. 199-221.
- Mazza A, Bossone E, Mazza F & Distant A (2004) Homocysteine and cardiovascular risk. *Monaldi Arch Chest Dis.* 62: 29-33.
- McKee T. (2003) Lípidos y membranas. In: McKee T, McKee JR, eds. *Bioquímica: la base molecular de la vida.* Madrid: McGraw-Hill Interamericana:331-72.
- McKeever TM, Britton J. (2004) Diet and asthma. *Am J Resp Crit Care Med.* 170:725-29.
- McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PW, Schaefer EJ. (1992) Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb*;12:1284-90.
- McNamara JR, Small DM, Li Z, Schaefer EJ. (1996) Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B. *J Lipid Res*;37:1924-35.
- McNamara RK, Carlson SE. (2006) Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;75:329-49.
- Meisinger C, Baumert J, Khuseynova N, Loewel H, Koenig W. (2005) Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation.* 112(5):651-7.
- Mensink RP, Katan MB. (1992) Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb*;12:911-9.

- Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. (2003) Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*;77:1146-55.
- Mensink RP. (2005) Metabolic and health effects of isomeric fatty acids. *Curr Opin Lipidol* Feb;16(1):27-30 2006.
- Mesa MD, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. (2004) Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidizability and thrombogenicity of low-density lipoprotein. *Atherosclerosis*;175:333-43.
- Metcalf RG, James MJ, Mantzioris E, Cleland LG. (2003) A practical approach to increasing intakes of n-3 polyunsaturated fatty acids: use of novel foods enriched with n-3 fats. *Eur J Clin Nutr*;57:1605-12.
- Metso S, Loimaala A, Mercuri MF, Nenonen A, Vuori I et al. (2004) Circulating oxidized low-density lipoprotein and common carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *J Biomed Sci*. 11(3):356-61
- Michalik L, Desvergne B, Wahli W. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors beta/delta: emerging roles for a previously neglected third family member. *Curr Opin Lipidol*;14:129-35.
- Mickleborough, T. D., Lindley, M. R., Ionescu, A. A. & Fly, A. D. (2006) Protective Effect of Fish Oil Supplementation on Exercise-Induced Bronchoconstriction in Asthma. *Chest* 129: 39-49.
- Min, Y., Lowy, C., Ghebremeskel, K., Thomas, B., Offley-Shore, B. & Crawford, M. (2005) Unfavorable effect of type 1 and type 2 diabetes on maternal and fetal essential fatty acid status: a potential marker of fetal insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 82: 1162-1168.
- Minami A, Ishimura N, Sakamoto S et al. (2002) Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester v. oleic acid-rich safflower oil on insulin resistance in type 2 diabetic model rats with hypertriacylglycerolaemia. *Br J Nutr*;87:157-62.
- Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ (2005) Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest* 127:1233-7.
- Moilanen, T. & Nikkari, T. (1981), "The effect of storage on the fatty acid composition of human serum", *Clinica Chimica Acta*, vol. 114, no. 1, pp. 111-116.
- Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Costa R, Chiofalo B, Dugo P, & Dugo G (2004), "Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of lipids", *J Chromatogr A*, vol. 1035, no. 2, pp. 237-247.
- Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Costa R, & Dugo G (2004), "Fast GC for the analysis of citrus oils", *J Chromatogr Sci*, vol. 42, no. 8, pp. 410-416.
- Moreno LA., Sarria A & Popkin BM (2002) The nutrition transition in Spain: a European Mediterranean country. *Eur J Clin Nutr*. 56: 992-1003.
- Morgan WJ, Crain EF, Gruchalla RS et al (2004) Results of a home-based environmental intervention among urban children with asthma. *N Engl J Med*. 351:1068-80.
- Mori TA, Beilin LJ. (2001) Long-chain omega 3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr Opin Lipidol*;12:11-7.
- Mori, Y., Murakawa, Y., Okada, K., Horikoshi, H. & Yokoyama, J. (1999) Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22: 908.
- Morris MC, Sacks F, Rosner B. (1993) Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 88:523-33.
- Morrison WR & Smith LM (1964), "Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol", *J Lipid Res.*, vol. 5, pp. 600-608.
- Moser AB., Jones DS, Gerald, VR. & Hugo, WM. (1999) Plasma and Red Blood Cell Fatty Acids in Peroxisomal Disorders. *Neurochemical Research* V24: 187-197.

- Moyad MA. (2005) An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: Part I. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*;23:28-35.
- Mozaffarian D. (2006) Trans fatty acids - Effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atherosclerosis Supplements*;7:29-32.
- Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. (2006) Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med*;354:1601-13
- Mozaffarian D, Ascherio A, Hu FB, Stampfer MJ, Willett WC, Siscovick DS, Rimm EB (2005) Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*, 111:157-164.
- ¹ Mozaffarian D, Rimm EB, King IB et al. (2004) Trans fatty acids and systemic inflammation in heart failure. *Am J Clin Nutr* 80:1521-5.
- ² Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE et al (2004) Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr* 79:606-12.
- Mozaffarian D, Psaty BM, Rimm EB et al. (2004) Fish intake and risk of incident atrial fibrillation. *Circulation*. 110:368-73.
- MSNBC (2006) News Services. www.msnbc.msn.com/id/16051436/New York City passes trans fat ban. 5 Diciembre, New York.
- Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, Camargo CA Jr, Stampfer MJ, Willett WC & Rimm EB (2003) Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *New England Journal of Medicine* 348: 109-118.
- Mullen BJ, Martin RJ (1992) The effect of dietary fat on diet selection may involve central serotonin. *Am J Physiol* 263:R559-63.
- Murphy, M. M., Vilella, E., Ceruelo, S., Figuera, L., Sanchez, M., Camps, J., Cuco, G., Ferre, N., Labad, A. et al. (2002) The MTHFR C677T, APOE, and PON55 Gene Polymorphisms Show Relevant Interactions with Cardiovascular Risk Factors. *Clin Chem* 48: 372-375.
- Muskiet FAJ, Fokkema MR, Schaafsma A, Boersma ER, Crawford MA. (2004) Is Docosahexaenoic Acid (DHA) Essential? Lessons from DHA Status Regulation, Our Ancient Diet, Epidemiology and Randomized Controlled Trials. *J Nutr*;134:183-6.
- Muskiet FAJ, van Goor SA, Kuipers RS et al. (2006) Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;75:135-44.
- Myher JJ & Kuksis A (1995), "General strategies in chromatographic analysis of lipids", *J Chromatogr B*, vol. 671, pp. 3-33.
- N
- Nair J, Vaca CE, Velic I, Mutanen M, Valsta LM, Bartsch H. (1997) High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;6:597-601.
- Nakamura MT, Cho HP, Xu J, Tang Z, Clarke SD. (2001) Metabolism and functions of highly unsaturated fatty acids: an update. *Lipids*;36:961-4.
- Nakamura MT, Nara TY. (2003) Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;68:145-50.
- Nelson GJ, Schmidt PC, Bartolini G, Kelley DS, Kyle D. (1997) The effect of dietary arachidonic acid on platelet function, platelet fatty acid composition, and blood coagulation in humans. *Lipids*;32:421-5.

- Nemets B, Stahl Z, Belmaker RH (2002) Addition of omega-3 fatty acids to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *Am J Psych* 159:477-79.
- Nestel, P. J. (2000) Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. *Am J Clin Nutr* 71: 228S-231.
- Nestel P, Shige H, Pomeroy S, Cehun M, Abbey M, Raederstorff D. (2002) The n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase systemic arterial compliance in humans. *Am J Clin Nutr*;76:326-30.
- Neuhouser ML, Patterson RE, King IB, Horner NK, Lampe JW. (2003) Selected nutritional biomarkers predict diet quality. *Public Health Nutr*;6:703-9.
- Newby, P. K., Hu, F. B., Rimm, E. B., Smith-Warner, S. A., Feskanich, D., Sampson, L. & Willett, W. C. (2003) Reproducibility and validity of the Diet Quality Index Revised as assessed by use of a food-frequency questionnaire. *Am J Clin Nutr* 78: 941-949.
- Nicolosi RJ, Stucchi AF, Kowala MC, Hennessy LK, Hegsted DM, Schaefer EJ. (1990) Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. In vivo studies of receptor and nonreceptor-mediated catabolism of LDL in cebus monkeys. *Arteriosclerosis*;10:119-28.
- Noaghiul S, Hibbeln JR. (2003) Cross-National Comparisons of Seafood Consumption and Rates of Bipolar Disorders. *American Journal of Psychiatry*;160:2222-7.
- Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM et al. (1997) Prostaglandin E2 Stimulates Aromatase Expression in Endometriosis-Derived Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab*;82:600-6.
- Noel M & Reddy M (2005) Nutrition and aging. *Prim Care* 32: 659-669.
- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, Eckardstein Av. (2002) HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*;161:1-16.
- Norlen L, Al-Amoudi A. (2004) Stratum Corneum Keratin Structure, Function and Formation: The Cubic Rod-Packing and Membrane Templating Model. *J Invest Dermatol*;123:732.
- Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. (2003) NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;284:L84-L89.
- O
- Oda E, Hatada K, Kimura J, Aizawa Y, Thanikachalam PV & Watanabe K (2005) Relationships between serum unsaturated fatty acids and coronary risk factors: negative relations between nervonic acid and obesity-related risk factors. *Int Heart J* 46: 975-985.
- Oken E, Kleinman KP, Olsen SF, Rich-Edwards JW, Gillman MW. (2004) Associations of Seafood and Elongated n-3 Fatty Acid Intake with Fetal Growth and Length of Gestation: Results from a US Pregnancy Cohort. *Am J Epidemiol*;160:774-83.
- Oken E, Wright RO, Kleinman KP et al. (2005) Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a U.S. Cohort. *Environ Health Perspect*;113:1376-80.
- Oomen CM, Ocke MC, Feskens EJ, Erp-Baart MA, Kok FJ, Kromhout D. (2001) Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study. *The Lancet*;357:746-51.
- Orth-Gomer K, Mittleman MA, Schenck-Gustafsson K et al. (1997). Lipoprotein(a) as a determinant of coronary heart disease in young women. *Circulation* 95(2):329-34.
- Osler M & Schroll M (1997) Diet and mortality in a cohort of elderly people in a north European community. *Int. J. Epidemiol.* 26: 155-159.

Osterud B, Bjorklid E.(2003) Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev.*(4):1069-112

Ostlund RE Jr, Racette SB, Stenson WF. (2002) Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterols, oxysterols, and squalene. *Nutr Rev*;60:349-59.

Otto SJ, van Houwelingen AC, Badart-Smook A, Hornstra G. (2001) Comparison of the peripartum and postpartum phospholipid polyunsaturated fatty acid profiles of lactating and nonlactating women. *Am J Clin Nutr*;73:1074-9.

P

Pala, V., Sieri, S., Masala, G., Palli, D., Panico, S., Vineis, P., Sacerdote, C., Mattiello, A., Galasso, R. & Salvini, S. (2006) Associations between dietary pattern and lifestyle, anthropometry and other health indicators in the elderly participants of the EPIC-Italy cohort. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 16: 186-201.

Palmquist DL, Lock AL, Shingfield KJ, Bauman DE. (2005) Biosynthesis of conjugated linoleic Acid in ruminants and humans. *Adv Food Nutr Res.*; 50:179-217.

Panagiotakos D, Pitsavos C, Polychronopoulos E, Chrysohoou C, Zampelas A & Trichopoulou A (2004) Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review. *Medical Science Monitor* 10: 193-198.

Panagiotakos, D. B., Chrysohoou, C., Pitsavos, C. & Stefanadis, C. (2006) Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study. *Nutrition* 22: 449-456.

Pariza MW, Park Y, Cook ME. (2001) The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res.* 40 283-98.

Parker, G., Gibson, N. A., Brotchie, H., Heruc, G., Rees, A. M. & Hadzi-Pavlovic, D. (2006) Omega-3 Fatty Acids and Mood Disorders. *American Journal of Psychiatry* 163: 969-978.

Pawlosky R, Hibbeln J, Lin Y, Salem N Jr. (2003) n-3 fatty acid metabolism in women. *Br J Nutr*;90:993-5.

Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N, Jr. (2001) Physiological compartmental analysis of {alpha}-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res*;42:1257-65.

Pedersen H, Petersen M, Major-Pedersen A et al. (2003) Influence of fish oil supplementation on in vivo and in vitro oxidation resistance of low-density lipoprotein in type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr*;57:713-20.

Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Mata P. (2002) Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis*;163:385-98.

Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L et al. (2005) International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*;35:421-4.

Perona, J. S., Cabello-Moruno, R. & Ruiz-Gutierrez, V. (2006) The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 429-45: 429-445.

Pesonen, E., Johnsson, J. & Berg, A. (2006) Intimal thickness of the coronary arteries in low-birthweight infants. *Acta Paediatrica* 95: 1234-1238.

Picard F, Auwerx J. (2002) PPAR and glucose homeostasis. *Annual Review of Nutrition*;22:167-97.

Pieke B, von Eckardstein A, Gulbahce E et al. (2000) Treatment of hypertriglyceridemia by two diets rich either in unsaturated fatty acids or in carbohydrates: effects on lipoprotein subclasses, lipolytic enzymes, lipid transfer proteins, insulin and leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*;24:1286-96.

Pietinen P, Ascherio A, Korhonen P et al. (1997) Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Epidemiol*;15:876-87.

Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Willet 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* 108:155-60.

Plat J, Mensink RP. (2005) Food Components and Immune Function. *Curr Opin Lipidol*;16:31-7.

Plutzky J. (1999) Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am J Cardiol*;84:15J-20J

Popkin BM, Siega-Riz AM, Haines PS, Jahns L. (2001) Where's the fat? Trends in U.S. diets 1965-1996. *Preventive Medicine*;32:245-54.

Popp-Snijders C, Schouten JA, Heine RJ, van der Meer J, van der Veen EA. (1987) Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Res*;4:141-7.

Posner BM, Cobb JL, Belanger AJ, Cupples LA, D'Agostino RB, Stokes J. (1991) Dietary lipid predictors of coronary heart disease in men. The Framingham Study. *Arch Intern Med*;151:1181-7.

Prescott SL, Calder PC. (2004) N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.; 7(2):123-9.

Psaltopoulou, T., Naska, A., Orfanos, P., Trichopoulos, D., Mountokalakis, T. & Trichopoulou, A. (2004) Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* 80: 1012-1018.

Psota TL, Gebauer SK, Kris-Etherton P. (2006) Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk. *The American Journal of Cardiology*;98:3-18.

Q

Quiles, J. L., Ochoa, J. J., Ramirez-Tortosa, C., Battino, M., Huertas, J. R., Martin, Y. & Mataix, J. (2004) Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Experimental Gerontology* 39: 1189-1198.

R

Raatz SK, Bibus D, Thomas W, Kris-Etherton P. (2001) Total Fat Intake Modifies Plasma Fatty Acid Composition in Humans. *J Nutr*;131:231-4.

Rabin BA, Boehmer TK & Brownson RC (2006) Cross-national comparison of environmental and policy correlates of obesity in Europe. *The European Journal of Public Health* 1-9.

Rashid MN, Fuentes F, Touchon RC, Wehner PS.(2003)Obesity and the risk for cardiovascular disease. *Prev Cardiol*.(1):42-7

Rasmussen, B. M., Vessby, B., Uusitupa, M., Berglund, L., Pedersen, E., Riccardi, G., Rivellese, A. A., Tapsell, L., Hermansen, K. & for The KANWU Study Group (2006) Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 83: 221-226.

Reaven G (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607 Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB (2003) Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 108:2957-2963

Reaven G (2005) The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chem* 51:931-938

Reaven PD, Witztum JL. (1996) Oxidized Low Density Lipoproteins in Atherogenesis: Role of Dietary Modification. *Annual Review of Nutrition*;16:51-71.

Reddy KS & Katan MB (2004) Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. *Public Health Nutr* 7: 167-186.

- Reddy KS, Katan MB. (2006) Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. *Public Health Nutr*;7:167-86.
- Reis, L. C. & Hibbeln, J. R. (2006) Cultural symbolism of fish and the psychotropic properties of omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75: 227-236.
- Reisman J, Schachter HM, Dales RE, Tran K et al. (2006) Treating asthma with n-3 fatty acids: where is the evidence? A systematic review. *BMC Complem and Alternative Medicine*. 6:26-34.
- Rennie KL, Hughes J, Lang R, Jebb SA. (2003) Nutritional management of rheumatoid arthritis: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*;16:97-109.
- Reynolds SS, Yanek LR, Vaidya D, Mora S, Moy TF, Saudek CD, Becker LC, Becker DM. (2006) Glucose levels in the normal range predict incident diabetes in families with premature coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract.*; 74(3):267-73.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000) C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.*, 342:836-843.
- Riemersma RA, Wood DA, (1986) Butler S et al. Linoleic acid content in adipose tissue and coronary heart disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*;31:6533-1423.
- Roberts TL, Wood DA, Riemersma RA, Gallagher PJ, Lampe FC. (1993) Linoleic acid and risk of sudden cardiac death. *Br Heart J*;70:524-9.
- Robinson DR, Urazake M, Huang R, Taki H, Sugiyama E, Knoell CT, Xu L, Yeh ET, Auron PE (1996) Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1beta gene expression. *Lipids*, 31:S23-S31.
- Roche HM. (1999) Unsaturated fatty acids. *Proc Nutr Soc*;58:397-401.
- Rodriguez CR, Seman LJ, Ordovas JM et al. (1994) Lipoprotein(a) and coronary heart disease. *Chem Phys Lipids*;67-68:389-98.
- Ross JA, Moses AG, Fearon KCH (1999) The anti-catabolic effects of n-3 fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2:219-226.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL et al. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*;288:321-33.
- Rymer C, Givens DI. (2005) N-3 fatty acid enrichment of edible tissue of poultry: a review. *Lipids.*; 40(2):121-30

S

- Sacks FM, Campos H. (2006) Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Cardiovascular Disease: Time to Widen Our View of the Mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*;91: 398-400.
- Sakai Y, Ito H, Egami Y, Ohoto N, Hijii et al. (2005) Favourable association of leg fat with cardiovascular risk factors. *J Intern Med*. 257(2):194-200
- Salam MT, Li YF, Langholz B & Gilliland FD (2005) Maternal fish consumption during pregnancy and risk of early childhood asthma. *J Asthma* 42: 513-518.
- Saleh J, Sniderman AD, Cianflone K. (1999) Regulation of Plasma fatty acid metabolism. *Clin Chim Acta*;286:163-80.
- Salem N, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. (2001) Mechanisms of action of DHA in the nervous system. *Lipids* 36:945-59.

- Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
- Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V et al. (2006) Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr* 95: 742-751.
- Sampath H, Ntambi JM. (2005) Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*;25:317-40.
- Sanchez-Villegas, A., Martinez, J. A., De Irala, J. & Martinez-Gonzalez, M. A. (2002) Determinants of the adherence to an "a priori" defined Mediterranean dietary pattern. *European Journal of Nutrition* 41: 249-257.
- Sanchez-Villegas A, Martinez JA, Prattala R, Toledo E, Roos G, Martinez-Gonzalez MA & FAIR-97-3096 Group (2003) A systematic review of socioeconomic differences in food habits in Europe: consumption of cheese and milk. *Eur J Clin Nutr.* 57: 917.
- Sanchez-Villegas A, Bes-Rastrollo M, Martinez-Gonzalez MA. & Serra-Majem L (2006) Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: the SUN cohort. *Int J Obes (Lond)* 30: 350-358.
- Sanders T. (2000) PUFA in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr.* 71(suppl):176s-8s.
- Sandra P & David F (2002), "High-throughput capillary gas chromatography for the determination of polychlorinated biphenyls and fatty acid methyl esters in food samples", *J Chromatogr Sci.*, vol. 40, no. 5, pp. 248-253.
- SanGiovanni JP, Chew EY. (2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina *Prog Retin Eye Res.*; 24(1):87-138.
- Sarzi-Puttini P, Comi D, Boccassini L, Muzzupappa S, Turiel M, Panni B & Salvaggio A (2000) Diet therapy for rheumatoid arthritis. A controlled double-blind study of two different dietary regimens. *Scand J Rheumatol.* 29: 302-307.
- Sattler AM, Soufi M, Maisch B, Schaefer JR. (2005) Lipids and lipoproteins in women. *Herz*;30:368-74.
- Scaglioni S, Veduci E, Agostoni C, Vergani B, Stival G, Riva E & Giovannini M (2004) Dietary habits and plasma fatty acids levels in a population of Italian children: is there any relationship? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 71: 91-95.
- Schaefer EJ. (2002) Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr*;75:191-212.
- Schachter HM, Kourad K, Merali Z, Lumb A, Tran K, Miguelez M. (2005) Effects of omega-3 fatty acids on mental health. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*;116:11.
- Schaefer, E. J. (2002) Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr* 75: 191-212.
- Schmidt EB. (2003) Marine n-3 fatty acids and thrombosis. *Thrombosis Research*;111:9-10.
- Schmidt EB, Rasmussen LH, Rasmussen JG, Joensen AM, Madsen MB, Christensen JH. (2006) Fish, marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease: A minireview with focus on clinical trial data. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;75:191-5.
- Schmitz, B., Reske, S. N., Machulla, H. J., Egge, H., & Winkler, C. 1984, "Cardiac metabolism of omega-(p-iodophenyl)-pentadecanoic acid: a gas- liquid chromatographic-mass spectrometric analysis", *Journal of Lipid Research*, vol. 25, no. 10, pp. 1102-1108.
- Schrepf R, Limmert T, Weber PC, Theisen K, Sellmayer A. (2004) Immediate effects of n-3 fatty acid infusion on the induction of sustained ventricular tachycardia. *The Lancet*;363:1441-2.
- Schrijvers, D. M., De Meyer, G. R. Y., Herman, A. G. & Martinet, W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovascular Research* In Press, Corrected Proof.

- Schroder H, Marrugat J, Vila J, Covas MI & Elosua R (2006) Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. *J Nutr.* 134: 3355-3361.
- Schroder H, Marrugat J, Covas MI (2006) High monetary costs of dietary patterns associated with lower BMI: a population-based study. *Int J Obesity* 1-6.
- Schwartz SA, Hernandez A, Mark Evers B. (1999) The role of NF- κ B/I κ B proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. *Surgical Oncology*;8:143-53.
- Schwarzenberg, S. J. & Sinaiko, A. R. (2006) Obesity and inflammation in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 7: 239-246.
- Scuteri A, Najjar SS, Morrell CH, Lakatta EG (2005) The metabolic syndrome in older individuals: prevalence and prediction of cardiovascular events: the cardiovascular health study. *Diabetes Care* 28:882-887
- Sears MR, Greene JM, William AR et al. (2003) A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 349:1414-22.
- Seppänen-Laakso T, Laakso I, Hiltunen R. (2002) Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*;465:39-62
- Serra-Majem L, Aranceta J & on behalf of the SENC Working Group on Nutritional Objectives for the Spanish Population. Spanish Society of Community Nutrition. (2001) Nutritional objectives for the Spanish population. Consensus from the Spanish Society of Community Nutrition. *Public Health Nutr.* 4: 1409-1413.
- Serra-Majem L, de la Cruz JN, Ribas L & Tur JA. (2003) Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr.* 57: S2-S7.
- Serra-Majem L, Ngo de la Cruz, Salleras L. (2004) Mediterranean Diet and Health: Is all the secret in olive oil? *Pathophys Haemost Thromb.* 33:461-5.
- Serra-Majem L, Ribas L, Ngo J, Ortega RM, Garcia A, Perez-Rodrigo C & Aranceta J (2004) Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents. *Public Health Nutr* 7: 931-935.
- Serrano-Martinez, M., Martinez-Losa, E., Prado-Santamaria, M., Brugarolas-Brufau, C., Fernandez-Jarne, E. & Martinez-Gonzalez, M. A. (2004) To what extent are the effects of diet on coronary heart disease lipid-mediated? *International Journal of Cardiology* 95: 35-38.
- Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB et al. (2002) Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *The Lancet*;360:1623-30.
- Sherry B. (2005) Food behaviors and other strategies to prevent and treat pediatric overweight. *Int J Obes (Lond)* 29: S116-S126.
- Simopoulos AP¹. (1999) Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*;5:421-9.
- Simopoulos, A. P. (2001) The Mediterranean Diets: What Is So Special about the Diet of Greece? *The Scientific Evidence.* *J. Nutr.* 131: 3065S-33073.
- ¹ Simopoulos AP, Pavlou KN eds (2001) Nutrition and fitness. Diet, genes, physical activity and health. *World Rev Nutr Diet.* 89:1-192.
- ² Simopoulos AP, Pavlou KN eds (2001) Nutrition and fitness. Metabolic studies in health and disease. *World Rev Nutr Diet.* 90:1-198.
- Sinclair AJ, Attar-Bashi NM, Li D. What is the role of alpha-linolenic acid for mammals? *Lipids* (2002);37:1113-23.
- Sinclair AJ, Johnson L, O'Dea K, Holman RT. Diets rich in lean beef increase arachidonic acid and long-chain omega 3 polyunsaturated fatty acid levels in plasma phospholipids. *Lipids* 1994;29:337-43.

- Sinclair AJ, Attar-Bashi NM, Li D. (2002) *Lipids* 37;1113.
- Singh B, Mallika V, Goswami B (2006) Metabolic syndrome: Diagnosis, potential markers and management-an update. *Clin Chim Acta*.
- Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Rastogi V, Moshiri M. (1997) Randomised double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival. *Cardiovasc Drugs Ther*, 11: 85-91.
- Sirol M, Fuster V, Fayad ZA. (2006) Plaque imaging and characterization using magnetic resonance imaging: towards molecular assessment. *Curr Mol Med*.; 6(5):541-8.
- Siscovick DS, Lemaitre RN, Mozaffarian D. (2003) The fish story: a diet-heart hypothesis with clinical implications: n-3 polyunsaturated fatty acids, myocardial vulnerability, and sudden death. *Circulation*, 107: 2632-2634.
- Siscovick DS, Raghunathan TE, King I et al. (1995) Dietary intake and cell membrane levels of LC-n-3 PUFA and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA*, 274: 1363-7.
- Skeaff CM, Gowans S. (2006) Home use of margarine is an important determinant of plasma trans fatty acid status: a biomarker study. *Br J Nutr*;96:377-83.
- Skoldstam L, Hagfors L, Johansson G. (2003) An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*;62:208-14.
- Skorepa J, Kahudova V, Kotrlíkova E, Mares P, & Todorovicova H (1983) "Gas-liquid chromatography profiling of intact lipids. Observation of differences between triglyceride structure of lipoproteins in type III and type IV hyperlipoproteinemia.", *J Chromatogr*, vol. 11, no. 273(1), pp. 180-186.
- Smit EN, Muskiet FAJ, Boersma ER. (2004) The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*;71:241-50.
- Snider MD, McGarry JD, Hanson RW. (2006) Lipid Metabolism I: Synthesis, storage, and utilization of fatty acids and triacylglycerols. In: Devlin TM, ed. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley & Sons, Inc.:662-89.
- Sniderman J, Cianflone K. (1999) Regulation of Plasma fatty acid metabolism. *Clin Chim Acta*;286:163-80.
- Snijder MB, Zimmet PZ, Visser M et al.(2004) Independent and opposite associations of waist and hip circumferences with diabetes, hypertension and dyslipidemia: the AusDiab Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 28(3):402-9
- Sontrop, J. & Campbell, M. K. (2006) [omega]-3 polyunsaturated fatty acids and depression: A review of the evidence and a methodological critique. *Preventive Medicine* 42: 4-13.
- Spady DK, Bilheimer DW, Dietschy JM. (1983) Rates of receptor-dependent and -independent low density lipoprotein uptake in the hamster. *Proc Natl Acad Sci USA*;80:3499-503.
- Spector SL, Surette ME. (2003) Diet and asthma: has the role of dietary lipids been overlooked in the management of asthma? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 90:371-77.
- Spivakov BY, Malofeeva GI & Petrukhin OM (2006) Solid-phase extraction on alkyl-bonded silica gels in inorganic analysis. *Anal Sci*. 22: 503-519.
- Stehr, S. N. & Heller, A. R. (2006) Omega-3 fatty acid effects on biochemical indices following cancer surgery. *Clinica Chimica Acta* 373: 1-8.
- Stein O, Stein Y. (2005) Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis*;178:217-30.
- Stein O, Stein Y. (1999) Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*;144:285-301.
- Stein Y, Stein O. (2003) Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis*;170:1-9.

- Stender S, Dyerberg J. (2004) Influence of trans Fatty Acids on Health. *Am Nutr Metab*;48:61-6.
- Stender S¹, Dyerberg J, Bysted A, Leth T, Astrup A. (2006) A trans world journey. *Atherosclerosis Supplements*;7:47-52.
- Stender S², Dyerberg J, Astrup A. (2006) High levels of industrially produced trans fat in popular fast foods. *N Engl J Med*;354:1650-2.
- Stern MP, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM (2004) Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care* 27:2676-2681.
- Stoekli, R. & Keller, U. (2004) Nutritional fats and the risk of type 2 diabetes and cancer. *Physiology & Behavior* 83: 611-615.
- Stoll AL, Severus WE, Freeman MP, Rueter S, Zboyan HA, Diamond E, Cress KK, Marangell LB (1999) Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psych* 56(5):407-12.
- Stoll A, Renshaw P, Yurgelun-Tood D, Cohen D (2000) Neuroimaging in bipolar disorder: what have we learned? *Biol Phys* 48:505-517.
- Storlien LH, Kriketos AD, Calvert GD, Baur LA, Jenkins AB. (1997) Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*;57:379.
- Su KP, Huang SY, Chiu CC, Shen WW. (2003) Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary trial. *Europ Neuropsychopharm* 13:267-271.
- Suarez EC. (2003) Joint Effect of Hostility and Severity of Depressive Symptoms on Plasma Interleukin-6 Concentration. *Psychosom Med*;65:523-7.
- Sublette ME, Russ MJ, Smith GS. (2004) Evidence for a role of the arachidonic acid cascade in affective disorders: a review. *Bipolar Disorders*;6:95-105.
- Sublette ME, Hibbeln JR, Galfalvy H, Oquendo MA, Mann JJ. (2006) Omega-3 Polyunsaturated Essential Fatty Acid Status as a Predictor of Future Suicide Risk. *American Journal of Psychiatry*;163:1100-2.
- Suzuki E, Sano A, Kuriki T, Miki T. (1993) Separation and determination of phospholipids in plasma employing thin-layer chromatographic plate with concentration zone or solid phase extraction. *Biol Pharm Bull*;16:77-80.
- Suzuki E, Sano A, Kuriki T & Miki T (1997) Improved separation and determination of phospholipids in animal tissues employing solid phase extraction. *Biol Pharm Bull*. 20: 299-303.
- Suzuki, T., Kohno, H., Hasegawa, A., Toshima, S., Amaki, T., Kurabayashi, M., & Nagai, R. (2002), "Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease", *Clinical Biochemistry*, vol. 35, no. 5, pp. 347-353.
- Suzuki K, Inoue T, Hioki R et al. (2006) Association of abdominal obesity with decreased serum levels of carotenoids in a healthy Japanese population. *Clinical Nutrition*;25:780-9.
- Svaneborg N, Kristensen SD, Hansen LM, Bullow I, Husted SE, Schmidt EB. (2002) The acute and short-term effect of supplementation with the combination of n-3 fatty acids and acetylsalicylic acid on platelet function and plasma lipids. *Thromb Res*, 105:311-6.
- Svetkey LP, Simons-Morton DG, Proschan MA, Sacks FM, Conlin PR, Harsha D & Moore TJ (2004) Effect of the dietary approaches to stop hypertension diet and reduced sodium intake on blood pressure control. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 6: 373-381.

T

- Tapiero H, Ba GN, Couvreur P, Tew KD. (2002) Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother* (2002) Jul;56 (5):215-22;56:215-22.

- Taskinen MR, Puolakka J, Pyorala T et al. (1996) Hormone Replacement Therapy Lowers Plasma Lp(a) Concentrations: Comparison of Cyclic Transdermal and Continuous Estrogen-Progestin Regimens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;16:1215-21.
- Temme EH, Mensink RP, Hornstra G. (1996) Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *Am J Clin Nutr*;63:897-903.
- Thies, F., Nebe-von-Caron, G., Powell, J. R., Yaqoob, P., Newsholme, E. A. & Calder, P. C. (2001) Dietary Supplementation with γ -Linolenic Acid or Fish Oil Decreases T Lymphocyte Proliferation in Healthy Older Humans. *J. Nutr.* 131: 1918-1927.
- Thies F, Garry JM, Yaqoob P et al. (2003) Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *The Lancet*;361:477-85.
- Thijssen MA & Mensink RP (2005) Fatty acids and atherosclerotic risk. *Handb Exp Pharmacol* 170: 194.
- Tilley (2001)
- Togo P, Osler M, Sorensen TIA & Heitmann BL (2001) Food intake patterns and body mass index in observational studies. *International Journal of Obesity* 25: 1741-1751.
- Tooze, J. A., Midthune, D., Dodd, K. W., Freedman, L. S., Krebs-Smith, S. M., Subar, A. F., Guenther, P. M., Carroll, R. J. & Kipnis, V. (2006) A New Statistical Method for Estimating the Usual Intake of Episodically Consumed Foods with Application to Their Distribution. *Journal of the American Dietetic Association* 106: 1575-1587.
- Toshima, S. i., Hasegawa, A., Kurabayashi, M., Itabe, H., Takano, T., Sugano, J., Shimamura, K., Kimura, J., Michishita, I. et al. (2000) Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein Levels : A Biochemical Risk Marker for Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2243-2247.
- Tranchida PQ, Presti ML, Costa R, Dugo P, Dugo G, & Mondello L (2006), "High-throughput analysis of bergamot essential oil by fast solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-flame ionization detection", *J Chromatogr A*, vol. 1103, no. 1, pp. 162-165.
- Trebble TM, Wootton SA, May A, Erlewyn-Lajeunesse MD, Chakraborty A, Mullee MA, Stroud MA & Beattie RM (2003) Essential fatty acid status in paediatric Crohn's disease: relationship with disease activity and nutritional status. *Aliment Pharmacol Ther* 18: 433-442.
- Trevisan M, Liu J, Muti P, Misciagna G, Menotti A, Fucci F (2001) Markers of insulin resistance and colorectal cancer mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:937-941.
- Trichopoulou A., Kouris-Blazos A, Vassilakou T, Gnardellis C, Venizelos M, Lagiou P, Wahlqvist ML & Trichopoulos D. (1995) Diet and survival of elderly Greeks: a link to the past. *Am J Clin Nutr.* 61: 1346S-1350S.
- Trichopoulou A. (2004) Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly: a review. *Public Health Nutr.* 7: 943-947.
- Trichopoulou A, Bamia C & Trichopoulos D (2005) Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch Intern Med* 165: 929-935.
- Trichopoulou T, Costacou T, Bamia C & Trichopoulos D (2003) Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New England Journal of Medicine* 348: 2599-2608.
- Trichopoulos D & Lagiou P (2004) Mediterranean diet and overall mortality differences in the European Union. *Public Health Nutrition* 7: 949-951.
- Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ooke MC, Peeters PH & et al (2005) Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *British Medical Journal* 330: 991-997.
- Tricon S, Burdge GC, Jones EL, Russell JJ, El-Khazen S, Moretti E, Hall WL, Gerry AB, Leake DS, Grimble RF, Williams CM, Calder PC, Yaqoob P. (2006) Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *Am J Clin Nutr*;83:744-53.

- Tsutsumi S, Haruna R, Tomisato W et al. (2002) Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci*;47:84-9.
- Tur JA, Romaguera D & Pons A. (2004) Adherence to the Mediterranean dietary pattern among the population of the Balearic Islands. *Br J Nutr*. 92: 341-346.
- Tur JA., Romaguera D & Pons A. (2005) Does the diet of the Balearic population, a Mediterranean-type diet, ensure compliance with nutritional objectives for the Spanish population? *Public Health Nutr*. 8: 275-283.
- Turini ME, Crozier GL, Donnet-Hughes A, Richelle MA. (2001) Short-term fish oil supplementation improved innate immunity, but increased ex vivo oxidation of LDL in man--a pilot study. *Eur J Nutr* 2001;40:56-65.
- Tvrzicka E, Mares P, Votruba M, & Hrabak P (1990), "Some limitations of plasma lipid analysis in clinical research by thin-layer chromatography with flame-ionization detection", *J Chromatogr.*, vol. 530, no. 2, pp. 424-431.
- Tvrzicka E, Stankova B, Buchtikova M, Andel M, & Zak A (2000), "Fatty acid composition of domestic dietary fats", *Sb Lek.*, vol. 101, no. 1, pp. 117-120.
- Tvrzicka E, Vecka M, Stanková B, & Zak A (2002), "Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection. Quantitative aspects", *Analytica Chimia Acta*, vol. 465, pp. 337-350.
- U
- Uauy R, Mena P, Valenzuela A. Essential fatty acids as determinants of lipid requirements in infants, children and adults. *Eur J Clin Nutr* (1999) Apr;53 Suppl 1:S66-77
- Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE. (2001) Essential fatty acids in visual and brain development *Lipids*;36(9):885-95
- Unwin N, Patel S, Bhopal R, Fischbacher C, White M, Alberti G (2003) A comparison of the prevalence and metabolic characteristics of WHO and NCEP definitions of the metabolic in three UK-based ethnic groups. *Diabet Med* 20:66-69
- Unwin N (2006) The metabolic syndrome. *J R Soc Med* 99:457-462
- Upritchard JE, Zeelenberg MJ, Huizinga H, Verschuren PM, Trautwein EA. (2005) Modern fat technology: what is the potential for heart health? *Proc Nutr Soc*;64:379-86.
- V
- Vamecq J, Latruffe N. (1999) Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *The Lancet*;354:141-8.
- Van Boven AJ, Jukema JW, Haaksma J et al on behalf of the REGRESS Study Group. (1998) Depressed heart rate variability is associated with events in patients with stable coronary artery disease and preserved left ventricular function. *Am Heart J*. 135: 571-6.
- van Dam, R. M., Willett, W. C., Rimm, E. B., Stampfer, M. J. & Hu, F. B. (2002) Dietary Fat and Meat Intake in Relation to Risk of Type 2 Diabetes in Men. *Diabetes Care* 25: 417-424.
- Van Es 1992
- van Staveren W, De Groot L & Haveman-Nies A (2002) The SENECA study: potentials and problems in relating diet to survival over 10 years. *Public Health Nutrition* 5: 901-905.
- Vercelli D. (2004) Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. *J Allergy Clin Immunol*. 113:381-6.
- Veriotti T & Sacks R (2001), "High-speed GC and GC/MS with a series-coupled column ensemble using stop-flow operation", *Anal Chem.*, vol. 73, no. 13, pp. 3045-3050.
- Vilez-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. (2006) Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis. *Curr Mol Med.*;6(5):489-99.

Vincent-Baudry S., Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, Portugal H, Planells R, Grolier P et al. (2005) The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr.* 82: 964-971.

Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C & Galli C (2005) Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr.* 44: 121-127.

Visioli F, Galli C (2001) The role of antioxidants in the Mediterranean diet. *Lipids* 36(suppl):s49-52.

Volker D, Fitzgerald P, Major G & Garg M (2000) Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27: 2343-2346.

W

Wahrburg U. (2004) What are the health effects of fat? *European Journal of Nutrition*;43:i6-i11.

Waijers, P. M., Ocke, M. C., van Rossum, C. T., Peeters, P. H., Bamia, C., Chloptsios, Y., van der Schouw, Y. T., Slimani, N. & Bueno-de-Mesquita, H. B. (2006) Dietary patterns and survival in older Dutch women. *Am J Clin Nutr* 83: 1170-1176.

Wakai K, Ito Y, Kojima M, Tokudome S, Ozasa K, Inaba Y, Yagyu K, Tamakoshi A & JACC Study Group (2005) Intake frequency of fish and serum levels of long-chain n-3 fatty acids: a cross-sectional study within the Japan Collaborative Cohort Study. *J Epidemiol.* 15: 211-218.

Wald DS, Law M, Morris JK.(2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis.*BMJ.* 325(7374):1202

Wallenfeldt K, Fagerberg B, Wikstrand J, Hulthe J. (2004) Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men.*J Intern Med.* 256(5):413-20.

Walsmith J, Roubenoff R. (2002) Cachexia in rheumatoid arthritis. *International Journal of Cardiology*;85:89-99.

Wang C, Harris WS, Chung M et al. (2006) n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr*;84:5-17.

Wang, L., Folsom, A. R., Zheng, Z. J., Pankow, J. S. & Eckfeldt, J. H. (2003) Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 78: 91-98.

Wang ST & Peter F (1983), "Gas-liquid chromatographic determination of fatty acid composition of cholesteryl esters in human serum using silica Sep-Pak cartridges", *J Chromatogr*, vol. 9, no. 276(2), pp. 249-256.

Wardlaw GM, Snook JT. (1990) Effect of diets high in butter, corn oil, or high-oleic acid sunflower oil on serum lipids and apolipoproteins in men. *Am J Clin Nutr*;51:815-21.

Wassertheil-Smoller S, Hendrix SL, Limacher M et al. (2003) Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. *JAMA*;289:2673-84.

Weggemans, R. M., Zock, P. L., Ordovas, J. M., Ramos-Galluzzi, J. & Katan, M. B. (2001) Genetic polymorphisms and lipid response to dietary changes in humans. *European Journal of Clinical Investigation* 31: 950-957.

Weikert, C., Hoffmann, K., Dierkes, J., Zyriax, B. C., Klipstein-Grobusch, K., Schulze, M. B., Jung, R., Windler, E. & Boeing, H. (2005) A Homocysteine Metabolism-Related Dietary Pattern and the Risk of Coronary Heart Disease in Two Independent German Study Populations. *J. Nutr.* 135: 1981-1988.

Weiss R, Dziura J, Burgert T, et al (2004) Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 350:2362-2374

White, T., Bursten, S., Federighi, D., Lewis, R. A., & Nudelman, E. (1998), "High-Resolution Separation and Quantification of Neutral Lipid and Phospholipid Species in Mammalian Cells and Sera by Multi-One-Dimensional Thin-Layer Chromatography", *Analytical Biochemistry*, vol. 258, no. 1, pp. 109-117.

- Wijendran V, Hayes KC. (2004) Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*;24:597-615.
- Willett WC, Ascherio A. (1994) Trans fatty acids: Are the effects only marginal? *Am J Public Health*;84:724.
- Williams CM, Burdge G. (2006) Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc*;65:42-50.
- Winkler, J. T. (2005) The fundamental flaw in obesity research. *Obesity Reviews* 6: 199-202.
- Wolfram G. (2003) Dietary fatty acids and coronary heart disease. *Eur J Med Res.* 20: 321-324.
- Wong KW. (2005) Clinical efficacy of n-3 fatty acid supplementation in patients with asthma. *Journal of the American Dietetic Association*;105:98-105.
- World Health Organization. (1999) Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Report of a WHO Consultation. Part I: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. WHO. . Geneva.
- Y
- Yaqoob P, Calder PC. (2003) N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation in the arterial wall. *Eur J Med Res*;8:337-54.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso L, Mostofsky I. (2002) The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiology of Aging*;23:843-53.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. (2005) Essential fatty acids and the brain: From infancy to aging. *Neurobiology of Aging*;26:98-102.
- Yokoyama, M. & Origasa, H. (2003) Effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in Japanese patients with hypercholesterolemia: rationale, design, and baseline characteristics of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *American Heart Journal* 146: 613-620.
- York DA, Rossner S, Caterson I et al. (2004) Prevention Conference VII: Obesity, a Worldwide Epidemic Related to Heart Disease and Stroke: Group I: Worldwide Demographics of Obesity. *Circulation*;110:e463-e470.
- Yu S, Derr J, Etherton TD, Kris-Etherton PM. (1995) Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterolemic. *Am J Clin Nutr*;61:1129-39.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL et al. (2005) Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 366: 1640-1649.
- Z
- Zarraga, I. G. E. & Schwarz, E. R. (2006) Impact of Dietary Patterns and Interventions on Cardiovascular Health. *Circulation* 114: 961-973.
- Zeleniuch-Jacquotte A, Chajes V, Van Kappel AL, Riboli E, Toniolo P. (2000) Reliability of fatty acid composition in human serum phospholipids. *Eur J Clin Nutr*;54:367-72.
- Zock PL, Katan MB. (1997) Trans fatty acids, lipoproteins, and coronary risk. *Can J Physiol Pharmacol*;75:211-6.
- Zschocke J, Schaefer JR. (2003) Homozygous familial hypercholesterolaemia in identical twins. *The Lancet*;361:1641.
- Zyriax, B. C. & Windler, E. (2000) Dietary fat in the prevention of cardiovascular disease. A review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 355-365.
- Zyriax, B. C., Boeing, H. & Windler, E. (2005) Nutrition is a powerful independent risk factor for coronary heart disease in women[mdash]The CORA Study: a population-based case-control study. *Eur J Clin Nutr* 59: 1201-1207.

VII. ANEXO

**A1. ESTANCIA INVESTIGADORA EN
UNIVERSITY COLLEGE CORK**

1. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REALIZADO DURANTE LA ESTANCIA EN EL *DEPT. OF FOOD AND NUTRITIONAL SCIENCES* DE LA *UNIVERSITY COLLEGE CORK* EN IRLANDA

1.1. Título, coordinadores y duración del trabajo de investigación

- **Título del trabajo de investigación:** *Analysis of vitamin D and Parathyroid hormone status in the YOUNG SeafoodPLUS cohort of Iceland* (Análisis del estatus de vitamina D y hormona paratiroidea en la cohorte YOUNG SeafoodPLUS de Islandia)
- **Coordinadores:** Dra. Mairead Kiely y Dr. George Paschos.
- **Duración:** 1 Junio - 30 Septiembre 2005.

1.2. Objeto general de la estancia de investigación

La estancia de investigación tuvo por objeto colaborar en el estudio de intervención “*Project 1.2. Young: Health of young European families and fish consumption*”, que el *Department of Food and Nutritional Sciences* de la *University College Cork* (UCC) llevó a cabo en el marco del proyecto europeo *FP6 Seafoodplus*.

Debido a que la obesidad es uno de los temas de salud pública que actualmente más preocupa a la comunidad científica, el estudio de intervención se planteó y realizó en adultos con sobrepeso, con edades comprendidas entre los 20-40 años, de tres poblaciones europeas (Islandia, Irlanda y España). Su principal objetivo era determinar los efectos diferenciales del consumo de pescado (pescado graso, pescado blanco y aceite de pescado) en el contexto de una dieta de reducción de peso, rica en frutas y verduras, sobre la pérdida de peso y composición corporal, biomarcadores de la resistencia a la insulina, niveles de lípidos circulantes, estatus antioxidante, y biomarcadores del metabolismo óseo de los participantes.

La extensa experiencia del centro receptor en el diseño y dirección de estudios clínicos y nutricionales, así como en la coordinación de la Encuesta Alimentaria Nacional Irlandesa, hicieron del objeto de la estancia una valiosa oportunidad para reforzar y aumentar la formación de la doctorante en el análisis de muestras biológicas, en la búsqueda de biomarcadores del estado nutricional y en el tratamiento estadístico especializado.

1.3. Objetivos específicos del trabajo de investigación

Los objetivos específicos del trabajo de investigación fueron:

- Examinar el estatus de vitamina D (serum 25OHD) en jóvenes adultos durante los meses de invierno en los que la ingesta dietética y las reservas de vitamina D son más bajas, en la muestra de la población de Islandia (n = 115)
- Examinar los efectos del consumo de pescado en el estatus de vitamina D en la muestra de adultos jóvenes de la población de Islandia (n = 115)
- Examinar si la pérdida de peso afecta el estatus de vitamina D durante el periodo de intervención.
- Examinar la asociación entre el estatus de vitamina D y la hormona paratiroidea en la muestra anterior.

1.4. Antecedentes bibliográficos

Como se sabe, la vitamina D, reconocida como “la vitamina del sol” (Holick, 2005) hace referencia a un grupo de esteroides estrechamente relacionados entre sí (**Figura A1**). Una adecuada exposición solar es la mayor fuente de vitamina D para los humanos. Desafortunadamente, su aporte a través de la dieta es mucho menor debido al escaso número de alimentos que la contienen de forma natural, como el pescado graso (Holick, 2004). En la actualidad existen diversos suplementos y alimentos enriquecidos con vitamina D para paliar este déficit natural en los alimentos (Lipps, 2001; Tangpricha et al., 2003) pero en general, estos preparados contienen cantidades insuficientes o inadecuadas de vitamina D para producir los beneficios deseados (Zittermann, 2006).

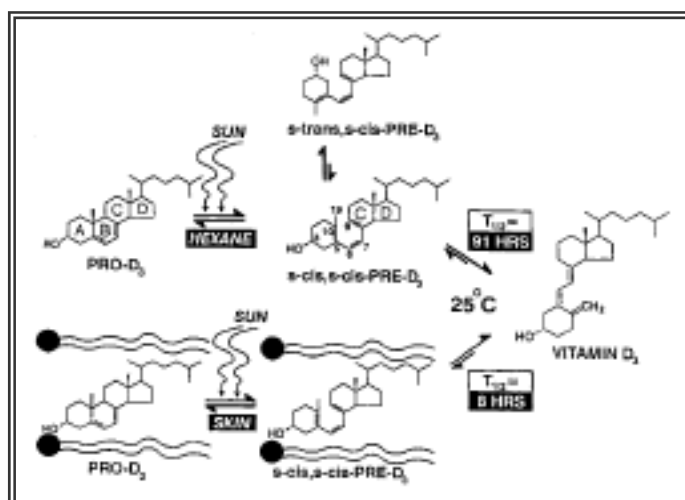


Figura A1. Estructuras químicas de la familia de la vitamina D
(figura adaptada de Holick 2003)

Durante la exposición solar de radiación UVB (290-315nm) el 7-dehidrocolesterol o ergosterol, que se halla en el interior de las capas epidérmicas de crecimiento activo (Holick et al., 1995) sufre la degradación fotolítica del anillo B para producir previtamina D₃, la cual se isomeriza a la forma más estable termodinámicamente, la vitamina D₃ o colecalciferol. La vitamina D₃, almacenada en el tejido adiposo, entra en el torrente circulatorio ligada a su proteína de unión (VDBP) y a la albúmina (Haddad et al., 1993). En el hígado, la vitamina D se hidroxila para formar 25-hidroxi-vitamina D (25-OH D) la cual también circula en forma de complejo con la VDBP. Una pequeña proporción de la 25-OH D sufre una hidroxilación adicional en el riñón, bajo regulación directa de la hormona paratiroidea y las concentraciones de ión calcio, para formar 1,25-dihidroxi-vitamina D (1,25-OH₂ D), una hormona calciotrópica biológicamente activa (Holick, 2004¹). La hidroxilación y metabolización ulteriores de la vitamina D producen compuestos hidrosolubles que son excretados en poco tiempo (Holick, 2003).

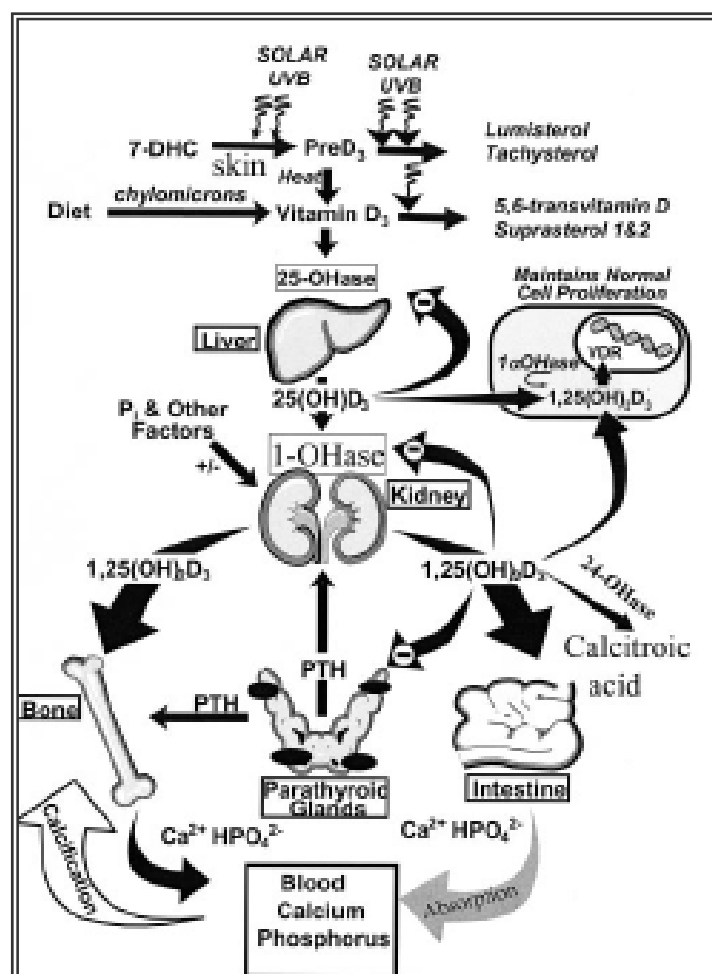


Figura A2.. Esquema de la producción cutánea de vitamina D y su metabolismo y regulación para la homeostasis del calcio y el crecimiento celular (figura adaptada de Holick 2003)

La 1,25-OH₂ D interacciona con su receptor nuclear (VDR), que a su vez se une con el receptor X del ácido retinoico. Este complejo es reconocido por secuencias genéticas específicas conocidas como los “*elementos receptivos de vitamina D*” (VDRE) para descifrar información genética responsable de sus acciones biológicas (Holick, 2005).

En el intestino, la 1,25-OH₂ D induce la expresión de un canal cálcico epitelial, la calbindina y una variedad de proteínas necesarias en el transporte del calcio de la dieta a la circulación (Bouillon 2001; Christakos et al., 2005). La 1,25-OH₂ D también interacciona con su VDR en los osteoblastos y estimula la expresión del activador receptor del ligando NFκβ (RANKL) similar a la hormona paratiroidea (Khosia, 2001). La 1,25-OH₂ D mantiene la homeostasis del calcio al aumentar la eficiencia de su absorción intestinal y al movilizar sus reservas del esqueleto. La PTH, la hipocalcemia y la hipofosfatemia son los mayores estimuladores de la producción renal de 1,25-OH₂ D (Portale et al., 1984). Es importante destacar que además de haberse identificado la VDR en el intestino delgado y en los osteoblastos, también se halla presente en casi todos los tejidos y células del organismo, incluyendo cerebro, corazón, piel, páncreas, pecho, colon y células inmunes (Holick, 2004²). La **Figura A2** muestra de forma esquemática la producción cutánea de vitamina D y su metabolismo y regulación para la homeostasis del calcio y el crecimiento celular.

Debido a que la actividad hepática de la vitamina D-25-hidroxilasa no está regulada estrechamente, cualquier cambio en la producción cutánea de vitamina D₃ o la ingesta de vitamina D (D₃ o D₂) tiene el efecto de alterar los niveles circulantes de 25-OH D (Reichel et al., 1989) por lo que la concentración sérica de 25-OH D está considerada como la medida más fiable para valorar el estado general de la vitamina D (Holick et al., 1996) siendo también de gran utilidad en el diagnóstico de pacientes con anomalías en las concentraciones séricas de calcio. La **Tabla A1** muestra la terminología sugerida para describir el estatus de vitamina D de acuerdo con las concentraciones circulantes de 25-OH D (Zittermann, 2006).

Tabla A1. Estatus de vitamina D de acuerdo con las concentraciones circulantes de 25-OH D (adaptada de Zittermann, 2006)

<i>Niveles del estatus de vitamina D</i>	<i>[25-OH D] (nmol/L)</i>	<i>Síntomas bioquímicos/clínicos</i>
Deficiencia	0-25	Hiperparatiroidismo severo, mala absorción de calcio, raquitismo, osteomalacia, miopatía
Insuficiencia	25-50.0	Niveles elevados de PTH, velocidad de absorción intestinal de calcio baja, densidad mineral ósea reducida, miopatía subclínica
Hipovitaminosis D	50-70 a 100	Bajas reservas de vitamina D en el organismo, niveles de PTH ligeramente elevados
Adecuado	70-100 a 250	Ninguna alteración de las funciones dependientes de la vitamina D
Toxicidad	>250	Hiperabsorción intestinal de calcio, hipercalcemia

En la actualidad, se sigue debatiendo la existencia de un “*umbral óptimo*” de vitamina D relacionado con un menor riesgo de diversas patologías (Heaney, 2005^a; Vieth, 2006). Entre los factores que afectan al estatus de vitamina D en el organismo humano cabe citar el envejecimiento (MacLaughlin et al., 1985; Salamote et al., 1993), la obesidad (Bell et al., 1985; Wortsman et al., 2000) así como cualquier factor que influya en el número de fotones UVB que penetran en la piel e influyan en la producción cutánea de la vitamina D₃ (Holick 2004¹) como son la estación del año, el momento del día, la latitud (Webb et al., 1988), el uso de protector solar (Shao et al., 1992) o la pigmentación aumentada de la piel (Kyriakidou-Himonas et al., 1999; Holick, 2004). Por su parte, los problemas de hipovitaminosis D, que en un principio se creían característicos de sectores de la población con alto riesgo, como la infancia y la tercera edad (Chel et al., 1998; Chuck et al., 2001) parecen estar también presentes en otros grupos de la población (Jones y Dwyer, 1998). Así mismo, la deficiencia de vitamina D no sólo causa un deterioro metabólico óseo entre niños y adultos, sino que puede contribuir a aumentar el riesgo de diversas enfermedades crónicas comunes (Holick, 2004²; Holick 2005).

1.5. Diseño del estudio

El diseño del estudio se basó en cuatro grupos de intervención: un primer grupo control, al que se les suministró aceite de girasol (grupo 1), el grupo de pescado blanco, al que se le suministró bacalao (grupo 2), el grupo de pescado azul, al que se le suministró salmón (grupo 3) y un grupo de aceite de pescado, al que se le suministró un suplemento de EPA y DHA en forma de cápsulas. La duración del estudio fue de ocho semanas. El número de individuos procedentes de la cohorte islandesa fue de 115 participantes. Se priorizó el análisis de la muestra islandesa frente a la irlandesa y española, debido a que Islandia era el país con una menor exposición solar durante invierno en comparación con los otros dos países participantes en el estudio.

1.6. Metodología experimental

Para la determinación del estatus de vitamina D en las muestras de suero de los individuos participantes en el estudio se utilizó un método de inmunoensayo enzimático destinado a la cuantificación de 25-OH-Vitamina D y otros metabolitos hidroxilados. Los parámetros de validación de los kits utilizados, “OCTEIA 25-Hydroxy Vitamin D” de Immunodiagnostic Systems Limited (Londres, UK), fueron: 9.3-151.2 nmol/L (intervalo óptimo de trabajo), 0,5 nmol/L (sensibilidad), 5.3-6.7% CV (intra-precisión), 4.6-8.7% (inter-precisión), 101% (recuperación), 75-100% (especificidad). El anticuerpo utilizado fue de tipo policlonal 25-OH Vitamina D de cordero de alta especificidad.

La determinación de la concentración de PTH en el suero humano de los voluntarios se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimométrico de doble anticuerpo. Los kits utilizados, “IEMA OCTEIA Intact PTH” de Immunodiagnostic Systems Limited (Londres, UK), presentaron los siguientes parámetros de validación: <0.7-38 pmol/L (intervalo óptimo de trabajo), 0.06 pmol/L (sensibilidad), 3.2-4.4 % CV (intra-precisión), 4.7-6.0% (inter-precisión), 100% (recuperación), 100% (especificidad). Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo monoclonal frente a los fragmentos N-terminal (anti-PTH 1-34) de ratón específico (anticuerpo en fase sólida o de captura) y anticuerpo monoclonal de cabra anti-PTH (39-84) purificado por afinidad y unido a la enzima peroxidasa.

Para cada uno de los 115 participantes, se analizaron dos muestras por duplicado de suero, una perteneciente al inicio del estudio (*baseline*) y otra perteneciente al final del estudio (*endpoint*) siendo el número total de muestras de suero analizadas de $n = 460$. Paralelamente y en todas las determinaciones, se llevaron a cabo análisis de muestras patrón y muestras de referencia.

El análisis estadístico se realizó mediante el software estadístico SPSS versión 12 (SPSS, Chicago, IL). La normalidad de las variables se examinó con el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Mediante ANOVA multifactorial se determinaron diferencias entre los valores de vitamina D y PTH al inicio y al final del estudio en cada uno de los grupos de intervención. Se utilizaron dos modelos de regresión lineal generales de medidas repetidas (MLG-MR), sin y con clasificación de los datos por la variable de mes de entrada. Como factor intra-sujeto se seleccionó los niveles séricos de 25-OHD, como factor inter-sujeto se seleccionó el grupo de intervención. Las covariables seleccionadas fueron: pérdida de peso (peso final-peso inicial), IMC al final de la intervención, edad y sexo. En el segundo modelo se añadió la covariable de vitamina D al inicio del estudio.

1.7. Resultados

La **Tabla A2** muestra los niveles séricos de 25-OH Vitamina D de los participantes islandeses al inicio y al final del periodo de intervención. Las ANOVAS mostraron diferencias significativas entre los niveles séricos de 25OHD al final del estudio en función del grupo de intervención ($p < 0.0001$), siendo el grupo de pescado azul el que presentaba mayores niveles de vitamina D. No se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles iniciales de 25OHD ni la diferencia ($\text{Vit D}_{\text{final}} - \text{Vit D}_{\text{inicial}}$) en función del grupo de intervención.

Tabla A2. Niveles séricos de 25-OH D de los participantes islandeses (n = 115)

<i>Grupo de intervención</i>	<i>n</i>	<i>[25-OH D] (nmol/L)</i>	
		<i>Inicio</i>	<i>Final</i>
1. Control	28	39,9 ± 12,9	35,2 ± 12,3
2. P. blanco	27	53,7 ± 22,0	48,4 ± 19,1
3. P. azul	31	54,3 ± 18,0	61,9 ± 18,5
4. Cápsulas	29	47,5 ± 15,5	51,3 ± 15,3

Los niveles séricos de PTH se presentan en la **Tabla A3**. El test t de muestras pareadas no mostró diferencias significativas en el contenido de PTH antes y después de la intervención.

Tabla A3. Niveles séricos de PTH de los participantes islandeses ($n = 115$)

Grupo de intervención	n	[PTH] (pmol/L)			
		Inicio		Final	
1. Control	28	2.8	± 0.9	2.8	± 0.8
2. P. blanco	27	2.7	± 0.7	2.7	± 0.9
3. P. azul	31	2.7	± 1.2	2.4	± 0.9
4. Cápsulas	29	2.8	± 1.3	3.1	± 1.4

El análisis mediante MLG de medidas repetidas permitió observar un efecto significativo en los contenidos finales de vitamina D determinados del mes de entrada en el que comenzaron la intervención los participantes islandeses ($p < 0.002$), pero no de la pérdida de peso que comportó las ocho semanas de intervención ($p > 0.05$).

La **Figura A3** muestra los niveles séricos de 25OH significativamente diferentes al inicio y final de la intervención en función de los dos meses en los que los individuos islandeses comenzaron el estudio (octubre y enero).

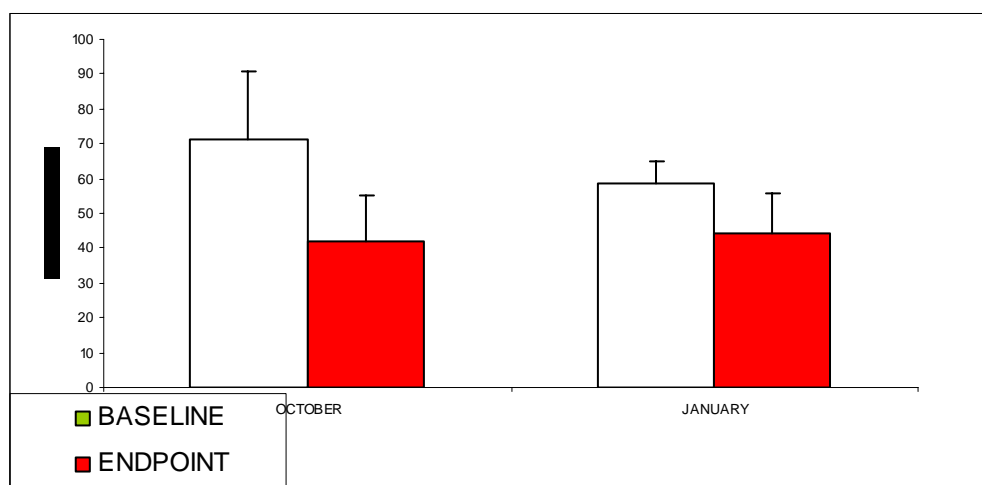


Figura A3. Niveles séricos de 25 OHD (nmol/L) al inicio y al final del estudio en función del mes de entrada para los individuos islandeses ($n=115$)

Los niveles de vitamina D para los grupos de intervención control y pescado azul para los individuos que comenzaron el estudio en el mes de octubre (**Figura A4**) muestran un aumento no significativo en ambos grupos.

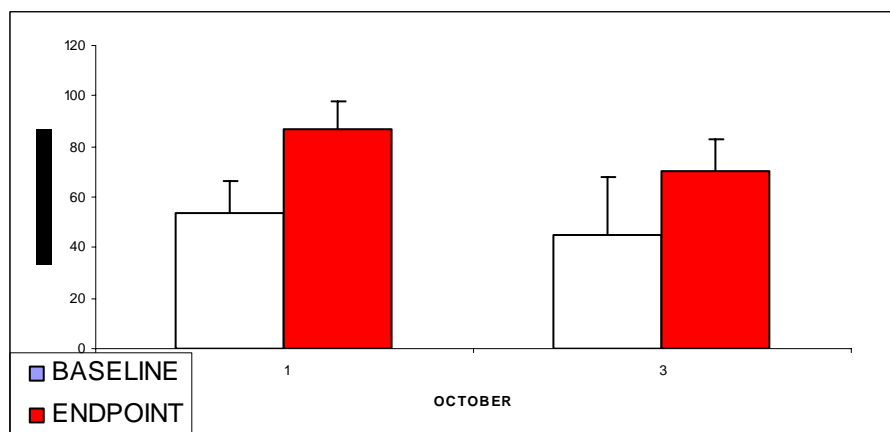


Figura A4. Niveles séricos de 25 OHD (nmol/L) de los grupos de intervención 1 y 3 al inicio y al final de la intervención para los islandeses que entraron el mes de octubre en el estudio.

Los datos obtenidos de vitamina D para todos los grupos de intervención en los individuos que comenzaron el estudio en enero (**Figura A5**) muestran un incremento significativo al final del estudio en el grupo de pescado azul y el grupo de cápsulas de EPA y DHA.

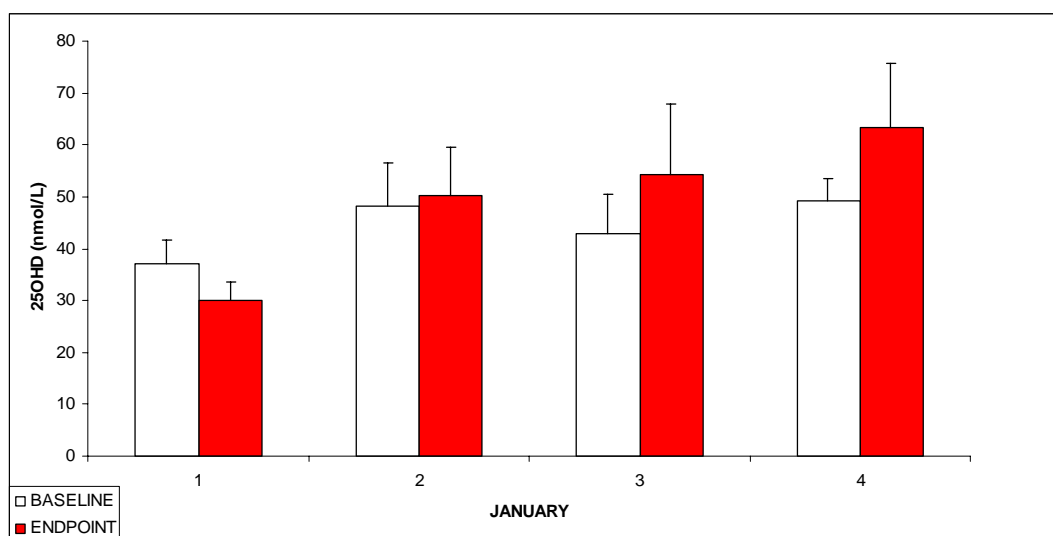


Figura A5. Niveles séricos de 25 OHD (nmol/L) de todos los grupos al inicio y al final de la intervención para los individuos islandeses que entraron el mes de enero en el estudio.

1.8. Discusión y conclusiones

La muestra de adultos jóvenes islandeses del estudio de intervención presentó unos niveles de vitamina D basales que según las recomendaciones internacionales se hallan en niveles inferiores a los deseados (Zittermann, 2006) en las categorías de insuficiencia e hipovitaminosis D.

El estatus de vitamina D alcanza su punto más bajo durante los meses de invierno y su nivel más alto a finales del verano. Este hecho se ha visto confirmado por los resultados obtenidos en la intervención islandesa. Así, el grupo control de la población que comenzó el estudio en octubre presentó niveles de vitamina D basales superiores a los observados en los individuos que comenzaron el estudio en enero. Así mismo, el hecho que la vitamina D esté inversamente relacionada con los niveles de hormona paratiroidea comporta implicaciones para la variación estacional en la actividad ósea del organismo.

La aplicación de modelos generales lineales de muestras repetidas señalaron que no hubo cambio significativo en los niveles séricos de vitamina D y de PTH en ninguno de los cuatro grupos de intervención. Si bien se observó una tendencia de reducción de los niveles de vitamina D en todos los grupos excepto en el del pescado azul. Sin embargo, es importante destacar que tras seccionar la muestra de individuos en función del mes de inicio de la intervención, los niveles del cambio de vitamina D mostraron estar claramente determinados por dicha variable. Los individuos que comenzaron el estudio en octubre (finales de verano) no presentaron diferencias significativas en sus niveles séricos de vitamina D. En cambio, entre los que comenzaron la intervención en invierno, los participantes asignados al grupo de pescado azul fueron, junto al grupo suplementado con cápsulas de EPA y DHA, mostraron un aumento significativo en sus niveles séricos de 25OHD.

Por otra parte, la diferencia de peso entre el final y el inicio de la intervención no se mostró como una variable significativa en relación a los contenidos séricos de vitamina D y de hormona paratiroidea.

Así, se puede concluir que el grupo de pescado azul mostró un efecto diferencial en el cambio de vitamina D durante las ocho semanas de duración del estudio en aquellos participantes que empezaron la intervención en el mes de octubre.

Los resultados de la estancia breve investigadora en la UCC fueron incorporados a la base del proyecto YOUNG y forman parte de la publicación resultante de los datos de vitamina D de las tres cohortes participantes en el estudio (S.Muldowney, A.Lucey, G.Paschos, A.Martínez, I.Thorsdottir, **I.Bondia-Pons**, KD.Cashman, M.Kiely. *Wintertime vitamin D status in young adult aged 20-40 years from Iceland, Spain and Ireland. Data from SEAFOODplus YOUNG project*”).

**A2. COMUNICACIONES DURANTE
LA ETAPA DE DOCTORADO**

COMUNICACIONES CIENTÍFICAS DURANTE LA ETAPA DE DOCTORADO

POSTER COMMUNICATIONS:

- 1) VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. Vigo (Spain) November 2006. **“Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by gas chromatography”**. Authors: I.Bondia, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater.
- 2) Fats and Health-Update on Dietary Phytosterols, Trans-fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids Congress. Frankfurt (Germany) October 2006. **“Comparison of the plasma fatty acid profile in obese type 2 diabetics and obese and healthy individuals”**. Authors: I.Bondia, O.Sancho, C. Molto, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater;
- 3) 4th Euro Fed Lipid Congress: Oils, Fats and Lipids for a Healthier Future. Madrid (Spain) October 2006. **“Determination of Conjugated Linoleic Acid Status by Gas Chromatography in a Sample of the Catalan Population”**. Authors: I.Bondia, C.Molto, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.
- 4) I World Congress of Public Health Nutrition and VII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Barcelona (Spain) September 2006. **“Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Catalan population”**. Authors: I.Bondia, L. Serra-Majem, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.
- 5) 11^a Jornadas de Análisis Instrumental (JAI). Barcelona (Spain) November 2005. **“Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by SPE and fast-GC”**. Authors: I.Bondia, S. Morera, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.
- 6) 3rd Euro Fed Lipid Congress and Expo: Oils, Fats and Lipids in a Changing World. Edinburgh (UK) September 2004. **“Determination of the Fatty Acid Content by Fast Gas Chromatography in a Sample of the Catalan Population”**. Authors: I.Bondia, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.
- 7) 3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. 3rd Waste Water Cluster European Workshop. Almería (Spain) November 2003. **“Comparison of Conventional and Fast Gas Chromatography in Plasma Fatty Acid Determination”**. Authors: I. Bondia , A.I. Castellote, M.C.López- Sabater

ORAL COMMUNICATION:

3rd YOUNG PROJECT meeting, **"Vitamin D and PTH results in the YOUNG SeafoodPLUS Cohort"** by I. Bondia-Pons. University College Cork, Cork (Ireland), 31 August 2005.

DETERMINATION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID IN HUMAN PLASMA BY GAS CHROMATOGRAPHY

Isabel Bondia-Pons; Ana I. Castellote; M. Carmen López-Sabater

Dept. of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain. e-mail: aicastellote@ub.edu

CONJUGATED LINOLEIC ACID BACKGROUND

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term for a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid (18:2n-6) in which the two double bonds are conjugated. CLA is found in the meat, milk and milk products of ruminant animals (Pariza et al., 2000).

Some animals studies suggest health benefits of cis-9, trans-11 CLA, including anticarcinogenic (Lock et al., 2004) and antiatherogenic (Kritchevsky et al., 2004) effects and improvements in blood lipid concentrations (Nicolosi et al., 1997), although most of these are unequivocally supported by consistent data from human studies (Wahle et al., 2004). This appears to be largely due to differences in the isomer blends used and biological effects of specific CLA isomers (Tricon et al., 2006).

Human studies have examined the effects of CLA supplementation on plasma lipid concentrations, being the main objective of these studies to examine the antiobesity effects of CLA (Smedman and Vessby, 2001).

The cis-9, trans-11 CLA isomer is the principal dietary form of CLA, accounting for as much as 85-90% of the total CLA content in dairy products (Lock et al., 2004). However the contribution of CLA to the human diet is relatively small (Lawson et al., 2001) and some authors have therefore proposed to enrich food products, mainly dairy products, to naturally increase the CLA contents in the human diet (Tricot et al., 2006). Nowadays, CLA world population data widely vary from negligible contents to even 1500 mg/day. This fact justifies the need of having available data of the CLA status in different populations to take as reference to establish future CLA recommendations for the human health benefits.

Therefore, specific, accurate and time-saving methods for the determination of the main CLA isomers are required for routine analysis of CLA contents in human plasma samples to be used in nutritional and clinical studies.

OBJECTIVE OF THE WORK

Our objective was to develop and validate a specific, accurate and time- and solvent-saving method for the determination of the main CLA isomers (cis-9, trans-11 CLA and trans-10, cis-12 CLA) by GC-FID in human plasma, which can be used in routine analysis.



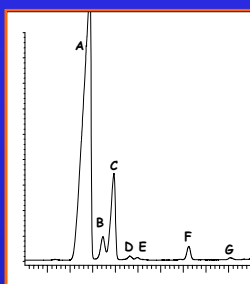
MAIN POINTS TO TAKE INTO ACCOUNT WHEN DEVELOPING A METHOD FOR CLA DETERMINATION

Due to the characteristic isomerisation processes involved in the CLA analysis, the selection of the methylation reactant, as well as the temperature and time of reaction, must be controlled in the methylation and esterification steps in order to avoid non desirable isomerisation and oxidative artefacts (Park et al., 2001; de la Fuente et al., 2006).

Therefore both acid-catalyzed and basic methylations, using different reactants at different temperatures and times of reaction were previously tested in standard CLA solutions (> 98% purity of both major CLA isomers), cow milk, animal and human plasma samples.

METHODOLOGY AND OBTAINED RESULTS

Main CLA isomers (sample: raw material mixture)



- A: CLA 911ct
- B: CLA 1113ct
- C: CLA 1012tc
- D: CLA 911cc
- E: CLA 1012cc
- F: CLA tt
- G: CLA oxid.

Final methodology conditions

PREPARATION OF THE SAMPLE

100 µL PLASMA
 Add 10 µl S.I. (13:0; 10 mg/ml)
 Saponificate with 2.5 ml NaOH/MeOH (0.5 M) at 80°C, 10 min
 Cooling down to room temperature
 Esterificate with 2.5 ml BF₃/MeOH 20% w/v at 80°C, 30 min
 Cooling down to room temperature
 Isolate the organic phase with 300 µL hexane; 1 min Vortex
 1 mL NaCl_{sat}; 30 s Vortex
 Centrifugation 8 min, 3000 rpm
 Remove water traces by adding anhydrous Na₂SO₄
 Transfer 100 µl of the organic phase to a GC-vial adapted with insert
 Concentrate by evaporating to dryness under N₂ and redissolving in 50 µl of hexane

ANALYSIS BY GC-FID

HP-68090 Series GC System
 Rtx-2330 column (40 m x 0.18 mm i.d. x 0.1 µm film thickness)
 Temperature program: 140°C at 20°C/min to 170°C (20 min) at 10°C/min to 230°C (5 min)
 Lineal velocity = 27,5 cm/s; Split ratio: 1/30; Volume of injection: 1 µl
 T(injector) = 250°C; T(detector) = 270°C

Optimization steps

Sample volume tests:
 50, 100, 150, 200 µl plasma

Saponification tests:

ACID: HCl/MeOH 1.25 M (12% of non desirable isomerisation of the main isomers to tt-CLA and 10% of oxidative artefacts)

BASIC: NaOH/MeOH 0.5 M (tests carried out with methanolic sodium hydroxide solution as well as with methanolic sodium methoxide solution) (Free fatty acids were not derivatized by alkoxyde catalyst)

BASIC+ACID CATALYSIS: NaOH/MeOH + BF₃/MeOH (20% w/v) (tests carried out with methanolic sodium hydroxide solution as well as with methanolic sodium methoxide solution, followed by the BF₃ solution)

Temperature and time of reaction:

Room T, 30 min (no total derivatization accomplished)

80°C, 10 min

80°C, 30 min (the longer the time, the higher the amount of non-desirable isomerization)

80°C, 60 min

80°C, 10 min + 80°C, 3 min

Concentration tests:

No concentration (problems to detect the CLA isomers when they are in very low amounts in the human plasma)

Concentrating 1/4 and 1/2

Precision

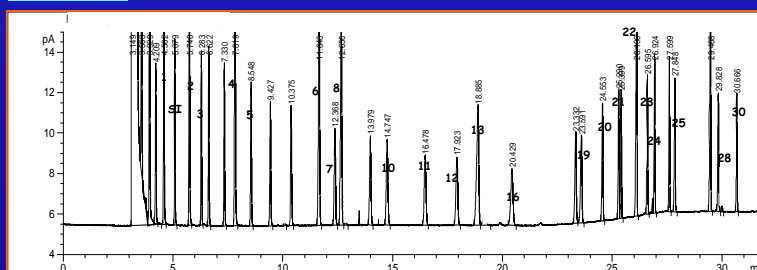
Intra-assay

Inter-assay

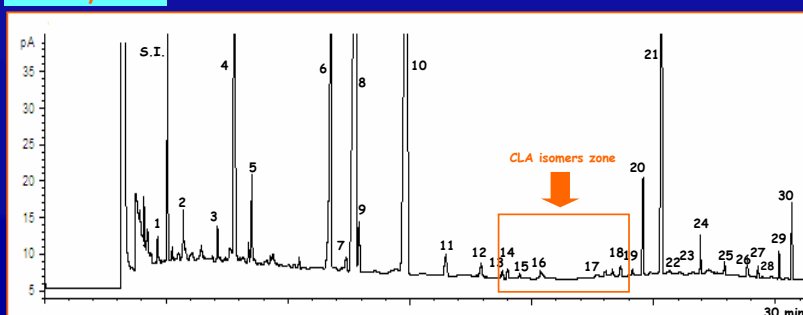
FATTY ACID	MEAN (%)	SD	CV (%)	MEAN (%)	SD	CV (%)
1.12:0	0.57	0.06	9.8	0.39	0.10	10.4
2.14:0	5.02	0.22	4.4	4.99	0.24	4.8
3.14:1	2.95	0.23	7.8	2.89	0.25	8.2
4.16:0	20.37	0.42	2.1	20.50	0.44	2.4
5.16:1	2.94	0.22	7.4	3.00	0.28	7.9
6.18:0	7.67	0.31	4.0	8.11	0.35	4.8
7.18:1trans	0.41	0.02	4.5	0.21	0.06	5.1
8.18:1cis n-9	21.62	0.62	2.9	22.01	0.68	3.1
9.18:1cis n-7	1.26	0.04	2.8	1.10	0.08	3.0
10.18:2cis n-6	23.62	0.46	2.0	23.77	0.55	2.5
11.18:3 n-6	0.58	0.01	2.6	0.50	0.03	2.9
12.18:3 n-3	0.32	0.01	4.1	0.34	0.04	4.8
13.20:0	0.13	0.01	7.3	0.23	0.03	7.8
14 cis-9, trans-11 CLA	0.22	0.07	6.9	0.16	0.08	7.2
15 trans-10, cis-12 CLA	0.12	0.02	8.2	0.09	0.03	8.8
16.20:1 n-9	0.31	0.02	8.3	0.27	0.04	8.7
17.11 CLA	0.06	0.01	8.0	0.08	0.01	8.6
18 oxid. CLA	0.22	0.04	8.8	0.15	0.05	8.8
19.20:2 n-6	0.32	0.03	9.0	0.28	0.06	9.6
20.20:3n-6	1.80	0.04	2.5	1.74	0.07	2.7
21.20:4 n-6	6.50	0.11	1.7	6.33	0.13	2.4
22.22:0	0.06	0.00	6.2	0.06	0.00	6.8
23.22:1	0.15	0.01	6.3	0.21	0.03	6.9
24.22:2	0.50	0.02	3.8	0.45	0.04	4.8
25.20:5n-3	0.13	0.00	0.0	0.04	0.00	0.0
26.22:4 n-6	0.42	0.03	7.5	0.32	0.04	7.8
27.22:5 n-6	0.32	0.03	9.3	0.41	0.05	9.9
28.24:1	0.18	0.02	8.8	0.21	0.03	9.3
29.22:5 n-3	0.40	0.02	3.9	0.33	0.04	4.7
30.22:6n-3	1.03	0.02	2.4	0.88	0.05	2.8

(n = 10) (n = 7)

FAME 37



Human plasma



COMPARISON OF THE PLASMA FATTY ACID PROFILE IN OBESE TYPE 2 DIABETICS AND OBESE AND HEALTHY INDIVIDUALS

Isabel Bondia-Pons*, Olga Sancho, Carolina Moltó, Ana.I.Castellote, M.Carmen López-Sabater

Dept. of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona
Av.Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain. *e-mail: ibondia@ub.edu

WHAT IS ALREADY KNOWN?

The number of people diagnosed with diabetes is growing rapidly worldwide and has reached epidemic status [1]. It is expected that the number of individuals with diabetes will rise to 221 million by the year 2010 and to 300 million by the year 2025 [2]. Of these cases, type 2 diabetes is the most prevalent in both developing and developed countries, and it has been associated with changes in human lifestyle over the last century (like physical inactivity, poor nutrition, and obesity) [3].

Type 2 diabetes is characterized by impaired insulin action (insulin resistance), by impaired β cell function or insulin secretion, or by both [3]. In genetically predisposed people type 2 diabetes arises with progressive obesity, especially visceral adiposity [4]. The close association between the epidemic of obesity and the development of insulin resistance and type 2 diabetes ("diabesity") has highlighted the key role of adiposity in the pathogenesis of these disorders [5].

On the one hand, plasma phospholipid fatty acids (PPL-FA) have been related to incident diabetes [6] and insulin-related phenomena such as fasting insulin levels, meal-induced increase in insulinemia, insulin secretion and so on in healthy, obese and diabetic individuals [7]. Nevertheless, only a few studies have compared the PPL-FA composition in type 2 diabetics with that of controls [4,8,9].

On the other hand, it is speculated on the basis of reported findings of some studies, that conjugated linoleic acid (CLA) could serve as a novel therapeutic approach for the prevention or treatment of type 2 diabetes and metabolic syndrome [10,11]. In addition, Bokry et al. observed a correlation between CLA concentration and degree of body weight loss as well as serum leptin (a hormone that plays a key role in body fat regulation) in patients with type 2 diabetes [12].

WHAT DID WE HYPOTHEZIZE?

> The deviations of the FA pattern on plasma phospholipids in type 2 diabetes are attributed to obesity rather than to diabetes itself.
> The 9cis,11trans linoleic acid concentration in plasma is higher in healthy lean subjects than in obese subjects, independently of their diabetic condition.

WHAT WAS THEN THE AIM OF THIS STUDY?

> To assess the combined effect of type 2 diabetes and obesity on the FA composition of plasma PPL and on the 9cis,11trans-linoleic acid plasma concentration

HOW WAS THE STUDY DESIGN AND THE EXPERIMENTAL CARRIED OUT?

3 groups of Spanish volunteers (n = 75; 40 men, 35 women)

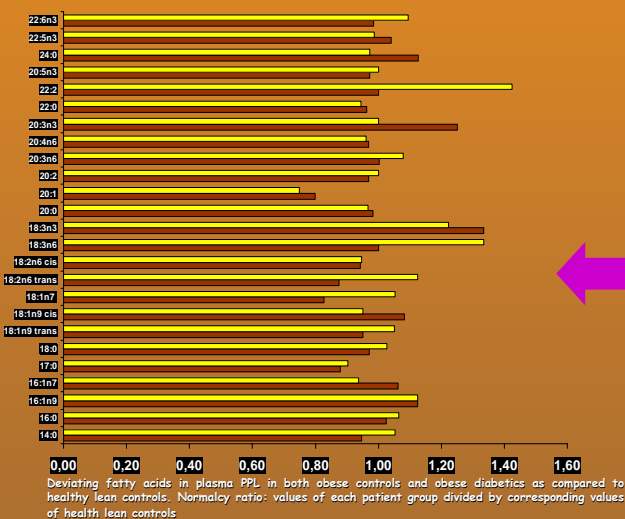
- OBESE CONTROLS (n = 27)
- OBESE TYPE 2 DIABETICS (n = 23)
- HEALTHY LEAN CONTROLS (n = 25)

- Analysis of the PPL-FA profile by fast-GC-FID [13]
- Analysis of the plasma CLA concentration by a modified method from Kramer et al. [14].

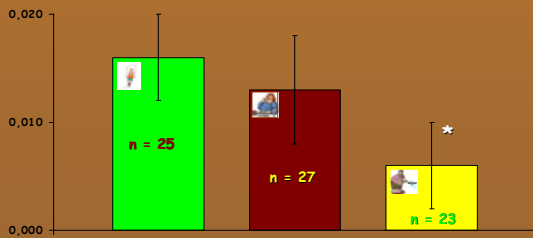
The separation was carried out by GC-FID on a Rtx-2330 column (40 m x 0.18 mm i.d. x 0.1 μ m film thickness). Internal normalization (19:0 as S.I.) was used for the quantification of the 9c, 11t-linoleic isomer

Parameter	HEALTHY LEAN CONTROLS	OBESE CONTROLS	OBESE DIABETICS
Age (years)	53.96 \pm 10.10	53.89 \pm 10.25	64.14 \pm 9.35 ^f
BMI (kg/m ²)	22.61 \pm 1.36 ^a	30.00 \pm 2.86	30.59 \pm 3.12
Glucose (mmol/l)	5.23 \pm 1.15 ^a	6.73 \pm 2.50 ^b	7.48 \pm 2.15 ^c
Fasting insulin (mU/l)	8.96 \pm 2.17 ^a	13.47 \pm 6.69 ^b	15.54 \pm 9.79 ^c
Insulin resistance index (nU/mmol/l)	1.71 \pm 1.25 ^a	2.20 \pm 1.54 ^b	3.21 \pm 1.24 ^c

Anthropometrical and biochemical characteristics of the volunteers (n=75); *** P<0.001.



Deviating fatty acids in plasma PPL in both obese controls and obese diabetics as compared to healthy lean controls. Normalizing ratio: values of each patient group divided by corresponding values of healthy lean controls



Plasma 9cis,11trans-linoleic acid concentration for the 3 volunteers groups (n=75); *P < 0.001 (adjusted by age, sex, and daily dairy products and ruminant meat intake)

WHAT DID WE FIND?

Fatty Acid	Healthy lean controls n = 25	Obese controls n = 27	Obese diabetics n = 23
14:0	0.38 \pm 0.15	0.36 \pm 0.14	0.40 \pm 0.11
16:0	28.22 \pm 1.38 ^a	28.94 \pm 1.37	30.02 \pm 1.39
16:1n9	0.16 \pm 0.07	0.18 \pm 0.10	0.18 \pm 0.10
16:1n7	0.32 \pm 0.12	0.34 \pm 0.13	0.30 \pm 0.09
17:0	0.41 \pm 0.05	0.36 \pm 0.06	0.37 \pm 0.07
18:0	13.60 \pm 1.29	13.20 \pm 0.86	13.96 \pm 1.26
18:1n9t	0.20 \pm 0.14	0.19 \pm 0.14	0.21 \pm 0.17
18:1n9c	11.95 \pm 1.80	11.96 \pm 1.83	10.50 \pm 2.00 ^a
18:1n7	1.15 \pm 0.23	0.95 \pm 0.31	1.21 \pm 0.23
18:2n6t	0.08 \pm 0.03	0.07 \pm 0.02	0.09 \pm 0.04
18:2n6c	20.77 \pm 2.54 ^a	19.60 \pm 2.85	19.66 \pm 2.15
18:3n6	0.06 \pm 0.04	0.06 \pm 0.04	0.08 \pm 0.03
18:3n3	0.09 \pm 0.04	0.12 \pm 0.03	0.11 \pm 0.05
20:0	0.59 \pm 0.08	0.58 \pm 0.11	0.57 \pm 0.09
20:1	0.20 \pm 0.08	0.16 \pm 0.08	0.15 \pm 0.08
20:2n6	0.32 \pm 0.12	0.31 \pm 0.09	0.32 \pm 0.11
20:3n6	2.83 \pm 0.55	2.84 \pm 0.70	3.05 \pm 0.65
20:4n6	9.57 \pm 1.52 ^a	8.89 \pm 1.51	8.81 \pm 1.51
20:3n3	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02
22:0	1.65 \pm 0.34	1.59 \pm 0.35	1.56 \pm 0.37
22:2	0.80 \pm 0.09	0.80 \pm 0.09	1.14 \pm 0.09 ^a
22:5n3	0.72 \pm 0.11	0.70 \pm 0.11	0.72 \pm 0.12
24:0	1.51 \pm 0.57	1.70 \pm 0.55 ^a	1.47 \pm 0.57
22:5n3	0.72 \pm 0.21	0.75 \pm 0.20	0.71 \pm 0.24
22:6n3	4.02 \pm 0.92	3.96 \pm 0.93	4.40 \pm 0.98

Plasma phospholipid fatty acids from the 3 volunteers groups (n=75)

^aP < 0.001

REFERENCES THAT WERE CONSULTED

1. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. Diabet Med 1997;14:51-585.
2. Zimmet P. Trends in Cardiovascular Medicine 2002;12:354-62.
3. Aminot-Gilchrist DV, Anderson HD. Am J Clin Nutr 2004;79:1159-511-63.
4. Rodriguez Y, Giri M, et al. Prostagl. Leukotr Essent Fatty Acids 2004;71:303-8.
5. Kirpichnikov D, Sowers JR. Trends in Endocrinology and Metabolism 2001;12:225-30.
6. Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH. Am J Clin Nutr 2003;78:91-8.
7. Lovejoy JC, Champagne GM, Smith SR, et al. Metabolism 2001;50:86-92.
8. Das UN. Prostagl. Leukotr Essent Fatty Acids 1995;52:387-91.
9. Seigneun M, Freyburger G, Gin H, et al. Diabetes Res Clin Pract 1994;23:169-77.
10. Ryden JW, Portocarrero GP, Song XM, et al. Diabetes 2001;50:1149-57.
11. Evans ME, Brown JM, McIntosh MK. J. Nutr. Bioch. 2002;13:508-16.
12. Bellury MA, Mahon A, Banni S. J Nutr 2003;133:2575-260.
13. Bondia-Pons I, Monera S, Castellote AI, López-Sabater MC. J. Chr. A. 2006;1116:204-8.
14. Kramer J, Fellner V, Dugan M, et al. Lipids 1997; 32(11):1219-27.

WHAT WERE THEN OUR CONCLUSIONS?

- > There were significant differences in the PPL-FA plasma composition for some fatty acids according to the group.
- ✓ Obese controls and obese diabetics had higher levels of 16:0 and lower levels of 18:2n6 and 20:4n6 than **lean healthy controls**
- ✓ Obese diabetics had lower 18:1n9cis and higher 22:2n6 levels than the other two groups of volunteers
- > Obese diabetics showed significant lower 9cis,11trans-linoleic acid concentration in plasma than did **obese controls** and **lean healthy controls**

OUR SINCERE ACKNOWLEDGEMENT TO...

The authors are grateful to the 75 volunteers and to the Public Health Division of the Dept. of Health of the Generalitat of Catalonia for providing the blood samples for the study.

Many thanks to Mercadona S.A. and the Catalan Nutrition Center of the Catalan Studies Institute for funding this study and to the Ministry of Education and Science for the F.P.U. PhD-grant to Isabel Bondia-Pons.

DETERMINATION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID STATUS BY GAS CHROMATOGRAPHY IN A SAMPLE OF THE CATALAN POPULATION



Isabel Bondia-Pons*, Carolina Moltó; Ana.I.Castellote; M.Carmen López-Sabater

Dept. of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av.Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain. *e-mail: ibondia@ub.edu

Introduction

The determination of the main isomer of the conjugated linoleic acid (*cis-9, trans-11-CLA*) in human plasma has become of interest in human health due to its beneficial effects observed in several clinical studies carried out in animals and humans.

CLA properties such as its anti-carcinogenic, immunologic and anti-obesity effects justify the necessity of having available data of the CLA status in different populations.

Nowadays, CLA world population data widely vary from negligible contents to even 1500 mg/day. As far as the authors know, there are no current available data about the plasma CLA content in healthy adults from Mediterranean populations like Spain.

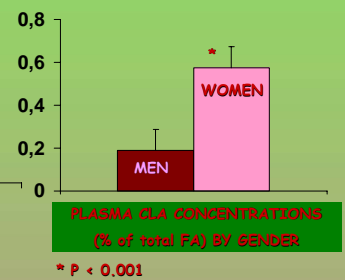
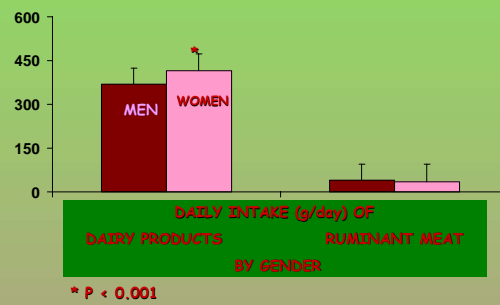
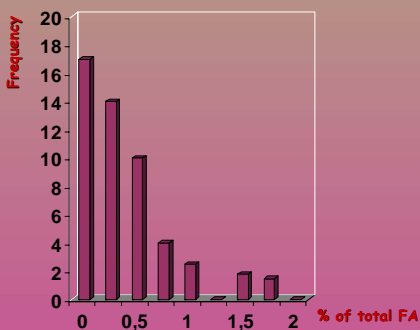
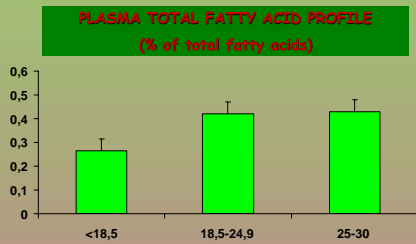
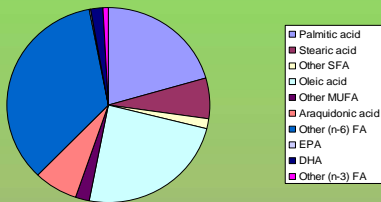
Aims of the study

- To evaluate the *cis-9, trans-11 CLA* isomer plasma levels of a representative sample of healthy subjects recruited for an institutional healthy survey in Catalonia, a Spanish Mediterranean region (n= 68; 18-66 y)
- To correlate the *cis-9, trans-11 CLA* isomer plasma CLA concentration with the intake of dairy products and ruminant meat

Methodology

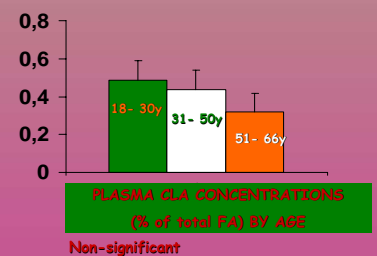
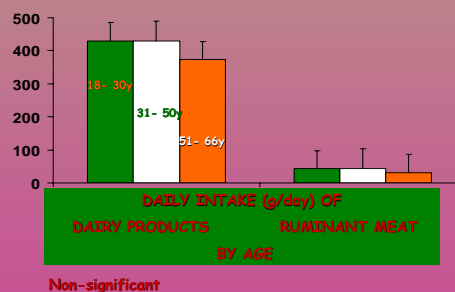
- Cross-sectional nutrition survey carried out in 2002-03
- Dietary habits assessed by means of 24-hour recall during 2 non-consecutive days and a FFQ referring to 92 food items
- Laboratory measurements:
 - Analysis of serum lipids by standardized enzymatic methods
 - Analysis of the FA profile by fast-GC-FID
 - Analysis of the plasma CLA concentration by acid methylation and conversion to its FAME, separation carried out by GC-FID on a Rtx-2330 column (40 m x 0.18 mm i.d. x 0.1 µm film thickness). Internal normalization (19:0 as S.I.) was used for the quantification of the CLA isomer.

Results



FOOD/ FOOD GROUP	r	Significance
Dairy products	0.28	P < 0.05
Milk	0.30	P < 0.05
Yoghurt	0.10	N.S.
Cheese	0.25	P < 0.05
Ruminant meat	0.35	P < 0.05

PEARSON CORRELATION OF PLASMA CLA CONCENTRATIONS AND FOOD GROUPS (adjusted by sex and age)



Conclusions

- The median daily dairy products and ruminant intake was 390±37,5g and 40±28,5g in the Catalan sample
- The median plasma CLA concentration in the Catalan sample was 0,41 % of total FA
- Women had higher plasma CLA concentrations than men. Women consumed more dairy products than men
- There were no significant differences in the plasma CLA concentrations according to the age of the participants
- Plasma CLA concentrations were positively correlated to the daily dairy products and ruminant meat intake in the participants under study

Acknowledgements

The authors are grateful to the Public Health Division of the Dept. of Health of the Generalitat of Catalonia for providing the blood samples for the study.

Many thanks to Mercadona S.A. and the Catalan Nutrition Center of the Catalan Studies Institute for funding this study.

Special thanks to the Ministry of Education and Science for the F.P.U. PhD-grant to Isabel Bondia-Pons.

LONG-CHAIN n-3 FATTY ACIDS AND CARDIOVASCULAR DISEASE RISK FACTORS AMONG THE CATALAN POPULATION



Isabel Bondia-Pons^{1*}; Lluís Serra-Majem²; Ana.I.Castellote¹; M.Carmen López-Sabater¹

¹ Dept. of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av.Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona, Spain. *e-mail: ibondia@ub.edu

² Dept. of Clinical Sciences, Center for Health Sciences. University of Las Palmas de Gran Canaria, PO Box 550, E-35080 Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

Introduction

The protective cardiovascular effect of fish consumption has been firmly established during the last years.

High intakes of the long-chain n-3 fatty acids (LC-FA) eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 (n-3)) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 (n-3)) have been found to be associated with reduced coronary artery disease (CAD) mortality in numerous studies.

There are several potential mechanisms for the protective role of fish-derived n-3 LC-FA. They include antithrombotic and anti-arrhythmic effects, decreased heart rate variability, resting blood pressure, decreased TG concentrations, increased insulin sensitivity, and reduced inflammatory responses.

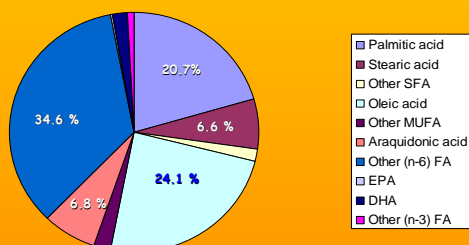
Long-chain n-3 FA intake should be promoted for all individuals especially those at risk of developing cardiovascular disease. However, there is still a wide gap between current intake of n-3 LC-FA and many of the recommendations given from international organizations.

Objectives of the study

- To examine the marine derived n-3 FA status of a representative sample of the adult population in Catalonia, a Mediterranean region (n = 516; 18-77 y).
- To look for the relation between plasma concentration of long chain n-3 FA and various CVD risk factors.

Methodology

- Cross-sectional nutrition survey carried out in 2002-03.
- Dietary habits assessed by means of 24-hour recall during 2 non-consecutive days and a FFQ referring to 92 food items.
- Anthropometric measurements: height, weight, waist and hip circumference.
- Laboratory measurements: Analysis of serum lipids by standardized enzymatic methods; Analysis of the plasma FA profile by fast-GC-FID.



Relative concentrations of plasma FA in the sample (Geometric mean, % by wt of total FA)

Results

MARINE FOOD CATEGORY	Men (n = 203)	Women (n = 313)	18-39 y (n = 192)	40 y (n = 324)	All (n = 516)
FRESH WATER FISH	4.48 ± 0.67	4.45 ± 0.65	3.91 ± 0.71	5.41 ± 0.62	4.47 ± 0.63
SALTWATER LEAN FISH	30.19 ± 4.92	38.3 ± 5.01 ^a	34.64 ± 4.40	35.84 ± 4.21	35.11 ± 4.59
SALTWATER OILY FISH	20.25 ± 4.71	19.53 ± 4.36	19.49 ± 4.45	20.36 ± 4.82	19.82 ± 5.42
CEPHALOPODS	11.20 ± 2.56	10.06 ± 2.45	11.62 ± 1.47	9.85 ± 1.81 ^b	10.49 ± 2.45
MOLLUSKS	4.24 ± 1.20	3.78 ± 1.36	4.02 ± 1.25	3.86 ± 1.52	4.00 ± 1.42
CRUSTACEANS	4.79 ± 1.35	4.38 ± 1.25	4.38 ± 1.14	4.82 ± 1.25	4.46 ± 1.14

Mean value (%) ± SE.
^a Significantly different from men (two-factor ANOVA): P ≤ 0.05
^b Significantly different from 18-39 y (two-factor ANOVA): P ≤ 0.05

Marine food category	n-3 LCFA	> 2 per week	2 per week	1 per week	2-3 per month	1 per month	Never	P
Fresh water fish	EPA	-	0.78 ± 0.15	0.71 ± 0.12	0.60 ± 0.11	0.57 ± 0.12	0.57 ± 0.15	0.477
	DHA	-	2.04 ± 0.32	2.10 ± 0.31	2.23 ± 0.29	2.13 ± 0.31	2.03 ± 0.34	0.325
	n	0	9	17	35	68	337	
Saltwater lean fish	EPA	0.75 ± 0.17 ^a	0.53 ± 0.15 ^b	0.55 ± 0.14 ^b	0.52 ± 0.11 ^b	0.61 ± 0.12 ^b	0.42 ± 0.11 ^c	0.0001
	DHA	2.31 ± 0.36 ^a	2.05 ± 0.30 ^b	2.03 ± 0.29 ^b	1.99 ± 0.29 ^b	2.04 ± 0.31 ^b	1.88 ± 0.32 ^c	0.012
	n	76	122	149	61	32	26	
Saltwater oily fish	EPA	0.88 ± 0.21 ^a	0.75 ± 0.17 ^b	0.58 ± 0.14 ^c	0.47 ± 0.18 ^d	0.42 ± 0.13 ^d	0.42 ± 0.17 ^d	0.0001
	DHA	2.45 ± 0.38 ^a	2.28 ± 0.35 ^b	2.08 ± 0.35 ^b	2.10 ± 0.37 ^c	1.81 ± 0.29 ^d	1.71 ± 0.32 ^d	0.0001
	n	35	73	164	83	56	55	
Cephalopods	EPA	0.90 ± 0.22	0.57 ± 0.18	0.60 ± 0.15	0.56 ± 0.15	0.55 ± 0.17	0.54 ± 0.17	0.313
	DHA	2.60 ± 0.41	2.16 ± 0.39	2.13 ± 0.36	2.07 ± 0.36	2.01 ± 0.32	1.96 ± 0.33	0.062
	n	6	26	126	131	108	69	
Mollusks	EPA	-	0.72 ± 0.17 ^a	0.57 ± 0.15	0.57 ± 0.15	0.56 ± 0.16	0.55 ± 0.18	0.075
	DHA	-	2.44 ± 0.41 ^a	2.07 ± 0.36 ^b	2.11 ± 0.35 ^b	2.08 ± 0.31 ^b	1.94 ± 0.33 ^b	0.010
	n	0	17	105	116	127	101	
Crustaceans	EPA	0.87 ± 0.22 ^a	0.68 ± 0.17	0.63 ± 0.18	0.57 ± 0.21	0.54 ± 0.21	0.54 ± 0.21	0.379
	DHA	2.44 ± 0.40 ^a	2.11 ± 0.36	2.14 ± 0.35	2.06 ± 0.35	2.06 ± 0.34	1.99 ± 0.37	0.061
	n	3	10	92	114	157	90	

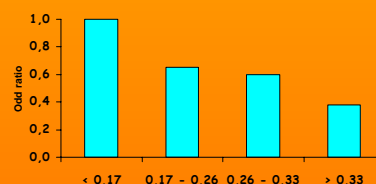
Mean value (%) ± SE.
 Values in the same row with different superscript letter are significantly different, P < 0.05.

CVD risk factors (Mean SD)	Men	Women	18-39 years	>40 years	All	P for sex X age
TC (mmol/L)	4.69	4.58	4.40	4.78	4.62	0.373
LDL-C (mmol/L)	2.97	2.74	2.64	2.97	2.83	0.353
HDL-C (mmol/L)	0.26 ^a	0.34	0.31 ^b	0.29	0.28	0.344
TG (mmol/L)	1.15	0.85	0.81	1.08	0.97	0.182
Glucose (mmol/L)	5.71 ^a	5.03	4.78	5.59	5.21	0.038
Insulin (mg/dL)	7.77	7.65	8.22	7.54	7.99	0.330
SBP (mm Hg)	127.36	118.4	112.6	129.30	123.24	0.274
DBP (mm Hg)	80.92	77.47	75.04	81.69	78.87	0.356

Mean value (%) ± SE.
^a Significant different from women (Two-factor ANOVA): P < 0.0001
^b Significant different from >40 y (Two-factor ANOVA): P < 0.0001

CVD risk factors	β (Log EPA)	P	β (Log DHA)	P
TC	-0.71	0.050	-0.42	0.191
LDL-C	-0.65	0.080	-0.01	0.555
HDL-C	2.10	0.080	0.01	0.305
Log TG	-1.15	0.001	-0.16	0.040
Insulin	-0.80	0.027	-0.06	0.462
SBP	-0.40	0.205	-0.40	0.127
DBP	-0.41	0.302	-0.39	0.205

Standardized regression coefficients from multiple linear regression analysis.
 Dependent variables: CVD risk factors
 Predictor variables: relative concentrations of plasma n-3 LC-FA (each model included age, sex, waist circumference, SBP, and smoking status).



Odds ratios of a prevalent high-risk concentration of plasma HDL-C by quartiles of the plasma ratio of EPA to AA.

Potential confounding variables	EPA	DHA	EPA-DHA	EPA / AA	(n-3) / (n-6)
Sex					
Men (n = 203)	0.47 ± 0.17	1.87 ± 0.30	2.40 ± 0.41	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.003
Women (n = 313)	0.49 ± 0.17	2.00 ± 0.34	2.53 ± 0.43	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.002
P	0.061	0.062	0.102	0.497	0.325
Ages					
18-39 y (n = 192)	0.38 ± 0.11	1.87 ± 0.35	2.29 ± 0.58	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.003
≥ 40 y (n = 324)	0.54 ± 0.19	1.99 ± 0.39	2.59 ± 0.55	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.002
P	0.0001	0.0630	0.0001	0.0001	0.0001
Waist circumference					
Normal (n = 361)	0.46 ± 0.12	1.95 ± 0.37	2.46 ± 0.60	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.003
Elevated (n = 155)	0.53 ± 0.14	1.94 ± 0.34	2.52 ± 0.54	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.003
P	0.016	0.843	0.490	0.006	0.287
Smoking status					
Smoker (n = 142)	0.42 ± 0.13	1.76 ± 0.35	2.25 ± 0.59	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.003
Occasionally smoker (n = 22)	0.42 ± 0.13	1.86 ± 0.37	2.47 ± 0.59	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.002
Nonsmoker (n = 349)	0.50 ± 0.13	2.02 ± 0.36	2.58 ± 0.52	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.002
P	0.011	0.001	0.001	0.006	0.002
Medication for hypertension					
Yes (n = 56)	0.61 ± 0.14	2.11 ± 0.37	2.78 ± 0.55	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.003
No (n = 460)	0.46 ± 0.15	1.98 ± 0.34	2.45 ± 0.56	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.004
P	0.002	0.094	0.160	0.0001	0.001
Medication for CVD problems					
Yes (n = 33)	0.56 ± 0.11	2.06 ± 0.35	2.68 ± 0.56	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
No (n = 483)	0.47 ± 0.11	1.94 ± 0.32	2.47 ± 0.54	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.002
P	0.124	0.297	0.198	0.070	0.098
Diabetic					
Yes (n = 27)	0.51 ± 0.14	1.78 ± 0.33	2.35 ± 0.52	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.004
No (n = 489)	0.45 ± 0.17	1.96 ± 0.35	2.49 ± 0.53	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.004
P	0.513	0.177	0.412	0.096	0.181

Geometric mean ± SE
 Data may vary slightly

Conclusions

- The daily fish and shellfish intake was 78.4 ± 11.3 g in the Catalan sample
- Plasma mean concentrations of EPA and DHA in the Catalan sample were respectively 0.48% and 1.95% of total FA
- EPA and DHA were inversely associated with TG concentrations, but there were no significant associations between n-3 LC-FA with the blood pressure, TC and LDL-C of the Catalan subjects under study
- Our results showed a protective effect of the EPA/AA ratio on plasma HDL-C
- The oily fish intake, the richest in EPA and DHA, was at an order of 1 serving per week in the Catalan population. It should be recommended to increase this intake at least to 2 servings per week.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Public Health Division of the Dept. of Health of the Generalitat of Catalonia for providing the blood samples for the study.
 Many thanks to Mercadona S.A. and the Catalan Nutrition Center of the Catalan Studies Institute for funding this study.
 Special thanks to the Ministry of Education and Science for the F.P.U. PhD-grant to Isabel Bondia-Pons.

DETERMINATION OF PHOSPHOLIPID FATTY ACIDS IN BIOLOGICAL SAMPLES BY SOLID PHASE EXTRACTION AND FAST-GAS CHROMATOGRAPHY

I. Bondia*, S. Morera, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater

Dept. Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA),
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona, Spain.
*e-mail: ibondia@ub.edu



INTRODUCTION

The importance of the long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), but primarily that of both arachidonic acid (ARA) and docosahexaenoic acid (DHA) in paediatric nutrition is based on their accumulation in the brain and the retina. The former fatty acids are believed to be involved in the development of mental and visual functions in the newborn. This makes it important to discover in an accurate way the their incorporation in the target tissues. The composition on phospholipids fatty acids in plasma and erythrocytes has become a useful incorporation marker [1-2].

The isolation of phospholipids is nowadays accomplished by thin layer chromatography (TLC) or by solid phase extraction (SPE) [3,4]. TCL is not only cumbersome, but also sensitive to sample load and can be quite expensive in both time and materials. A most suitable option has been shown to be the isolation by SPE, using aminopropyl phases or polymeric phases.

OBJECTIVE To present a method for the determination of phospholipids LC-PUFAs in plasma and erythrocytes by using SPE.

METHOD PROCEDURE

Tested Options

500 µl

200 µl

100 µl

CHCl₃/MeOH (2:1)

Hexane/i-PrOH

n-BuOH

Dichlorometane/MeOH (2:1)

Sep-Pak® Vac 3cc (500mg) NH₂ Cartridges

Sep-Pak® Vac 1cc (100mg) NH₂ Cartridges

Waters Oasis® HLB 3cc (60 mg) Cartridges

HCl/MeOH (3N) 100°C, 45 min.

NaCH₃O 100°C, 15 min.

BF₃/MeOH 14%(w/v) 100°C, 15 min.

BF₃/MeOH 14%(w/v) 100°C, 1h.

BF₃/MeOH 14%(w/v) 100°C, 2h.

BF₃/MeOH 14%(w/v) 100°C, 2,5 h.

Selected Option

200 µl sample (plasma or erythrocytes)

40 µg internal standard (IS) solution (PC(15:0))

LIPID EXTRACTION

3 ml Dichlorometane/MeOH (2:1)

3 min vortex

3000 rpm, 3 min centrifugation

500 µl NaCl (sat)

Lower organic phase to dryness under N₂

Redissolution in 200 µl CHCl₃

SPE SEPARATION

Sep-Pak® Vac 1cc (100mg) NH₂ Cartridges

- Conditioning of the cartridge:

2 x 1 ml Hexane

1ml Chloroform/2-Propanol (2:1)

- Loading of the sample: in 200 µl CHCl₃

- Washing steps:

1ml Chloroform/2-Propanol (2:1) (NEUTRAL LIPIDS)

1ml 2% Acetic acid in Diethyl Eter (FREE FATTY ACIDS)

- Elution step:

3 x 0.5 ml MeOH (PHOSPHOLIPIDS)

METHYLATION

2 ml BF₃/MeOH 14% (w/v), 110°C, 2h

- 300 µl n-hexane

- 1 min vortex

- 400 µl NaCl (sat); 7 min, 3000 rpm centrifugation

- Anhydrous Na₂SO₄

FAST GC ANALYSIS

Varian Capillary column VF- 23 ms (high cyanopropyl phase)

10m x 0.10 mm x 0.10 µm

120°C at 35°C/min to 175°C (0,5min) at 20°C to 250°C

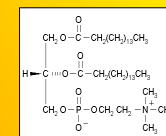
Split ratio of 1:30

Shimadzu GC-2010 GC/ FID detector

RESULTS

% RECOVERY

1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine : PPL (C16:0)



Added PPL (C16:0) (µg)	% Recovery
10	92,3
20	97,7
40	102,5
100	102,9
150	101,9

PRECISION

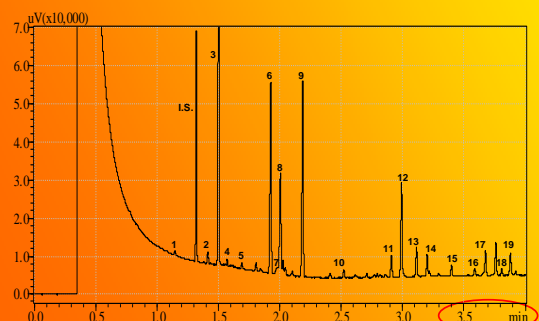
INTRA-ASSAY

INTER-ASSAY

Peak	FATTY ACID	mg/ml	%CV	% FAME	%CV	mg/ml	%CV	% FAME	%CV
1	C14:0	4,8	5,38	0,47	5,49	5,0	5,58	0,48	5,79
2	C15:1	3,5	6,90	0,29	8,65	3,7	7,10	0,31	8,95
3	C16:0	315,0	0,48	30,64	0,65	315,4	0,68	30,20	0,95
4	C16:1	4,2	7,00	0,41	7,01	4,3	7,20	0,45	7,31
5	C17:0	4,7	7,53	0,45	7,52	5,1	7,73	0,47	7,92
6	C18:0	161,5	6,00	15,71	5,86	161,8	6,20	15,40	6,36
7	C18:1n-9 trans	12,0	5,60	1,01	5,29	12,4	5,80	1,02	5,49
8	C18:1n-9 cis	131,5	4,53	11,51	4,09	132,0	4,73	11,75	4,49
9	C18:2 n-6 cis	185,5	2,95	20,04	2,83	185,8	3,15	20,45	3,33
10	C20:0	6,1	7,74	0,59	7,62	6,3	7,94	0,55	8,32
11	C20:3 n-6	17,7	4,12	1,72	4,07	17,9	4,32	1,69	4,87
12	C20:3 n-3	76,7	7,06	7,47	7,17	77,1	7,26	7,62	7,67
13	C20:4n-6	19,3	2,43	1,88	2,39	19,8	2,63	1,85	2,79
14	C22:1n-9	3,6	7,87	0,35	8,07	3,7	8,07	0,32	8,49
15	C20:5n-3	7,3	4,34	0,71	4,51	7,5	4,54	0,65	4,81
16	C24:0	18,4	4,26	1,79	4,27	19,0	4,46	1,75	4,57
17	C24:1	21,1	3,90	2,05	3,93	21,5	4,10	2,15	4,23
18	C 22:5 n-3	5,0	8,93	0,41	9,74	5,2	9,02	0,39	9,84
19	C22:6 n-3	14,7	5,91	1,00	5,18	14,9	6,11	1,02	5,48

(n=10, human plasma)

FAST GC-CHROMATOGRAM



REFERENCES

- [1] Am J Clin Nutr. 2004; 79(2):251-60
- [2] Prost Leukot Ess Fatty Acids. 2004; 71(6):363-74
- [3] J Lipid Reserach. 1992;33:1871-75
- [4] J Lipid Reserach. 1985;26:137-42



DETERMINATION OF THE FATTY ACID CONTENT BY FAST GAS CHROMATOGRAPHY IN A SAMPLE OF THE CATALONIAN POPULATION



*Bondia-Pons I., Castellote A.I., López-Sabater M.C.

Dept. de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona, Spain.

*e-mail: ibondia@farmacia.far.ub.es

INTRODUCTION & AIM

Gas chromatography (GC) has been the method of choice in fatty acid analysis for half a century. Its determination in human plasma is a useful tool to understand the importance of dietary fat for human health [1], and has become a routine analysis when nutritional and clinical studies are carried on.

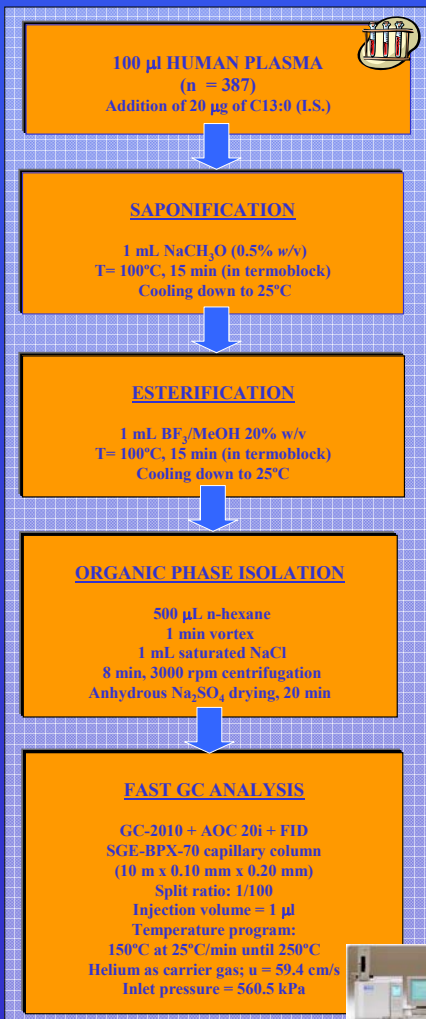
The high sample throughput, that characterises this kind of population study, increases the need for a significant reduction in cost and analysis time. Nowadays this reduction is possible thanks to instrumental developments in narrow-bore fast GC [2-4]. In human plasma, this technique allows the analysis of a considerable number of fatty acid methyl esters (C12:0 to C22:6 n-3) in only 3.2 minutes [5].

The first application of this methodology to a considerable number of plasma samples was therefore the main aim of the present study.

For this purpose, the plasma fatty acid content of 387 healthy subjects recruited for an institutional health survey in Catalonia, a Spanish Mediterranean region, was determined.

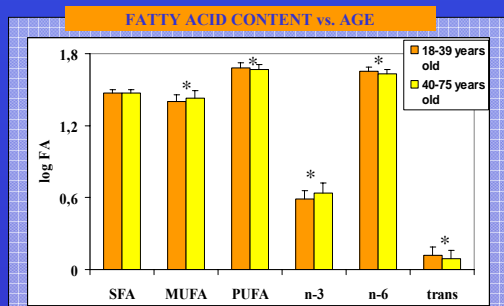
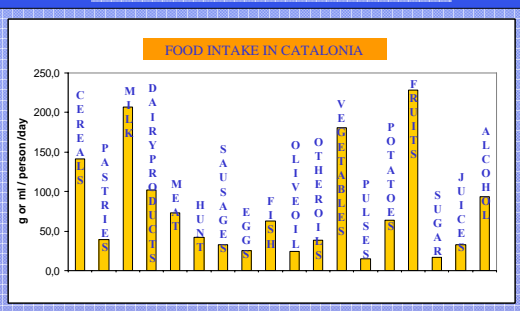
The catalonian dietary habits are also shown, as well as the pattern of the beneficial "typical Mediterranean diet", which is rich in mono- (MUFA) and n-3 polyunsaturated (PUFA), but low in saturated fatty acid (SFA) [6].

EXPERIMENTAL



	Men (n=175)		Women (n=121)	
	Mean	SD	Mean	SD
Age	41	14	37	13
Body weight (kg)	80	12	65	13
Height (cm)	173	7	162	6
Body mass index (kg/m ²)	27	4	25	6
Waist perimeter (cm)	92	11	79	13
Hip perimeter (cm)	101	7	99	10
Systolic blood pressure (mm Hg)	127	18	118	18
Diastolic blood pressure (mm Hg)	80	11	75	10
Total cholesterol	192	36	184	37
HDL cholesterol	46	12	58	14
LDL cholesterol	123	30	109	35
Triglycerides	108	68	70	36

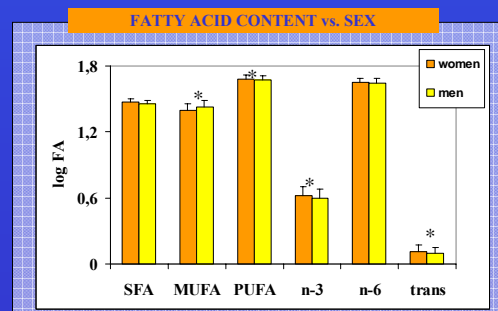
Population characteristics



RESULTS

FATTY ACID	%FAME	SD	% FAME	
			Lower value	Upper value
C14:0	0,6	0,4	0	4,9
C15:0	0,2	0,2	0	2,3
C15:1	0,2	0,2	0	1,9
C16:0	20,4	2	15,4	28,4
C16:1	1,6	0,6	0,4	3,9
C17:0	0,3	0,1	0	1,8
C17:1	0,2	0,2	0	1
C18:0	6,6	0,8	4	11,4
C18:1 n-9 t	0,2	0,2	0	2
C18:1 n-9 c	23	4,2	13,9	40,5
C18:2 n-6 t	0,1	0,1	0	1,1
C18:2 n-6 c	33,6	5,1	14,7	48,5
C18:3 n-6	0,4	0,2	0,1	1
C18:3 n-3	0,3	0,1	0	1,1
C20:0	0,1	0,1	0	1,1
C20:1	0,1	0,1	0	0,6
C20:2	0,2	0,2	0	1,7
C20:3	1,4	0,4	0	2,8
C20:4 n-6	7,1	1,4	1,9	12,8
C22:0	0,1	0,4	0	7
C22:1	0,1	0,3	0	2,7
C20:5 n-3	0,5	0,4	0	2,4
C24:0	0,2	0,1	0	0,8
C24:1	0,1	0,2	0	2,9
C22:5	0,3	0,1	0	1,1
C22:6 n-3	2,1	0,7	0,3	7,6
SFA	28,5	2,3	22,7	40,8
MUFA	25,4	4,3	15,7	43,2
PUFA	46,1	5,3	24,5	58,7
n-3	3,2	1,0	1,3	9,3
n-6	42,8	5,3	21,4	55,7
trans	0,3	0,3	0	2,8

Fatty acid content in the 387 analysed human plasma samples.



(*) Significant differences ($\alpha < 0.001$)

CONCLUSIONS

• A new Fast GC method for the determination of human plasma fatty acid content was applied to a sample of the Catalonian population.

• Significant differences were found in the content of MUFA, PUFA n-3, PUFA n-6 and *trans* fatty acids, but not in SFA according to sex and age of the analysed Catalonian population sample:

• Men showed more MUFA and less PUFA, n-3 and *trans* content than women

• People > 40 years old showed more MUFA, n-3 and less PUFA n-6 and *trans* than people < 40 years old.

• The high n-6/n-3 index found (13/1) suggests that intake of fish, nuts or other n-3 enriched food should be increased in the Catalonian population.

REFERENCES

- [1] T. Seppänen-Laakso, I. Laakso, R. Hiltunen, *Analytica Chimica Acta* 465 (2002) 39.
- [2] F. David, D.R. Gere, F. Scanlan, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 309.
- [3] L. Mondello, A. Casilli, P. Quinto Tranchida, R. Costa, B. Chiofalo, P. Dugo, G. Dugo, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 237.
- [4] P. Koryár, H.G. Janssen, E. Matisová, U.A. Brinkman, *Trends in analytical chemistry* 21 (2002) 558.
- [5] I. Bondia-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, *J. Chromatogr. B* (in press).
- [6] Consensus statement on dietary fat, the mediterranean diet, and lifelong good health. *The American Journal of Medicine* 113 (2002) 5S.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to R. M. Alarcón for her technical help. Special thanks are due to the Spanish Ministry of Education for their grant to I. Bondia-Pons.

COMPARISON OF CONVENTIONAL AND FAST GAS CHROMATOGRAPHY IN PLASMA FATTY ACID DETERMINATION

I. Bondía, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater*
Dpt. Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA),
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona, Spain.
*E-mail: mclopez@ub.edu

INTRODUCTION

Determination of fatty acids in human plasma by gas chromatography (GC) has become a useful and routine tool for understanding the importance of dietary fat for human health [1]. Numerous and diverse present-day biomedical and nutritional studies are commonly designed to evaluate the effects of these fat biomarkers on nutritional status and to establish their relationships with some major pathologies like cardiovascular diseases [2-5].

The large sample size required in these studies underlines the need to optimize not only all the steps of the experimental part of sample preparation, but also the time of the final gas chromatography analysis.

Nowadays this objective is possible thanks to the improved development in the fast-GC technique. In practical terms, this implies the use of narrow bore capillary columns, high inlet pressures, accurate split flow control, fast oven temperature heating rates and fast electronics [6]. It allows several replicated analyses of a sample in the same time as a single conventional GC separation, with similar precision and sensitivity.

Important to point out is the fact that successful exploitation of a fast-GC method requires careful adjustment of the settings of the GC instrument. Results presented in other specific fast-GC applications have convincing evidence of this fact [7,8]. But, as far as we know, fast-GC application to fatty acid determination in biological samples like plasma has not yet been reported.

AIM

> To compare conventional and fast gas chromatography conditions in the framework of plasma fatty acid determination.

EXPERIMENTAL



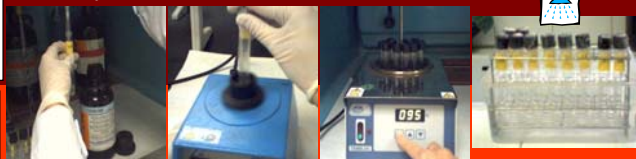
100 µl PLASMA

↓ 20 µg I.S. (C13:0)

1.-SAPONIFICATION

- 1ml NaCH₃O (0.5% w/v)
- water bath at 95°C, 15 min
- cooling down to 25°C

NaCH₃O



2.-ESTERIFICATION

- 1ml BF₃/MeOH 20% w/v
- water bath at 95°C, 15min
- cooling down to 25°C

BF₃/MeOH



3.-ORGANIC PHASE ISOLATION

- 500 µl n-hexane
- 1min vortex
- 1ml saturated NaCl
- 8min, 3000rpm centrifugation
- Anhydrous Na₂SO₄ drying, 20min

Hexane

NaCl

Organic phase
Aqueous phase



GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS

Injection volume: 1 µl
Injector (250°C) and FID-Detector (270°C)

CONVENTIONAL GC:

- 30 m x 0.25 mm x 0.20 µm SP-2330 Column
- 160°C at 5°C/min to 250°C (3min)
- Split ratio of 1:30
- HP-68090 Series GC System

FAST GC:

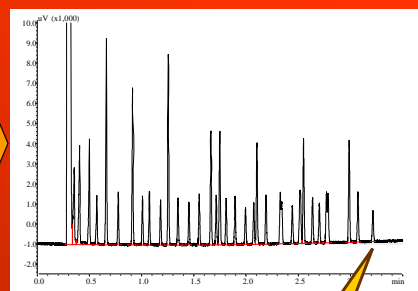
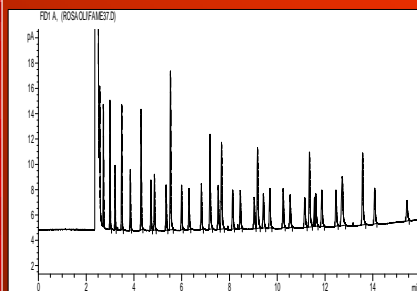
- 10 m x 0.10 mm x 0.20 µm SGE-BPX70 Column
- 150°C at 50°C/min to 170°C (1.4min) at 50°C/min to 250°C (0.6min)
- Split ratio of 1: 200
- Shimadzu GC-2010 GC

RESULTS

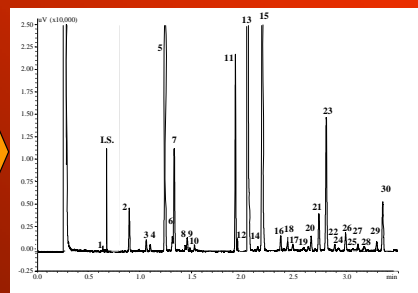
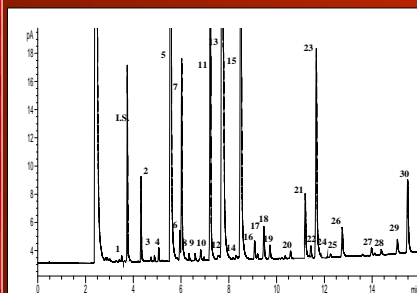
CONVENTIONAL GC

Separation of 37 Fatty Acid Methyl Esters Mix (FAME)

FAST GC



Separation of FAME in HUMAN PLASMA



Peak FAME	Retention Time values (min)				FAME Contents (%)			
	Conventional-GC		Fast-GC		Conventional-GC		Fast-GC	
	t _r	%CV	t _r	%CV	%FAME	%CV	%FAME	%CV
1 C12:0	3.487	0.129	0.592	0.040	0.08	3.76	0.10	3.84
2 C14:0	4.297	0.130	0.824	0.052	2.40	2.91	2.45	2.51
3 C14:1	4.621	0.124	0.923	0.040	0.10	3.10	0.08	3.35
4 C15:0	4.813	0.131	0.997	0.040	0.10	2.98	0.12	3.21
5 C16:0	5.526	0.126	1.237	0.065	21.00	0.56	21.20	0.61
6 C16:1n9	5.990	0.117	1.335	0.040	0.50	2.24	0.45	2.31
7 C16:1n7	6.023	0.120	1.376	0.075	2.20	1.27	2.15	1.32
8 C16:2n4	6.381	0.114	1.447	0.050	0.07	3.01	0.04	3.25
9 C16:3n4	6.604	0.110	1.488	0.040	0.06	2.89	0.09	3.31
10 C16:4n1	6.824	0.124	1.531	0.030	0.06	3.34	0.04	3.51
11 C18:0	7.181	0.111	1.964	0.043	7.00	1.15	7.10	1.02
12 C18:1n9t	7.555	0.114	2.059	0.030	1.10	2.63	1.21	2.45
13 C18:1n9c	7.666	0.110	2.089	0.050	20.10	2.00	20.30	2.00
14 C18:2n6t	8.152	0.106	2.173	0.040	0.20	4.36	0.21	4.15
15 C18:2n6c	8.452	0.104	2.275	0.032	29.50	1.86	29.54	1.79
16 C18:3n6	9.033	0.094	2.383	0.036	0.39	2.95	0.34	2.99
17 C20:0	9.075	0.110	2.512	0.040	0.05	4.08	0.03	4.19
18 C18:3n3	9.417	0.088	2.468	0.031	0.41	3.38	0.38	3.42
19 C20:1n9	9.685	0.200	2.592	0.021	0.22	3.89	0.21	3.92
20 C20:2n6	10.539	0.099	2.741	0.030	0.11	4.21	0.11	4.31
21 C20:3n6	11.150	0.080	2.807	0.027	1.38	2.05	1.41	2.23
22 C22:0	11.498	0.099	2.867	0.040	0.05	4.05	0.06	4.18
23 C20:3n6	11.610	0.081	2.862	0.029	7.80	1.66	7.65	1.73
24 C22:1n9	11.901	0.100	2.960	0.022	0.21	3.51	0.20	3.68
25 C22:2	12.001	0.171	3.069	0.070	0.20	4.56	0.20	4.50
26 C20:5n3	12.698	0.107	3.003	0.031	0.51	3.75	0.49	3.82
27 C24:0	13.924	0.069	3.195	0.040	0.21	4.12	0.19	4.21
28 C22:4n6	14.332	0.080	3.258	0.090	0.24	3.89	0.23	3.95
29 C22:5n3	15.000	0.063	3.310	0.035	0.47	3.27	0.47	3.37
30 C22:6n3	15.432	0.065	3.347	0.040	2.31	1.46	2.28	1.28

CONCLUSIONS

> The new Fast-GC method allows a correct separation of FAME in an extremely short time (3,35 min)

> Excellent reproducibility on times in fast-GC method

> Similar precision in both methods

> Fast-GC doesn't affect the analytical quality of the assays

REFERENCES

- [1] T. Seppänen-Laakso, I. Laakso, R. Hiltunen, *Analítica Chimica Acta* 465 (2002) 39.
- [2] L. Arab, *J. Nutr.* 133 (2003) 925S.
- [3] L. Kilander, L. Berglund, M. Boberg, B. Vessby, H. Lithell, *Int. J. of Epidemiol.* 30 (2001) 1119.
- [4] F. Pérez-Jiménez, J. López-Miranda, P. Mata, *Atherosclerosis* 163 (2002) 38S.
- [5] A. Nkondjock, B. Shatenstein, P. Maisonneuve, P. Ghadirian, *Cancer Detection and Prevention* 27 (2003) 55.
- [6] F. David, D.R. Gere, F. Scanlan, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 309.
- [7] L. Mondello, G. Zappia, I. Bonaccorsi, G. Dugo, G. Dugo, H.M. McNair, *J. Microcolumn Separations*, 12(1) (2000) 41.
- [8] P. Korytár, H.G. Janssen, E. Matšová, U.A. Brinkman, *Trends in analytical chemistry* 21 (2002) 558.

**A3. ÍNDICES DE IMPACTO
DE LOS ARTÍCULOS YA PUBLICADOS**

INDICES DE IMPACTO DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS:

- 1) **I.Bondia-Pons**, H.Schröder, M.I.Covas, A.I.Castellote, J.Kaikkonen, H.E.Poulsen, A.V. Gaddi, A. Machowetz, H. Kiesewetter, M.C. López-Sabater (2007) A moderate consumption of olive oil in European healthy men reduced the systolic blood pressure in non-Mediterranean participants. *J Nutrition*, Jan;137(1):84-87.
AREA: Nutrition and Dietetics
IMPACT FACTOR: 3.689
CUARTILE: 1 (7/53)

- 2) **I.Bondia-Pons**, L.Serra-Majem, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater (2007) Identification of foods contributing to the dietary lipid profile of a Mediterranean population. *British Journal of Nutrition* (in press)
AREA: Nutrition and Dietetics
IMPACT FACTOR: 2.710
CUARTILE: 1 (10/53)

- 3) **I.Bondia-Pons**, L.Serra-Majem, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater (2007) Compliance with the European and national nutritional objectives in a Mediterranean population. *European J of Clinical Nutrition* Feb 14; 1-10.
AREA: Nutrition and Dietetics
IMPACT FACTOR: 2.163
CUARTILE: 2 (18/53)

- 4) **I.Bondia-Pons**, S.Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C.López-Sabater (2006) Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *J Chromatogr A* May 26; 1116 (1-2):204-8.
AREA: Chemistry, Analytical
IMPACT FACTOR: 3.096
CUARTILE: 1 (7/70)

- 5) **I.Bondia-Pons**, A.I. Castellote, M.C López-Sabater (2004) Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Oct 5; 809 (2):339-44.
AREA: Chemistry, Analytical
IMPACT FACTOR: 2.391
CUARTILE: 1 (15/70)

A4. CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

DATOS PERSONALES



Nombre: Isabel Bondia Pons
Lugar y fecha de nacimiento: Maó (Baleares) 18 Noviembre 1976
Direcciones: C/Europa 23, 3º 2ª. 08028 Barcelona
C/Bastió 15- 07703 Maó (Baleares)
Teléfono/Móvil: 93 444 24 81 / 646.268.286
E-mail: ibondia@ub.edu; ibondiapons@yahoo.es

FORMACIÓN UNIVERSITARIA

- Febrero de 2000: **Licenciada en Química**. Facultad de Química. Universidad de Barcelona.
- Junio de 2001: **Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- Octubre de 2002: **Máster en Química Experimental**. Título: "Extracción a escala de planta piloto de los lípidos internos de la lana". Especialidad de Ingeniería Química y Ciencia de Materiales. Facultad de Química. Universidad de Barcelona.
- Junio de 2004: **Certificado de Aptitud Pedagógica (C.A.P.) Especialidad de Física y Química**. Universidad Politécnica de Catalunya.
- Julio de 2004: **Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A., Examen de Suficiencia Investigadora)** del programa de doctorado "Medicamentos, alimentación y salud". Dept. Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona (Nota de examen: **Sobresaliente**)
- Enero de 2007: Depósito oficial de la Tesis Doctoral de título: "**Estudio del perfil de ácidos grasos en la evaluación de la dieta mediterránea como patrón de dieta saludable en poblaciones europeas**" en la Universidad de Barcelona. La defensa tendrá lugar en Marzo de 2007. La tesis reúne todos los requisitos para recibir la **Mención de Honor Europea**.

EXPERIENCIA PROFESIONAL e INVESTIGADORA

- Enero de 2004 – Marzo de 2007: Beca doctoral de **Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (F.P.U)** en el Grupo de Investigación "*Aspectos nutricionales y bromatológicos de los lípidos*". Dept. Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. (nota de los trabajos tutelados del período de investigación: **Matrícula de Honor**; nota de todos los cursos de doctorado realizados: **Sobresaliente**)
- Junio - Septiembre 2005: Beca de Estancia investigadora durante la etapa de doctorado para Becarios F.P.U. en el grupo de investigación de la Dra. Mairead Kiely. Título del estudio: "**Analysis of vitamin D and PTH status in the YOUNG SeafoodPLUS cohort**" en el marco del proyecto europeo FP6 1.2. *YOUNG: Health of young European families and fish consumption*". Dept. Food and Nutritional Sciences, University College Cork, Cork (Irlanda)
- Enero de 2003 - Diciembre 2003: Trabajo de investigación relativo a la "**Evaluación nutricional de la población catalana**" para la Fundación Bosch i Gimpera en el Grupo de Investigación "Aspectos nutricionales y bromatológicos de los lípidos", Dept. de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

- Julio 2001 - Diciembre 2002: Trabajo de investigación de título: **“Optimización a nivel de laboratorio e industrial de la extracción de los lípidos internos de la lana y estudio de eficacia para aplicación cosmética”** en el marco del proyecto “Extracción y análisis de los lípidos internos de la lana y su aplicación cosmética” en el Grupo de Investigación de Estructuras Lipídicas del Departamento de Tensioactivos del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona (IIQAB). Centro de Investigación y Desarrollo C.S.I.C. Barcelona.
- Julio - Agosto 2000: Departamento de Aplicación, Producción y Control de Calidad de Productos Cárnicos (**Anwendungstechnische Abteilung**) en la empresa Naturin GmbH & Co. en Weinheim (Alemania). – **Prácticas como Estudiante Universitaria de C.T.A.**
- Julio - Agosto 1999: Laboratorio de Control de Calidad Colágeno (**Betriebschemie und Qualitätswesen Kollagen**) en la empresa Naturin GmbH & Co. en Weinheim (Alemania). – **Prácticas como Estudiante Universitaria de C.T.A.**
- Agosto 1998: Laboratorio de Materia Prima (**Rohware Labor**) en la empresa Naturin GmbH & Co. en Weinheim (Alemania). – **Prácticas como Estudiante Universitaria de Química.**

PREMIOS

- **Premio Accésit al Mejor Estudio Químico Textil de aplicación a la industria** por el trabajo: *“Extracción a escala de planta piloto de los lípidos internos de la lana”* en el 16º Premio de la Asociación Española de Químicos y Coloristas Textiles (A.E.Q.C.T.) para jóvenes investigadores. Barcelona, 12 de marzo de 2003.

PUBLICACIONES

1. **I.Bondia-Pons**, H.Schröder, M.I.Covas, A.I.Castellote, J.Kaikkonen, H.E.Poulsen, A.V. Gaddi, A. Machowetz, H. Kiesewetter, M.C. López-Sabater (2007) A moderate consumption of olive oil in European healthy men reduced the systolic blood pressure in non-Mediterranean participants. *J Nutrition*, Jan;137(1):84-87.
2. **I.Bondia-Pons**, L.Serra-Majem, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater (2007) Compliance with the European and national nutritional objectives in a Mediterranean population. *European J of Clinical Nutrition*, Feb:1-10. (en prensa)
3. **I.Bondia-Pons**, L.Serra-Majem, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater (2007) Identification of foods contributing to the dietary lipid profile of a Mediterranean population. *British Journal of Nutrition*(en prensa)
4. **I.Bondia-Pons**, S.Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C.López-Sabater (2006) Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *J Chromatogr A* May 26; 1116(1-2):204-8. 26(2).
5. **I.Bondia-Pons**, A.I. Castellote, M.C López-Sabater (2004) Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Oct 5; 809 (2):339-44.
6. **I. Bondia-Pons** (2004) Extraction of Internal Wool Lipids at a pilot plant level (article in Spanish) *Revista de Química Textil (J Textile Chem)* Vol. 167, 60-73.
7. M.Martí, A.M.Manich, M.H.Ussman, **I.Bondia**, J.L.Parra, L.Coderch (2004) Internal Lipid Content and Viscoelastic Behavior of Wool Fibers. *J Applied Polymer Science*, Vol. 92, 3252-3259.

8. L.Coderch, **I. Bondia**, J. Fonollosa, S. Méndez, J.L.Parra (2003) Ceramides from Wool: Analysis and Structure. *International Federation Societies of Cosmetic Chemists* Vol.6. Number 2; April/June.

Publicaciones en proceso de revisión y enviadas:

9. **I.Bondia-Pons**, C.Moltó, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography (en revisión)
10. **I.Bondia-Pons**, L.Serra-Majem, A.I. Castellote, A.Mariné, M.C.López-Sabater. *A priori* approach of the Mediterranean Diet in a population sample from coastal north-east Spain Evaluation of diet quality with the Mediterranean dietary quality index in a population sample from Mediterranean north-east Spain (en revisión)
11. **I. Bondia-Pons**, L. Serra-Majem, A.I. Castellote, M.C.López-Sabater. Long- chain n-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Catalan population.(en revisión)
12. **I. Bondia-Pons**, L. Serra-Majem, A.I. Castellote, M.C.López-Sabater. Fatty acids and diseases: does the Catalan population follow the medical nutrition advice? (en revisión)
13. **I.Bondia-Pons**, L.Serra-Majem, A.I. Castellote, A.Mariné, M.C.López-Sabater. Evaluation of the conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid contents in a sample from Mediterranean north-east Spain. (pendiente de enviar)
14. S.Muldowney, A.Lucey, G.Paschos, A.Martínez, I.Thorsdottir, **I.Bondia-Pons**, KD.Cashman, M.Kiely (2007). Wintertime vitamin D status in young adults aged 20-40 years from Iceland, Spain and Ireland, Data from SEAFOODplus YOUNG project. (pendiente de enviar)

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Congress proceedings:

- **I.Bondia**, J.Fonollosa, M.Martí, L.Coderch Chemical and mechanical wool modification due to ceramide extraction. Proceedings of the 71st International Congress of IWTO, Barcelona (2002)
- M.Martí, **I.Bondia**, L.Coderch, J.L.Parra. Ceramides from Wool: Analysis and Structure. Proceedings of the XIX International Congress of IFATCC, Paris (2002).

Presentación de comunicaciones en forma de póster científico:

- VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. Vigo (Spain), Noviembre 2006. "**Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by gas chromatography**". Autores: I.Bondia, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater.
- Fats and Health-Update on Dietary Phytosterols, Trans-fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids Congress. Frankfurt, Octubre de 2006. "**Comparison of the plasma fatty acid profile in obese type 2 diabetics and obese and healthy individuals**". Autores: I.Bondia, O.Sancho, C. Moltó, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater; y "**Conjugated Linoleic Acid Isomers content of preterm human milk**". Autores: C. Moltó, I.Bondia, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.
- 4th Euro Fed Lipid Congress: Oils, Fats and Lipids for a Healthier Future. Madrid, Octubre de 2006. "**Determination of Conjugated Linoleic Acid Status by Gas Chromatography in a Sample of the Catalan Population**". Autores: I.Bondia, C.Moltó, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.

- I World Congress of Public Health Nutrition and VII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Barcelona, Septiembre de 2006. **“Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Catalan population”**. Autores: I.Bondia, L. Serra-Majem, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.
- 11ª Jornadas de Análisis Instrumental (JAI). Barcelona, Noviembre de 2005. **“Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by SPE and fast-GC”**. Autores: I.Bondia, S. Morera, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.
- 3rd Euro Fed Lipid Congress and Expo: Oils, Fats and Lipids in a Changing World. Edinburgh, Septiembre de 2004. **“Determination of the Fatty Acid Content by Fast Gas Chromatography in a Sample of the Catalan Population”**. Autores: I.Bondia, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater.
- 3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. 3rd Waste Water Cluster European Workshop. Almería, Noviembre, 2003. **“Comparison of Conventional and Fast Gas Chromatography in Plasma Fatty Acid Determination”**. Autores: I. Bondia, A.I. Castellote, M.C.López- Sabater
- XIX IFATTC Congress. Paris, Octubre 2002. : **“Wool modification after internal wool lipid extraction”**. Autores: I. Bondia, J. Sánchez, M. Martí, A. De la Maza, J.L. Parra, L. Coderch. **Galardonado con el 2º premio de pósters del Congreso.**
- 22nd International Federation Societies of Cosmetic Chemists Congress. Edinburgh, Septiembre 2002. **“Ceramides from wool: analysis and structure”**. Autores: L. Coderch, I. Bondia, J. Fonollosa, A. De la Maza, J.L. Parra.

Comunicaciones orales como ponente:

- 71st International Wool Textile Organization Congress. Barcelona. Presentación oral en el Forum de Tecnología Comercial del artículo de título: **“Chemical and mechanical wool modification due to ceramide extraction”**, 15 Mayo de 2002
- 3rd YOUNG PROJECT meeting, **“Vitamin D and PTH results in the YOUNG SeafoodPLUS cohort”**. University College Cork, Cork (Irlanda), 30 de Agosto de 2005.

CURSOS Y EVENTOS DE DIFUSIÓN CIENTÍFICA

- 1ª Reunión del Proyecto de Excelencia **“Programación precoz de la obesidad” PREOBE** organizada por la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada. Granada, 6 de febrero de 2007.
- Conferencia magistral a cargo del Dr. Valentín Fuster sobre **Enfermedad Cardiovascular y Alimentación** organizada por la Fundación Dieta Mediterránea. Barcelona, diciembre de 2006.
- **SPSS EMEA User Conference**: SPPSS Directions 2006, organizada por SPSS Inc., Barcelona, 22-23 de mayo de 2006.
- **X Food Studies Meeting on Health and Chemistry: Functional Ingredients** organizado por la Asociación de Químicos e Ingenieros del IQS; Grupo Profesional Alimentario y AFCA. Institut Químic de Sarrià, Barcelona, 25-26 de abril de 2006.
- Seminarios sobre **Desarrollo de métodos para HPLC: Técnicas y estrategias y Transferencia de métodos HPLC a UPLC: Revisión de aspectos clave y herramientas disponibles. Aspectos clave de la instrumentación Acquity** organizados por Waters Cromatografía S.A. (4h), Barcelona, 31 de marzo de 2006.
- Workshop on **All the performance, all the time: a new world in LC and LC/MS** organizado por Agilent Technologies Spain, S.L. (4h). Barcelona, 27 de marzo de 2006.
- Workshop on **Foods for the XXI century Bioactive Proteins and Prebiotics as Functional Ingredients: New insights into their functionality and mechanism of action** organizado por EARNERST Project (EU-Food-CT-2005-007036) y la Asociación de Químicos e Ingenieros del IQS. Institut Químic de Sarrià, (9h), Barcelona, 25 de octubre de 2005.

- Workshop on **Vitamin D in bone health** organizado por la Universidad de Cork. Cork (Irlanda), 20 de septiembre de 2005.
- Seminario sobre **Cromatografía de gases y Cromatografía de líquidos** organizado por Agilent Technologies Spain, S.L. (4h). Facultad de Química y Física, Universidad de Barcelona. Barcelona, 7 de abril de 2005.
- IV Reunión de la Red Española de Investigación en **Salud Infantil y Medio Ambiente (INMA)** organizada por la Fundación Hospital Clínico y la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada. Granada, 2-4 de febrero de 2005.
- Seminario de **Normas ISO 9000**, Dept. de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Barcelona, 2 de marzo de 2005.
- Seminario de **Extracción en fase sólida (SPE)** organizado por la empresa Waters S.A. Dept. de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Barcelona, 20 de septiembre de 2004.
- Curso de **Gestión de bases de datos bibliográficos con Reference Manager** incluido en el programa de formación del profesorado de la Universidad de Barcelona. Instituto de la Educación, Universidad de Barcelona. Barcelona, 5-8 de julio 2004. (16h).
- Curso de **Estadística Inferencial con SPSS** incluido en el programa de formación del profesorado de la Universidad de Barcelona. Instituto de la Educación, Universidad de Barcelona. Barcelona, 2-16 de junio 2003. (30h).
- MS-Workshop sobre **Espectrometría de Masas** organizado por el III Pla de Recerca de Catalunya, 2001/2003. Facultad de Química. Universidad de Barcelona. Barcelona, 7-8 de julio, 2003.
- Jornada formativa sobre **Seguridad Alimentaria: Últimos avances científico-tecnológicos** Les Heures, Fundación Bosch i Gimpera, Universidad de Barcelona. Barcelona, 27 de marzo de 2003.
- Jornada formativa sobre **Productos de alto valor añadido a partir de subproductos y residuos** Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona. CSIC-Barcelona. Barcelona, 7 noviembre de 2002.

IDIOMAS

Lenguas maternas: Castellano y Catalán.

Inglés:

- Proficiency Level III. Institute of North American Studies. Barcelona, Diciembre de 2004.
- Advanced American English Certificate. Institute of North American Studies. Barcelona, Febrero de 2003.
- First Certificate in English, University of Cambridge. Barcelona, Diciembre de 2000.

Alemán:

- Curso C.2.1. de alemán (Oberstufe 1; 60 h). Goethe Institut, Barcelona, Febrero de 2005.
- Curso de alemán: "Internationaler Ferienkurs für deutsche Sprache und Kultur" Sprachkurs. Universidad Ruprecht-Karls de Heidelberg, Agosto de 2003.
- 5º Curso de alemán de la Escuela Oficial de Idiomas. Barcelona, Junio de 2002.
- Zertifikat Deutsch als Fremdsprache. Goethe Institut, Febrero de 2002.

Francés:

- 1º Curso de Francés de la Escuela Oficial de Idiomas. Barcelona, Junio de 2004.

CONOCIMIENTOS INFORMÁTICOS

- Windows, Microsoft Office 2000, Herramientas de Internet. Diseño de Páginas Web.
- Softwares: SPSS v. 12.1.; Reference Manager v. 11.0.; Quantity One-Phosphoimager Fluor-S Multimager; Power Point 2000; Photo Editor 3.01.; Corel Photo-Paint.; ACD/ChemSketch v.4.55.; Boreal v.2.5.

ACTIVIDAD DOCENTE

- Curso 2005-2006: Docencia de clases prácticas de la asignatura de "**Nutrición y Bromatología**" (perteneciente al Plan de Estudios de Farmacia de la Universidad de Barcelona) 40h. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Cursos 2004-2005 y 2005-2006: Docencia y supervisión en el laboratorio de alumnos en formación de la asignatura de "**Formación en Centros de Trabajo**", del módulo de "Formación Profesional específica de Grado Superior-Familia Química". Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona, Barcelona.

OTROS MÉRITOS CIENTÍFICOS

- Miembro del *Grupo de Investigación Consolidado de Catalunya 2938-BROMATOL* (I i II Plans de Recerca). 2003 hasta la actualidad.
- Miembro investigador del "*Centro de Referencia en Tecnología de Alimentos CeRTA*". Generalitat de Catalunya. 2003 hasta la actualidad.
- Miembro de la *European Federation for the Science and Technology of Lipids*. 2004 hasta la actualidad.
- Miembro investigador del Cluster de *Enfermedades Crónicas* del Proyecto CIBER de *Epidemiología y Salud*. 2007.
- Reviewer científico en la revista *Journal of Chromatography A* (enero de 2007- actualidad).
- Experiencia en el análisis de compuestos lipídicos (ácidos grasos, esteroides, fosfolípidos, índices de pureza y calidad, análisis acelerados de oxidación, compuestos volátiles, vitaminas)
- Experiencia en la validación y puesta a punto de métodos analíticos cromatográficos (Fast GC, Conventional GC, HPLC, TLC, MPLC, 2D-TLC, latroscan, SPE)
- Experiencia en el análisis de compuestos antioxidantes (polifenoles y vitaminas especialmente)
- Experiencia en técnicas inmunológicas.
- Experiencia en el tratamiento estadístico especializado.
- Experiencia en el manejo de muestras biológicas (plasma, eritrocitos, suero, leche materna) y muestras alimentarias.
- Experiencia en la redacción de publicaciones científicas y de procedimientos normalizados de trabajo según la normativa ISO-9000.

REFERENCIAS

López-Sabater M. Carmen, PhD

Researcher and Lecturer in Pharmacy and Food Science
Head of the Research Group: Nutritional and Technological Properties of Lipids.
Dept. Nutrition and Food Science
Faculty of Pharmacy
University of Barcelona (Spain)
Av. Joan XXIII, s/n
E-08028 Barcelona, Spain.
E-mail: mclopez@ub.edu
Tel. 34 93 402 45 08

Kiely Mairead, PhD

Researcher and Lecturer in Nutrition
Dept. Nutritional and Food Sciences
University College Cork
College Road
Cork, Ireland
E-mail: m.kiely@ucc.ie
Tel: 353.21.4903394
Fax: 353.21.4270244

George K. Paschos PhD

Postdoctoral Research Fellow
FitzGerald Lab
Institute for Translational Medicine and Therapeutics
829 Biomedical Research Building II/III
University of Pennsylvania
421 Curie Boulevard
Philadelphia, PA 19104
Tel +1 215 898 0255/0256
Fax +1 215 573 9004
gpaschos@mail.med.upenn.edu

Schobel Willfried, PhD

Technical Director
Naturin GmbH & Co.
Badeniastrasse 13
69469 Weinheim
E-mail: schobel@naturin.viscofan.com
Fax: 49 6201 86485

Coderch Negra Luisa, PhD

Researcher in Chemistry
Lipid Structure Research Group
The Chemical and Environmental Research Institute of Barcelona (IIQAB)
Spanish National Research Council (C.S.I.C.)
Jordi Girona St., 18-26
08034 Barcelona, Spain
E-mail: lcnesl@iiqab.csic.es
Tel. 34 93 400 61 79
Fax: 34 93 204 59 04

(More references contacts are kindly available by request)