



EFFECTE DELS CANVIS TERAPÈUTICS DE L'ESTIL DE VIDA SOBRE LA FUNCIÓ ENDOTELIAL AVALUADA PER TONOMETRIA ARTERIAL PERIFÈRICA

Jordi Merino Ribas

Dipòsit Legal: T.1560-2013

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Jordi Merino Ribas

**EFECTE DELS CANVIS TERAPÈUTICS DE L'ESTIL DE VIDA
SOBRE LA FUNCIO ENDOTELIAL AVALUADA PER TONOMETRIA
ARTERIAL PERIFERICA**

TESI DOCTORAL

Dirigida pel Prof. Lluís Masana Marín

Unitat de Medicina Vasculard i Metabolisme
Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi
Departament de Medicina i Cirurgia
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Programa de Doctorat: BIOMEDICINA



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

2013



Autorització del director/a o codirector/s/a/es de la tesi doctoral

DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL	
Títol de la tesi doctoral EFECTE DELS CANVIS TERAPÈUTICS DE L'ESTIL DE VIDA SOBRE LA FUNCIÓ ENDOTELIAL AVALUADA PER TONOMETRIA ARTERIAL PERIFÈRICA	
Doctorand/a JORDI MERINO RIBAS	
Programa de Doctorat / Programa Oficial de Postgrau BIOMEDICINA	
Departament MEDICINA I CIRURGIA	Grup de recerca UNITAT DE MEDICINA VASCULAR I METABOLISME UNITAT DE RECERCA EN LÍPIDS I ARTERIOSCLEROSI
Director/a LLUÍS MASANA MARÍN	Correu electrònic del Director/a luis.masana@ur.cat
Codirector/a RAIMON FERRÉ VALLES NÚRIA PLANA GIL	Correu electrònic del Codirector/a rferre@grupsagessa.cat nplana@grupsagessa.cat
Tutor/a (si s'escau)	Correu electrònic del Tutor/a

INFORME DEL DIRECTOR DE TESI		
Els (co)director/s sotasignats emeten l'informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit, en base a la revisió dels següents elements de qualitat:		
	SI	NO
La tesi consisteix en un treball original de recerca	X	
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	X	
Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	X	
La metodologia està descrita	X	
Hi consta el procediment	X	
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	X	
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	X	
La bibliografia està ben reflectida	X	
D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques:		
Negative effect of a low-carbohydrate, high-protein, high-fat diet on small peripheral artery reactivity in patients with increased cardiovascular risk Jordi Merino, Richard Kones, Raimon Ferré, Núria Plana, Josefa Girona, Gemma Aragonés, Daiana Ibarretxe, Mercedes Heras and Luis Masana.		
Long-chain n-3PUFA consumption improves small peripheral artery function in patients at increased cardiovascular risk Jordi Merino, Aleix Sala-Vila, Richard Kones, Raimon Ferré, Núria Plana, Josefa Girona, Daiana Ibarretxe, Mercedes Heras, Emilio Ros, Lluís Masana.		
Even low physical activity levels improve vascular function in overweight and obese postmenopausal women Jordi Merino, Raimon Ferré Josefa Girona, Dolors Aguas, Anna Cabré, Núria Plana, Angels Vinuesa, Daiana Ibarretxe, Josep Basora, Carme Buixadera and Lluís Masana.		
Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi:		

I en conclusió, s'emet l'informe FAVORABLE pel tràmit de dipòsit de la tesi doctoral i posterior defensa pública.

....., de..... de 2011

Nom i cognoms:
Director/a de la tesi

Nom i cognoms:
Codirector/a (si s'escau)

Nom i cognoms:
Codirector/a (si s'escau)

*En memòria dels que ja no hi són però que
estarien orgullosos d'aquest treball.*

Agraïments

El treball que teniu a les mans reflecteix l'esforç, dedicació i trajectòria professional de moltes persones. Avui sóc jo qui firma aquesta tesi doctoral, però sense l'empenta, guia, constància, passió i ganes de fer les coses ben fetes que han mostrat el meu director de tesi, el Prof. Lluís Masana, i els co-directors Núria Plana i Raimon Ferré, aquest treball no hagués estat possible. Vull agrair-los tot el que m'han ensenyat durant aquest temps d'elaboració de la tesi, tant en l'àmbit laboral com en el personal.

He tingut la gran sort de poder formar part d'un equip líder en l'àmbit de la recerca en lípids i malaltia cardiovascular. M'agradaria agrair a tots els membres de la URLA el fet d'haver compartit estones de ciència on hem discutit projectes, hipòtesis i articles, i molts bons moments lúdics. Així mateix com a tots els membres del Servei de Medicina Interna i Nutrició que m'ajuden dia a dia.

Voldria agrair la tasca que han fet la majoria de docents que he tingut en la meva formació acadèmica. Especialment al professor de química a Batxillerat, Josep Maria Casas, qui em va despertar un interès especial, i el professor Jordi Salas-Salvadó, del qual tinc molt present la seva frase "el coneixement és de la persona que el te".

En aquest apartat d'agraïments voldria fer menció als amics del poble, especialment al Malloí Nolla i Lluís Pomares, als amics corredors d'Obrint Traça i a tota la comunitat "runner" que comparteixo al whatsapp.

A la Marta, per transmetre'm la seva energia positiva, entusiasme, detalls i ganes de fer coses. Com sempre em diu ella "Junts anem més lluny".

Finalment a la meva família, especialment a la meva mare, al barber i al meu avi, els quals m'han motivat sempre a tirar endavant, m'han recolzat en els moments bons i també en els difícils.

Moltes gràcies a tots.

Índex

1. Presentació i Justificació	17
2. Introducció	21
2.1 MALALTIA CARDIOVASCULAR I ARTERIOSCLEROSI.....	23
2.1.1 Definició i epidemiologia.....	23
2.1.2 Factors de risc cardiovascular i malaltia cardiovascular	24
2.1.2.1 Obesitat, Síndrome Metabòlica, Diabetis Tipus 2 i Malaltia Cardiovascular	28
2.1.2.2 Menopausa	30
2.1.3 Patogènia de l'arteriosclerosi.....	32
2.1.4 Disfunció endotelial i arteriosclerosi	34
2.1.4.1 Patogènia	34
2.1.4.2 Relació entre disfunció endotelial i arteriosclerosi	36
2.2 AVALUACIÓ DE L'ARTERIOSCLEROSI SUBCLÍNICA.....	37
2.2.1 Concepte i justificació	37
2.2.2 Gruix íntima-mitja carotidi.....	38
2.2.2.1 Definició.....	38
2.2.2.2 GIMc i canvis terapèutics sobre l'estil de vida	39
2.2.3 Avaluació de la funció endotelial	40
2.2.3.1 Mètodes d'avaluació clínica de la funció endotelial	41
2.2.3.1.1 Test intracoronari d'Acetilcolina	41
2.2.3.1.2 Dilatació Mediada per Flux (FMD)	42
2.2.3.1.3 Tonometria Arterial Perifèrica (PAT)	42
2.2.3.2 Mètodes d'avaluació bioquímica de la funció endotelial.....	46
2.2.3.2.1 ICAM-1 VCAM-1	47
2.2.3.2.2 E-selectina	48
2.2.3.2.3 Molècules mediadores de la inflamació (TNF- α , IL-6, PCR)	48

2.2.3.2.4 Partícules LDL oxidades (LDLox)	50
2.3 CANVIS TERAPÈUTICS SOBRE L'ESTIL DE VIDA	51
2.3.1 Definició i importància.....	51
2.3.1.1 Evidències de l'impacte global dels canvis terapèutics de l'estil de vida en front el risc cardiovascular	51
2.3.2 Alimentació, risc cardiovascular i arteriosclerosi subclínica	53
2.3.2.1 Antecedents	53
2.3.2.2 Patró de consum Mediterrani, risc cardiovascular i arteriosclerosi	54
2.3.2.3 Model de consum Mediterrani, inflamació i funció endotelial	56
2.3.2.4 Greixos de la dieta i funció endotelial; paper dels Omega-3.....	59
2.3.2.5 Dieta baixa en hidrats de carboni	64
2.3.2.5.1 Dieta baixa en hidrats de carboni i funció endotelial	66
2.4 ACTIVITAT FÍSICA, RISC CARDIOVASCULAR I ARTERIOSCLEROSI	68
2.4.1 Evidència científica	68
2.4.2 Tipus d'activitat física.....	69
2.4.3 Activitat física i funció endotelial.....	71
2.5 TABAC, RISC CARDIOVASCULAR I ARTERIOSCLEROSI	72
2.5.1. Epidemiologia i evidències	72
2.5.2. Fumadors passius.....	73
2.5.3. Tabac i disfunció endotelial	74
3. Raó de la Tesi.....	77
4. Hipòtesi i Objectius	81
4.1 HIPÒTESI	83
4.1 OBJECTIU ESTUDI CLÍNIC 1	84

4.2 OBJECTIU ESTUDI CLÍNIC 2	85
4.3 OBJECTIU ESTUDI CLÍNIC 3	86
5. Materials i Mètodes	87
5.1 PACIENTS I DISSENY DE L'ESTUDI.....	89
5.2. AVALUACIÓ CLÍNICA I NUTRICIONAL.....	90
5.2.1. Low Carbohydrate Diet Score (LCDS) i Índex de dieta Mediterrània	90
5.3. ESTUDIS VASCULARS I D'IMATGE	92
5.3.1 Avaluació de la funció endotelial de petita artèria	92
5.3.2 Determinació del gruix íntima-mitja carotidi	93
5.3.3 Determinació del greix abdominal	94
5.4 DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES	95
5.5 ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES.....	97
6. Resultats.....	99
Estudi 1; SaRHI – score de dieta baixa en hidrats de carboni	101
Estudi 2; SaRHI – greixos poliinsaturats w-3 de cadena llarga	111
Estudi 3; SaRHI – nivells baixos d'activitat física	141
7. Discussió	151
8. Conclusions	163
9. Perspectives Futures.....	167
10. Referències.....	171

1. Presentació i Justificació

1. Presentació i Justificació

El projecte de la tesi doctoral que us presento s'ha realitzat a la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme i a la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. La Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi (URLA) pertany al departament de Medicina i Cirurgia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili. La tesi doctoral ha estat dirigida pel Prof. Lluís Masana, la Dra. Núria Plana i el Dr. Raimon Ferré.

Un dels objectius de la medicina, a més de curar les malalties, és prevenir l'aparició d'aquestes, alleugerar el patiment i perllongar la vida. L'enfoc clínic de la Unitat es centra en prevenir, diagnosticar i tractar les malalties que predisposen a l'arteriosclerosi, mentre que en la vessant bàsica, les línies de recerca estan dirigides a estudiar els mecanismes de desenvolupament de l'arteriosclerosi, relacionar la predisposició genètica amb el fenotip clínic i investigar en l'àmbit epidemiològic amb la finalitat d'utilitzar aquest coneixement per poder-ne fer la transferència a l'activitat clínica. Actualment, les malalties cardiovasculars són la primera causa de mortalitat a Catalunya així com a la resta del món; per tant, unitats específiques en aquest àmbit són de gran importància per a la societat.

Els estudis epidemiològics han revelat que l'arteriosclerosi és una malaltia progressiva i multifactorial, resultat de diversos factors ambientals i genètics. En el nostre projecte hem intentat contribuir, des del punt de vista preventiu i terapèutic, a la lluita del que s'ha considerat l'epidèmia més important del segle XXI. Des d'un punt de vista científic, aquesta tesi pretén aportar noves dades sobre la importància de la prevenció de l'arteriosclerosi i el tractament dels

1. Presentació i Justificació

factors de risc, aportant noves evidències sobre l'efecte dels canvis terapèutics de l'estil de vida i la funció endotelial de petita artèria, el primer pas en el desenvolupament de la lesió de les artèries. Els resultats de l'estudi ens podrien ajudar a entendre millor la relació de la disfunció endotelial, els moduladors ambientals i els biomarcadors vasculars, així com esdevenir una eina útil per a la prevenció de la malaltia cardiovascular.

La tesi està dividida en diferents apartats. La Introducció, que proporciona un ampli punt de vista sobre l'arteriosclerosi i on es recullen aspectes epidemiològics, fisiopatologia, factors de risc cardiovascular i eines per a avaluar l'arteriosclerosi subclínica que seran d'utilitat per poder entendre el curs del treball. Un apartat important de la introducció està focalitzat en l'efecte que tenen els canvis terapèutics de l'estil de vida sobre el risc cardiovascular, l'arteriosclerosi i la disfunció endotelial. A continuació, la Raó de la Tesi, Hipòtesi i els Objectius que justifiquen el desenvolupament dels estudis. Tot seguit, els Materials i els Mètodes utilitzats per dur a terme tots els experiments i valoracions. Els resultats s'han descrit en tres manuscrits dels quals dos han estat recentment publicats en revistes d'àmbit internacional i d'impacte reconegut en el camp de la nutrició, malaltia vascular i l'arteriosclerosi. L'altre es troba sotmès a revisió editorial en una revista internacional. Després, la Discussió, les Conclusions finals de la tesi i les Perspectives Futures. Finalment, les Referències de tota la bibliografia consultada.

En els laboratoris de la URLA es treballa segons el sistema de la norma de qualitat ISO 9001 garantint els resultats obtinguts en aquesta tesi.

2. Introducció

2. Introducció

2.1 MALALTIA CARDIOVASCULAR I ARTERIOSCLEROSI

2.1.1 Definició i epidemiologia

En el concepte de la malaltia cardiovascular s'inclouen les malalties arterials del cor, la malaltia cerebrovascular i les vasculars perifèriques. La malaltia cardiovascular deguda a l'arteriosclerosi inclou la malaltia isquèmica coronària, l'accident vascular cerebral o ictus, l'aneurisma d'aorta abdominal i la malaltia vascular perifèrica. La malaltia cardiovascular és la principal causa mundial de morbimortalitat. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) estima que l'any 2008, 17.3 milions de persones van morir com a conseqüència de les malalties cardiovasculars. La tendència de les darreres dècades en la que aquesta malaltia afectava majoritàriament als països desenvolupats s'ha trencat, observant actualment que fins el 80% de les morts d'origen cardiovascular tenen lloc en països pobres o països en vies de desenvolupament. Es calcula que l'any 2030 fins a 23.6 milions de persones, un 36% més respecte el 2008, moriran com a conseqüència de la malaltia cardiovascular ¹. Concretament, a Espanya, 125.000 morts anuals es deuen a l'aterosclerosi, 5 milions de persones ingressen a l'hospital a causa de la malaltia i més de 560.000 pacients són donats d'alta de l'hospital amb el diagnòstic de malaltia cardiovascular ². La interacció entre l'envelliment de la població i un estil de vida, cada vegada menys saludable amb el conseqüent augment significatiu del pes corporal, són els principals desencadenants d'aquest augment progressiu de la malaltia cardiovascular que s'ha convertit en l'epidèmia del segle XXI.

2. Introducció

2.1.2 Factors de risc cardiovascular i malaltia cardiovascular

Els factors de risc cardiovasculars són els determinants que, d'acord amb els estudis epidemiològics, condicionen una major probabilitat o risc de tenir una malaltia cardiovascular, i que es relacionen amb un increment de la mortalitat per aquesta causa. Els factors de risc cardiovascular es diferencien entre els no modificables (edat, gènere i condicionants genètics) i els modificables. S'han descrit molts factors de risc cardiovascular modificables, però els que confereixen un risc més elevat degut a la seva aterogenitat són: la diabetis, la hipertensió arterial, la dislipèmia, l'obesitat abdominal, el tabac, el sedentarisme i el mal hàbit alimentari ³. El control dels factors de risc cardiovascular es tradueix en una disminució significativa dels events cardiovasculars. Resultats de metanàlisis recents conclouen que la disminució de les concentracions de colesterol LDL, en 1 mmol/L (38.6mg/dl), es relaciona amb una disminució del risc relatiu de mortalitat cardiovascular del 28%, i d'un 26.6% en patir algun event cardiovascular ⁴. Per altra banda, el control de la pressió arterial, sobretot de la pressió arterial sistòlica, es relaciona amb una disminució significativa dels events cardiovasculars, especialment l'íctus i l'infart de miocardi. Les dades actuals mostren que la reducció de 5mmHg en la pressió arterial pot disminuir el risc d'íctus fins un 34% i de malaltia isquèmica coronària fins un 21% ⁵. En la població diabètica, el tractament hipolipemiant i hipotensor s'ha relacionat amb una clara reducció del risc relatiu de morts cardiovasculars i events cardiovasculars majors. S'ha observat que la disminució d'1mmol/L de colesterol LDL en població diabètica redueix la mortalitat cardiovascular en un 13% i els events vasculars majors en un 21% ⁶. Estudis de seguiment a gran escala observen que l'adopció d'un estil de vida saludable (basat en l'abstinència tabàquica, l'activitat física, l'alimentació i el control ponderal) podria relacionar-

2. Introducció

se amb una disminució del 69% de morts per infart de miocardi en homes i en un 81% en dones després d'un seguiment de 14 anys ⁷. La pèrdua de pes és una eina efectiva per a la disminució del risc cardiovascular i la taxa de mortalitat cardiovascular. L'últim informe de l'OMS destaca que 2.8 milions de persones moren cada any com a conseqüència de ser obesos o tenir sobrepès ¹. Dades recents mostren que seguir una patró de consum considerat com dieta Mediterrània explica fins un 30% en la prevenció de les malalties cardiovasculars prematures ⁸. Estudis prospectius mostren una forta relació entre el tabaquisme i la malaltia isquèmica coronària: s'ha observat que l'hàbit tabàquic condiona un increment entre el 30 i el 35% de tenir un event cardiovascular prematur ⁹. Referent a l'activitat física, les evidències científiques mostren que el risc de malaltia cardiovascular entre les persones sedentàries comparat amb els no sedentaris és almenys dues vegades major ^{9, 10}. Degut a aquestes evidències, l'American Heart Association (AHA) ha desenvolupat el concepte de prevenció primordial per definir un estat òptim de salut cardiovascular. Aquest estat es fonamenta en 7 punts bàsics per a la prevenció de la malaltia cardiovascular, 4 hàbits relacionats amb un estil de vida saludable (realitzar exercici moderat de forma habitual, una alimentació saludable, absència de tabaquisme i un índex de massa corporal (IMC) inferior a 25kg/m²) i el control de 3 factors de risc cardiovascular com són la pressió arterial, el colesterol i els nivells de glucosa ¹¹ (Figura 1).

2. Introducció

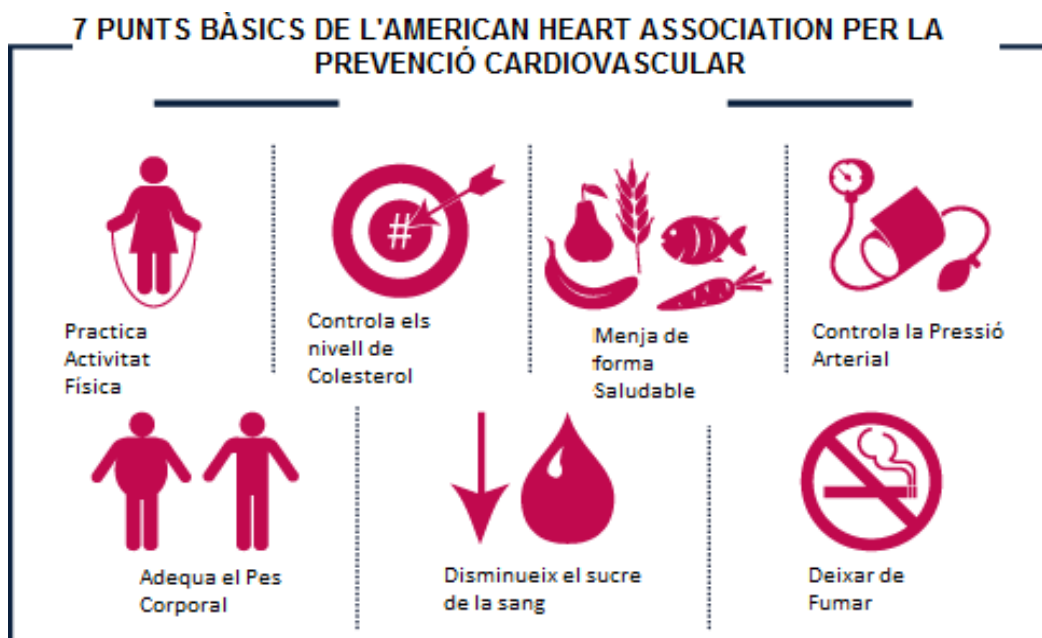


Figura 1. Els 7 punts bàsics per la prevenció cardiovascular. AHA 2012. Disponible a <http://mylifecheck.heart.org>

2.1.2.1 Obesitat, Síndrome Metabòlica, Diabetis Tipus 2 i Malaltia Cardiovascular

L'obesitat és la malaltia metabòlica amb més prevalença en els països desenvolupats i continua augmentant de manera progressiva. Dades de la OMS situen la prevalença de sobrepès per sobre del 34% a nivell mundial ¹. En països com els Estats Units o països de l'est d'Europa aquesta prevalença es situa per sobre del 65%. El percentatge d'obesos es troba a nivell mundial en el 10% dels homes i el 14% de les dones, amb un clar increment des de l'any 1980 quan es situava al 5% en homes i 8% en dones ¹. Aquest augment és d'especial importància en les persones més joves on la prevalença d'obesitat continua a l'alça. Dades de l'informe de la Sociedad Española para el Estudio De la Obesidad (SEEDO) situen la prevalença d'obesitat a l'estat espanyol en un 15.5%, 13.2% dels homes i 17,5% de les dones ¹². L'obesitat es defineix quan l'índex de massa

2. Introducció

corporal (la relació entre el pes i la talla de l'individu) és igual o superior a 30kg/m^2 . El criteri d'obesitat abdominal ens dona una major informació de la localització del greix; així, segons NCEP/ATP III (National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III) s'estableix el diagnòstic d'obesitat abdominal quan el perímetre abdominal és superior a 102cm en els homes i 88cm en les dones. L'obesitat, i especialment l'obesitat abdominal, comporta un risc especial associat a mortalitat cardiovascular ja que condiciona una alteració metabòlica important degut a una disfunció progressiva del teixit adipós. El teixit adipós és l'òrgan d'emmagatzematge i mobilització del greix de l'organisme i el seu interès ha augmentat per la seva funció com a òrgan endocrí, ja que té la capacitat d'alliberar una gran quantitat de molècules, adipoquines, com la Interleuquina 6 (IL-6), molècules proinflamàtores, com el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α), i mediadors bioactius com l'adiponectina i la leptina, que influeixen no només en l'homeòstasi del greix corporal, sinó també en la resistència a la insulina, la diabetis, la inflamació i el procés arterioscleròtic ¹³. El patró de producció de les adipoquines canvia en l'obesitat i la diabetis, on s'observa una disminució de les molècules que exerceixen efectes protectors, com l'adiponectina, i augmenten aquelles que tenen accions proinflamàtores, com la leptina, el TNF- α o la IL-6, que promouen l'expressió de biomarcadors endotelials (E-selectina, VCAM1, ICAM1) els quals afavoreixen el dany vascular i la disfunció endotelial (Figura 2).

2. Introducció

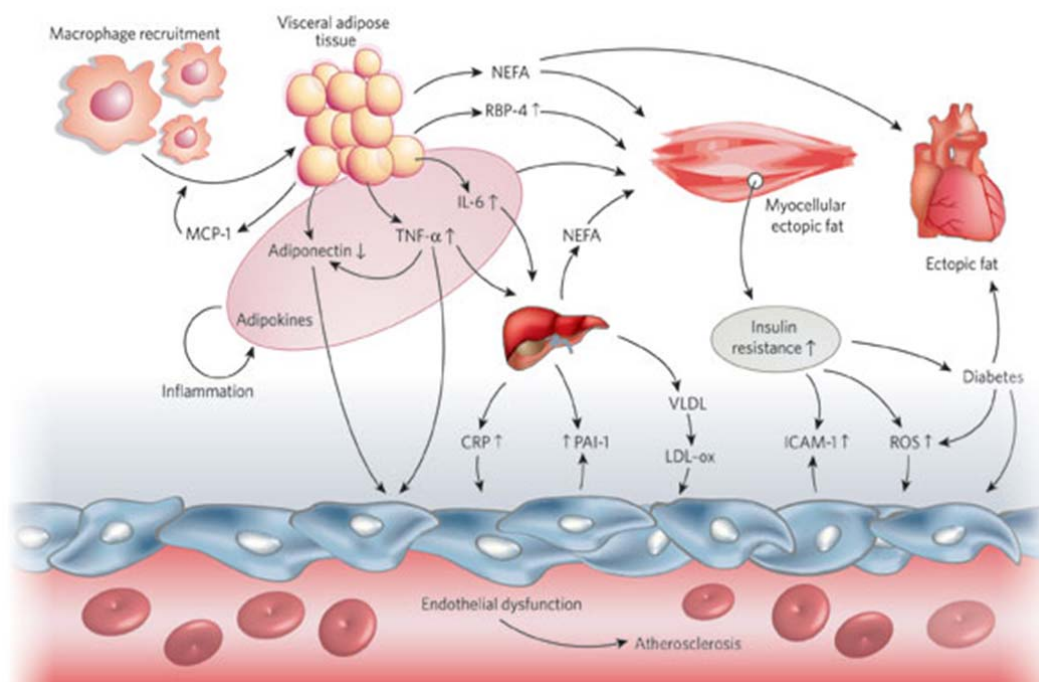


Figura 2. Mecanismes que relacionen l'obesitat amb la malaltia cardiovascular. Van Gaal L et al. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. Nature 2006 ¹⁴. Reproduïda amb el permís de l'autor i de la revista.

Dades de l'estudi epidemiològic diabet@s, dissenyat per identificar la prevalença de diabetis a Espanya, mostren que, a l'estat espanyol, aquesta és del 13.8% ajustat per edat i gènere. S'observa que almenys un 30% de la població té alguna alteració en el metabolisme de la glucosa, definit com glucèmia basal alterada o intolerància al test de sobrecàrrega oral de la glucosa ¹⁵. En l'estudi s'ha observat que fins el 80% dels diabètics tenen obesitat abdominal, per tant el paper del greix abdominal en la diabetis sembla ser fonamental. A més de l'alteració proinflamatòria que exerceix el greix visceral sobre l'endoteli, l'augment de mediadors de la inflamació condueix a un estat de resistència a la insulina degut a la interacció entre molècules inflamatòries com la proteïna C-reactiva (PCR) o el TNF- α i el receptor de la insulina. Es coneix que l'estat de resistència a la insulina produeix una profunda alteració del metabolisme energètic, repercutint en el perfil lipoproteic. Els pacients amb obesitat

2. Introducció

abdominal o diabetis tipus 2 presenten freqüentment hipertrigliceridèmia, disminució de colesterol HDL i increment de les partícules petites i denses de colesterol LDL, a més d'increment d'apolipoproteïna B, augment dels àcids grassos lliures circulants i hiperlipèmia postprandial ¹⁶. Aquest entramat metabòlic es coneix com a síndrome metabòlica i va ser descrit per Reaven a finals de la dècada dels 90 ¹⁷. Existeix la controvèrsia sobre si aquest conjunt d'alteracions metabòliques donen un especial risc cardiovascular, ja que per sí soles aquestes alteracions ja eren suficientment aterògenes. Avui en dia, amb el coneixement de gran part de les bases fisiopatològiques d'aquesta alteració metabòlica i el successiu desajust fisiològic que s'ocasiona en la síndrome metabòlica, es justifica la importància del diagnòstic d'aquesta entitat patològica per identificar al pacient amb elevat risc cardiovascular ¹⁸. Existeixen diverses definicions internacionals que han estat proposades per l'OMS, l'EUA National Cholesterol Education Program (NCEP/ATPIII) l'any 2001 i la Federació Internacional de Diabetis (IDF) el 2005, entre d'altres, classificades en la Taula 1. Totes aquestes definicions comparteixen els components essencials: alteracions del metabolisme de la glucosa, obesitat, hipertensió i dislipèmia. Tot i així, difereixen en el concepte de la mesura de l'obesitat abdominal, ja que és un element obligatori segons la IDF, però no en l'ATPIII. Aquest fet a portar a terme a l'elaboració d'un document consens sobre l'harmonització dels criteris diagnòstics del síndrome metabòlic ¹⁹. Aquest document destaca que la obesitat abdominal no ha de ser un element obligatori pel diagnòstic del síndrome metabòlic, però que és una eina útil de cribatge de la malaltia.

2. Introducció

Taula 1. Definicions de la síndrome metabòlica segons els diferents organismes.

Organització Mundial de la Salut	NCEP / ATPIII	Federació Internacional de Diabetes
Diabetis o alteració de la glucosa en dejú o defecte en la tolerància a la glucosa o resistència a la insulina		Obesitat central definida Homes ≥ 94 cm; Dones ≥ 80 cm en europeus
Dos o més dels següents criteris:	Tres o més dels següents criteris:	Dos o més dels següents criteris:
Relació cintura-cadera: H > 0.90 ; D > 0.85 i/o IMC > 30 kg/m ²	Perímetre abdominal (cm): H > 102 ; D > 88	Perímetre abdominal (cm): H > 102 ; D > 88
Pressió Arterial (mmHg): $\geq 140/90$ o tractament hipotensor	Pressió Arterial (mmHg): $\geq 130/85$ o tractament hipotensor	Pressió Arterial (mmHg): $\geq 130/85$ o tractament hipotensor
TG (mg/dl) ≥ 150 o tractament hipolipemiant i/o HDL (mg/dl) H < 35 D < 40	TG (mg/dl): ≥ 150 o tractament hipolipemiant HDL (mg/dl): H < 40 ; D < 50	TG (mg/dl): ≥ 150 o tractament hipolipemiant HDL (mg/dl): H < 40 ; D < 50
Microalbuminúria: relació de l'excreció en l'orina d'albúmina (mg/ml) ≥ 20 o relació albúmina/creatinina (mg/g) ≥ 30	Glucosa plasmàtica en dejú (mg/dl) ≥ 110	Glucosa plasmàtica en dejú (mg/dl) ≥ 100

Abreviacions: ATP, Adult Treatment Panel; IMC, índex de massa corporal; HDL, lipoproteïna d'alta densitat; NCEP, National Cholesterol Education Program; TG, triglicèrids.

2.1.2.2 Menopausa

L'OMS defineix la menopausa com la desaparició permanent de la menstruació després de 12 mesos consecutius d'amenorrea sense causa patològica justificada²⁰. La menopausa podria definir-se fisiològicament com una pèrdua de la resposta ovàrica a l'estimulació de les gonadotropines, fet que provoca una caiguda plasmàtica dels nivells d'estrògens²¹. Estudis a gran escala han observat que el risc cardiovascular de les dones post menopàusiques és equivalent o superior al dels homes de la mateixa edat. Dades del Framingham Heart Study van associar la menopausa amb un increment del risc de malaltia coronària a 10

2. Introducció

anys de 4.1 vegades superior en comparació a les dones de la mateixa edat sense menopausa ²². Dades del Nurse's Health Study van descriure un risc relatiu de malaltia coronària d'1.7 en dones post menopàusiques. Tot i així, quan aquesta observació es va ajustar per l'edat i l'hàbit tabàquic, el risc relatiu va deixar de ser estadísticament significatiu²³. Per tant, el fet sumatori de diferents factors de risc cardiovascular pot multiplicar de forma exponencial el risc cardiovascular de la dona post menopàusica. Estudis clínics mostren que el risc relacionat amb la menopausa és bàsicament degut a la sobtada interrupció en la secreció d'estrògens, els quals tenen efectes beneficiosos indirectes sobre el perfil lipídic, el control glucèmic i efectes directes sobre el funcionament de la paret arterial. S'ha observat que els estrògens tenen accions importants en l'alliberament d'òxid nítric, actuen com a calci-antagonistes i tenen un efecte antiploriferatiu de les cèl·lules musculars llises ²⁴. La menopausa freqüentment s'associa a hipertensió degut a l'efecte del'augment de pes i sobretot del greix abdominal, resistència a la insulina, retenció de sodi, augment de la viscositat sanguínia i increment de la proliferació de les cèl·lules musculars llises que determina un augment de la resistència perifèrica ²⁵ Degut a la desaparició en la secreció d'estrògens/andrògens s'afavoreix el dipòsit abdominal de greixos amb augment del greix visceral ²⁶, aquest fet és de gran rellevància clínica i condiciona un augment del risc cardiovascular, especialment en aquelles dones que no realitzen activitat física. Estudis clínics d'intervenció concloen que la pràctica d'activitat física habitual d'intensitat moderada o alta es relacionen amb una millora significativa del control dels factors de risc cardiovascular, especialment en la hipertensió arterial, la diabetis, la dislipèmia o l'obesitat abdominal ^{27,28}. Dades recents evidencien que la pràctica habitual d'activitat física moderada en aquest col·lectiu de risc cardiovascular augmentat es

2. Introducció

relaciona amb una menor progressió del gruix íntima mitja carotídi després de 4 anys de seguiment. Altres marcadors d'arteriosclerosi subclínica com la inflamació²⁹ i la disfunció endotelial, avaluada mitjançant tècniques clíniques de vasodilatació o biomarcadors plasmàtics, milloren després d'una intervenció sobre l'activitat física en dones post menopàusiques obeses³⁰⁻³². Tot i aquest clar efecte beneficiós de l'activitat física sobre el risc cardiovascular global i els marcadors d'arteriosclerosi subclínica, alguns tipus d'activitat física s'han relacionat amb un increment de la inflamació i estrés oxidatiu a curt termini, fet que comporta controvèrsia en l'efecte d'alguns tipus d'activitat física sobre la millora de la funció endotelial^{33,34}.

2.1.3 Patogènia de l'arteriosclerosi

L'arteriosclerosi és el procés progressiu d'acumulació de lípids, components del sistema immunitari i elements de fibrosi a la paret de l'artèria que provoca progressivament l'oclusió de la llum del vas³⁵. Estudis clínics mostren que l'arteriosclerosi és una malaltia multifactorial essent el resultat de diferents factors genètics i ambientals^{3, 35,36}. L'arteriosclerosi es considera un procés dinàmic i gradual de disfunció de l'endoteli i de progressió de les cèl·lules musculars llises (Figura 3a). Estudis patològics revelen l'aparició d'una sèrie de canvis en els vasos durant l'aterogènesi i mostren el paper fonamental de les cèl·lules inflamatòries, particularment de monòcits/macròfags en la progressió del procés^{3, 36}. Estudis in vitro suggereixen diverses possibles vies d'iniciació i progressió de la malaltia. Tot i així, la principal evidència és el paper clau que desenvolupa l'endoteli, permetent i induint l'acumulació de partícules de colesterol LDL en l'espai subendotelial, el reclutament de monòcits, la inflamació

2. Introducció

i la formació de cèl·lules escumoses. La formació de cèl·lules escumoses té lloc a partir de l'entrada de colesterol LDL de l'espai subendotelial al macròfag, principalment pels receptors scavengers³⁷. Aquestes cèl·lules, en disposar-se en forma de capes estratificades a l'íntima arterial, formen l'anomenada estria grassa (Figura 3b). Les estries grasses no són clínicament significatives, però són les precursoras de les lesions més avançades que es caracteritzen per l'acumulació de lípids i restes necròtiques. Si el procés de proliferació continua, l'estria grassa pot evolucionar cap a una lesió més avançada o placa d'ateroma, que conté major riquesa lipídica i restes cel·lulars (Figura 3c). A més, les plaques poden arribar a ser cada vegada més complexes, amb calcificació, ulceració a la superfície luminal, i presència de lesions hemorràgiques que hi creixen. Encara que les lesions avançades poden produir símptomes d'isquèmia com a resultat d'una progressiva oclusió de la llum vascular, la complicació clínica més important és la ruptura de la placa ateromatosa i la formació d'un trombe, donant lloc a la malaltia vascular coronària o accident cerebrovascular (Figura 4d)^{3, 36, 38}.

2. Introducció

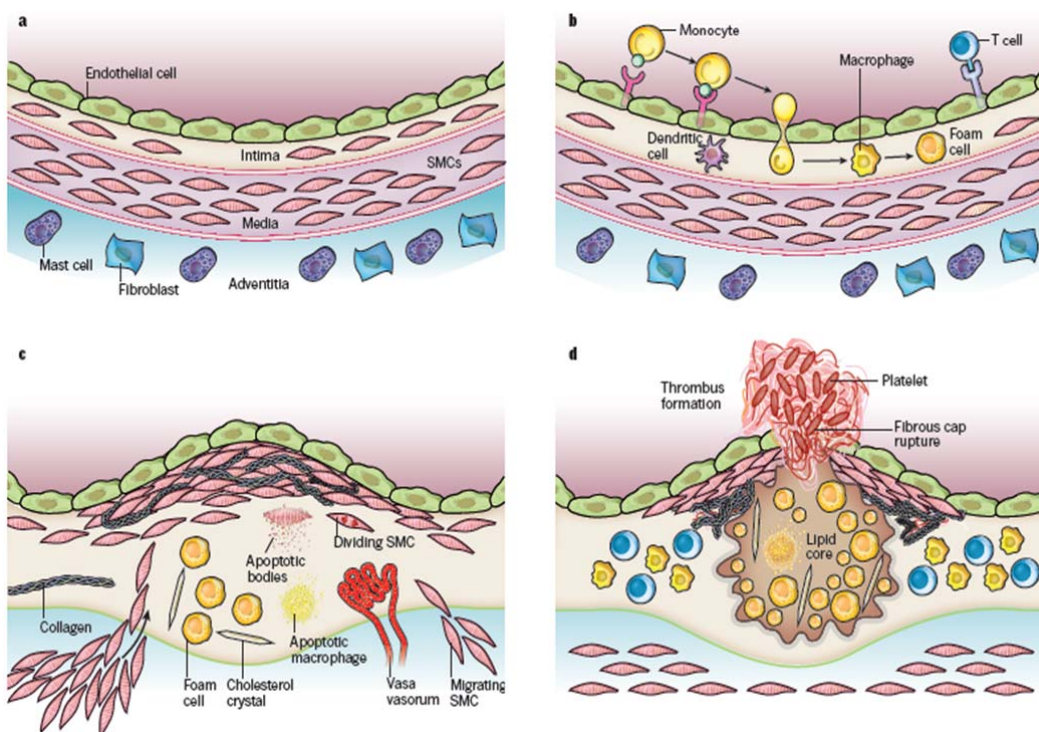


Figura 3. Estadis en el desenvolupament de la lesió arterioscleròtica. Libby P et al. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature 2011 ³⁶. Reproduïda amb permís de l'autor i de la revista.

2.1.4 Disfunció endotelial i arteriosclerosi

2.1.4.1 Patogènia

L'endoteli vascular és una monocapa de cèl·lules que recobreix la llum del vas. La integritat de les cèl·lules, i per tant de la paret vascular, és un element crític per preservar l'homeòstasi vascular que inclou la regulació de la permeabilitat vascular i transport de molècules, que contribueixen al manteniment del to vascular regulant el balanç de molècules vasodiladores i vasoconstrictores i proporcionen una superfície no adherent pels leucòcits circulants ³⁹. El procés de disfunció endotelial involucra cèl·lules endotelials de la paret vascular, monòcits,

2. Introducció

limfòcits, citokines proinflamatòries, chemoquines, factors de creixement i espècies reactives de l'oxigen altament influenciades per l'ambient ^{36,39}. L'activació i la disfunció endotelial, que apareixen en el primer estadi de l'aterogènesi, es caracteritzen per l'augment de la permeabilitat vascular a les lipoproteïnes, augment del reclutament de leucòcits, reducció de la producció d'òxid nítric i desequilibri de factors protrombòtics i antitrombòtics ⁴⁰. Entre els agents que actuen sobre l'efecte de reclutament de monòcits, trobem les molècules d'adhesió (selectines i integrines) i les substàncies quimioattractants (proteïna quimiotàctica de monòcits, MCP-1) expressades a la superfície endotelial. Com es mostra a la Figura 4, les selectines (E- i P-selectina) promouen una unió transitòria dels monòcits a l'endoteli anomenada "rolling", de manera que augmenta el temps de contacte que permet la unió amb les integrines (VCAM1 i ICAM1). L'augment de permeabilitat vascular dóna lloc a la captació del subendoteli de partícules LDL circulants, les quals interaccionen amb els proteoglicans de la matriu subendotelial, afavorin la retenció i els processos de modificació proteolítica i oxidativa, passant a ser altament aterogèniques ⁴¹.

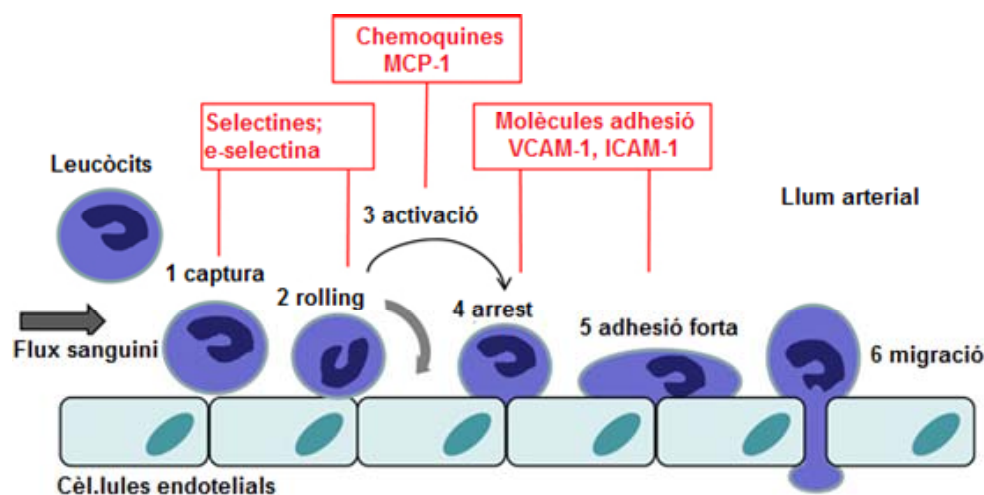


Figura 4. Adhesió dels leucòcits i migració. Adaptat de Wallboys C et al. El paper dels determinats sanguinis en la transmissió de leucòcits. F1000 Prime Reports 2011 ⁴⁰

2.1.4.2 Relació entre disfunció endotelial i arteriosclerosi

2. Introducció

Estudis clínics i de laboratori mostren que les alteracions en la funció endotelial precedeixen el desenvolupament de canvis morfològics que contribueixen a la progressió i el desenvolupament de l'arteriosclerosi. Treballs experimentals pioners durant la dècada dels 80, utilitzant cèl·lules aïllades de paret arterial, van demostrar que l'estimulació d'aquestes cèl·lules amb acetilcolina donava lloc a una vasodilatació, que es relaciona amb la presència d'un endoteli sa ⁴². Es va demostrar que aquesta resposta estava provocada per l'òxid nítric (NO). Altres treballs en humans a finals de la dècada dels 80 i principis dels 90 van demostrar que la infusió introcoronària d'acetilcolina, en pacients sotmesos a implantacions de catèters cardíacs, va provocar una vasodilatació reflexa endoteli-dependent atribuïble a l'alliberació d'òxid nítric per part de l'endoteli ^{43, 44}. Actualment es coneix que la síntesi d'òxid nítric juga un paper clau en la preservació de l'homeòstasi vascular. Tot i així, altres factors com els determinats hemodinàmics, les propietats de les proteïnes de la paret arterial, els estímuls endocrins o l'estímul del sistema nerviós simpàtic, juguen un paper clau en la preservació de la funcionalitat de l'endoteli vascular en un territori arterial o altre. Així, s'ha descrit que en artèries grans, o també anomenades artèries de conducció (diàmetre > 2.5cm), la vasodilatació arterial està influenciada per les característiques de les proteïnes elàstiques de la làmina elàstica arterial interna i pels determinants hemodinàmics ⁴⁵⁻⁴⁷. En artèries mitjanes, o també anomenades artèries musculars (diàmetre entre 10mm i 0.3mm), la vasodilatació està principalment associada a les característiques del flux sanguini, l'estímul del sistema nerviós simpàtic i per la capacitat d'alliberació d'òxid nítric per les cèl·lules endotelials. En artèries petites, o també anomenades artèries de resistència (diàmetre entre 300 i 10 µm, la vasodilatació està modulada per l'efecte del sistema nerviós simpàtic, estímuls endocrins i per la capacitat

2. Introducció

d'alliberar òxid nítric per part de l'endoteli ^{45,48}. Un mecanisme que sembla comú en tot el territori arterial i que s'ha descrit com a desencadenant de la disfunció endotelial és la incapacitat per reparar el dany endotelial per part de les cèl·lules endotelials. Quan es produeix una injúria de manera continuada sobre l'endoteli, els mecanismes reparadors d'aquest dany fracassen i això condueix a un major nombre de cèl·lules endotelials disfuncionants, les quals es caracteritzen per un fenotip pro-inflamatori, pro-oxidatiu i pro-aterogènic. Aquest fenomen condueix a l'acúmulo i formació de plaques d'ateroma en àrees de baixa tensió de flux, una condició que promou la contínua acumulació local de lípids, de mediadors de la inflamació, de marcadors de l'estrès oxidatiu, el trencament de la matriu cel·lular i la progressió de la placa ^{39,49}.

2.2 AVALUACIÓ DE L'ARTERIOSCLEROSI SUBCLÍNICA

2.2.1 Concepte i justificació

L'avaluació clínica de l'arteriosclerosi és una eina que ajuda a estratificar el risc cardiovascular de manera independent de la presència dels factors de risc cardiovascular clàssics ⁵⁰⁻⁵². L'avaluació del risc cardiovascular es basa en càlculs sobre la presència de factors de risc clàssics, principalment l'edat, el gènere, el tabaquisme, la diabetis, la pressió arterial i els nivells de colesterol, i fa referència a la probabilitat de tenir un event cardiovascular major en els pròxims 10 anys de vida, quan s'utilitzen les equacions de predicció del risc de Framingham ⁵³, o de mortalitat als 10 anys quan s'utilitzen les equacions de predicció europees del Score ⁵⁴.

2. Introducció

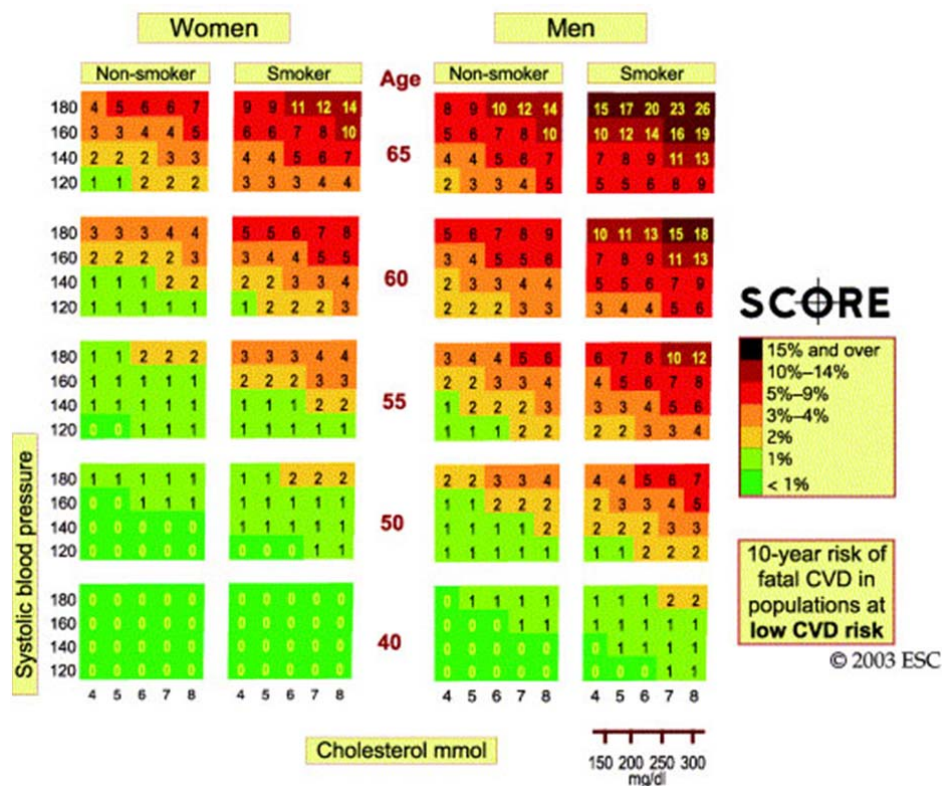


Figura 5. Taules d'avaluació del risc de patir un event cardiovascular mortal en els pròxims 10 anys per a la població Europea. SCORE.

Degut a que el cribatge poblacional no es relaciona directament amb el risc individual, les tècniques d'imatge i funcionalitat de les artèries ens haurien d'ajudar a una millor predicció del risc cardiovascular global individual ^{55,56}.

2.2.2 Gruix íntima-mitja carotídi

2.2.2.1 Definició

La determinació per ultrasons del gruix íntima-mitja carotídi (GIMc) es basa en la determinació de la distància entre la interfase llum-endoteli vascular i mitja-adventícia. El GIMc es considera un indicador de l'edat arterial, i alguns estudis han demostrat que l'addició d'aquesta variable a l'equació de Framingham

2. Introducció

millora la predicció del risc ⁵¹. La detecció del GIMc per ecografia és un mètode fiable, reproduïble i no invasiu per l'avaluació de l'arteriosclerosi subclínica. Estudis clínics han demostrat que la determinació del GIMc es relaciona de forma potent amb altres tècniques d'imatge que es poden utilitzar per l'avaluació de l'arteriosclerosi subclínica, com són la ressonància magnètica nuclear o la determinació de calci coronari. A la pràctica clínica habitual està recomanada com eina de cribatge d'arteriosclerosi subclínica en aquells individus amb risc cardiovascular moderat ⁵¹. El GIMc es relaciona amb la presència de factors de risc associats com el tabaquisme, la hipertensió, la hipercolesterolèmia o la diabetes, entre d'altres ⁵².

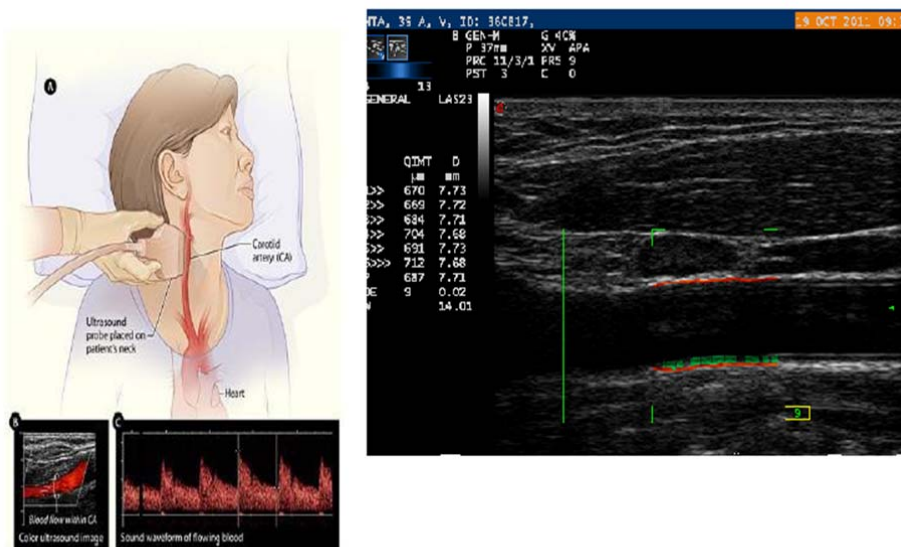


Figura 6. Avaluació de l'arteriosclerosi subclínica mitjançant la determinació del GIMc.

2.2.2.2 GIMc i canvis terapèutics sobre l'estil de vida

L'evidència que els canvis terapèutics de l'estil de vida influeixen sobre el GIMc és força robusta. Recentment s'han publicat diferents estudis observacionals i de seguiment que vinculen el tabaquisme, l'activitat física i l'alimentació amb el GIMc ⁵⁷⁻⁶¹. S'ha observat que el tabac podria ser el factor ambiental més

2. Introducció

relacionat amb el GIMc, ja que són molts els estudis d'intervenció que relacionen l'hàbit tabàquic amb un deteriorament progressiu de la disfunció endotelial i engruiximent del complex íntima-mitja ^{59,61}. Estudis recents mostren com alguns tipus de greixos, en concret el consum de greixos monoinsaturats, presents en l'oli d'oliva, el consum d'aliments rics en greixos omega-3 o el patró de consum mediterrani pot tenir un paper beneficiós en la progressió del GIMc ^{60, 62, 63}. L'efecte beneficiós que s'atribueix a aquests nutrients o a aquest patró de consum es deu a la capacitat per interferir en les vies d'inflamació i oxidació relacionades amb l'augment del dany vascular i progressió del dipòsit lipídic subendotelial quan es comparan amb el consum de greixos saturats ⁶². Altres factors ambientals, com el consum d'enol o l'augment en el nivell d'activitat física, també es relacionen de forma directe i beneficiosa amb aquest paràmetre de risc cardiovascular global ^{57,64,65}. El nostre grup ha observat prèviament que una intervenció global intensiva sobre els factors ambientals com el tabac, l'activitat física i l'alimentació es relaciona amb una menor progressió del GIMc després d'un any de seguiment en comparació a una intervenció convencional sobre aquests factors ⁵⁹.

2.2.3 Avaluació de la funció endotelial

La funció endotelial és la capacitat que té l'endoteli arterial per preservar la homeostasi de la paret vascular. La principal funció de l'endoteli vascular és mantenir del tó vascular, fet que permet mantenir una pressió intravascular que faciliti la perfusió tissular ³⁶. L'avaluació de la funció endotelial és difícil i en general es basa en mesures indirectes que inclouen la determinació de la funció endotelial mitjançant biomarcadors plasmàtics, que són un reflex de la

2. Introducció

funcionalitat de l'endoteli arterial, o mitjançant tècniques clíniques de provocació de resposta vasodilatadora.

No existeixen fins al moment estudis clínics d'intervenció a gran escala que permetin estratificar el risc cardiovascular dels pacients en funció del valor de la determinació de la funció endotelial. Tot i així, el nostre grup ha descrit prèviament que la determinació clínica de la funció endotelial de petita artèria és una eina que es podria utilitzar per monitoritzar la progressió d'increment del gruix íntima-mitja carotídi ⁵⁹. Dades recents demostren que la determinació de la funció endotelial de petita artèria mitjançant la tonometria arterial perifèrica (PAT) es podria relacionar amb futures hospitalitzacions cardíaques ⁶⁶. També s'ha observat mitjançant aquest mètode que, el valor de la determinació de la funció endotelial dona una predicció més acurada del desenvolupament d'insuficiència cardíaca a llarg termini ⁶⁷. Estudis que utilitzen la tècnica de la dilatació mediada per flux (FMD) per determinar la funció endotelial observen que aquesta determinació pot donar una major predicció en el desenvolupament de la malaltia cardiovascular ⁶⁸.

2.2.3.1 Mètodes d'avaluació clínica de la funció endotelial

2.2.3.1.1 Test intracoronari d'Acetilcolina

Per estudiar la funció de les artèries a finals de la dècada dels 80 s'utilitzava l'administració intrarterial de substàncies vasodilatadores com l'acetilcolina, l'adenosina o la papaverina. Diferents estudis van relacionar l'administració d'acetilcolina intracoronària, en pacients sotmesos a la implantació d'un catèter, amb major vasodilatació coronària ⁶⁹. Es considera el mètode gold estàndard per estudiar la dilatació mediada per òxid nítric, tot i que és un mètode invasiu.

2. Introducció

2.2.3.1.2 Dilatació Mediada per Flux (FMD)

Les tècniques clíniques utilitzades per avaluar la funció endotelial es fonamenten amb la determinació de la vasodilatació reflexa posterior a una isquèmia arterial transitòria induïda. L'any 1992 es va constatar l'existència d'un nou mètode per induir la resposta vasodilatadora arterial de forma no invasiva en artèries de conducció. La dilatació mediada per flux (FMD) en l'artèria braquial es podia determinar mitjançant ultrasons, i era un subrogat de la funció de l'òxid nítric ⁴⁴. Aquesta metodologia es basa en la mesura ecogràfica del diàmetre de l'artèria braquial abans i després de la isquèmia induïda. La dilatació de 5-10 minuts, després de la isquèmia, és mediada per l'endoteli i depenent de NO, per tant, la FMD reflecteix la funció vasodilatadora depenent de l'endoteli. Les anomalies derivades es consideren un marcador de dany en la funció endotelial ⁷⁰. La FMD es veu disminuïda en pacients amb arteriosclerosi, amb factors de risc cardiovascular i millora amb la teràpia per minvar el risc cardiovascular. La FMD s'associa amb els biomarcadors plasmàtics de funció endotelial, incloent-hi els nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants ⁷¹. És el mètode d'avaluació de funció endotelial amb més estudis que ho recolzen, però la utilització en la pràctica clínica no ha estat generalitzada degut a la infraestructura necessària per portar a terme les determinacions, la seva alta dependència dels intercanvis d'operador i la seva variabilitat inter-assaig ⁷².

2.2.3.1.3 Tonometria Arterial Perifèrica (PAT)

La tonometria arterial perifèrica (PAT) és un mètode fiable, reproducible i operador independent ⁷³⁻⁷⁵, el qual és capaç de detectar alteracions vasculars en artèries de petit tamany ^{76,77}. L'aparell Endo-PAT2000 determina el valor d'hiperèmia reactiva post-isquèmia com a índex de mesura de la funció endotelial

2. Introducció

(saRHI). PAT és una tecnologia no invasiva que estudia les variacions en l'amplitud de l'ona de pols arterial (PWA) del dit de la mà amb bio-sensors digitals. Aquests sensors valoren els canvis en el volum digital a través d'ones de pols, les quals són percebudes per un transductor de pressió i analitzades directament per un software específic. La metodologia de la tècnica està descrita en l'apartat de materials i mètodes.

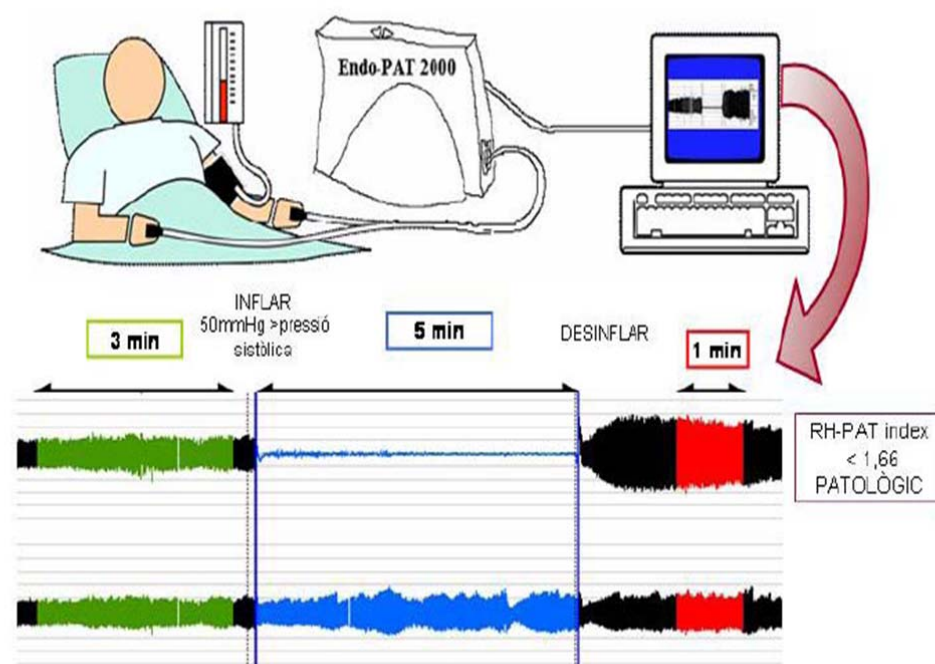


Figura 7. Esquema de la determinació de la funció endotelial de petita artèria mitjançant l'aparell EndoPAT2000.

Aquest mètode ha estat comparat amb el gold estàndard (AchCV), observant-se una bona sensibilitat i especificitat ⁷³. També està relacionat amb el mètode de l'artèria braquial FMD ⁷⁸. Els estudis més rellevants d'aquesta metodologia es troben a la taula 2.

2. Introducció

Taula 2. Revisió dels estudis clínics més significatius de la funció endotelial de petita artèria realitzats amb PAT.

Referència	Població estudiada	Detalls de l'estudi	Resultats importants
Morris et al 2013 ⁸⁰	855 pacients amb FRCV	Avaluació de la FE en funció de la raça	La raça negra disminució de la FE i rigidesa arterial.
Aversa et al 2013 ⁸¹	44 dones obesas	Intervenció per avaluar la pèrdua de pes, funció sexual i la FE	La intervenció més intensiva és relaciona amb major pèrdua de pes i millora de la FE.
Torimoto et al 2013 ⁸²	57 pacients diabètics	Avaluació de la glucèmia i FE	Les fluctuacions en la glucosa relacionades amb la FE.
Westerink et al 2013 ⁸³	100 pacients amb OA	Tractament hipolipemiant en monoteràpia o teràpia combinada durant 6setm	No diferències en la FE.
Flammer et al 2013 ⁸⁴	84 participants amb FRCV	Suplementació amb antioxidants	No diferències en la FE.
Akiyama et al 2012 ⁶⁷	494 pacients amb Insuf C.	Seguiment de 20 mesos per avaluar diferències entre ICC i no ICC	FE inferior en pacients amb ICC associat a un increment de la predicció d'events CV.
Mellor et al 2012 ⁸⁵	10 pacients amb DM2	Ingesta de xocolata amb polifenols i sense polifenols	Xocolata alta amb polifenols relacionat amb millora de la FE.
Skulas-Ray et al 2011 ⁸⁶	26 pacients amb HTG	Suplementació amb EPA/DHA	No millora de la FE amb suplementació amb EPA/DHA.
Fukao et al. 2011 ⁸⁷	17 pacients amb HTA	Tractament hipotensor, 2 fàrmacs calci-antagonistes	No diferències en la FE entre grups d'estudi.
Hamburg 2011 et al ⁷⁷	1843 pacients amb FRCV	PAT i FMD simultani	No correlació entre les dues tècniques.
Ferré et al 2011 ⁸⁸	816 pacients amb FRCV	PAT i FRCV	HDL, ApoA1 relacionat positiu amb PAT, Tabac i Perímetre abdominal negatiu
Rubinshtein et al. 2010 ⁶⁶	329 pacients amb FRCV	PAT i events CV. Seguiment de 7anys	PAT s'associa a la malaltia cardiovascular i identifica els pacients amb risc CV
Matsuzawa et al. 2010 ⁸⁹	140 dones amb angina de pit	PAT i predicció de risc d'isquèmia coronària	El valor de PAT és inferior en pacients amb isquèmia.
Hamburg et al. 2008 ⁷⁵	1957 adults amb FRCV	PAT i factors de risc CV	PAT inferior en homes, obesitat, perfil lipídic alterat, DM2, tabac, tractament amb hipolipemiant.
Dhindsa et al. 2008 ⁴⁵	40 adults sans	PAT i FMD mesurat simultàniament	PAT i FMD correlacionen amb la resposta hiperèmica.
Aversa et al. 2008 ⁹⁰	20 DM2	Tractament amb sildenafil. PAT i FMD	El sildenafil augmenta la resposta hiperèmica de PAT i FMD.

2. Introducció

Taula 2. Continua.

Referència	Població estudiada	Detalls de l'estudi	Resultats importants
Haller et al. 2007 ⁷⁶	44 nens	PAT (DM1 vs. no DM1)	El valor de PAT és inferior en nens diabètics.
Bonetti et al. 2004 ⁷³	94 pacients amb MCV (catèter)	PAT i valoració de la resposta amb Ach	El valor de PAT és inferior en pacients amb disfunció endotelial coronària.
Kuvin et al. 2003 ⁷⁴	89 pacients amb angina de pit	PAT FMD i simultani	PAT i FMD correlacionen i amb els factors de risc CV, i amb l'estrés.
Bonetti et al. 2003 ⁹¹	23 adults amb angina de pit	Tractament amb fàrmac adequat	El valor de PAT augmenta després del tractament.

Abreviacions: PAT, Tonometria arterial perifèrica; FMD, Dilatació mediada per flux; Ach, Test d'acetilcolina; FRCV, Factors de Risc Cardiovascular; HTA Hipertensió Arterial DM2, Diabetis Melitus Tipus 2; HTG, Hipertrigliceridemia; ICC Insuficiència Cardíaca Crònica

Estudis previs mostren la correlació del saRHI amb el Framingham Risk Score en una població general ^{75,79}. La capacitat predictiva de la mesura de saRHI ha estat recentment demostrada i s'han associat valors de PAT disminuïts, que indiquen disfunció endotelial amb el risc d'aparició de malaltia CV ^{66,67}. S'ha establert que un valor de l'índex de la hiperèmia reactiva inferior a 1,66 indicaria una funció endotelial anormal. No obstant això, els valors del rang normal probablement varien en funció de la població, zona geogràfica i estil de vida. Els resultats del nostre grup indiquen que el saRHI pot millorar amb una intervenció intensiva sobre els canvis terapèutics de l'estil de vida, i que la major progressió d'aquest índex es relaciona amb una menor progressió del GIMc ⁵⁹. Hem observat en una cohort amb més de 800 participants amb risc cardiovascular moderat o alt que el tabaquisme, el perímetre abdominal i les concentracions d'HDL i apolipoproteïnaA1 són els majors moduladors del valor de saRHI ⁸⁸. En una cohort de pacients amb obesitat mòrbida sotmesos a una intervenció nutricional amb ingrés hospitalari per perdre pes, es va observar que la pèrdua de pes era el

2. Introducció

major dels moduladors de la millora del saRHI observada ⁹². Hem descrit que les concentracions plasmàtiques de FABP4 (fatty acid binding protein 4), es relacionen amb disfunció endotelial de petita artèria en pacients diabètics tipus 2

⁹³.

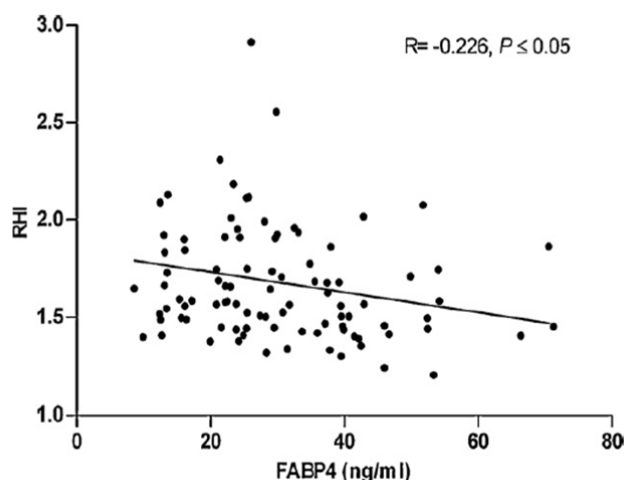


Figura 8. Relació entre els nivells de FABP4 i el valor RHI. Aragonés et al. Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2010 ⁹³.

Per contra, l'augment d'activitat física comporta una disminució de les concentracions de FABP4 que es relaciona amb una millora de la funció endotelial ⁹⁴. Així mateix, hem observat una relació significativa i inversa entre els nivells de biomarcadors plasmàtics de funció endotelial com la E-selectina, sVCAM-1 i LDLox amb el saRHI ⁹⁵.

2.2.3.2 Mètodes d'avaluació bioquímica de la funció endotelial

L'avaluació de la funció endotelial es pot determinar mitjançant biomarcadors plasmàtics que ens indiquen l'estat de l'endoteli vascular. En els últims anys, degut a la evolució de tècniques de laboratori més precises i sensibles, es poden estudiar una gran varietat de biomarcadors de funció endotelial. Entre elles destaquen les molècules d'adhesió, un grup de proteïnes heterogènies

2. Introducció

responsables de l'adhesió recíproca entre els diferents tipus cel·lulars com cèl·lules endotelials, monòcits, limfòcits, plaquetes, cèl·lules musculars llises o bé entre cèl·lules i la matriu extracel·lular. En estudis previs s'han classificat aquestes molècules en sis tipus de molècules d'adhesió: integrines (VLA-4), selectines (P-, E- selectines), immunoglobulines (ICAM1, VCAM1, PECAM-1), cadherines, proteoglicans i mucines ^{36,96}. Les molècules d'adhesió poden expressar-se constitutivament a la superfície de la membrana cel·lular o bé per la inducció d'un estímul. La interacció entre l'endoteli i els leucòcits circulants a través d'integrines, selectines i immunoglobulines és clau en el reclutament d'aquests durant la disfunció endotelial i el desenvolupament de la lesió arterioscleròtica ³⁵.

2.2.3.2.1 ICAM-1 VCAM-1

ICAM1 (molècula d'adhesió intercel·lular 1) i VCAM1 (molècula d'adhesió vascular 1) són molècules d'adhesió que actuen com a lligands endotelials de les integrines expressades en els leucòcits i les plaquetes. La seva funció és facilitar l'adhesió endotelial i la transmigració dels leucòcits circulants a l'espai subendotelial. Aquestes molècules s'expressen principalment en les cèl·lules endotelials; tot i així, també poden expressar-se en cèl·lules musculars llises i monòcits i, per tant, no es poden considerar específiques de l'endoteli ⁹⁷. L'expressió d'ICAM1 i VCAM1 està augmentada en resposta a l'estímul de citokines inflamatòries i LDL oxidades. S'han observat concentracions plasmàtiques elevades d'ICAM-1 i VCAM-1 en individus amb malaltia coronària ^{98, 99}, increment del GIMc ¹⁰⁰ i diabetis ¹⁰¹. Estudis recents mostren com l'activitat física podria ser el factor ambiental amb més capacitat per modular les concentracions plasmàtiques d'ICAM-1 i VCAM-1 ^{102, 103}. El nostre grup ha descrit

2. Introducció

prèviament que les concertacions de VCAM-1 es relacionen de forma inversa amb l'índex d'hiperèmia reactiva en pacients amb risc cardiovascular moderat o alt ⁹⁵.

2.2.3.2.2 E-selectina

L'E-selectina és una proteïna d'adhesió cel·lular expressada només en les cèl·lules endotelials activades per citoquines. Durant la inflamació l'E-selectina promou la unió transitòria dels monòcits a l'endoteli, de manera que augmenta el temps de contacte per permetre la unió a les integrines ¹⁰⁴. Amb tècniques de laboratori es pot mesurar l'E-selectina circulant ja que és secretada per l'acció d'una proteasa o bé alliberada pel dany vascular. Estudis previs han observat que l'E-selectina està augmentada en pacients amb malaltia cardiovascular, diabetis tipus 2, dislipèmia o hipertensió arterial ^{105,106}. S'ha descrit, en estudis d'intervenció, que els canvis terapèutics d'estil de vida poden disminuir els nivells d'E-selectina plasmàtica ¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. Dades recents del nostre grup observen com les variacions en E-selectina són un predictor independent de la determinació clínica de la funció endotelial en pacients amb risc cardiovascular moderat o alt ⁹⁵.

2.2.3.2.3 Molècules mediadores de la inflamació (TNF- α , IL-6, PCR)

La inflamació té un paper clau en l'inici i progressió de l'arteriosclerosi, per tant, estudiar les concentracions plasmàtiques de mediadors de la inflamació com el TNF- α , la IL-6 o la PCR s'ha postulat per millorar l'estratificació del risc cardiovascular.

El TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral α) es sintetitza fonamentalment en el macròfag, però també en l'adipòcit. El TNF- α pot exercir efectes perjudicials sobre la funció vascular a través de diversos mecanismes ¹⁰⁹. Entre aquests mecanismes destaca la inducció de l'activació del factor de transcripció NF-kB

2. Introducció

amb forta repercussió sobre la inflamació local, la disminució en la biodisponibilitat d'òxid nítric per la inhibició de la síntesi d'eNOS i l'estimulació de la producció de la proteïna C reactiva, que juga un paper important en la resposta inflamatòria sistèmica ^{109, 110}. L'alimentació, el tabaquisme i l'activitat física tenen un fort impacte en les concertacions plasmàtiques d'aquest mediador de la inflamació. Estudis recents mostren com la suplementació de la ingesta amb omega 3 es tradueix en una reducció del 12% dels nivells de TNF- α en comparació amb placebo després de 4 mesos d'intervenció en un grup de 138 pacients de mitjana edat amb obesitat i sedentarisme ¹¹¹. Dades d'estudis asiàtics mostren com la ingesta habitual de productes de soja es relaciona de forma inversa amb els nivells de TNF- α en dones obeses ¹¹². Dades de l'estudi MESA conclouen que el comportament sedentari s'associa a un patró no favorable d'inflamació de forma independent del grau d'adipositat de l'individu ¹¹³.

La interleuquina 6 (IL-6) forma part de les citoquines, i és produïda pel macròfag i l'adipòcit. Estudis previs suggereixen que la IL-6 pot participar en el desenvolupament de l'aterosclerosi, ja que s'expressa en les cèl·lules escumoses i en cèl·lules musculars llises de les lesions ateromatoses. S'ha observat que durant la pràctica d'activitat física, la IL-6 estimula la lipòlisi del teixit adipós fet que provoca l'estimulació de la producció hepàtica de glucosa i l'augment de la sensibilitat d'IL-6 al múscul esquelètic, afavorint la resistència a la insulina ¹¹⁴. Referent a l'alimentació, hi ha estudis petits que mostren com dietes riques en polifenols o antioxidants en general es tradueixen en un millor perfil inflamatori global on s'inclou la IL-6 i el TNF- α ¹¹⁵.

La proteïna C reactiva (PCR) és un reactant de fase aguda de la inflamació secretada pel fetge. S'ha demostrat que té un efecte directe en la paret arterial

2. Introducció

com a proteïna proaterogènica, ja que està relacionada amb la reducció de la producció de NO, prostaciclina i estimulació de la producció d'endotelina -1, molècules d'adhesió, MCP-1 i interleuquines ¹¹⁶. També s'indueix l'expressió del factor tissular i de les espècies reactives d'oxigen (ROS) i la secreció d'altres citoquines proinflamatòries en macròfags. Existeixen moltes evidències que relacionen els canvis terapèutics de l'estil de vida i els nivells de PCR. S'ha descrit que la pèrdua de pes, l'augment de l'activitat física, l'abandó del tabaquisme i el consum de polifenols i antioxidants contribueixen a aquesta disminució ¹¹⁷⁻¹¹⁹.

2.2.3.2.4 Partícules LDL oxidades (LDLox)

Les lipoproteïnes oxidades tenen un paper clau en el desenvolupament del procés arterioscleròtic. Les lipoproteïnes circulants, principalment LDL, poden travessar l'endoteli danyat, a causa de l'augment de la permeabilitat vascular, i acumular-se en l'espai subendotelial. Les LDL oxidades atrauen els monòcits cap a l'íntima on es diferencien en macròfags. La internalització de partícules oxidades per part dels macròfags a través dels seus receptors dóna lloc a la producció de cèl·lules escumoses que promou la formació de la placa d'ateroma ^{35,36}. Per tant, la presència de les LDL oxidades afavoreix la formació de cèl·lules escumoses, l'augment de l'adhesió leucocitària, l'atracció de monòcits, el creixement i diferenciació de monòcits, l'activació dels macròfags i la síntesi de citoquines proinflamatòries, l'afectació del to vascular, l'augment de la permeabilitat vascular i coagulació, la citotoxicitat i la proliferació de les cèl·lules musculars llises ^{3, 36}. S'ha vist que el tractament amb antioxidants retarda la progressió de la lesió arterioscleròtica degut a la parcial inhibició de la formació de LDL oxidades, si bé aquestes observacions experimentals no s'han pogut traduir a la

2. Introducció

clínica ¹²⁰. Estudis clínics mostren com el tabaquisme podria ser el principal factor ambiental associat a un increment de la formació de LDL oxidada ¹²¹, i per altra banda l'activitat física moderada ajuda a la disminució de les concentracions de LDL oxidada ¹²².

2.3 CANVIS TERAPÈUTICS SOBRE L'ESTIL DE VIDA

2.3.1 Definició i importància

Els canvis terapèutics sobre l'estil de vida (CTEV) fan èmfasi a un patró alimentari saludable, activitat física d'intensitat baixa-moderada de forma regular, l'abstinència del consum de tabac i combatre l'estrès diari. La intervenció sobre aquests factors ambientals ha demostrat ser beneficiosa no tant sols en el maneig del risc cardiovascular, referent a la prevenció de l'aparició d'events cardiovascular i/o en la incidència dels factors de risc cardiovasculars ¹²³⁻¹²⁶, sinó també davant d'altres malalties cròniques com el càncer, les malalties pulmonars o algunes malalties neurodegeneratives ¹²⁷.

2.3.1.1 Evidències de l'impacte global dels canvis terapèutics de l'estil de vida en front el risc cardiovascular

Les evidències més robustes que un estil de vida saludable és útil en la prevenció el risc cardiovascular es fonamenten amb els estudis observacionals de gran escala. Així, l'estudi Health Professional Follow-Up Study (HPFUS) va incloure l'any 1986, 42.847 homes que no fumaven, tenien un IMC inferior a 25kg/m², realitzaven almenys 30 minuts al dia d'activitat física moderada, consumien alcohol de forma moderada (5-30g/dia) i seguien una alimentació saludable

2. Introducció

segons l'índex de patró de consum saludable establert per la USDA (Departament d'agricultura dels E.E.U.U.). Després de 16 anys, es va observar que els homes que seguien les 5 pràctiques van disminuir en un 87% el seu risc relatiu d'events cardiovasculars, mentre que els que adoptaven almenys dos d'aquests pràctiques tenien una disminució del 27% del seu risc de tenir events cardiovasculars ¹²⁸. Aquests resultats es van confirmar a posteriori amb les dades de l'estudi de les infermeres (Nurse's Health Study) on es van observar percentatges semblants de reducció de risc relatiu de malaltia cardiovascular ¹²⁹. Estudis europeus a gran escala, com la cohort EPIC-Norfolk que va seguir 20.244 homes i dones del Regne Unit durant 11 anys, va avaluar com 4 simples hàbits de salut afectaven la mortalitat. Els hàbits de salut van ser: no fumar, fer activitat física de forma habitual, beure alcohol de forma moderada i consumir almenys 5 racions al dia entre fruita i verdura. Després d'ajustar per possibles factors de confusió, el risc relatiu de mortalitat per aquells que van seguir 1, 2, 3 o 4 hàbits va ser 1.39, 1.95, 2.52 i 4.04 respectivament ¹³⁰. Dades de l'estudi Potsdam, que va incloure 23.153 ciutadans alemanys seguits durant quasi 8 anys, va utilitzar com a variables d'hàbits saludables el tabaquisme, un IMC inferior a 30kg/m², activitat física igual o superior a 3.5hores per setmana i un elevat consum en fruita i vegetals, pa integral i baix consum en carn vermella. Les variables finals d'estudi van ser la diabetis, l'infart de miocardi, l'accident vascular cerebral i el càncer. Els individus amb els 4 hàbits saludables van tenir una disminució del risc del 78% en el desenvolupament de qualsevol de les 4 patologies. L'adherència a un sol hàbit de salut va disminuir fins al 50% el risc d'una malaltia crònica ¹³¹.

2. Introducció

2.3.2 Alimentació, risc cardiovascular i arteriosclerosi subclínica

2.3.2.1 Antecedents

El filòsof, metge i professor grec Hipòcrates (aprox. 460aC – aprox. 370 aC) va escriure "Som el que mengem". Aquesta afirmació en una època no empírica té especial rellevància avui en dia ja que l'alimentació està fortament relacionada amb el desenvolupament de malalties cròniques com la diabetis, la hipercolesterolèmia o la hipertensió arterial i en el l'aparició de futurs events cardiovasculars. Les primeres dades experimentals en que l'alimentació pot prevenir aquests factors de risc cardiovasculars i els events cardiovasculars van sorgir a la dècada dels 50 dels resultats de l'estudi dels 6 països. Ancel Keys, de l'Escola de Salut Pública de la Universitat de Minnessota, va comparar la ingesta de 6 països (EUA, Japó, Canadà, Austràlia, Anglaterra, Gales i Itàlia) i va observar que l'hàbit alimentari i el tipus de greix consumit per les persones que vivien en els països de l'àrea mediterrània tenia components que prevenien la mortalitat cardiovascular ¹³².

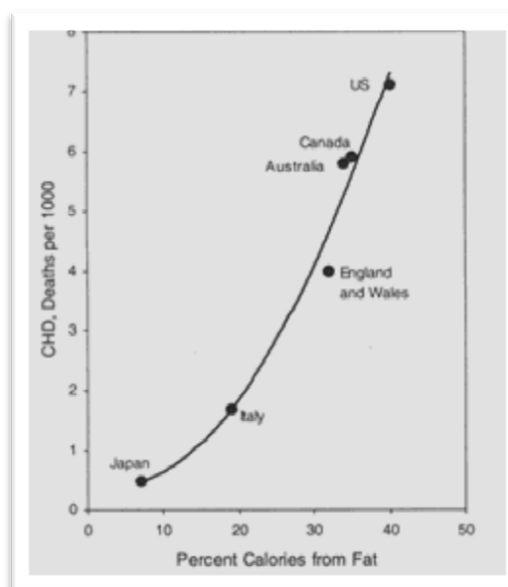


Figura 9. Relació entre el consum de greixos i la mortalitat coronària. Adaptat de Keys et al. Journal of Mount Sinai Hospital 1953;20:118-138.

2. Introducció

L'estudi es va ampliar a 7 països a principis del 1970 i és amb el nom de "L'estudi dels 7 països" amb el que s'han establert les bases de la nutrició i dietètica actual. Avui en dia són centenars els estudis epidemiològics i d'intervenció clínica que relacionen una alimentació saludable amb la supervivència o menor probabilitat de desenvolupar factors de risc cardiovascular. La recerca actual es basa en identificar aquells components alimentaris potencialment més beneficiosos en funció de la dotació genètica individual per poder optimitzar els processos fisiològics i retardar al màxim possible les alteracions metabòliques adverses.

2.3.2.2 Patró de consum Mediterrani, risc cardiovascular i arteriosclerosi

La relació entre un patró de consum alimentari conegut com patró de consum mediterrani i l'efecte beneficiós sobre els factors de risc cardiovascular global ha estat provat en molts estudis epidemiològics i d'intervenció ^{133, 134}. El patró de consum mediterrani es caracteritza per una ingesta rica en oli d'oliva, fruits secs, vegetals i cereals integrals. Un consum moderat en peix i carn magres, i un consum baix en productes làctics, carn vermella, carns processades i dolços juntament amb un consum moderat de vi, sempre dins dels àpats tal i com s'observa a la Figura 10 ¹³⁵.

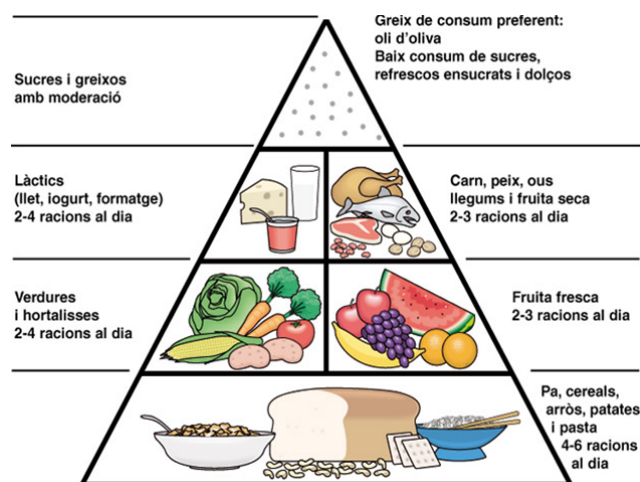


Figura 10. Piràmide del patró de consum Mediterrani.

2. Introducció

Dades d'un subestudi de l'estudi INTERHEART, en el que es van comparar 5.761 pacients que havien patit un infart de miocardi amb 10.646 persones sense malaltia cardiovascular, es va observar una relació inversa entre el patró de consum prudent (ric en fruita i verdura) i la probabilitat d'events cardiovasculars. Els autors de l'estudi van estimar que el model de consum occidental (ric en aliments precuinats, aperitius salats i carns) seria el responsable del 30% del risc atribuïble a l'infart de miocardi ⁸. En una estudi transversal, l'estudi ATTICA, en el que es van incloure 3.204 pacients amb risc cardiovascular elevat, es va observar que l'adherència a la dieta mediterrània era inversament proporcional a la presència d'algun factor de risc cardiovascular aïllat com la diabetis, la hipertensió, la dislipèmia o tots ells en conjunt ¹³⁶. L'estudi Lyon Diet Heart Study va ser un assaig clínic aleatoritzat de prevenció secundària dissenyat per avaluar si el patró de consum mediterrani era capaç de disminuir la probabilitat d'aparició d'un segon infart de miocardi després de 46 mesos de seguiment. Es va observar una reducció del risc relatiu d'infart de miocardi o mort d'origen cardíac del 47% en aquells pacients que estaven inclosos en el grup d'intervenció amb dieta mediterrània en comparació al grup control ¹³⁴. L'estudi GISSI-Prevenzione va incloure més d'11.000 pacients amb infart de miocardi que van ser assessorats per incrementar el consum d'aliments típics de la dieta mediterrània com l'oli d'oliva, verdures, fruita i peix. Després de 6.5 anys de seguiment es va observar una disminució significativa en el nombre de morts cardiovasculars entre aquells pacients que van tenir una bona adherència alimentària ¹³⁷. Fins a l'actualitat, cap estudi clínic aleatoritzat a gran escala havia avaluat l'efecte del consum d'un patró de dieta mediterrània sobre el risc cardiovascular. Aquestes evidències les ha aportat l'estudi PREDIMED. Es tracta d'un ensaig clínic, aleatoritzat, controlat i multicèntric de prevenció primària de malaltia cardiovascular que ha sigut

2. Introducció

realitzat a Espanya. En aquest estudi es van incloure 7447 participants (entre 55 i 80 anys, dels quals un 57% eren dones) amb alt risc cardiovascular, però sense diagnòstic de malaltia cardiovascular prèvia. Els participants van ser aleatoritzats a un dels tres grups d'intervenció següents: pautes de dieta mediterrània suplementada amb oli d'oliva extra verge, dieta mediterrània suplementada en fruits secs, o bé una dieta control baixa en greix (consell dietètic per reduir el consum de greix total de la dieta segons les recomanacions de la AHA). Els participants rebien sessions quadrimestrals individuals i grupals d'educació dietètica i, depenent del grup assignat, provisions gratuïtes d'oli d'oliva extra verge, diversos fruits secs (nous, avellanes i ametlles) o petits regals que no fossin aliments. L'objectiu primari de l'estudi PREDIMED era avaluar l'efecte de la dieta mediterrània sobre el risc d'esdeveniments cardiovasculars majors (infart de miocardi, accident vascular cerebral o mort cardiovascular). Després d'una mitjana de seguiment de 4.8 anys, 288 participants van patir un esdeveniment cardiovascular major. Es va demostrar que aquells participants assignats al grup de dieta mediterrània suplementada en oli d'oliva (96 esdeveniments) i els aleatoritzats a dieta mediterrània suplementada en fruits secs (83 esdeveniments) tenien, respectivament, un 30% i un 28% menys risc de patir un esdeveniment cardiovascular o mortalitat que aquells assignats a la dieta baixa en greix (109 esdeveniments majors). Durant aquest estudi no es van reportar efectes adversos de la intervenció i tampoc guany de pes corporal¹³⁵.

2.3.2.3 Model de consum Mediterrani, inflamació i funció endotelial

Estudis en animals de laboratori observen que una alimentació rica en proteïnes i greixos es relaciona amb un increment en el número i volum de plaques d'ateroma carotídies, disminució de cèl·lules progenitores endotelials circulants i

2. Introducció

augment de biomarcadors plasmàtics de disfunció endotelial ¹³⁸. Estudis clínics aleatoritzats en humans observen que el model de consum mediterrani es relaciona amb una millora de la funció endotelial de mitjana o petita artèria quan es compara amb altres patrons de consum baixos en hidrats de carboni o rics en greixos saturats ¹²⁴. La taula 3 mostra les evidències més rellevants que relacionen el patró de consum mediterrani amb la funció endotelial. Es pot observar que els estudis tenen un tamany mostral relativament petit, el temps de seguiment és força curt i que els resultats són contradictoris. L'estudi amb un major potència estadística és el Rallidis et al, en que s'inclou 90 pacients amb obesitat abdominal, seguits durant dos mesos. Els pacients van ser aleatoritzats a un grup control o a un grup de consell intensiu d'intervenció nutricional. Es va observar un augment significatiu del 2% en la vasodilatació endotelial avaluada per FMD en aquelles persones que adopten un model de consum mediterrani ¹²⁴. Cioni G et al, van observar en una cohort de 95 pacients amb risc cardiovascular moderat o alt una relació positiva entre els valors d'saRHI i la puntuació de patró de consum mediterrani. Es discuteix en aquest estudi que la relació entre el consum de vi negre i la funció endotelial va ser estadísticament significativa després d'ajustar per factors de confusió com l'edat, el gènere, l'IMC, el tabaquisme, la hipertensió o la puntuació de la dieta mediterrània ¹⁴⁰. En concordança amb aquestes observacions, alguns autors han argumentat que el model de consum mediterrani podria ser el millor patró alimentari contra la inflamació i la disfunció endotelial degut a que es caracteritza per un elevat consum en greixos saludables, fibra i components antioxidants^{139,149-153}.

2. Introducció

Taula 3. Estudis d'evidència entre patró de consum mediterrani i la determinació de la funció endotelial.

Referències	Població estudiada	Detall de l'estudi	Mètode utilitzat	Resultat important
Klonizakis M, 2013 ¹³⁹	22 sedentaris sense FRCV	Combinació d'activitat física i DM o dieta habitual. 8 setmanes	LDF + ACh	DM amb pauta d'activitat física millora la FE.
Cioni et al 2013 ¹⁴⁰	95 pacients amb FRCV	Puntuació de DM i FE	PAT	Major puntuació de DM millor FE.
Fernández JM, 2012 ¹⁴¹	45 pacients amb SM	Efecte combinat de DM amb o sense activitat física. 12 setmanes.	PAT	saRHI millora en aquells que fan DM i activitat física.
Marin C, 2012 ¹⁴²	12 pacients d'edat avançada	3 tipus d'intervencions nutricionals. 4 setmanes cadascuna.	In vitro (HUVEC).	DM protegeix cèl·lules de l'estrès oxidatiu, prevé senescència cel·lular i redueix apoptosi.
Thomazella MC, 2011 ¹⁴³	40 pacients amb SCA	DM vs. Dieta baixa en greix. 3 mesos.	FMD	No diferències entre FE segons intervenció.
Marin C, 2011 ¹⁴⁴	20 participants sans d'edat avançada	3 tipus d'intervencions nutricionals. 4 setmanes cadascuna.	EPC	DM reducció del dany endotelial i millora la capacitat regenerativa de l'endoteli.
Pérez-Martínez P, 2010 ¹⁴⁵	Participants amb SM	4 intervencions amb diferent composició en AGS, AGM i suplementos omega-3.	FMD i Biomarcadors	AGM millora la FE i ICAM-1.
Rallidis LS, 2009 ¹²⁴	90 individus amb obesitat abdominal sense DM2	2 grups de DM, un amb supervisió i l'altre sense. 8 setmanes.	FMD	Adherència DM millora la FE.
Buscemi S, 2009 ¹⁴⁶	20 dones amb sobrepès o obesitat	DM i dieta baixa en CH. 8 setmanes	FMD i Biomarcadors	Dieta baixa en CH disminueix FE.
Fuentes F, 2008 ¹⁴⁷	20 homes sans	3 dietes amb diferent composició de greixos. 4 setmanes cadascuna.	LDF + Biomarcadors	DM millora FE postpandrial.
Cortes B, 2006 ¹⁴⁸	12 sans i 12 dislipèmics	2 dietes suplementades amb fruits secs o oli d'oliva durant 1 setmana.	FMD	No diferències en la FE.

Abreviacions: PAT, Tonometria arterial perifèrica; FMD, Dilatació mediada per flux; LDF Fluxometria Doppler per làser; ACh, Test d'acetilcolina; EPC, Cèl·lules progenitores endotelials; FRCV, Factors de Risc Cardiovascular; DM, Dieta Mediterrània; FE, Funció Endotelial; SCA, síndrome coronària aguda; SM, Síndrome Metabòlica; HUVEC, Cèl·lules Endotelials de cordó umbilical humà; AGS, Àcids Grasos Saturats; AGM, Àcids Grasos Monoinsaturats; CH, Carbohidrats.

2. Introducció

Diferents estudis d'intervenció suggereixen que el consum d'aliments rics en flavonoides com el te, el vi negre, la soja o el cacau poden millorar la funció endotelial en pacients amb malaltia cardiovascular establerta ^{149, 150}. En aquest sentit, Pérez-Martínez et al va observar que el consum d'un patró alimentari mediterrani ajudava a disminuir els nivells postprandials de biomarcadors d'estrès oxidatiu com els peròxids lipídics, proteïnes carbonilades, l'activitat de la superòxid dismutasa (SOD) i el peròxid d'hidrògen (H₂O₂) plasmàtic quan es comparava amb una alimentació rica en greixos saturats en pacients amb síndrome metabòlica¹⁵¹. De forma similar, el patró de consum mediterrani va atenuar l'estat inflamatori postprandial, demostrant una disminució significativa en el NF-κB, metaloproteinasa-9 i TNF-α^{152, 153}. Altres estudis clínics han demostrat que el patró de consum mediterrani incrementa la biodisponibilitat d'òxid nítric, amb la consegüent millora de la funció endotelial ¹³⁹. Això ha estat associat a una millora de la capacitat de la regeneració endotelial i l'augment de la producció de cèl·lules progenitores endotelials quan es compara amb un consum ric en greixos saturats o amb un consum baix en greix i ric en carbohidrats ^{141, 142}.

2.3.2.4 Greixos de la dieta i funció endotelial; paper dels Omega-3

Així com les dietes riques en greixos saturats incrementen la morbi-mortalitat cardiovascular, el consum de greixos poliinsaturats omega-3 contribueixen en un efecte cardioprotector. Els principals tipus de greixos poliinsaturats de la sèrie omega 3 són l'àcid alfa-linolènic, (C18:3 n-3), present bàsicament als fruits secs, llavors i els seus olis, i els seus derivats metabòlics com l'àcid eicosapentaenoic (EPA, C20:5 n-3) i l'àcid docosahexaenoic (DHA, C22:6 n-3), presents bàsicament al peix blau o al marisc. L'efecte clínic dels omega-3 podria estar

2. Introducció

associat a la millora en la hipertriglicèrdèmia, la disminució de la pressió arterial i la protecció en front les arítmies cardíques ¹⁵⁴. S'ha suggerit que aquest fet es podria deure a que els greixos poliinsaturats omega-3 són molècules de senyalització que poden interferir en diferents vies metabòliques. Hi ha una ampli ventall d'estudis clínics que relacionen la ingesta o la suplementació en greixos poliinsaturats omega-3 amb la funció endotelial. Els principals estudis clínics aleatoritzats en aquest àmbit es troben resumits a la taula 4. D'aquests estudis només n'hi ha dos que avaluïn la funció endotelial de petita artèria amb resultats conflictius ^{86, 164}. D'una banda, en un estudi que incloïa nens es va observar que la suplementació a dosis d'1.2 g/d d'EPA+DHA durant ≤ 3 mesos no millorava l'saRHI ¹⁶⁴. Per altra banda, en un altre estudi amb pacients amb elevat risc cardiovascular amb dosis de fins a 4g/d d'EPA/DHA s'observava millora sobre la funció endotelial i inflamació ⁸⁶. Darrere de la millora clínica de la funció endotelial observada en la majoria d'estudis que utilitzen suplementes de greixos poliinsaturats omega-3 o se'n recomana un augment de la seva ingesta, es troba la modulació sobre la inflamació, que condiciona al seu temps una millora sobre la sensibilitat a la insulina que repercuteix sobre una millor funció cel·lular. S'ha suggerit que l'efecte biològic d'aquest tipus de greixos es podria descriure en 5 possibles vies moleculars d'actuació afectades per aquests tipus de greixos ¹⁶⁷.

2. Introducció

Taula 4. Estudis sobre l'impacte del consum de greixos poliinsaturats omega-3 sobre la funció endotelial.

Referències	Població estudiada	Detall de l'estudi	Mètode utilitzat	Resultat important
Din JN, 2013 ¹⁵⁵	20 fumadors	Estudi creuat (placebo vs. 2g/d w-3) 6 setmanes	FMD	W-3 millora la FE i fibrinòlisi.
Mackay I, 2012 ¹⁵⁶	150 pacients amb MVP	Estudi creuat (850mg EPA/DHA vs. placebo) 6 setmanes	FMD	EPA/DHA no millora la FE.
Hileman CO, 2012 ¹⁵⁷	Pacients amb VIH	Estudi aleatoritzat (2g/d w-3 vs. placebo) 24 setmanes	FMD	No benefici dels w-3 en FE o inflamació.
Van den Elsen LW, 2011 ¹⁵⁸	123 gestants	Aleatorització a dieta habitual o a dieta habitual + 2d/setm peix blau	In vitro	Menor inflamació i activació de les cèl·lules endotelials amb el peix.
De Mello VD, 2011 ¹⁵⁹	131 individus amb FRCV	Aleatorització a dieta rica en peix greixós i fibra vs. dieta control. 12 setm.	FMD	Productes integrals i el peix greixós milloren FE i la inflamació.
Sanders TA, 2011 ¹⁶⁰	312 individus sans	Estudi aleatoritzat (0.45, 0.9 i 1.8g/d d'EPA/DHA vs. placebo).	FMD	No millora de la FE.
Newens KJ, 2011 ¹⁶¹	59 subjectes sans	Ingesta de solució rica en AGS vs. AGS amb DHA.	FMD	La FE millora amb la ingesta AGS enriquida amb DHA.
West SG, 2010 ¹⁶²	20 pacients dislipèmics	2 dietes amb diferent alfa-linoleic i linolènic. 2 mesos.	FMD	Millora la FE amb ingesta elevada en alfa-linolènic.
Moerti D, 2011 ¹⁶³	43 pacients amb ICC	Estudi aleatoritzat (1 gr/d omega-3, 4g/d w-3 o placebo) 3 mesos.	FMD	Augment de la FE a altes dosis w-3.
Skulas-Ray AC, 2011 ⁸⁶	23 pacients amb HTG	Estudi creuat (placebo, 850mg/d EPA/DHA o 3.4g/d EPA/DHA) 8 setm.	PAT	No millora de la FE en cap de les dosis w-3.
Dangardt F, 2010 ¹⁶⁴	25 adolescents obesos	Estudi aleatoritzat (placebo o 1.2g/d w-3) 3 mesos.	PAT	Millora de la FE i disminució de la inflamació.
Wong CY, 2010 ¹⁶⁵	97 DM2	Estudi aleatoritzat (4g/d w-3 o càpsules OO) 12 setm.	FMD	No millora de la FE.
Rizza S, 2009 ¹⁶⁶	50 fills de DM2	Estudi aleatorització (placebo vs 2g/d w-3) 12 setm.	FMD	Millora de la FE i la inflamació.

Abreviacions: w-3, Greixos omega-3; FE, Funció Endotelial; FMD, Dilatació Mediada per Flux; VIH, Virus Immunodeficiència Humana; FRCV, Factors de Risc Cardiovascular; MVP, Malaltia Vascular Perifèrica; PAT, Tonometria Arterial Perifèrica; ICC, Insuficiència Cardíaca Crònica; EPA/DHA, Àcids ecosapentanoic i docosahexaenoic; AGS, Àcids Grassos Saturats; HTG, Hipertrigliceridèmia; DM2, Diabetis Mellitus Tipus 2; OO, Oli d'Oliva.

2. Introducció

La Figura 11 esquematitza aquestes vies moleculars relacionades amb els greixos poliinsaturats omega-3 de cadena llarga. La primera via d'actuació és deguda a les propietats físico-químiques de les membranes cel·lulars o orgànuls, que són influenciades per la incorporació de greixos poliinsaturats omega-3. Les membranes riques en greixos poliinsaturats omega-3 mostren una millor fluïdesa, fet que modula la funció de les proteïnes de membrana i de les senyals intermembrana ¹⁶⁸. La segona via metabòlica relacionada amb les propietats beneficioses que confereixen els greixos poliinsaturats omega-3 sembla deure's a la interacció directe que tenen amb els canals i amb les proteïnes de membrana. Aquest és el cas de la modulació dels canals iònics o de proteïnes com el GPR120, els quals contribueixen a efectes antiarítmics o antiinflamatoris respectivament ¹⁶⁹.

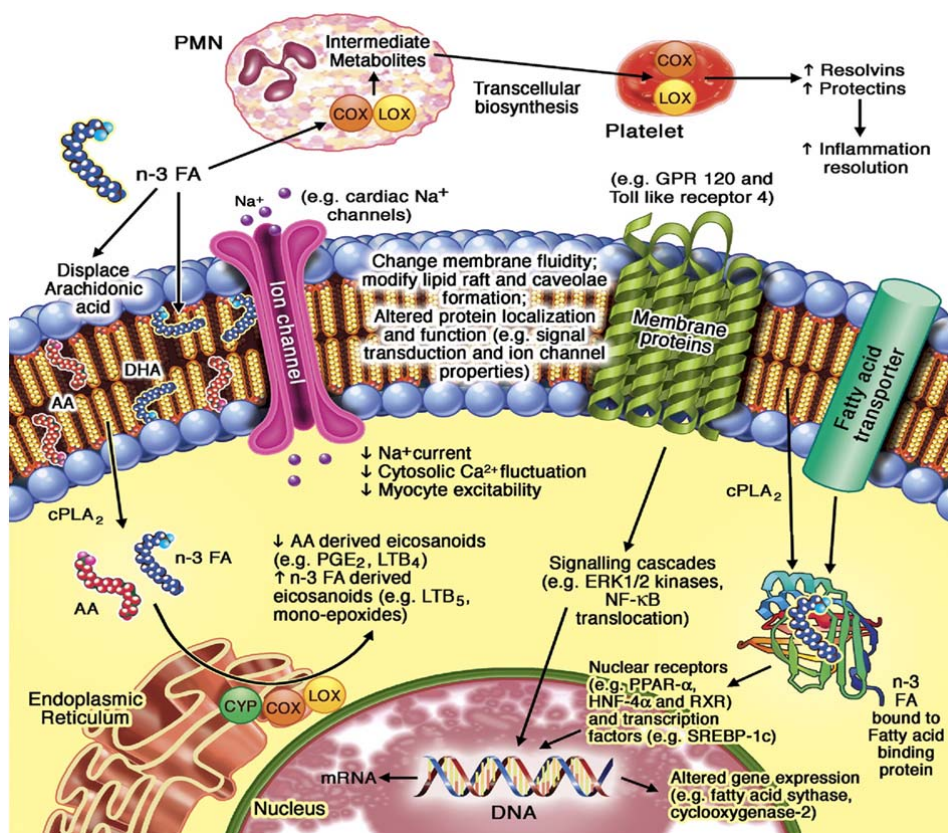


Figura 11. Vies metabòliques afectades pels greixos poliinsaturats omega-3. Mozafarian et al Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. JACC 2011 ¹⁶⁷. Reproduïda amb permís de l'autor i la revista.

2. Introducció

La tercera via d'actuació és que els greixos poliinsaturats omega-3 regulen directament l'expressió genètica via receptors nuclears o factors de transcripció. Els greixos poliinsaturats omega-3 són lligands naturals de diferents receptors nuclears en múltiples teixits, incloent quasi totes les subespècies de PPARs, el factor nuclear hepàtic 4 (HNF-4), el receptor retinoid x (RXR) i els receptors x hepàtics o de factors de transcripció com SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding-Protein-1c). La interacció entre els greixos poliinsaturats omega-3 i els receptors nuclears són modulats per les proteïnes citoplasmàtiques transportadores de lipoproteïnes al nucli. Així doncs, l'efecte observat dels greixos omega-3 sobre el metabolisme lipídic i les vies moleculars de la inflamació és degut en part a aquest efecte sobre la regulació genètica^{170, 171}. El quart mecanisme podria ser degut al metabolisme parcial dels greixos poliinsaturats omega-3 que es converteixen a eicosanoids per efecte de la ciclooxigenasa (COX), la lisoxigenasa (LOX) i el citocromP450. Els greixos poliinsaturats omega-3 tenen la capacitat de desplaçar l'àcid araquidònic de la membrana cel·lular reduint la producció de precursors eicosanoids derivats de l'àcid araquidònic. Aquest fet pot influenciar la inflamació, la trombosi i la funció vascular¹⁷². El cinquè efecte dels greixos poliinsaturats omega-3 suggereix la capacitat que tenen aquest greixos en resoldre la inflamació per diferents metabòlits derivats de l'acció de la COX i la LOX que s'anomenen mediadors pro-resolvins, on s'inclouen les resolvines o protectines^{173, 174}.

2. Introducció

2.3.2.5 Dieta baixa en hidrats de carboni

Les dietes baixes en hidrats de carboni s'han convertit en molt populars ja que són una eina efectiva per la pèrdua ràpida de pes. L'efecte de la major sacietat del consum de proteïna i la generació de cossos cetònics és la base fisiològica d'aquests plans alimentaris. La majoria de societats científiques recomanen, per a la prevenció de l'obesitat, la diabetis i la malaltia cardiovascular, realitzar una alimentació hipocalòrica amb un consum moderat de greix, baixos en proteïnes i alta en carbohidrats, especialment hidrats de carboni complexos o amb baix índex glucèmic ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. L'efecte sobre la pèrdua de pes a curt termini de les dietes riques en proteïna és millor que les dietes riques en hidrats de carboni tal i com ha estat documentat en diferents estudis clínics ¹⁷⁸. Sacks et al va avaluar a llarg termini l'efecte de la diferent composició nutricional sobre la pèrdua de pes. En aquest estudi es van aleatoritzar 800 adults obesos a una de les següents 4 dietes: A) 20% greixos, 15% proteïnes, 65% carbohidrats; B) 20% greixos, 25% proteïnes, 55% carbohidrats; C) 40% greixos, 15% proteïnes, 45% carbohidrats; D) 40% greixos, 25% proteïnes, 35% carbohidrats. Després de dos anys de seguiment va concloure que les dietes reduïdes en calories van resultar una eina clínica útil per la pèrdua de pes, independent del percentatge de macronutrients ja que no hi va haver diferències significatives en funció dels 4 tipus d'alimentació ¹⁷⁹. L'estudi DIOGENES va incloure més de 1.000 individus que havien perdut almenys un 8% del pes corporal en una dieta molt baixa en calories. Els participants es van aleatoritzar durant 26 setmanes a 5 plans alimentaris diferents. Es va observar que la millor adhesió al tractament post pèrdua de pes va ser per a aquells participants assignats a una dieta amb moderat increment de proteïnes i baix índex glucèmic, tot i que no es van observar diferències significatives entre el pes corporal entre grups ¹⁸⁰. Dades

2. Introducció

recents de l'estudi LookAHEAD, on s'inclouen més de 5000 pacients amb diabetis tipus 2 aleatoritzats a un grup de control clínic convencional o a un grup de control intensiu sobre l'estil de vida (alimentació equilibrada (30% greixos, 15% proteïnes, 55% carbohidrats) i activitat física) no observa diferències significatives entre grups en la mortalitat total després de 9 anys de seguiment ¹⁸¹. Per contra, la cohort americana Health Professionals Follow-Up Study (amb més de 40.000 participants classificats en funció del percentatge de macronutrients, definit per un índex validat de puntuació de l'alimentació en funció de la ingesta de macronutrients, observa com després de 20 anys de seguiment la incidència en diabetis és significativament més elevada a menor ingesta de carbohidrats i major en proteïna i greix ¹⁸². En concret hi havia un 37% més de casos de diabetis atribuïbles a un consum augmentat en proteïna i greix, ja que es van ajustar els resultats per l'edat, el tabaquisme, l'activitat física, la ingesta de cafè, la ingesta d'alcohol, la història familiar de diabetis, la ingesta calòrica, i l'IMC. L'associació es va veure atenuada en ajustar pel consum de carn vermella, però tot i així explicava de forma significativa un 11% més d'incidència de diabetis. Amb dades conjuntes del Health Professionals Follow-Up Study i el Nurse's Health Study, amb més de 120.000 participants, es va observar que un patró de consum baix en hidrats de carboni i alt en proteïnes i greixos es relacionava amb un augment de la mortalitat global de fins un 12% quan es comparava amb un patró de consum baix en proteïnes i ric en carbohidrats ¹⁸³. A nivell europeu destaca una cohort que inclou més de 43.000 dones de Suècia seguides durant una mitjana de 15 anys. En aquest estudi, després de controlar per tots els factors nutricionals de confusió, com la ingesta calòrica o el percentatge de greixos saturats i insaturats, es va concloure que les dones tenien un percentatge superior d' incidència d' event cardiovascular per

2. Introducció

cada 2 unitats d'increment en l'escala de puntuació de dieta. Els autors argumenten que a termes pràctics aquest augment del 5% de la incidència d'un event cardiovascular correspon a una mitjana de disminució de 20g d'hidrats de carboni i augment de 5g de proteïna al dia ¹⁸⁴.

2.3.2.5.1 Dieta baixa en hidrats de carboni i funció endotelial

En els últims anys s'han publicat diferents estudis que relacionen el percentatge de macronutrients de la ingesta amb la funció endotelial de petita o gran artèria. Aquests estudis es troben resumits a la taula 5. S'observa de la revisió d'aquests estudis que les dietes baixes o molt baixes en hidrats de carboni es poden associar a una alteració de la funció endotelial de petita i mitjana artèria ^{188, 189, 191}. La majoria d'estudis clínics focalitzats en estudiar la relació entre el percentatge de macronutrients de la ingesta i la millora de la funció endotelial, no han trobat diferències significatives entre consum alt o baix en hidrats de carboni i la funció endotelial. Això és probablement degut a que la modificació en el pes corporal que s'ha provocat durant el seguiment d'aquests estudis ha fet millorar la funció endotelial de forma independent a la composició de macronutrients ^{185-187, 192, 194, 195, 197}. S'ha descrit que l'obesitat i el greix visceral estan associats amb la disfunció endotelial tant en artèries de conducció com en artèries de resistència, i la pèrdua de pes aconseguit mitjançant una disminució de la ingesta millora la funció endotelial tot i en absència de malaltia cardiovascular o presència de factors de risc cardiovascular ^{198, 199}. En estudis sense pèrdua de pes, dietes baixes en hidrats de carboni i altes en proteïnes poden estar associades de forma significativa amb major contingut lipídic a l'espai subendotelial, disminució en el nombre de cèl·lules progenitores endotelials circulants en models de laboratori d'arteriosclerosi ¹³⁸ i en disminució

2. Introducció

de la FMD en subjectes obesos sans ¹⁹³. Fins a l'actualitat no hi ha estudis que avaluïn la composició de macronutrients de la ingesta amb la determinació de la funció endotelial de petita artèria.

Taula 5. Estudis d'evidència clínica entre la dieta baixa en hidrats de carboni i la determinació de la funció endotelial.

Referències	Població estudiada	Detall de l'estudi	Mètode utilitzat	Resultat important
Khoo J, 2011 ¹⁸⁵	31 pacients DM2 i OA	Estudi aleatoritzat (hipocalòrica vs. hipocalòrica baixa en CH) 8/setm.	FMD	No diferències en la FE entre grups.
Johnstone AM, 2011 ¹⁸⁶	16 obesos	Estudi creuat (hiperproteica (30%) amb diferent CH (4% i 35%)). 4 setmanes	In vitro	No diferències en FE i oxidació.
Bladjerg EM, 2011 ¹⁸⁷	106 obesos prèvia pèrdua de pes	Estudi aleatoritzats (3 dietes amb diferència en greixos i AGM) 6 mesos	FMD	No diferències en la FE i inflamació segons composició.
Wycherley TP, 2010 ¹⁸⁸	49 obesos o sobrepès	Estudi aleatoritzat (dieta baixa en HC o dieta baixa en greix) 1 any	FMD	Dieta baixa en HC empitjora FE.
Dod HS, et al 2010 ¹⁸⁹	27 pacients amb CAD + 20 sans	Cas control (AF + Dieta baixa en greix) 12 setmanes	FMD	Alimentació baixa en greix i AF millora FE
Volek JS, 2009 ¹⁹⁰	40 obesos amb HTG	Estudi aleatoritzat (dieta baixa en CH (12%) o dieta baixa en greix (20%) 12/setm	FMD	Millora FE de la dieta baixa en CH.
Miller M, 2009 ¹⁹¹	18 adults sans	Estudi creuat (Atkins (baixa en HC) DM (alta HC) i Ornish (baixa en greix) 4 setmanes.	FMD	Dieta Atkins pitjor FE.
Buscemi S, 2009 ¹⁴⁶	20 pacients amb obesitat o sobrepès	Estudi aleatoritzat (Dieta hipocalòrica baixa en HC i vs. model mediterrani) 2 mesos	FMD	Hipocalòrica baixa en HC empitjora FE.
Keogh JB, 2008 ¹⁹²	99 obesos	Estudi aleatoritzat (baixa en HC i alta en AGS o alta en HC i baixa en AGS) 8 setm.	FMD	No diferències en la FE.
Philips SA, 2008 ¹⁹³	20 obesos i 20 subjectes sans	Estudi aleatoritzat (dieta AHA (30% greix) o dieta Atkins (20gr HC)) 8 setm.	FMD	Dieta baixa en greix millora la FE.
Keogh JB, 2007 ¹⁹⁴	36 obesos	Estudi aleatorització (dieta alta o baixa en HC i baixa en AGS) 12 mesos.	FMD	No millora en la FE.

2. Introducció

Taula 5. Continua.

Referències	Població estudiada	Detall de l'estudi	Mètode utilitzat	Resultat important
Clifton PM, 2005 ¹⁹⁵	55 pacients amb OA i HTG	Estudi aleatorització (dieta baixa en greix i alta en CH o dieta control). 3 mesos	FMD	No millora de la FE.
Keogh JB, 2005 ¹⁹⁶	40 subjectes sans	Estudi creuat (3 dietes altes en greix i una amb dieta baixa en HC) 3 setm.	FMD	Empitjorament de la FE amb la dieta alta en AGS.
Ambring A, 2004 ¹⁹⁷	22 subjectes sans	Estudi creuat (DM vs. dieta tradicional sueca) 4 setm.	FMD	No millora de la FE.

Abreviacions: DM2, Diabetis Mellitus Tipus 2; OA, Obesitat Abdominal; CH, Carbohidrats; FE, Funció Endotelial; FMD, Dilatació Mediada per Flux; PAT, Tonometria Arterial Perifèrica; AGM, Àcids Grassos Monoinsaturats; DM, Dieta Mediterrània; HTG, Hipertrigliceridèmia; AGS, Àcids Grassos Saturats; AHA, American Heart Association.

2.4 ACTIVITAT FÍSICA, RISC CARDIOVASCULAR I ARTERIOSCLEROSI

2.4.1 Evidència científica

Les primeres evidències que relacionen l'activitat física i la malaltia cardiovascular daten del 1953, quan Morris et al van descriure la relació entre la pràctica d'activitat física i la menor mortalitat per malalties cardiovasculars. L'estudi "The London Bus Study" ha passat a la història per constatar l'observació entre la diferent quantitat d'activitat física realitzada pels conductors i cobradors de bitllets dels autobusos londinencs (de dues plantes) i el menor risc relatiu dels cobradors de bitllets de morir de malaltia cardiovascular, en comparació amb els conductors ²⁰⁰. Des d'aleshores, centenars d'estudis han intentat relacionar el nivell d'activitat física, ja sigui laboral o de temps lliure, amb la incidència o

2. Introducció

prevalença de les malalties cardiovasculars. Els estudis actuals relacionen la pràctica d'activitat física d'intensitat baixa o moderada amb una disminució del risc d'events cardiovasculars, atribuïnt a l'activitat física un component central en la prevenció primària i secundària de la malaltia cardiovascular ^{201,202}. S'ha observat que no només té un paper beneficiós en el risc cardiovascular, sinó que també és important en altres malalties cròniques com el càncer, la depressió o la osteoporosi ^{203,204}. En l'àmbit de prevenció cardiovascular, la pràctica habitual d'activitat física ha demostrat una millora significativa en la pèrdua de pes, la millora del control glucèmic, la disminució de la pressió arterial, la disminució de les concentracions de colesterol LDL i triglicèrids i l'augment de colesterol HDL ²⁰². Per altra banda, els resultats dels estudis observacionals, longitudinals i prospectius suggereixen de forma robusta una relació directament proporcional entre el sedentarisme i les malalties cardiovasculars ^{9,10}.

2.4.2 Tipus d'activitat física

Degut a que l'activitat física és important en la prevenció i terapèutica cardiovascular, és important definir el terme "activitat física". L'activitat física fa referència a qualsevol moviment corporal produït pels músculs esquelètics que condiciona una despesa energètica. D'altra banda, l'exercici físic implica també moviment corporal i despesa energètica, però aquest concepte és una subcategoria de l'activitat física, ja que l'exercici físic es considera una activitat física planificada amb una metodologia concreta i una repetició. L'activitat física i la pràctica d'exercici físic conduiran a una millora de la salut, sempre i quan es respectin uns principis bàsics que fan referència a l'avaluació prèvia de l'estat de salut de les persones que es disposen a començar la pràctica d'activitat física, es realitzi una prescripció adequada a la condició física i s'adeqüin la freqüència, la

2. Introducció

duració, la intensitat i la progressió en funció de les característiques individuals ⁹. Això és especialment important en aquelles persones amb malaltia cardiovascular coneguda ²⁰⁵. Les societats científiques recomanen un mínim de 2.5 a 5hores a la setmana d'activitat física d'intensitat moderada o baixa, o almenys d'1 a 1.5hores/setmana d'activitat física intensa per disminuir el risc cardiovascular ^{9, 206}. A més a més, l'evidència científica suggereix que el volum d'activitat física setmanal s'hauria d'obtenir mitjançant el sumatori de múltiples rutines diàries, almenys de 10 minuts de durada, i que aquesta activitat física s'hauria de distribuir al llarg de la majoria dels dies de la setmana ²⁰⁶. L'activitat física de moderada intensitat es defineix com l'activitat desenvolupada entre el 40-59% de la freqüència cardíaca màxima o del volum màxim d'oxigen (VO2max) o a un nivell d'exhauriment subjectiu de 5 o 6 en una escala del 0-10. Exemples d'activitat física moderada inclouen, no només activitats físiques esportives com l'atletisme, el ciclisme, la natació, l'esquí de muntanya, l'excursionisme, el patinatge, el rem o l'aeròbic, sinó també activitats relacionades amb la vida diària com caminar a ritme moderat, pujar les escales, fer la feina de neteja de la casa o arreglar el jardí. Aquestes activitats corresponen a un nivell de despesa energètica de 4 a 6 equivalents metabòlics per hora (METs/h).



Figura 12. Piràmide de l'activitat física proposada per la Conselleria de Sanitat de la Generalitat de Catalunya.

2. Introducció

L'activitat física d'intensitat elevada és l'activitat que es realitza entre el 60-85% de la freqüència cardíaca màxima, que es tradueix en un nivell de percepció de cansament de 7-8 sobre 10. Aquestes activitats corresponen a una despesa energètica entre 7 i 10 METs/h ²⁰⁶.

2.4.3 Activitat física i funció endotelial

Diferents estudis clínics conclouen que l'exercici físic, particularment l'exercici aeròbic, promou adaptacions favorables en la funció de la cèl·lula endotelial que s'evidencien a nivell clínic. La bibliografia actual descriu que l'exercici regular és una eina no farmacològica per millorar la funció endotelial en subjectes amb factors de risc cardiovascular com la dislipèmia, la hipertensió arterial, la diabetis o la síndrome metabòlica ²⁰⁷, i en pacients amb malaltia coronària establerta o insuficiència cardíaca ²⁰⁸. La pràctica habitual o l'augment d'activitat física té la capacitat de modular l'estrès oxidatiu, la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), la biodisponibilitat d'òxid nítric, l'estimulació del sistema nerviós i la freqüència cardíaca, factors que es relacionen amb la disfunció endotelial i arteriosclerosi ²⁰⁹. Tot i que l'exercici comporta un increment de l'estrès oxidatiu degut al major consum d'oxigen que genera un increment de la producció de ROS, s'ha demostrat que les LDL oxidades en plasma són ràpidament eliminades pel fetge i que no influeixen tant en la inflamació com ho fan les partícules oxidades que es troben a l'espai subendotelial ³⁰. S'ha postulat que l'estrès oxidatiu provocat en el plasma en resposta a l'exercici pot estimular una resposta antioxidant, increment de la SOD, GPx, disminució dels F2-isoprostans i mieloperoxidases, que podria inhibir l'oxidació de les LDL subendotelials i la inflamació local ²¹⁰. A nivell de la paret arterial, l'exercici té la capacitat de

2. Introducció

disminuir l'estimulació simpàtica de la paret del vas, fet que es relaciona amb una adaptació estructural al remodelatge arterial que normalitza la freqüència de flux ²¹¹. Estudis amb animals i cultius de cèl·lules endotelials suggereixen que l'estrès tensional, que exerceix el pas del flux sanguini, incrementa l'activitat i l'expressió de l'eNOS probablement degut a una estabilització de l'enzim i a la unió permanent d'un factor de transcripció al promotor d'ARNm de l'eNOS ^{30, 212, 213}, que es tradueix en un augment en la biodisponibilitat d'òxid nítric.

2.5 TABAC, RISC CARDIOVASCULAR I ARTERIOSCLEROSI

2.5.1. Epidemiologia i evidències

El consum de tabac és una de les principals causes de mort a nivell mundial. Tot i que cada dia moren més de 3.000 persones al món per complicacions relacionades amb el consum de tabac, es calcula que un 30% de la població mundial és fumadora ¹. S'ha observat que el tabaquisme és responsable del 60% de les morts evitables dels fumadors, la meitat de les quals degudes a la malaltia cardiovascular. El tabaquisme també té un increment sobre altres malalties cròniques com les malalties del sistema respiratori i els càncers ²¹⁴. Segons les estimacions de l'SCORE, els fumadors tenen el doble de probabilitats de tenir un event cardiovascular fatal durant els pròxims 10 anys en comparació als no fumadors. Tot i així, mentre el risc relatiu d'infart de miocardi per sobre dels 60 anys és el doble, el risc relatiu en menors de 50 anys és 5 vegades més elevat comparat amb els no fumadors ²¹⁵. Dades de l'estudi INTERHEART mostren que el tabaquisme es va associar a 3 vegades més de risc de patir un event coronari isquèmic agut no fatal, i va establir l'efecte de dosi-dependència ja que aquest

2. Introducció

risc va pujar fins a 4.6 vegades més si es fumaven més de 20 cigarrets al dia ⁸. L'estudi EUROSPIRE III (Evaluation of secondary prevention of coronary heart disease), on s'inclouen pacients menors de 70 anys amb events coronaris de diferents països d'Europa durant l'any 2007, va documentar que el 30% dels participants en l'estudi eren fumadors en el moment de patir un event coronari, dades que van ser similars a les cohorts EUROSPIRE I i EUROSPIRE II que va es van portar a terme als anys 1995 i 2000 respectivament ²¹⁶. L'estudi SAVE (Survival And Ventricular Enlargement) va avaluar 2.231 pacients en els dies posteriors (3-16 dies) d'haver patit un event cardiovascular. Es va observar que el l'abandó del tabac al cap de 6 mesos reduïa un 43% el risc de mort per qualsevol causa, en un 32% el risc de mort cardiovascular o infart de miocardi recurrent i en un 35% l'hospitalització per insuficiència cardíaca ²¹⁷. Les evidències obtingudes des de l'any 2000 mostren que els beneficis per la salut de l'abandonament del tabac es donen de forma ràpida. A les 24hores de deixar de fumar hi ha millores significatives en la pressió arterial i la freqüència cardíaca ²¹⁵. El risc d'infart de miocardi disminueix a la meitat al cap d'un any de deixar de fumar en comparació amb els que continuen fumant. Al cap de 5-15 anys el risc d'accident vascular cerebral o malaltia isquèmica coronària s'equipara als que no han fumat mai, sempre i quan no s'hagin desenvolupats lesions en òrgans diana durant l'època de fumador ²¹⁸.

2.5.2. Fumadors passius

Molts estudis clínics suggereixen que el tabaquisme passiu augmenta el risc de malaltia cardiovascular amb un major risc relatiu del que s'esperaria ²¹⁹. S'ha demostrat que una persona no fumadora que viu amb persones que fumen i està exposat al fum del tabac té un 30% més de risc de malaltia cardiovascular

2. Introducció

comparat amb el que no fuma i no està exposat ²²⁰. Un percentatge semblant s'ha observat en l'exposició del fum del tabac en l'àmbit laboral ²²¹. La normativa antitabac i la prohibició de fumar en certs llocs públics ha conduït a una disminució significativa en la incidència d'infart de miocardi. S'ha observat que les polítiques d'ambients públics lliures de fum han estat relacionades a una disminució ràpida en els ingressos hospitalaris per infarts aguts de miocardi, amb una disminució al voltant del 17% en països com USA, Itàlia, Escòcia, Canadà, Irlanda, França, Anglaterra o Argentina 1 any després de l'entrada en funcionament de la llei i en un 30% als 3 anys ¹.

2.5.3. Tabac i disfunció endotelial

Els mecanismes pels quals el tabac es relaciona amb la malaltia cardiovascular són diferents i sinèrgics ²²². S'ha descrit que els components del fum de tabac com la nicotina, les aldones saturades i diferents tipus de quinones provoquen un increment en les concentracions de ROS, peroxinitrits i radicals lliures de diferents compostos orgànics, els quals condueixen a una resposta inflamatòria ^{223, 224}. Degut a aquesta interacció entre els components del fum del tabac i els macròfags pulmonars, es produeix un increment en la circulació de citoquines proinflamatòries, on TNF- α juga un paper crucial per ampliar la resposta inflamatòria sistèmica. A més a més, diferents línies d'evidència suggereixen que els constituents del fum del tabac poden activar de forma directa la producció vascular de ROS que provoca una disminució de la biodisponibilitat d'òxid nítric i disfunció endotelial ^{225, 226}, que condueix a una activació dels monòcits circulants i el seu nivell d'adherència a l'endoteli ²²⁷. Estudis previs han identificat NAD(P)H oxidases i xantina-oxidasa, marcadors de l'estrès oxidatiu, com a dos potencials fonts de radicals O₂⁻ en diferents tipus cel·lulars que

2. Introducció

podrien ser induïts per components del fum del tabac ^{228, 229}. Addicionalment, l'exposició al fum del tabac indueix l'apoptosi endotelial degut a l'activació de caspasa-3 , a més de la disminució significativa de l'activació de l'eNOS, fet que accentua l'apoptosi de la cèl·lula endotelial ²³⁰. S'ha descrit que el consum de tabac es relaciona amb un increment de l'oxidació i modificació del DNA en humans i animals de laboratori ²³¹. Els fumadors tenen 20 vegades més risc de tenir una angina vasoespàstica comparat amb els que no han fumat mai degut a que els components del fum del tabac indueixen un efecte vasoconstrictor a la paret vascular coronària, alteren el llinar d'isquèmia coronària i disminueixen de forma marcada la capacitat de reserva miocàrdica ²³².

3. Raó de la Tesi

3. Raó de la tesi

El procés de disfunció endotelial és un procés sistèmic i generalitzat; tot i així, els mecanismes que regulen la homeòstasi endotelial vascular són diferents en funció del territori arterial. S'ha descrit recentment que en artèries petites, o també anomenades artèries de resistència, la vasodilatació està mediada per l'efecte sinèrgic entre la capacitat d'alliberar òxid nítric per la cèl·lula endotelial, per les influències del sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic i per influències endocrines. Per altra banda, en artèries grans o artèries de conducció la capacitat de síntesi d'òxid nítric perd una mica d'importància, ja que aquesta vasodilatació està mediada per les característiques físiques del flux sanguini, per les característiques de les proteïnes elàstiques de la làmina interna elàstica i la innervació simpàtica ⁷⁷. En artèries de mitjà tamany, com l'artèria braquial, la vasodilatació és un efecte entremig entre els mecanismes reguladors de petita artèria i d'artèria de conducció. Degut a aquest fet, la repercussió clínica de la disfunció endotelial sobre un territori vascular o un altre es manifesta en formes fisiopatològiques diferents. Així, la disfunció endotelial de petita artèria seria la major responsable de resistència perifèrica amb particular significança sobre la regulació de la pressió arterial, la malaltia renal crònica, la nefropatia, l'afectació de la substància blanca del cervell i/o la disfunció del teixit adipós ^{48,233}. Per altra banda, en artèries de major diàmetre la disfunció endotelial té una especial repercussió clínica sobre l'ateromatosi carotídia o les coronariopaties ²³⁴.

Amb el coneixement dels mecanismes que regulen la vasodilatació i l'homeòstasi arterial, s'ha observat que els mètodes FMD i PAT poden mesurar diferents aspectes de la disfunció endotelial, essent el mètode FMD responsable de la determinació de la disfunció arterial d'artèria mitjana de conducció, mentre que la disfunció endotelial avaluada per PAT correspondria a una disfunció endotelial

3. Raó de la tesi

de petita artèria ⁷⁷. Tal i com s'ha revisat en l'apartat de tècniques d'avaluació de la funció endotelial, existeixen alguns estudis que relacionen la presència de factors de risc cardiovascular, o la probabilitat d'events cardiovasculars, amb la funció endotelial de petita artèria. Tot i així, els estudis que relacionen la disfunció endotelial de petita artèria amb els canvis terapèutics de l'estil de vida són escassos. Segons el nostre coneixement, només hi ha un estudi transversal que relaciona el patró alimentari amb el valor de funció endotelial de petita artèria ¹⁴⁰. Referent al consum de greixos omega-3 existeixen dos estudis contradictoris que relacionen aquest tipus de greixos amb la funció endotelial de petita artèria ^{86, 164}. Per altra banda, no existeix cap estudi previ que relacioni els nivells d'activitat física amb la funció endotelial de petita artèria, i no es coneix si nivells d'activitat física inferiors als de les recomanacions de les guies clíniques poden tenir un efecte beneficiós sobre la salut cardiovascular.

4. Hipòtesi i Objectius

4. Hipòtesi i Objectius

Hipòtesi:

Les mesures terapèutiques sobre l'estil de vida, aplicades en persones amb un risc cardiovascular moderat o alt, tenen la capacitat de millorar la progressió de la disfunció endotelial de petita artèria, determinant de la resistència arterial perifèrica, avaluada mitjançant l'índex d'hiperèmia reactiva (saRHI) per tonometria arterial perifèrica o biomarcadors plasmàtics de disfunció endotelial. El nostre grup ha observat que la millora del saRHI és un marcador de menor progressió del gruix íntima-mitja carotidi. Les dietes baixes en hidrats de carboni repercuteixen de forma negativa en el saRHI en pacients amb risc cardiovascular moderat o alt en comparació amb les persones que realitzen una alimentació amb una composició nutricional semblant al patró de consum de la dieta mediterrània. L'augment en el consum de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 té beneficis sobre la funció endotelial de petita artèria i sobre els marcadors bioquímics de funció endotelial i la inflamació. L'exercici físic de baixa intensitat i perllongat en el temps té la capacitat de millorar el saRHI, l'estrès oxidatiu i la freqüència cardíaca independentment de les variacions en el pes corporal.

4. Hipòtesi i Objectius

Objectius:

Estudi Clínic 1

SaRHI – score de dieta baixa en hidrats de carboni

- 1** Estudiar la relació entre la ingesta de diferents percentatges de m macronutrients, avaluat mitjançant un índex validat de dieta baixa en hidrats de carboni, i la funció endotelial de petita artèria en pacients amb risc cardiovascular moderat o alt.
 - 1.1** Estudiar l'efecte d'una dieta baixa en hidrats de carboni i alta en proteïna i greix sobre el valor de saRHI.
 - 1.2** Identificar els components alimentaris i d'estil de vida que impliquen una bona funció endotelial.
 - 1.3** Estudiar la relació entre el valor de saRHI i l'alimentació en diferents malalties metabòliques com la diabetis, l'obesitat abdominal o la síndrome metabòlica.
 - 1.4** Avaluat els determinants independents de tenir un saRHI alt.

4. Hipòtesi i Objectius

Estudi Clínic 2

SaRHI – greixos poliinsaturats omega-3 de cadena llarga

- 1 Estudiar de forma prospectiva la relació entre l'augment de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 i la funció endotelial de petita artèria en pacients amb risc cardiovascular moderat o alt.
 - 1.1 Estudiar els canvis en el valor saRHI en funció de l'augment o la disminució de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3.
 - 1.2 Estudiar els canvis en biomarcadors d'inflamació i estrès oxidatiu en funció de l'augment o la disminució de la ingesta de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3.
 - 1.3 Estudiar de forma progressiva els moduladors dels valors de saRHI.

4. Hipòtesi i Objectius

Estudi Clínic 3

SaRHI –nivells baixos d'activitat física

- 1 Avaluar l'efecte de l'exercici físic de baixa intensitat i perllongat en el temps sobre la funció endotelial de petita artèria, l'estrès oxidatiu i la freqüència cardíaca per tal d'estudiar-ne els determinats.
 - 1.1 Avaluar els canvis en la funció endotelial de petita artèria en un grup de pacients amb risc cardiovascular moderat que participen en un programa comunitari d'activitat física de baixa intensitat.
 - 1.2 Avaluar l'efecte de les variacions d'activitat física de baixa intensitat sobre biomarcadors de l'estrès oxidatiu, superòxid dismutasa i glutatió peroxidasa, i de la síntesi d'òxid nítric mitjançant les concentracions de dimetilarginina asimètrica (ADMA).
 - 1.3 Estudiar la relació entre els canvis en l'activitat física de baixa intensitat i els canvis en la freqüència cardíaca.
 - 1.4 Avaluar l'efecte de l'activitat física de baixa intensitat sobre els factors de risc cardiovascular clàssics, el pes corporal i la distribució de greix corporal.

5. Materials i Mètodes

5. Materials i Mètodes

La metodologia emprada en aquests estudis està detallada en els apartats corresponents de les diferents publicacions. Aquí se'n fa un resum i posada en comú.

5.1 PACIENTS I DISSENY DELS ESTUDIS

Els pacients que formen part d'aquests estudi són homes i dones de 30 a 65 anys d'edat que s'atenen a les consultes mèdiques de la Unitat de Medicina Vasculat i Metabolisme de l'Hospital Sant Joan de Reus i dels centres d'atenció primària que tenen l'hospital com a referència. Els criteris d'inclusió van ser la presència de factors de risc cardiovascular com: l'obesitat abdominal, la dislipèmia, la diabetis mellitus tipus 2, la hipertensió arterial o la síndrome metabòlica que determina un risc cardiovascular moderat o alt segons les equacions de predicció de Framingham. Els criteris d'exclusió van ser: patir malaltia cardiovascular prèvia, malaltia renal, hepàtica o pulmonar crònica, malaltia neurodegenerativa o càncer. El disseny de l'estudi 1 va ser observacional, l'estudi 2 va consistir en un estudi d'intervenció prospectiu d'un any de durada i l'estudi 3 va ser un estudi d'intervenció prospectiu en una cohort caracteritzada. Els estudis es van portar a terme seguint les guies clíniques de bona pràctica aprovades a la declaració de Hèlsinki i totes les intervencions i procediments que es van realitzar durant els estudis van ser aprovats pel comitè ètic i d'investigació clínica de l'Hospital. Així mateix, tots els participants van signar el consentiment informat.

5. Materials i Mètodes

5.2. AVALUACIÓ CLÍNICA I NUTRICIONAL

Es va considerar dislipèmia, hipertensió, diabetis o síndrome metabòlic si els individus tenien el diagnòstic previ d'aquestes patologies o si prenen tractaments farmacològics destinats a controlar la pressió arterial, la glucèmia o els nivells de lípids en sang. El tabaquisme es va categoritzar com a fumador actiu, no fumador o ex-fumador. L'activitat física es va avaluar amb el qüestionari de Minnesota adaptat a població espanyola ²³⁵. Mitjançant les dades d'activitat física es va calcular el número de METS/h/setmana de cada individu segons les taules d'equivalències d'activitat física de L'escola per la Promoció de la Nutrició i la Salut (Arizona, Phoenix, USA) ²³⁶. El pes, la talla, perímetre abdominal i la pressió arterial es van avaluar amb els mètodes estàndards per personal entrenat. Les entrevistes nutricionals van constar de recollida de recordatoris 24 hores, registres alimentaris de 3 dies o d'una setmana i una història dietètica completa per cada pacient. Les dades dels registres alimentaris es van utilitzar per calcular els percentatges de nutrients mitjançant el programa de càlcul nutricional del CESNID (Cesnid Nutritional Program, versió 2.0, Barcelona).

5.2.1. Low Carbohydrate Diet Score (LCDS) i Índex de dieta Mediterrània

L'índex de dieta baixa en hidrats de carboni, el Low Carbohydrate Diet Score (LCDS), es va utilitzar en l'estudi 1 per avaluar la relació entre el percentatge de macronutrients de la ingesta amb la determinació del saRHI. Aquest índex té la capacitat de classificar els individus en un número en funció de la ingesta relativa de greixos, proteïnes i carbohidrats ²³⁷.

5. Materials i Mètodes

Punts	Ingesta de Carbohidrats	Ingesta de Proteïna	Ingesta de Greix
0	>56.0	<14.1	<26.0
1	51.6–56.0	14.1–15.6	26.0–29.5
2	49.1–51.5	15.7–16.6	29.6–31.6
3	47.1–49.0	16.7–17.3	31.7–33.2
4	45.2–47.0	17.4–18.0	33.3–34.7
5	43.3–45.1	18.1–18.7	34.8–36.1
6	41.2–43.2	18.8–19.4	36.2–37.7
7	38.8–41.1	19.5–20.3	37.8–39.5
8	35.4–38.7	20.4–21.5	39.6–42.0
9	29.3–35.3	21.6–24.0	42.1–46.9
10	<29.3	>24.0	>46.9

Figura 13. Criteris per determinar el Low-Carbohydrate-Diet Score. Halton et al. Low carbohydrate diet score i risc de malaltia coronària en dones. NEJM 2006 ²³⁷

Com es pot observar a la Figura 13, a mesura que s'obté una puntuació més elevada es correspon a un menor consum en carbohidrats i més elevat en proteïnes i greixos. Dos estudis observacionals a gran escala han utilitzat aquest sistema d'avaluació de la composició nutricional. S'ha evidenciat que aquest índex ha estat útil per donar evidències epidemiològiques de que un consum alt en proteïna i greix animal s'associa a un major risc de diabetis tipus 2 en una cohort de més de 40.000 homes sans seguits durant una mitjana de 20 anys ¹⁸², i també en dones ¹⁸⁴. Per altra banda, en l'estudi 3 es va utilitzar un model de puntuació de dieta mediterrània validat ¹³⁶ per avaluar canvis en el patró de consum que es poguessin relacionar amb les variables d'interès.

5. Materials i Mètodes

Mediterranean Diet Score

Cada quan menja.....						
Cereals integrals (pa, pasta, arròs)	Mai 0	1-6R /setm 1	7-12R/setm 2	13-18 R/setm 3	19-31R/setm 4	>32R/setm 5
Patata	Mai 0	1-4R/setm 1	5-8R/setm 2	9-12R/setm 3	13-18R/setm 4	>18R/setm 5
Fruita	Mai 0	1-4R/setm 1	5-8R/setm 2	9-15R/setm 3	16-21R/setm 4	>22R/setm 5
Vegetals	Mai 0	1-6R /setm 1	7-12R/setm 2	13-20 R/setm 3	21-32R/setm 4	>33R/setm 5
Llegums	Mai 0	<1R /setm 1	1-2R/setm 2	3-4R/setm 3	5-6R/setm 4	>6R/setm 5
Peix	Mai 0	<1R /setm 1	1-2R/setm 2	3-4R/setm 3	5-6R/setm 4	>6R/setm 5
Carn vermella i carns procesades	<= 1 5	2-3R /setm 4	4-5R/setm 3	6-7R/setm 2	8-10R/setm 1	>10R/setm 0
Carn blanca	<= 3 5	4-5R /setm 4	5-6R/setm 3	7-8R/setm 2	9-10R/setm 1	>10R/setm 0
Làctics sencers	<= 10 5	11-15R /setm 4	16-20R/setm 3	21-28R/setm 2	29-30R/setm 1	>30R/setm 0
Oli d'oliva per cuinar i amanir	Mai 0	Rarament 1	<1R/setm 2	1-3R/setm 3	3-5R/setm 4	Diari 5
Begudes alcohòliques ml/dia	<300ml 5	300 4	400 3	500 2	600 1	700 o 0 0

Panagiotakos DB et al, *Preventive Medicine* 44 2007

Figura 14. Score de Dieta Mediterrània. Panagiotakos, DB, et al., Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore, *Prev Med* ¹³⁶

5.3. ESTUDIS VASCULARS I D'IMATGE

5.3.1 Avaluació de la funció endotelial de petita artèria

L'índex d'hiperèmia reactiva de petita artèria es va avaluar utilitzant la tonometria arterial perifèrica (PAT) amb l'aparell Endopat-2000. Les determinacions es van realitzar en una habitació amb l'ambient tranquil amb poca il·luminació, temperatura controlada (22-24°C) després d'un dejú de 12hores i amb abstinència de fumar o fer exercici d'elevada intensitat en les 24hores prèvies a les determinacions. La determinació de la funció endotelial clínica es va realitzar mitjançant el procediment estàndard detallat ^{75, 237}. Es

5. Materials i Mètodes

col·loquen dos sensors mecànics en els dos dits índex del pacient i el manegot de pressió arterial en un braç. Després de 5 minuts basals en que l'aparell enregistra els canvis de l'ona de pols mitjançant els didals pneumàtics, s'infla el manegot de la pressió per sobre de 40mmHg de la pressió arterial sistòlica del pacient per produir una isquèmia sobre un braç. Posterior a la oclusió de 5 minuts s'allibera de nou la pressió del manegot i s'enregistren els canvis en l'ona de pols i el flux distal durant 5 minuts. Les mesures del flux dels dos dits, una del braç provant i l'altre del braç control, es comparen després d'un període d'estabilització, i la segona comparació es pren després dels 5 minuts de la isquèmia induïda. Els resultats són processats per un software específic que calcula la isquèmia reflexa vasodilatadora observada en el braç probant (abans i després de la isquèmia) en comparació amb les dades enregistrades del braç control. El valor generat s'anomena saRHI. La variabilitat d'aquest índex en el nostre laboratori és similar a la variabilitat reportada per l'empresa que ha desenvolupat l'aparell (coeficient de correlació intra-classe de 0.52i la variació entre subjecte de 0.19). La rigidesa arterial, mesurada com l'índex d'augment, es pot determinar en la mateixa exploració i processada per un software que analitza les diferències en l'amplitud de l'ona de pols abans i després de la isquèmia en comparació amb el braç control. Posteriorment es calcula l'índex d'augment ajustat a 75 batecs per minut (AIX@75).

5.3.2 Determinació del gruix íntima-mitja carotidi

La determinació del gruix íntima-mitja carotidi es va realitzar a tots els pacients de l'estudi amb l'aparell d'ultrasons Esaote My-Lab 60 equipat amb una sonda de 8L5 de 5-12MHz. Les determinacions del gruix íntima-mitja carotidi es van

5. Materials i Mètodes

realitzar pel mateix investigador i es va seguir el procediment de la metodologia de referència ²³⁹. Es va avaluar el gruix íntima-mitja de la caròtida dreta i esquerra en les seves porcions comuns, de la zona de bifurcació o bulb carotidi i en la caròtida interna. La mitjana i màxim de les 6 determinacions es va definir com IMT mitjà o IMT màxim.

5.3.3 Determinació del greix abdominal

La determinació del greix abdominal es va realitzar seguint el protocol establert per la Societat Europea d'Ultrasonografia ²⁴⁰. Segons aquesta metodologia, la determinació del tipus i la quantitat de greix abdominal es va realitzar avaluant la zona subxifoidal i la zona supraumbilical. Per la medició del greix subxifoidal, es va utilitzar una sonda de 8Mhz situada perpendicularment a la pell a nivell epigàstric. El gruix de greix subcutani es va definir com la distància entre la cara externa de la línia alba i la part distal de la pell. En aquesta mateixa zona, el gruix del greix visceral es va definir com la distància entre la part interna de la línia alba i la càpsula hepàtica. El màxim gruix de greix intrabdominal preaòrtic es va determinar a nivell supraumbilical amb la sonda de 3.5Mhz. Aquesta mesura es va definir com la distància entre la línia alba i la paret anterior de l'artèria aorta.

5. Materials i Mètodes

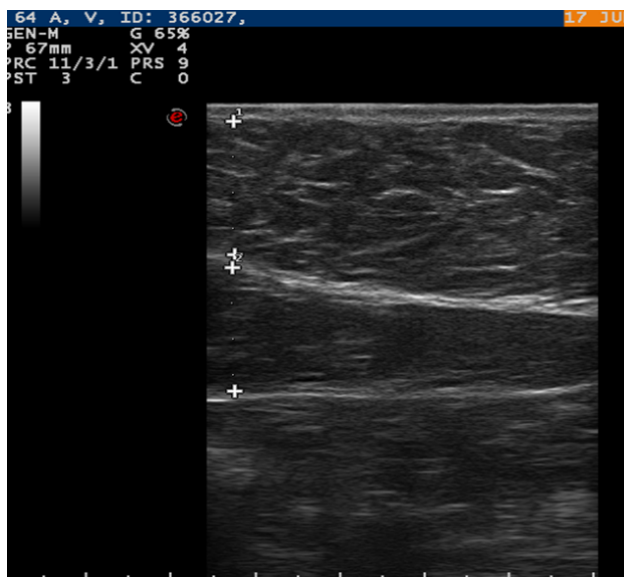


Figura 15. Determinació ecogràfica del greix abdominal subcutani i abdominal visceral a la regió subxifoidal.

5.4 DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES

Les mostres de sang es van recollir el mateix dia en que es van realitzar els estudis vasculars. Un total de 30ml de sang venosa es van dividir en alíquotes seguint el protocol de treball normalitzat del nostre centre (BIOBANC). Les determinacions bioquímiques bàsiques es van portar a termes seguint els protocols estàndards mitjançant determinacions enzimàtiques o immunoassaigs adaptats a un autoanàlitzador (Cobas Mira, Roche). L'expressió de les citocines proinflamatòries es va determinar mitjançant un Array d'anticossos contra citocines humanes (RayBiotech, USA) Es tracta d'un array basat en el sistema multiplex per la quantificació simultània de múltiples citocines. La lectura de les mostres es va visualitzar mitjançant fluorescència amb un escàner. L'estudi de la capacitat antioxidant es va realitzar mitjançant la determinació eritrocitària i plasmàtica dels enzims superòxid dismutasa (SOD) i glutacions peroxidasa (GPx). Les determinacions es van realitzar mitjançant el procediment estàndard de la

5. Materials i Mètodes

casa comercial dels assajos (Cayman Chemical Company, USA). Per la determinació de l'activitat de la SOD, el kit utilitza la sal de tetrasoli per la detecció dels radicals superòxid que formen la xantina oxidasa i la hipoxantina. Una unitat de SOD es defineix com la quantitat d'enzim necessari per produir el 50% de la dismutació del radical superòxid. Aquest assaig mesura els tres tipus de SOD (Cu/Zn, Mn i Fe). Per la GPx l'assaig mesura de manera indirecta la seva activitat, a través d'una reacció acoplada amb la glutatió reductasa. Les concentracions d'ADMA i LDLox es van realitzar mitjançant immunoassajos seguint el protocol de la casa comercial (ADMA- ELISA, Immunodiagnostik AG, Germany; oxLDL-ELISA, Mercodia, Sweden). L'assaig d'ADMA basat en immunoassaig requereix una prèvia derivatització de la mostra. Després la mostra s'incuba amb una antisèrum-ADMA en micropous on hi ha enganxat un derivat-ADMA (tracer). Durant la incubació l'ADMA present a la mostra desplaça l'anticòs unit al tracer. Posteriorment s'afegeix un anticòs conjugat amb peroxidasa que s'unirà a l'anticòs anti-ADMA. Finalment una reacció enzimàtica donarà color que serà inversament proporcional a la quantitat de ADMA present a la mostra. Per comparació amb una corba estàndar es determina les concentracions de ADMA a la mostra. La determinació de LDLox es basa en un immunoassaig directe en el qual hi ha dos anticossos monoclonals que reconeixen dos determinants antigènics de la molècula d'apoB oxidada.

5. Materials i Mètodes

5.5 ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES

Tots les anàlisis estadístiques van ser realitzades utilitzant el programa SPSS de la versió 17.0 a la 19.0. La significació estadística mínima per cada test es va considerar a partir de $P < 0.05$.

1. Es van utilitzar mètodes estàndard (Kolmogorov-Smirnov) per comprovar si les variables seguien una distribució normal.
2. Les diferències entre dos grups es van analitzar amb el test ANOVA (paramètric) o amb el test U-Mann-Whitney (no paramètric). Les diferències entre múltiples grups es van analitzar utilitzant el post hoc de Bonferroni (paramètric).
3. Les diferències entre el seguiment de les variables es van analitzar amb el test de dades aparellades t-Student (paramètric) o amb el test de Wilcoxon (no paramètric).
4. Per avaluar el grau d'associació entre dues variables es van utilitzar els coeficients de correlació de Pearson (paramètric) i Spearman (no paramètric) o el test de Kruskal Wallis (categòric).
5. Es van crear models de regressió logística múltiple o regressió lineal per estimar la capacitat de grups de variables per predir les variables estudiades.
6. Les gràfiques dels estudis s'han dissenyat amb el programa GraphPad Prism 5.0.

6. Resultats

6. Resultats

RESUM DELS RESULTATS

Estudi 1; SaRHI – score de dieta baixa en hidrats de carboni

Objectiu 1.1) *Estudiar l'efecte d'una dieta baixa en hidrats de carboni i alta en proteïnes i greixos sobre la el valor de saRHI.*

Els individus amb una puntuació baixa en l'score de dieta baixa en hidrats de carboni (45.5HC, 20P, 32.3L) tenien un valor de saRHI més elevat que els individus amb un score elevat de dieta baixa en HC (29.4HC, 24,2P, 44,9L) (1.66 vs. 1.55, P = 0.037).

Objectiu 1.2) *Identificar els components alimentaris i d'estil de vida que impliquen una bona funció endotelial.*

Es va realitzar un model de regressió múltiple multivariant en que la variable dependent va ser el quartil superior del saRHI, i com a variables alimentàries independents es va introduir el consum de greixos saturats, el consum de fibra, el consum d'enol i l'score de dieta baixa en hidrats de carboni. Es va observar que el patró de consum dels individus del quartil 1 d'alimentació (major consum d'HC) en front als dels quartil 4 (menor consum d'HC) tenien una major probabilitat d'estar en el quartil alt de saRHI (OR 0.85; 95%CI 0.19,0.92).

6. Resultats

Objectiu 1.3) *Estudiar la relació entre el valor de saRHI i l'alimentació en diferents malalties metabòliques com la diabetis, l'obesitat abdominal o la síndrome metabòlica.*

Analitzant el quartil superior i inferior de l'score de dieta baixa en HC en relació a la malaltia metabòlica, es va observar una millora significativa del saRHI en totes les condicions metabòliques. Els resultats van ser: per obesitat abdominal (1.82 vs. 1.58, $P < 0.05$), per DM2 (1.78 vs. 1.62, $P < 0.05$), per síndrome metabòlica (1.82 vs. 1.61, $P < 0.05$), per augment de la pressió arterial (1.79 vs 1.61, $P < 0.05$) i per augment dels triglicèrids (1.72 vs. 1.59, $P < 0.05$).

Objectiu 1.4) *Avaluar els determinants independents de tenir un saRHI alt.*

Es va realitzar un model de regressió múltiple multivariant en que la variable dependent va ser el quartil superior del saRHI, i com a variables independents tots els factors relacionats amb la funció endotelial. Després d'ajustar per les interaccions, es va observar que l'score de dieta baixa en HC era l'única variable associada de forma independent amb el quartil alt de saRHI (OR -0.75; 95%CI 0.19,0.92; $P = 0.031$).

Negative effect of a low-carbohydrate, high-protein, high-fat diet on small peripheral artery reactivity in patients with increased cardiovascular risk

Jordi Merino^{1*}, Richard Kones², Raimon Ferré¹, Núria Plana¹, Josefa Girona¹, Gemma Aragonés¹, Daiana Ibarretxe¹, Mercedes Heras¹ and Luis Masana¹

¹Vascular Medicine and Metabolism Unit, Lipids and Atherosclerosis Research Unit, Sant Joan University Hospital, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Faculty of Medicine, Universitat Rovira i Virgili, Spanish Biomedical Research Network in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain

²Cardiometabolic Research Institute, 7505 Fannin Street, Suite 210, Houston, TX 77054, USA

(Submitted 3 February 2012 – Final revision received 27 April 2012 – Accepted 10 June 2012)

Abstract

Low-carbohydrate diets have become increasingly popular for weight loss. Although they may improve some metabolic markers, particularly in type 2 diabetes mellitus (T2D) or the metabolic syndrome (MS), their net effect on arterial wall function remains unclear. The objective was to evaluate the relation between dietary macronutrient composition and the small artery reactive hyperaemia index (saRHI), a marker of small artery endothelial function, in a cohort of patients at increased cardiovascular (CV) risk. The present cross-sectional study included 247 patients. Diet was evaluated by a 3-d food-intake register and reduced to a novel low-carbohydrate diet score (LCDS). Physical examination, demographic, biochemical and anthropometry parameters were recorded, and the saRHI was measured in each patient. Individuals in the lowest LCDS quartile (Q1, 45% carbohydrate; 20% protein; 32% fat) had higher saRHI values than those in the top quartile (Q4, 29% carbohydrate, 24% protein, 40% fat; 1.66 (SD 0.41) v. 1.52 (SD 0.22), $P=0.037$). These results were particularly strong in patients with the MS (Q1 = 1.82 (SD 0.32) v. Q4 = 1.61 (SD 0.27); $P=0.021$) and T2D (Q1 = 1.78 (SD 0.31) v. Q4 = 1.62 (SD 0.35); $P=0.011$). Multivariate analysis demonstrated that individuals in the highest LCDS quartile had a significantly negative coefficient of saRHI, which was independent of confounders (OR = 0.85; 95% CI 0.19, 0.92; $P=0.031$). These findings suggest that a dietary pattern characterised by a low amount of carbohydrate, but high amounts of protein and fat, is associated with a poorer small artery vascular reactivity in patients with increased CV risk.

Key words: Low-carbohydrate diets: Endothelial function: Cardiovascular risk: metabolic syndrome: Type 2 diabetes mellitus

Obesity and the closely related risk cluster of the metabolic syndrome (MS) increase cardiovascular (CV) risk, in turn raising the incidence and prevalence of CHD. Several major scientific bodies currently recommend a low-fat, high-carbohydrate, energy-deficient diet to manage weight and associated comorbidities^(1–3). On the other hand, diets rich in fat and protein, but low in carbohydrates, have become popular, with advocates de-emphasising the role of energy intake in weight gain. Several best-selling books endorse this strategy of carbohydrate reduction, and maintain that weight will be lost despite iso-energetic intake, accompanied by a reduction in CV risk. The low-carbohydrate diet score (LCDS) provides an effective tool to classify individuals according to their relative levels of fat, protein and carbohydrate consumption, embodied in a simple number⁽⁴⁾. The LCDS is based on the percentage of energy consumed as carbohydrate, and reflects the concordance with low carbohydrate intake. The higher the individual score, the

lower the carbohydrate, but the higher the protein and fat content, in that patient's diet. The LCDS has successfully been employed to show that a low-carbohydrate diet is positively associated with the risk of type 2 diabetes (T2D) in a large cohort of healthy men after 20 years of follow-up⁽⁵⁾.

Measurement of the peripheral arterial tonometry (PAT) hyperaemic response, embodied in the small artery reactive hyperaemia index (saRHI), is a relatively new technique considered a toll reflecting endothelial and other variables on small artery vascular function and dilation^(6–9). The genesis, regulation and significance of changes in cutaneous digital hyperaemia differ from those affecting flow-mediated dilatation (FMD), and these determinants are not well known. We previously reported that high adherence to therapeutic lifestyle changes, including a Mediterranean dietary pattern, was associated with improved peripheral small artery vascular reactivity, as assessed by the saRHI, in conjunction with

Abbreviations: ATPIII, Adult Treatment Panel III; CV, cardiovascular; EF, endothelial function; FMD, flow-mediated dilatation; HDL-C, HDL-cholesterol; LCDS, low-carbohydrate diet score; LDL-C, LDL-cholesterol; MS, metabolic syndrome; PAT, peripheral arterial tonometry; RHI, reactive hyperaemia index; saRHI, small artery reactive hyperaemia index; T2D, type 2 diabetes mellitus.

* **Corresponding author:** J. Merino, fax +34 977319984, email jordi.merino@urv.cat

improvements in carotid intima–media thickness⁽¹⁰⁾. We also generated a hypothesis that chronic consumption of high percentages of dietary protein and fat, along with a low intake of carbohydrate, may lead to peripheral small artery vascular dysfunction. The aim of the present study was to evaluate the relation between dietary macronutrient composition, using the LCDS, on the saRHI in a group of patients with increased CV risk.

Subjects and methods

Design and study participants

This is a cross-sectional study in 247 men and women, aged 30–70 years, without a previous diagnosis of CVD, who attended the Vascular Medicine and Metabolism Unit of the University Hospital Sant Joan in Reus (Spain). Only patients with intermediate to high CV risk according to the Framingham risk score, who were diagnosed with diabetes or satisfied adult treatment panel III (ATPIII) criteria for the MS⁽¹¹⁾, were enrolled. We chose patients at intermediate to high risk primarily because re-classification of patients at this level is consistent with present practice guidelines, frequently leading to a change in therapy, and is therefore likely to be clinically meaningful and cost-effective. Patients with diagnosed CVD; chronic renal, hepatic, pulmonary or neurodegenerative problems; a history of prior neoplasia; or other serious chronic diseases were excluded. The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human patients were approved by the Ethical and Clinical Investigation Committee of the hospital. Written informed consent was obtained from all patients.

Clinical assessment

Each of our patients was evaluated with a review of lifestyle components (diet, physical activity and smoking), a complete physical examination including anthropometry, biochemical testing and vascular assessment with the saRHI. Physical activity was quantified in metabolic equivalent task/hours (MET/h) per week according to the Minnesota questionnaire adapted for a Spanish population⁽¹²⁾. Tobacco status was assessed using standardised questionnaires administered by health care providers⁽¹³⁾. A 3-d food-intake register was used to evaluate the diet. The food data of dietary records were converted to energy and nutrient data by experienced dietitians and analysed using the PCN (CESNID Nutritional Program, version 2.0, University of Barcelona). The percentages of energy from carbohydrate, protein and fat were coded according to defined categories, using the LCDS method previously described by Halton *et al.*⁽⁴⁾ in their Women's Health Study Cohort. Briefly, the carbohydrate categories were scored from 10 (lowest intake) to 0 (highest intake), whereas protein and fat categories were scored from 0 (lowest intake) to 10 (highest intake). Ranks were added to create a total score with a maximum value of 30, representing the highest intake of protein and fat and the lowest intake of carbohydrate (see Halton *et al.*⁽⁴⁾, Table 1).

Peripheral small artery vascular reactivity assessment

The saRHI was measured using PAT technology (Endo-PAT-2000; Itamar Medical Limited). Determinations were performed in a quiet room with a controlled temperature (22–24°C) after patients had fasted for 12 h and refrained from smoking or strenuous exercise for 24 h. The patients

Table 1. Differences in demographic and lifestyle data according to low-carbohydrate diet score (LCDS) quartiles†
 (Mean values and standard deviations, percentages of patients, medians and interquartile ranges)

	LCDS Q1 (n 62)		LCDS Q2 (n 63)		LCDS Q3 (n 52)		LCDS Q4 (n 70)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Score (units)								
Median		14		20		24		27
Interquartile range		4		1		1		1
Carbohydrates (%)	45.56	5.46	36.31**	4.47	35.21**	3.41	29.41**	4.98
Protein (%)	20.03	5.18	20.91	6.15	22.95*	3.75	24.24*	3.15
Fat intake (%)	32.32	6.02	40.18**	6.76	40.79**	5.48	44.92**	5.02
Total energy (kJ/d)	7359	2133	7418	2050	7096	2665	6577	1594
Fibre (g/d)								
Median		22		20		20		18
Interquartile range		7		9		7		8
Age (years)	55	11	56	10	54	9	54	9
Sex, men (%)	74		76		77		81	
T2D (%)	34		26		40		37	
Dyslipidaemia (%)	88		92		88		93	
Metabolic syndrome (%)	69		71		60		66	
Hypertension (%)	48		57		61		63	
Smokers (%)	34		35		35		37	
MET (h/week)	33	28	32	25	26	16	23	20
Hypoglycaemic drugs (%)	20		19		26		25	
Hypolipaeamic drugs (%)	66		73		73		77	
Antihypertensive drugs (%)	40		43		44		43	

T2D, type 2 diabetes mellitus; MET, metabolic equivalent task.

Mean values were significantly different from Q1: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

† Derived with an ANOVA or Wilcoxon test for continuous variables or χ^2 test for categorical variables.

lay in a relaxed, quiet and evenly illuminated environment while the device recorded changes in pulse waves in the digital arteries. The technique involved in PAT has been described elsewhere^(14,15). There is a 5 min baseline measurement, after which the cuff is inflated enough to produce ischaemia above baseline systolic pressure. After 5 min of occlusion, the cuff is rapidly deflated and PAT tracing is recorded for an additional 5 min. Blood flow measurements from two fingertips – one from each hand, one a test, the other a control – were compared after a stabilisation period, and a second comparison pair of measurements was taken before and after 5 min of brachial ischaemia in the test arm. The results were processed by specific software to calculate the post-ischaemia reflex vasodilatation observed when measurements from the test arm (before and after ischaemia) were compared to those from the control arm. The value generated was termed the saRHI. The variability of this technique in our laboratory was 17%, the intra-class correlation coefficient was 0.52 and the within-subject variation was 0.19.

Biochemical determinations

Venous blood samples were obtained after a 12-h overnight fast, centrifuged immediately and stored at -80°C until the assays were performed. Total cholesterol, TAG, glucose, direct LDL-cholesterol (LDL-C) and HDL-cholesterol (HDL-C), apoB100 and high sensitive C-reactive protein levels were measured using enzymatic and turbidimetric assays (Spinreact) adapted to the autoanalyser Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics). Differential expression of human inflammatory cytokines was determined using the Human Cytokine Antibody Array (RayBiotech). The array is coated with six specific cytokine antibodies. It was probed with serum samples to allow for the comparisons of relative cytokine levels. The cytokine-antibody-biotin complex was visualised with the addition of a streptavidin-labelled fluorescent dye using a laser scanner.

Statistical analysis

Data are presented as means and standard deviations or as medians and interquartile ranges for continuous variables and as frequencies for categorical variables. Normality distribution of variables was assessed with the Kolmogorov–Smirnov test. Differences between diet, anthropometric, biochemical or vascular data were analysed using the ANOVA or Kruskal–Wallis test for continuous variables or χ^2 test for categorical ones. Univariate association was tested by Spearman correlation analysis. A logistic regression model test was performed to assess the determinants of the saRHI in the present study group patients. The dependent variable of interest was the highest quartile of the saRHI defined as a quartile of individuals with a high saRHI. Independent variables were selected on the basis of univariate analysis and from the variables known to be associated with the dependent variable according to our previous studies. In this test, independent variables were age, sex, T2D, atherogenic dyslipidaemia defined as low HDL-C (<1.03 mmol/l in men and 1.29 mmol/l in women) and high TAG (>1.5 mmol/l),

abdominal obesity and high blood pressure according to ATPIII criteria, high LDL-C (≥ 4.14 mmol/l), smoking, highest quartile of LCDS, highest quartile of physical activity, highest quartile of SFA intake, highest quartile of alcohol intake and highest quartile of fibre intake. *P*-values were calculated as two-sided; a *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. SPSS version 19.0 (SPSS, Inc.) was used for all statistical analysis.

Results

Associations of low-carbohydrate diet score with biochemical and vascular data

The median LCDS in the present study group was 22 (SD 8) points. Participants were distributed into LCDS quartiles according to their macronutrient intake percentages (Table 1). The diet of individuals in the lowest LCDS quartile was composed of 45% carbohydrate, 20% protein and 32% fat. Participants in the top quartile had an intake of 29% carbohydrate, 24% protein and 40% fat. There were no differences between study participant quartiles other than the expected nutrient profile, as indicated in Table 1.

The differences in biochemical and vascular data between LCDS quartiles are shown in Table 2. We observed that individuals in the lowest quartile had a higher saRHI than individuals in the highest quartile (1.66 (SD 0.41) *v.* 1.52 (SD 0.22), $P=0.037$). No significant differences were observed in the other vascular or biochemical parameters.

Association of low-carbohydrate diet score, small artery reactive hyperaemia index and metabolic diseases

An inverse association was observed between the LCDS and saRHI ($r = -0.178$, $P=0.005$). A total of 160 participants fulfilled the ATPIII criteria for the MS. The MS patients in the lowest LCDS quartile ($n = 38$) had higher saRHI values than the MS patients in the highest LCDS quartile ($n = 48$; 1.82 (SD 0.32) *v.* 1.61 (SD 0.27), $P=0.021$; Fig. 1). When the MS components were evaluated, the same association existed between each MS component, saRHI and the LCDS quartiles. The exception was in individuals with low HDL-C, in whom the saRHI was not different when comparing individuals according to the LCDS quartiles (1.74 (SD 0.35, $n = 9$) *v.* 1.62 (SD 0.48, $n = 8$), $P=NS$), as illustrated in Fig. 1.

Among the eighty-four T2D patients, those in the lower quartile ($n = 21$) had better saRHI values than those in the highest quartile ($n = 26$; 1.78 (SD 0.31) *v.* 1.62 (SD 0.35), $P=0.011$; Fig. 1). These results were not modified when pharmacological therapy was taken into account.

Determinants of small artery reactive hyperaemia index

To assess the effect of LCDS on the saRHI independent of potential confounders, a multivariate stepwise test was performed. We considered the highest quartile of the saRHI (2.14 (SD 0.39) as the dependent variable and age, sex, T2D, atherogenic dyslipidaemia defined as low HDL-C

Table 2. Anthropometric, biochemical and vascular data between lowest and highest low-carbohydrate diet score (LCDS) (Mean values and standard deviations; medians and interquartile ranges)

	LCDS Q1 (n 62)		LCDS Q2 (n 63)		LCDS Q3 (n 52)		LCDS Q4 (n 70)		P*
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Body weight (kg)	87.9	14	88.6	13.5	87.1	13.6	89.4	13.1	0.819
Waist circumference (cm)	105	9	105	9	104	9	105	8	0.831
Systolic blood pressure (mmHg)									0.561
Median		130		132		130		135	
Interquartile range		50		15		36		30	
Total cholesterol (mmol/l)	5.43	1.54	5.14	1.04	5.29	1.08	5.26	1.08	0.295
LDL-C (mmol/l)	3.34	0.98	3.04	0.98	3.41	1.02	3.23	0.87	0.128
HDL-C (mmol/l)	1.36	0.37	1.35	0.27	1.36	0.29	1.31	0.37	0.889
apoB100 (mmol/l)	1.18	0.23	1.18	0.21	1.19	0.24	1.17	0.23	0.199
TAG (mmol/l)									0.180
Median		1.91		2.16		2.09		2.49	
Interquartile range		0.97		1.44		1.21		2.05	
Glucose (mmol/l)									0.444
Median		5.76		5.88		5.92		6.19	
Interquartile range		1.89		1.71		2.54		2.64	
hs-CRP (mmol/l)									0.515
Median		1.51		1.76		1.24		1.52	
Interquartile range		4.84		4.56		1.90		1.82	
IL-6 (pg/ml)									0.434
Median		84		87		93		101	
Interquartile range		150		119		102		196	
TNF- α (pg/ml)									0.343
Median		171		184		277		507	
Interquartile range		213		112		339		608	
sICAM-1 (ng/ml)									0.621
Median		96.11		93.51		99.25		121.36	
Interquartile range		16.32		20.85		21.33		22.11	
sVCAM-1 (ng/ml)									0.609
Median		10.04		9.71		10.95		10.97	
Interquartile range		9.77		7.21		6.78		5.92	
sE-selectin (ng/ml)									0.407
Median		34.57		31.15		30.51		41.99	
Interquartile range		35.62		34.59		32.24		31.99	
saRHI (units)									0.037
Median		1.66		1.62		1.61		1.52	
Interquartile range		0.41		0.33		0.3		0.22	

Q, quartiles; LDL-C, LDL-cholesterol; HDL-C, HDL-cholesterol; hs-CRP, high-sensitive C-reactive protein; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1; sVCAM-1, soluble vascular adhesion molecule 1; sE-selectin, soluble E-selectin; saRHI, small artery reactive hyperaemia index.

* Differences regarding Q1 and Q4 study groups using one-way ANOVA or Kruskal–Wallis test.

(<1.03 mmol/l in men and 1.29 mmol/l in women) and high TAG (> 1.5 mmol/l), abdominal obesity and high blood pressure according to ATP III criteria, high LDL-C (\geq 4.14 mmol/l), smoking, highest quartile of LCDS, highest quartile of physical activity (40 (SD 18) MET/h per week), highest quartile of SFA intake (11.6 (SD 2.8) g/d), highest quartile of alcohol intake (21 (SD 12) g/d) and highest quartile of fibre intake (22 (SD 7) g/d) as independent variables. As seen in Fig. 2, individuals in the highest LCDS quartile, as compared with the lowest quartile, had negative probabilities of high saRHI, with a estimated prognostic value of 75 % (OR = 0.85; 95 % CI 0.19, 0.92; $P=0.031$). Saturated fat intake was not an independent predictor of saRHI (OR = 0.88; 95 % CI: 0.41, 1.93; $P=0.631$).

Discussion

Stratifying participants according to their unique dietary macronutrient composition (LCDS), we examined the impact of varying dietary carbohydrate content on small artery vascular function assessed by a recently homologated new tool,

the saRHI. We observed that the higher the LCDS, reflecting a lower dietary carbohydrate content, the lower the small artery reactivity in the digital vascular bed. This inverse relationship was significant and independent of the analyses used and a characteristic of the metabolic risk factors, especially in patients with T2D, the MS or abdominal obesity. While differences in endothelial function (EF) biomarkers did not reach statistical significance, they varied in the same direction. In essence, patients consuming carbohydrate-poor diets had the worst EF profiles.

The literature suggests that diets with low or very low carbohydrate content may be associated with impaired small artery vascular function^(16–19). Randomised clinical trials have shown that weight loss *per se* is the main determinant of improvement in peripheral small artery reactivity using a low-carbohydrate diet or low-fat diet^(20–25). In fact, obesity and visceral adiposity are associated with endothelial dysfunction in resistance and conduit arteries, and weight loss brought about by lowered energy intake improves EF, even in the absence of heart disease or CV risk factors^(26,27).

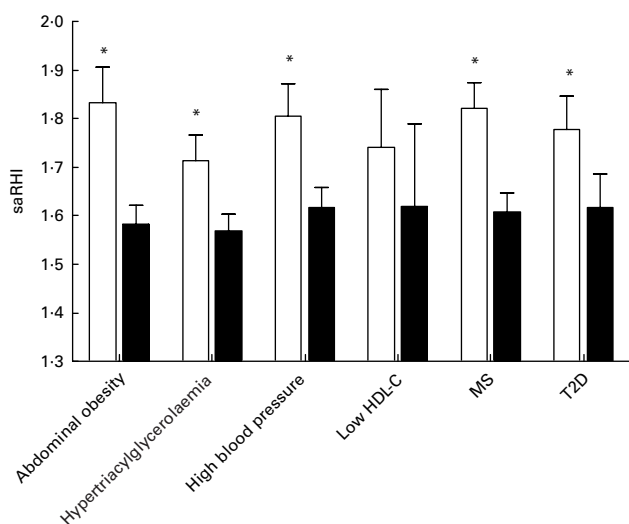


Fig. 1. Differences in the small artery reactive hyperaemia index (saRHI) according to low-carbohydrate diet score (LCDS) quartile and the cardiovascular risk factors. □, LCDS quartile 1 patients; ■, LCDS quartile 4 patients. Data obtained with Kruskal–Wallis test. Values are medians with their inter-quartile ranges. * Median values were significantly different ($P < 0.05$). HDL-C, HDL-cholesterol; MS, metabolic syndrome; T2D, type 2 diabetes mellitus.

However, in clinical trials without changes in body weight, low-carbohydrate/high-protein diets may be significantly associated with twice the amount of arterial plaque, a reduction in the number of circulating and bone marrow endothelial progenitor cells in murine models of atherosclerosis⁽²⁸⁾ and lower FMD in healthy and obese subjects⁽²⁹⁾. One dissenting randomised clinical trial included forty obese and overweight subjects with hypertriacylglycerolaemia, showing an inverse association between carbohydrates and FMD.

However, these data were collected postprandially and cannot be directly extrapolated to basal conditions⁽³⁰⁾. The present results therefore reinforce the known negative impact of very low-carbohydrate diets on vascular function assessed by FMD under fasting conditions, using the PAT technique.

The components and variables affecting EF, assessed by FMD, as compared with PAT differ, and although there may be some correlation, the two techniques provide distinct information about vascular function in conduit arteries *v.* the peripheral small arteries of the finger⁽³¹⁾.

The FMD is highly dependent on NO production, whereas the reactive hyperaemia index (RHI) is not, even though NO has been reported to contribute to RHI^(8,32). While the European Society of Cardiology classifies RHI with other techniques to measure 'EF'⁽³³⁾, the data available at present indicate that each of these methods probably has a unique blend of physiological determinants, and each provides particular information about different vascular beds^(31,34). A recent direct comparison of methods did not reveal a strong correlation⁽⁹⁾. However, FMD is difficult to perform compared to the RHI, and the correlation between the two and other data derived are sufficient to continue clinical investigation^(9,34). Indeed, the saRHI correlates with coronary endothelial dysfunction⁽¹⁴⁾, accurately measures vascular effects when the net CV risk burden improves⁽³⁵⁾, correlates with carotid intima–media thickness and can predict future adverse CV events⁽³⁶⁾. Information from non-invasive PAT studies is useful to assess static or serial vascular function in a variety of patient phenotypes with raised CV risk⁽³⁷⁾.

Our group has shown that saRHI-measured endothelial dysfunction is also associated with increased soluble E-selectin plasma concentrations, suggesting that at least

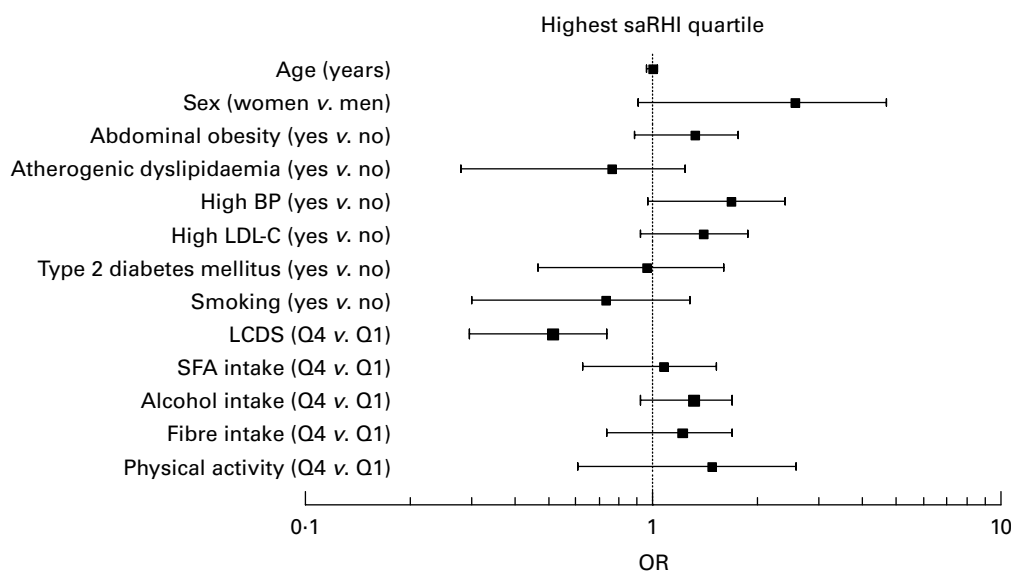


Fig. 2. Determinants of small artery reactive hyperaemia index (saRHI). Multivariate stepwise binary logistic regression test. Dependent variable: highest quartile of saRHI (2.14 (SD 0.39)). Independent variables: age, sex, atherogenic dyslipidaemia (TAG > 1.5 mmol/l and HDL-cholesterol < 1.03 mmol/l in men and 1.29 mmol/l in women), abdominal obesity and high blood pressure (BP) according to adult treatment panel III criteria, high LDL-cholesterol (LDL-C \geq 4.14 mmol/l), smoking, highest quartile of low-carbohydrate diet score (LCDS), highest quartile of physical activity (40 (SD 18) metabolic equivalent task/h per week), highest quartile of SFA intake (11.6 (SD 2.8) g/d), highest quartile of alcohol intake (21 (SD 12) g/d) and highest quartile of fibre intake (22 (SD 7) g/d). Estimated prognostic value: 75%. R^2 Nagelkerke: 0.62.

some mechanisms are shared by both large and small artery function⁽³⁸⁾. In patients without the MS but with risk-related elevations in soluble E-selectin and soluble vascular adhesion molecule 1, there was a strong correlation between saRHI values and levels of oxidised LDL⁽³⁹⁾. A uniting theme is that the saRHI is clearly associated with metabolic parameters, mainly waist circumference, and plasma concentrations of TAG, HDL-C and apoA1⁽⁴⁰⁾. In the present study, we observed significant differences in saRHI between LCDS quartiles composed of hypertriacylglycerolaemic and abdominal obesity subjects; a lack of a similar relationship in subjects with low HDL-C might be due to the small sample size of patients with low HDL-C criteria (Q1 = 9 and Q4 = 8).

Limitations

The present study had other limitations. One was related to the score used in the study and the cut-off values. The LCDS was performed using US population data, and the percentiles of diet relate to healthy American white men and women. However, as the diet consumed by the present study population was similar to the diet of a corresponding American population with equally high CV risk⁽⁴¹⁾, the comparison is reasonable. We did not grade or independently consider dietary amounts of animal or vegetable protein or dietary fat, as the primary focus was the influence of low carbohydrate intake on small artery vascular reactivity. As the study was conducted in patients with increased CV risk, results cannot be generalised to healthy individuals. The present study design did not control all possible confounding variables. Errors associated with completion of food diaries are possible. Although not described, either the pharmacological agents that our patients were taking themselves, or interaction with macronutrient changes, could have influenced EF. Uncontrolled dietary ingredients, such as *n*-3 fatty acids and polyphenols, could potentially confound the results. Finally, a cross-sectional study cannot establish causality. In view of the strength of our main finding, the quantitative importance of these limitations appears small.

Conclusion

In a cross-sectional study of patients with increased CV risk, a dietary pattern characterised by a high LCDS (high protein and fat, but low carbohydrate content) was associated with poorer peripheral small artery function compared with individuals consuming a diet with a lower LCDS. The association was strong in patients with two different metabolic diseases studied: the MS and T2D. This relationship needs confirmation with larger cohorts in randomised clinical trials.

Acknowledgements

The present work was supported by grants from ISCIII, Madrid, Spain (PI 05/1954). CIBERDEM is an initiative of ISCIII, Spain. The authors declared no conflict of interest. The authors' responsibilities were as follows: R. F., N. P. and L. M. designed the study; J. M., G. A., R. F. and N. P. conducted

research; M. H. performed the biochemical analyses; J. M., R. F. and L. M. performed the statistical tests and wrote the final manuscript. R. K. reviewed the manuscript, and contributed significantly to the final form of the introduction and the discussion. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, *et al.* (2000) AHA Dietary Guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke* **31**, 2751–2766.
2. Cummings S, Parham ES & Strain GW (2002) Position of the American Dietetic Association: weight management. *J Am Diet Assoc* **102**, 1145–1155.
3. Flock MR & Kris-Etherton PM (2011) Dietary Guidelines for Americans 2010: implications for cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* **13**, 499–507.
4. Halton TL, Willett WC, Liu S, *et al.* (2006) Low-carbohydrate-diet score and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* **355**, 1991–2002.
5. de Koning L, Fung TT, Liao X, *et al.* (2011) Low-carbohydrate diet scores and risk of type 2 diabetes in men. *Am J Clin Nutr* **93**, 844–850.
6. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, *et al.* (2003) Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* **146**, 168–174.
7. Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, *et al.* (2006) Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* **101**, 545–548.
8. Celermajer DS (2008) Reliable endothelial function testing at our fingertips? *Circulation* **117**, 2428–2430.
9. Dhindsa M, Sommerlad SM, DeVan AE, *et al.* (2008) Interrelationships among noninvasive measures of postischemic macro- and microvascular reactivity. *J Appl Physiol* **105**, 427–432.
10. Ferre R, Plana N, Merino J, *et al.* (2012) Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **22**, 95–102.
11. Grundy SM, Cleeman JI, 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. *Crit Pathw Cardiol* **4**, 198–203.
12. Elosua R, Garcia M, Aguilar A, *et al.* (2000) Validation of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire in Spanish women. Investigators of the MARATDON Group. *Med Sci Sports Exerc* **32**, 1431–1437.
13. DiClemente CC, Prochaska JO, Fairhurst SK, *et al.* (1991) The process of smoking cessation: an analysis of precontemplation, contemplation, and preparation stages of change. *J Consult Clin Psychol* **59**, 295–304.
14. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, *et al.* (2004) Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* **44**, 2137–2141.
15. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, *et al.* (2008) Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **117**, 2467–2474.
16. Dod HS, Bhardwaj R, Sajja V, *et al.* (2010) Effect of intensive lifestyle changes on endothelial function and on inflammatory markers of atherosclerosis. *Am J Cardiol* **105**, 362–367.

17. Miller M, Beach V, Sorkin JD, *et al.* (2009) Comparative effects of three popular diets on lipids, endothelial function, and C-reactive protein during weight maintenance. *J Am Diet Assoc* **109**, 713–717.
18. Wycherley TP, Brinkworth GD, Keogh JB, *et al.* (2010) Long-term effects of weight loss with a very low carbohydrate and low fat diet on vascular function in overweight and obese patients. *J Intern Med* **267**, 452–461.
19. Phillips SA, Jurva JW, Syed AQ, *et al.* (2008) Benefit of low-fat over low-carbohydrate diet on endothelial health in obesity. *Hypertension* **51**, 376–382.
20. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, *et al.* (2003) A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med* **348**, 2082–2090.
21. Gardner CD, Kiazand A, Alhassan S, *et al.* (2007) Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A to Z Weight Loss Study: a randomized trial. *JAMA* **297**, 969–977.
22. Johnstone AM, Lobley GE, Horgan GW, *et al.* (2011) Effects of a high-protein, low-carbohydrate *v.* high-protein, moderate-carbohydrate weight-loss diet on antioxidant status, endothelial markers and plasma indices of the cardiometabolic profile. *Br J Nutr* **106**, 282–291.
23. Clifton PM, Keogh JB, Foster PR, *et al.* (2005) Effect of weight loss on inflammatory and endothelial markers and FMD using two low-fat diets. *Int J Obes (Lond)* **29**, 1445–1451.
24. Keogh JB, Brinkworth GD, Noakes M, *et al.* (2008) Effects of weight loss from a very-low-carbohydrate diet on endothelial function and markers of cardiovascular disease risk in subjects with abdominal obesity. *Am J Clin Nutr* **87**, 567–576.
25. Ferrara LA, Innelli P, Palmieri V, *et al.* (2006) Effects of different dietary protein intakes on body composition and vascular reactivity. *Eur J Clin Nutr* **60**, 643–649.
26. Pierce GL, Beske SD, Lawson BR, *et al.* (2008) Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults. *Hypertension* **52**, 72–79.
27. Brook RD (2006) Obesity, weight loss, and vascular function. *Endocrine* **29**, 21–25.
28. Foo SY, Heller ER, Wykrzykowska J, *et al.* (2009) Vascular effects of a low-carbohydrate high-protein diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15418–15423.
29. Phillips SA (2007) Effects of low-carbohydrate diet on vascular health: more than just weight loss. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H2037–H2039.
30. Volek JS, Ballard KD, Silvestre R, *et al.* (2009) Effects of dietary carbohydrate restriction versus low-fat diet on flow-mediated dilation. *Metabolism* **58**, 1769–1777.
31. Hamburg NM, Palmisano J, Larson MG, *et al.* (2011) Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: The Framingham Heart Study. *Hypertension* **57**, 390–396.
32. Bacon SL, Lavoie KL, Arsenault A, *et al.* (2011) The research on endothelial function in women and men at risk for cardiovascular disease (REWARD) study: methodology. *BMC Cardiovasc Disord* **11**, 50.
33. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, *et al.* (2011) Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **18**, 775–789.
34. Schnabel RB, Schulz A, Wild PS, *et al.* (2011) Noninvasive vascular function measurement in the community: cross-sectional relations and comparison of methods. *Circ Cardiovasc Imaging* **4**, 371–380.
35. Chouraqui P, Schnall RP, Dvir I, *et al.* (2002) Assessment of peripheral artery tonometry in the detection of treadmill exercise-induced myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* **40**, 2195–2200.
36. Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, *et al.* (2010) Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* **31**, 1142–1148.
37. Plana N, Ferre R, Merino J, *et al.* (2011) Heterozygous familial hypercholesterolaemic patients have increased arterial stiffness, as determined using the augmentation index. *J Atheroscler Thromb* **18**, 1110–1116.
38. Versari D, Daghini E, Virdis A, *et al.* (2009) Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care* **32**, Suppl. 2, S314–S321.
39. Aragonés G, Ferre R, Girona J, *et al.* (2012) Small artery dilation and endothelial markers in cardiovascular risk patients. *Eur J Clin Invest* **42**, 34–41.
40. Ferre R, Aragonés G, Plana N, *et al.* (2011) High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A₁ levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries. *Atherosclerosis* **216**, 115–119.
41. Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, *et al.* (2007) Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* **115**, 2390–2397.

6. Resultats

6. Resultats

Estudi 2; SaRHI – greixos poliinsaturats w-3 de cadena llarga

Objectiu 1.1) *Estudiar els canvis en el valor de saRHI en funció de l'augment o la disminució de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3.*

Els pacients en el tercer tertíl de variació de la ingesta de greixos poliinsaturats omega-3 de cadena llarga (125 a 989mg/d) van tenir un augment significatiu en el valor de saRHI (0.19 ± 0.06 , $P < 0.05$) després del seguiment. Les diferències en saRHI també van ser significatives quan es van comparar entre tertils d'ingesta.

Objectiu 1.2) *Estudiar els canvis en biomarcadors d'inflamació i estrès oxidatiu en funció de l'augment o la disminució de la ingesta de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3.*

En els pacients en el tercer tertíl de variació de la ingesta de greixos poliinsaturats omega-3 de cadena llarga (125 a 989mg/d), es va observar una disminució significativa en els nivells de PCR (-0.41 ± 1.08 , $P < 0.05$), TNF- α (-24.5 ± 56.3 , $P < 0.05$), VCAM-1 (-237 ± 81 , $P < 0.05$) i LDLox (-5.9 ± 8.8 , $P < 0.05$).

6. Resultats

Objectiu 1.3) *Estudiar els moduladors del saRHI de forma progressiva.*

Els models multivariants sense ajustar varen mostrar que les variables associades de forma significativa amb el saRHI varen ser els canvis en els nivells d'apolipoproteïna A1 i la ingesta de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 de forma directa, i els nivells de TNF- α , sVCAM-1, sE-selectina, la pressió arterial sistòlica i el perímetre abdominal de forma inversa. Quan aquest model es va ajustar pels canvis en el consum de greixos omega-3 de cadena llarga, van mantenir la significança amb la variable dependent les concentracions de sE-selectina -0.278 (-0.692; -0.037) i la pressió arterial sistòlica -0.321 (-0.687; -0.045).

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Nutritional Biochemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number: JNB-13-457

Title: Increasing long-chain n-3PUFA consumption improves small peripheral artery function in patients at intermediate-high cardiovascular risk.

Article Type: Research Article

Keywords: Endothelial function; Long-chain omega-3PUFA; fish oil; inflammation; subclinical atherosclerosis

Corresponding Author: Dr. Jordi Merino,

Corresponding Author's Institution: Sant Joan University Hospital, IISPV, Rovira i Virgili University. CIBERDEM

First Author: Jordi Merino

Order of Authors: Jordi Merino; Aleix Sala-Vila; Richard Kones; Raimon Ferré; Núria Plana; Josefa Girona; Daiana Ibarretxe; Mercedes Heras; Emilio Ros; Luis Masana

Abstract: Dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LCn-3PUFA) improve endothelial function in medium-large size arteries, but effects on small peripheral arteries, responsible for most arterial resistance, are little known. We investigated the effects of increasing LCn-3PUFA intake with the usual diet on small artery reactive hyperemia (saRHI). Within a clinical trial evaluating the effects of 1 year of intensive lifestyle intervention versus standard care on cardiovascular markers in subjects at risk, we selected 108 participants regardless of treatment allocation (n=47 standard care; n=61 intensive intervention) with complete baseline and follow-up information about dietary, clinical, saRHI, and biochemical data, including biomarkers of inflammation and endothelial activation. At the end of follow-up, saRHI increased across tertiles of change in dietary LCn-3PUFA. Subjects in the top tertile (increased LCn-3PUFA intake) increased ApoA1 and decreased hs-CRP, serum TNF- α , sICAM-1, sVCAM-1, and oxLDL from baseline. After pooling data, in unadjusted models, changes in saRHI significantly correlated to changes in LCn-3PUFA intake and ApoA1 (directly) and changes in systolic blood pressure, waist circumference, TNF- α , sVCAM-1, and sE-selectin (inversely). In a multivariate model, changes in dietary LCn-3PUFA were found to be significantly associated to changes in saRHI (B = 0.176 [95% confidence intervals = 0.073 to 0.288] for an increase by 100 mg/day). Systolic blood pressure was also significantly associated to saRHI changes, although in a detrimental way (B = -0.151 [-0.207 to -0.091] for an increase by 9 mm Hg). We concluded that increased dietary consumption of LCn-3PUFA might be a cost-effective strategy to improve peripheral vasoactivity.

Dr. Bernhard Hennig,

Editor-in-Chief, The Journal of Nutritional Biochemistry

Reus, 26th July 2013

Dear Dr. Hennig:

Enclosed, please find the manuscript entitled “**Increasing long-chain n-3PUFA consumption improves small peripheral artery function in patients at intermediate-high cardiovascular risk**”, to be considered for publication as original research in *JNB*.

The novel results of this study is that in subjects at intermediate-high cardiovascular risk, increased intake of LCn-3PUFA through a non-supplemented diet improves biochemical modulators of vascular endothelial cell function in association with a significant improvement of peripheral saRHI, a surrogate marker of both small artery endothelial function and future cardiac events. This reinforces the notion that of these fatty acids as overall vasculoprotective agents in small peripheral arteries, which resistance is involved in chronic renal and cerebro-vascular disease and adipose tissue dysfunction.

The central message of our paper is consistent with (a) the current model of the pathogenesis of endothelial dysfunction, (b) its relationship with adhesion factors, (c) prevalent concepts of the role of multiple risk factors contributing to atherogenesis, and (d) prior work linking adverse lifestyle characteristics, endothelial dysfunction, and elevated cardiovascular risk. Our results could help not only to better understand the mechanisms of the disease, but also to better translate to the society the results of patient-oriented research.

All authors listed have contributed to the work, all authors have agreed to submit the manuscript to *JNB*, no part of the work has been published before, and the study has been reviewed by the appropriate ethics committees. As stated in “Acknowledgements”, all authors have made a substantial contribution to the study and approved the manuscript. None of them has any conflict of interest.

Thank you in advance for your interest. We look forward to hearing from you. Yours sincerely,

Jordi Merino, corresponding author

Vascular Medicine and Metabolism Unit

Lipids and Atherosclerosis Research Unit

Universitat Rovira i Virgili

Biomedical Research Network in Diabetes and Associated Metabolic Disorders

(CIBERDEM).

Tel: +34 977 759366

Fax: +34 977 759322

e-mail: jordi.merino@urv.cat

List of suggested reviewers:

Philip C. Calder. E-mail: pcc@soton.ac.uk

Raffaele De Caterina. E-mail: rdecafer@unich.it

Dariusz Mozaffarian. E-mail: dmozaffa@hsph.harvard.edu

List of excluded reviewers:

Richard J. Deckelbaum. E-mail: rjd20@columbia.edu

Naomi Hamburg. E-mail: nhamburg@bu.edu

Eric Bruchert. eric.bruckert@psl.ap-hop-paris.fr.

Increasing long-chain n-3PUFA consumption improves small peripheral artery function in patients at intermediate-high cardiovascular risk.

Jordi Merino, MD,^{a, b, *}, Aleix Sala-Vila, PhD,^{c, d, *}, Richard Kones, PhD,^e, Raimon Ferre, PhD,^{a, b},
Núria Plana, PhD,^{a, b}, Josefa Girona, PhD,^{a, b}, Daiana Ibarretxe, MD,^{a, b}, Mercedes Heras, MD,^{a, b},
Emilio Ros, PhD,^{c, d}, Lluís Masana, Prof,^{a, b}

* These authors contributed to this work equally.

^a Vascular Medicine and Metabolism Unit and Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, IISPV, Rovira i Virgili University 43201 Reus, Spain

^b Spanish Biomedical Research Network in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain

^c Lipid Clinic, Endocrinology and Nutrition Service, Biomedical Research Institute August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^d CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain

^e Cardiometabolic Research Institute, 7505 Fannin Street. Suite 210 Houston, Texas 77054 USA

Correspondence to:

Jordi Merino, E-mail: jordi.merino@urv.cat

Vascular Medicine and Metabolism Unit and Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, IISPV, Rovira i Virgili University 43201 Reus, Spain .Spanish

Biomedical Research Network in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM),

Barcelona, Spain Av. Josep Laporte 1, 43204 Reus, Spain. Tel.: +34 977310300 ext.

50414/50077. Fax: +34 977319984.

Running title: LCn-3PUFA and small artery endothelial function.

Funding: This work was supported by grants from ISCIII, Madrid, Spain (PI 05/1954). AS-V was supported by post-doctoral contract FIS CP12/03299.

Keywords: Cardiovascular risk; diet; docosahexaenoic acid; eicosapentaenoic acid; endothelial function; inflammation.

1 **ABSTRACT**

2 Dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LCn-3PUFA) improve endothelial function in
3 medium-large size arteries, but effects on small peripheral arteries, responsible for most arterial
4 resistance, are little known. We investigated the effects of increasing LCn-3PUFA intake with the
5 usual diet on small artery reactive hyperemia (saRHI). Within a clinical trial evaluating the
6 effects of 1 year of intensive lifestyle intervention versus standard care on cardiovascular markers
7 in subjects at risk, we selected 108 participants regardless of treatment allocation (n=47 standard
8 care; n=61 intensive intervention) with complete baseline and follow-up information about
9 dietary, clinical, saRHI, and biochemical data, including biomarkers of inflammation and
10 endothelial activation. At the end of follow-up, saRHI increased across tertiles of change in
11 dietary LCn-3PUFA. Subjects in the top tertile (increased LCn-3PUFA intake) increased ApoA1
12 and decreased hs-CRP, serum TNF- α , sICAM-1, sVCAM-1, and oxLDL from baseline. After
13 pooling data, in unadjusted models, changes in saRHI significantly correlated to changes in LCn-
14 3PUFA intake and ApoA1 (directly) and changes in systolic blood pressure, waist circumference,
15 TNF- α , sVCAM-1, and sE-selectin (inversely). In a multivariate model, changes in dietary LCn-
16 3PUFA were found to be significantly associated to changes in saRHI (B = 0.176 [95%
17 confidence intervals = 0.073 to 0.288] for an increase by 100 mg/day). Systolic blood pressure
18 was also significantly associated to saRHI changes, although in a detrimental way (B = -0.151 [-
19 0.207 to -0.091] for an increase by 9 mm Hg). We concluded that increased dietary consumption
20 of LCn-3PUFA might be a cost-effective strategy to improve peripheral vasoactivity.

21 INTRODUCTION

22 Endothelial dysfunction is an early and critical event in the pathogenesis and progression of
23 atherosclerosis and ensuing cardiovascular events. Brachial artery flow-mediated dilation (FMD)
24 is the most widely used non-invasive method to assess endothelial function in medium-sized
25 arteries. Despite the prognostic value of FMD [1], its clinical use has not been generalized
26 mainly due to technical requirements. Importantly, it does not provide information about small
27 artery resistance, of particular significance in blood pressure regulation, chronic renal and
28 cerebro-vascular disease [2], and adipose tissue dysfunction [3]. Digital peripheral arterial
29 tonometry (PAT) is a homologated and automated non-invasive method that captures a beat-to-
30 beat plethysmographic recording of the finger arterial pulse wave amplitude (PWA), which
31 depends on nitric oxide (NO) synthesis [4]. Digital PAT allows measurement of the small artery
32 reactive hyperemia index (saRHI), a surrogate marker of peripheral small artery endothelial
33 function that correlates with both traditional and novel cardiovascular risk factors and subsequent
34 cardiac events [5,6].

35 Endothelial dysfunction can be improved by lifestyle modifications, as shown in clinical studies
36 [7,8]. This condition is defined by an alteration in the morphological and functional state of the
37 endothelium characterized by a reduction in the bioavailability of vasodilators. The pleiotropic
38 effects of dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LCn-3PUFA), mainly
39 eicosapentaenoic acid (C20:5n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA), include
40 reducing production of inflammatory cytokines and enhanced NO release, with ensuing
41 improvement of endothelium-dependent vasodilation [9]. Consistently, dietary LCn-3PUFA
42 improve endothelial function as assessed by FMD [reviewed in 10,11]. However, information on
43 the effect of these fatty acids on peripheral small artery endothelial function is scarce. Two
44 intervention trials at doses ≥ 1.2 g/d of EPA+DHA during ≤ 3 months reported conflicting results

45 regarding changes in peripheral reactive hyperaemia in obese adolescents [12] and subjects at
46 high vascular risk [13]. The effect on saRHI of EPA and DHA supplied by the usual diet, in the
47 absence of LCn-3PUFA supplementation, remains to be explored. We hypothesized that increased
48 intake of LCn-3PUFA through a non-supplemented diet would affect biochemical modulators of
49 vascular endothelial cell function, ensuing improvement of peripheral small artery function. To
50 address this issue, we assessed for 1 y changes on calculated intake of LCn-3PUFA and measured
51 biomarkers of inflammation, endothelial activation, and saRHI in free-living subjects at
52 intermediate-high cardiovascular risk.

53

54

55 **METHODS**

56 Design and study participants

57 This prospective study included men and women aged between 30 and 70-y who attended the
58 Vascular Medicine and Metabolism Unit of University Hospital Sant Joan in Reus (Spain)
59 between May 2009 and December 2010. They were patients with ATPIII-defined abdominal
60 obesity, metabolic syndrome, or diabetes [14] and had an intermediate-high Framingham risk
61 score. These subjects were part of a larger randomized clinical trial assessing the effects of one
62 year of intensive therapeutic lifestyle changes (TLC) compared to standard care on peripheral
63 small artery function [15]. Briefly, TLC was focused to promote a Mediterranean dietary pattern
64 with at least two servings per week of fatty fish and adapted to patient cardiovascular risk factors,
65 increased physical activity and cessation of smoking. Anthropometric measurements, dietary
66 determinations, blood biochemistry including biomarkers of inflammation and endothelial
67 activation, and determination of saRHI were performed to all participants at baseline and after
68 intervention for one year. Subjects who reported consuming LCn-3PUFA supplements were not

69 considered for this sub-study. Complete information was available in 108 participants (n = 47
70 standard care group; n = 61 intensive TLC group). Regardless of treatment allocation,
71 participants were distributed into tertiles of changes of intake of fish-derived LCn-3PUFA from
72 baseline to end of follow-up. Tertiles 1, 2 and 3 can be equated to decrease, no change, and
73 increase intake of LCn-3PUFA, respectively. The sample size of 35 subjects in each tertile ensued
74 a 80% power to detect a difference between means of 0.024 with a significance level (alpha) of
75 0.05 (two-tailed). The study conformed to the Declaration of Helsinki guidelines and all
76 procedures were approved by the hospital Ethical and Clinical Investigation Committee. Written
77 informed consent was obtained from all participants.

78

79 Clinical and dietary assessment

80 Dyslipidemia, hypertension, or diabetes were considered to be present if subjects had a prior
81 diagnosis of these conditions and/or were treated with lipid-lowering, antihypertensive, or
82 antidiabetic agents, respectively. Smoking status was categorized into never, past or current
83 smoking. Physical activity was assessed with the validated Spanish version of the Minnesota
84 Leisure-Time Physical Activity questionnaire [16]. Height, weight, and waist circumference were
85 measured with standard methods. Trained personnel measured systolic and diastolic blood
86 pressure using a validated oscillometer (Omron HEM-705CP; Hoofddorp, The Netherlands) in
87 triplicate with a 5 minute interval between each measurement, and the mean of these values was
88 recorded. Three-day records were used to evaluate food consumption. To improve the quality of
89 collected data, subjects received an instruction manual at the beginning of the study, including
90 photographs of three portion sizes of foods and drinks. For each item, the subjects were requested
91 to indicate the portion size consumed. The use of the manual has been validated elsewhere [17].
92 Food data were translated into nutrients by an experienced dietitian using the PCN (Cesnid

93 Nutritional Program, version 2.0, Barcelona, Spain).

94

95 Peripheral saRHI assessment

96 saRHI was measured using PAT technology (EndoPAT-2000, Itamar Medical Ltd., Israel).

97 Determinations were performed in a quiet room with a controlled temperature (22-24°C) after a

98 12 h-fast and no smoking or strenuous exercise during the preceding 24 h. Subjects lay in a

99 relaxed, quiet and evenly illuminated environment while the device recorded changes in pulse

100 waves in the digital arteries. The PAT technique used in this study has been described elsewhere

101 [15]. Briefly, after a 5-min baseline measurement, a cuff was placed in the forearm and inflated

102 enough to produce ischemia above baseline systolic pressure. After occlusion for 5 min, the cuff

103 was rapidly deflated and the PAT tracing was recorded for an additional 5 min. Blood flow

104 measurements from two fingertips (one from each hand, one a test, the other a control) were

105 compared after a stabilization period, and a second comparison pair of measurements was taken

106 before and after 5 min of brachial ischemia in the test arm. The results were processed by specific

107 software to calculate the post-ischemic reflex vasodilatation observed in the test arm (before and

108 after ischemia) in comparison with the control arm. The value obtained was termed saRHI. The

109 variability of saRHI measurements in our laboratory was similar to that reported by the

110 manufacturing company device (intra-class correlation coefficient of 0.52 and within-subject

111 variation of 0.19).

112

113 Biochemical determinations

114 Fasting venous blood was centrifuged immediately and samples were stored at -80°C until

115 analyses. Analytes were determined by subject in frozen samples of whole serum or plasma as

116 appropriate. Serum lipids, apolipoproteins and glucose concentrations were determined by

117 standard enzymatic methods in the hospital clinical laboratory. Hs-CRP was determined by a
118 turbidimetric assay. Inflammatory cytokines were determined using the Human Cytokine
119 Antibody Array (RayBiotech, Norcross, GA, USA), with mean inter- and intra-assay CVs <12%
120 and <10%, respectively. Oxidized low-density lipoproteins were determined by ELISA (Merckodia
121 AB, Uppsala, Sweden), with a mean inter- and intra-assay CV of 6.3% and 4.7%, respectively.

122

123 Statistical methods

124 Normality distribution of variables was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. The Mann-
125 Whitney test was used to assess for differences in changes on dietary LCn-3PUFA between
126 intervention groups (standard care / intensive TLC). Subsequent data refer to pooled data from
127 both groups. Baseline imbalances in cardiovascular risk among tertiles of changes from baseline
128 of dietary LCn-3PUFA were assessed by chi-square, Kruskal-Wallis, or ANOVA with Bonferroni
129 post-hoc tests, as appropriate. Within-tertile changes from baseline in food and nutrient
130 consumption and biochemical and vascular variables were assessed using paired t-test or the
131 Wilcoxon test, as appropriate. Between-tertile comparisons were assessed by chi-square test,
132 Kruskal-Wallis and ANOVA with Bonferroni post-hoc test, as appropriate. Linear regression
133 models were constructed to search for associations between changes of saRHI (dependent
134 variable) with each independent variable of interest (changes of waist circumference, systolic and
135 diastolic blood pressure, fasting glucose, LDL-c, HDL-c, triglycerides, apolipoprotein (apo) A1,
136 hs-CRP, IL-6, TNF- α , sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, and oxLDL, expressed as Z-transformed
137 scores; and change in LCn-3PUFA intake, expressed as an increase by 100 mg/d). We then
138 assessed the association between changes in LCn-3PUFA intake (independent variable) with
139 changes on saRHI (dependent variable). To address this issue, we performed a multivariate linear
140 regression adjusting for gender, age, diabetes, dyslipidemia, allocation into TLC group, and

141 variables showing significant association with saRHI in the unadjusted linear regression models
142 (changes in ApoA1, systolic blood pressure, waist circumference, TNF- α , sVCAM-1, and sE-
143 selectin). In all cases, two-sided p-values were calculated and $p < 0.05$ was considered statistically
144 significant. SPSS version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses.

145

146

147 **RESULTS**

148 After 1 year of intervention, no significant differences were found for changes in LCn-3PUFA
149 intake between participants allocated into standard care (median 294 mg/d, rang interquartil 288
150 mg/d) or intensive TLC group (median 353 mg/d, rang interquartil 317 mg/d) ($P = 0.143$).

151 Subsequent data refer to pooled data from both groups. Tertiles of LCn-3PUFA change were well
152 balanced for participants' baseline clinical characteristics, lipid profiles, and treatment regimens
153 (**Table 1**). Likewise, no significant changes were observed across tertiles in lifestyle variables,
154 including energy and nutrient intake, smoking, physical activity, and adiposity (**Table 2**). At the
155 end of follow-up, subjects in the top tertile (increased LCn-3PUFA intake) showed a significant
156 increase of ApoA1 and reductions of hs-CRP, serum TNF- α , sICAM-1, sVCAM-1, and oxLDL.

157 SaRHI changed across tertiles (with a significant increase from baseline in the top tertile) with
158 significant between-group differences ($P = 0.028$). **Table 3** shows that variables significantly
159 associated with saRHI were changes in LCn-3PUFA intake and ApoA1 (directly), and systolic
160 blood pressure, waist circumference, TNF- α , sVCAM-1, and sE-selectin (inversely). **Figure 1**
161 shows the change in saRHI associated with an increase by 100 mg/d of LCn-3PUFA intake and
162 other cardiometabolic risk-related variables. As seen, only changes in LCn-3PUFA consumption
163 ($B = 0.176$ [95% CI = 0.073 to 0.288]), and systolic blood pressure ($B = -0.151$ [-0.207 to -
164 0.091]) were significantly associated with saRHI changes (Durbin-Watson 2.147, $R^2 = 0.599$).

165 **DISCUSSION**

166 In this sub-analysis of a randomized clinical trial evaluating the 1-y effects of intensive TLC in
167 108 free-living individuals at intermediate-high cardiovascular risk, we observed that increasing
168 intake of fish-derived LCn-3PUFA significantly improves peripheral saRHI, a surrogate marker
169 of endothelial function and cardiac events. This effect might be explained in part by a beneficial
170 effect of LCn-3PUFA intake on circulating endothelial activation molecules and inflammation
171 markers. Therefore, increased consumption of LCn-3PUFA achieved through a normal diet might
172 be a cost-effective strategy to improve peripheral vasoactivity, which is involved in both
173 atherosclerosis and diabetes-related microvascular complications.

174 Endothelial function is a tightly regulated physiological process that is influenced by many
175 factors, including mechanical and biochemical blood signals. Two decades ago, Fleischhauer and
176 co-workers reported that LCn-3PUFA improved endothelium-dependent vasodilatation as a result
177 of changes in endothelial membrane fluidity [18]. Mechanisms underlying the functional
178 regulatory action of these fatty acids on vascular endothelium have since been unveiled, as
179 reviewed [19]. The salutary effect of dietary LCn-3PUFA on saRHI (a surrogate marker of small
180 artery endothelial function) reinforces the notion of these fatty acids as overall vasculoprotective
181 agents in small peripheral arteries, which resistance is involved in chronic renal and cerebro-
182 vascular disease [2] and adipose tissue dysfunction [3]. This adds to the well-known effects of
183 LCn-3PUFA on FMD, another surrogate marker of endothelial function that measures the dilation
184 capacity of large-conduit arteries (usually the brachial artery).

185 We found significant inverse associations between saRHI and sVCAM-1 and sE-selectin, which
186 concurs with the results of a cross-sectional study conducted in 407 subjects with no evidence of
187 cardiovascular disease but at low–intermediate global cardiovascular risk (5–20% at 10 years
188 according to the Framingham risk score) [20]. Similarly, both waist circumference and

189 ApoA1 were associated with saRHI in a larger cohort with similar clinical characteristics [21]. In
190 our study the statistical significance of all of these associations was blunted after adjusting for
191 LCn-3PUFA intake. This finding suggests that the ultimate effect of LCn-3PUFA on saRHI is
192 likely to be mediated through a reduction of inflammation (decreased TNF- α) and circulating
193 endothelial activators (decreased s-VCAM-1 and sE-selectin) and an improvement in the
194 functionality of HDL cholesterol (increased ApoA1). The latter is speculative, however, given
195 that no enzymatic activities were determined. Nevertheless, many clinical studies have shown
196 that supplementation with LCn-3PUFA was associated with an increase of large HDL particles
197 and/or decrease of small HDL particles [22]. This is consistent with the view that large, spherical
198 HDL are the preferred acceptors of the cholesterol that effluxes from macrophages via the ATP
199 binding cassette transporter G1 [23]. Such HDL particle changes have been observed even with
200 LCn-3PUFA doses similar to those derived from fish consumption by our study subjects,
201 although the issue is far from settled [reviewed in 24].

202 Our results provide evidence on a novel lifestyle factor for improving saRHI, which adds to
203 weight loss [25], quitting smoking [15], and greater adherence to a Mediterranean diet [15].
204 Remarkably, this effect can be observed even with small increases of LCn-3PUFA in the context
205 of realistic changes in consumption of fish achieved through a normal diet without
206 supplementation. This is the main novelty compared to the results of the few clinical trials that
207 examined saRHI responses after pharmacological doses of LCn-3PUFA supplements. Thus, doses
208 of 3.4 g/d had no effect on saRHI, which was ascribed to the low duration of the intervention (8
209 wk), [13] while smaller doses (1.2 g/d) but with a higher exposure (3 mo) significantly improved
210 vasomotor function [12]. Therefore, our results add to the notion that consumption of seafood and
211 fatty fish in particular is an integrative strategy to improve cardiovascular health, as
212 recommended by guidelines of scientific societies [26,27]. In this regard, the vascular benefits

213 derived from higher customary fatty fish intake may help explain the low rates of both incident
214 coronary heart disease and cardiac death observed in Japan [28] and Spain [28,29] despite a high
215 background prevalence of cardiovascular risk factors [30,31].

216 There are limitations to our study. Given that the study subjects were at intermediate to high
217 cardiovascular risk, the generalization of our findings to healthier individuals is uncertain.

218 Patients were previously under pharmacological intervention. Although we did not observe on-
219 trial changes in medication, the interaction between drugs and small artery endothelial function
220 may modulate the results. There are also strengths to our study, such as the comprehensive
221 characterization of study subjects for cardiovascular risk factors and the use of validated methods
222 for acquisition of dietary data.

223 In conclusion, our results show that in subjects at intermediate cardiovascular risk increased
224 intake of LCn-3PUFA through a non-supplemented diet improves biochemical modulators of
225 vascular endothelial cell function in association with a significant improvement of peripheral
226 saRHI, a surrogate marker of both small artery endothelial function and future cardiac events.
227 Our findings are consistent with the current model of the pathogenesis of endothelial dysfunction;
228 its relationship with vascular cell adhesion molecules; and prior work linking adverse lifestyle
229 characteristics, endothelial dysfunction, and high cardiovascular risk.

230

231 **Acknowledgements**

232 The authors' responsibilities were as follows: RF, NP and LM designed the study; JM, RF, NP,
233 DA and LM conducted research; MH, JG performed the biochemical analyses; JM, AS-V, RK,
234 RF, ER and LM performed the statistical tests and wrote the final manuscript. The authors
235 acknowledge the enthusiastic collaboration of study participants. CIBERdem and CIBERObn are
236 initiatives of ISCIII, Spain. None of the authors had a personal or financial conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults. The Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007;115:2390-7.
- [2] O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* 2005;46:200-4.
- [3] de Jongh RT, Ijzerman RG, Serné EH, Voordouw JJ, Yudkin JS, de Waal HA, et al. Visceral and truncal subcutaneous adipose tissue are associated with impaired capillary recruitment in healthy individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:5100-6.
- [4] Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011;18:775-89.
- [5] Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467-74.
- [6] Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;31:1142-8.
- [7] Rallidis LS, Lekakis J, Kolomvotsou A, Zampelas A, Vamvakou G, Efstathiou S, et al. Close adherence to a Mediterranean diet improves endothelial function in subjects with abdominal obesity. *Am J Clin Nutr* 2009;90:263-8.
- [8] Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res* 2010;79:184-92.
- [9] De Caterina R. n-3 fatty acids in cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2011;364:2439-50.

- [10] Egert S, Stehle P. Impact of n-3 fatty acids on endothelial function: results from human interventions studies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14:121-31.
- [11] Wang Q, Liang X, Wang L, Lu X, Huang J, Cao J, et al. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 2012;221:536-43.
- [12] Dangardt F, Osika W, Chen Y, Nilsson U, Gan LM, Gronowitz E, et al. Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents. *Atherosclerosis* 2010;212:580-5.
- [13] Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS, Vanden Heuvel JP, Wagner PR, West SG. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* 2011;93:243-52.
- [14] National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-421.
- [15] Ferré R, Plana N, Merino J, Aragonès G, Girona J, Heras M, et al. Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:95-102.
- [16] Elosua R, Garcia M, Aguilar A, Molina L, Covas MI, Marrugat J. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:1431-7.
- [17] Le Moullec N, Deheeger M, Preziosi P. Validation du manuel photos utilité Pour l'enquete

alimentaire de l'Etude SU.VI.MAX. *Cah Nutr Diet* 1996;31:158-64.

- [18] Fleischhauer FJ, Yan WD, Fischell TA. Fish oil improves endothelium-dependent coronary vasodilation in heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:982-9.
- [19] Balakumar P, Taneja G. Fish oil and vascular endothelial protection: bench to bedside. *Free Radic Biol Med* 2012;53:271-9.
- [20] Aragonès G, Ferré R, Girona J, Plana N, Merino J, Heras M, et al. Small artery dilation and endothelial markers in cardiovascular risk patients. *Eur J Clin Invest* 2012;42:34-41.
- [21] Ferré R, Aragonès G, Plana N, Merino J, Heras M, Buixadera C, et al. High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1 levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries. *Atherosclerosis* 2011;216:115-9.
- [22] Burillo E, Martin-Fuentes P, Mateo-Gallego R, Baila-Rueda L, Cénarro A, Ros E, et al. Omega-3 fatty acids and HDL. How do they work in the prevention of cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:432-41.
- [23] Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:139-43.
- [24] Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem* 2011;57:392-410.
- [25] Merino J, Megias-Rangil I, Ferré R, Plana N, Girona J, Rabasa A, et al. Body weight loss by very-low-calorie diet program improves small artery reactive hyperemia in severely obese patients. *Obes Surg* 2013;23:17-23.
- [26] Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:2747-57.
- [27] Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European

Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 2012;33:1635-701.
Erratum in: *Eur Heart J* 2012;33:2126.

- [28] Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999;353:1547-57.
- [29] Marrugat J, Elosua R, Aldasoro E, Tormo MJ, Vanaclocha H, Segura A, et al. Regional variability in population acute myocardial infarction cumulative incidence and mortality rates in Spain 1997 and 1998. *Eur J Epidemiol* 2004;19:831-9.
- [30] Ueshima H. Explanation for the Japanese paradox: prevention of increase in coronary heart disease and reduction in stroke. *J Atheroscler Thromb* 2007;14:2780-6.
- [31] Gabriel R, Alonso M, Segura A, Tormo MJ, Artigao LM, Banegas JR. ERICE Cooperative Group. Prevalence, geographic distribution, and geographic variability of major cardiovascular risk factors in Spain. Pooled analysis of data from population-based epidemiological studies: the ERICE Study. *Rev Esp Cardiol* 2008;61:1030-40.

FIGURE 1

Title: Multivariate associations between saRHI and cardiometabolic risk-related variables in 108 patients at intermediate-high cardiovascular risk.

Caption: Data are presented as point estimates with 95% CI for an increase by 100 mg/d of LCn-3PUFA and for a 1 SD-changes in ApoA1 (5.02 mmol/L); systolic blood pressure (9 mm Hg); waist circumference (2.3 cm); tumour necrosis factor-alpha, TNF- α (33.2 pg/mL); soluble vascular adhesion molecule-1, sVCAM-1 (214 ng/mL); and soluble E-selectin, sE-selectin (21.8 ng/mL). The model also included gender, age, diabetes, dyslipidemia, and allocation into therapeutic lifestyle changes (TLC) group as potential confounders.

Values relating to saRHI are 0.176 (0.073 to 0.288) for LCn-3PUFA; -0.088 (-0.165 to 0.056) for being male; 0.001 (-0.008 to 0.001) for age; -0.112 (-0.19 to 0.067) for being diabetic; -0.058 (-0.151 to 0.134) for being dyslipidemic; 0.098 (-0.072 to 0.267) for allocation into TLC group; 0.078 (-0.026 to 0.185) for ApoA1; -0.151 (-0.207 to -0.091) for systolic blood pressure; 0.033 (-0.065 to 0.031) for waist circumference; 0.163 (-0.055 to 0.211) for TNF- α ; -0.07 (-0.103 to 0.048) for sVCAM-1; and -0.063 (-0.115 to 0.039) for sE-selectin.

Table 1. Baseline clinical characteristics, lipid profiles and treatment regimens of the study

subjects by tertiles (T) of 1-y changes in LCn-3PUFA intake (ranges in mg/d).

	T1 (-454 to -29) n=36	T2 (-28 to 124) n=36	T3 (125 to 989) n=36	p *
Male, n (%)	27 (75.0)	26 (72.2)	27 (75.0)	0.852
Age, years	55 ± 8	54 ± 10	58 ± 10	0.128
Family history of early-onset CHD, n (%)	4 (11.1)	5 (13.9)	5 (13.9)	0.952
BMI, kg/m ²	31.3 ± 3.1	31.7 ± 3.6	31.2 ± 3.5	0.790
Waist circumference, cm ¹	105 ± 9	105 ± 10	106 ± 9	0.978
Leisure-time physical activity, MET-h/wk	24 ± 19	30 ± 20	27 ± 21	0.257
Current smoker, n (%)	16 (44.4)	14 (38.9)	14 (38.9)	0.890
Former smoker, n (%)	5 (13.9)	7 (19.4)	5 (13.9)	0.697
Dyslipidemia, n (%)	29 (80.5)	26 (72.2)	29 (80.5)	0.529
Total cholesterol, mmol/L ¹	5.5 ± 1.5	5.1 ± 1.4	5.2 ± 1.2	0.142
HDL-cholesterol, mmol/L ¹	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.2	0.535
LDL-cholesterol, mmol/L ¹	3.5 ± 1.4	3.1 ± 1.4	3.2 ± 1.1	0.165
Triacylglycerols, mmol/L ¹	3.2 ± 2.2	2.6 ± 1.6	2.8 ± 1.5	0.665
Use of statins, n (%)	20 (55.6)	16 (44.4)	19 (52.8)	0.618
Hypertension, n (%)	20 (55.6)	20 (55.6)	21 (58.3)	0.859
Systolic blood pressure, mm Hg ¹	137 ± 19	138 ± 21	137 ± 18	0.995
Dyastolic blood pressure, mm Hg ¹	85 ± 8	84 ± 10	85 ± 10	0.730
Use of antihypertensive drugs, n (%)	19 (52.7)	16 (44.4)	18 (50.0)	0.765
Type-2 diabetes, n (%)	13 (36.1)	12 (33.3)	12 (33.3)	0.960
Fasting glucose, mmol/L	6.9 ± 2.2	6.7 ± 2.4	6.3 ± 1.7	0.312
Use of oral antidiabetic agents, n (%)	9 (25.0)	7 (19.4)	5 (13.9)	0.492
Use of insulin, n (%)	2 (5.6)	2 (5.6)	1 (2.8)	0.811
Allocated to the intensive TLC group, n (%)	20 (55.6)	19 (51.9)	22 (61.1)	0.532

Values are given as mean ± SD or median ± interquartile range¹ except for qualitative variables (expressed as n and %). CHD, coronary heart disease; MET-h/wk, hours at a

given metabolic equivalent level (units of energy expenditure in physical activity, 1 MET-min is roughly equivalent to 1 kcal); TLC, therapeutic lifestyle changes.

* Obtained by chi-square test, Kruskal-Wallis and ANOVA with Bonferroni post-hoc test, as appropriate.

Table 2. Changes in lifestyle, clinical, biochemical and vascular data variables (final minus baseline) by tertiles (T) of 1-y changes in LCn-3PUFA intake (range in mg/d).

	T1 (-454 to -29) n=36	T2 (-28 to 124) n=36	T3 (125 to 989) n=36	p *
Total energy, kcal/d	- 89 ± 208	-74 ± 184	-75 ± 201	0.184
Protein, g/d	-5.71 ± 7.10	-4.43 ± 6.81	-6.17 ± 5.7	0.170
Carbohydrate, g/d	-27.33 ± 18.15 ‡	-21.36 ± 17.38	-25.52 ± 18.34 ‡	0.158
Total fat, g/d	1.88 ± 1.11	2.19 ± 0.98	1.9 ± 1.06	0.535
SFA, g/d	-1.21 ± -0.61	-1.14 ± 0.59	-1.39 ± 0.86	0.775
MUFA, g/d	2.18 ± 1.45	1.94 ± 1.03	2.23 ± 1.19	0.886
PUFA, g/d	1.55 ± 0.81	0.87 ± 1.01	1.91 ± 1.29	0.520
Total fiber, g/d ¹	-0.90 ± 0.87	1.02 ± 1.03	-2.21 ± 0.95	0.303
Quit smoking, n (%) †	4 (11.1)	2 (5.6)	3 (8.4)	0.619
Leisure-time physical activity, MET-h/wk	4.7 ± 11.3	6.5 ± 16.4	6.3 ± 16.6	0.420
Waist circumference, cm ¹	-1.6 ± 4.3 ‡	-0.9 ± 4.7	-1.1 ± 4.5	0.772
Systolic blood pressure, mm Hg	-4 ± 14	-6 ± 18 ‡	-4 ± 15	0.788
Glucose, mmol/L	-0.08 ± 0.90	-0.23 ± 1.08	-0.14 ± 0.89	0.746
LDL-cholesterol, mmol/L ¹	-0.13 ± 0.86	-0.19 ± 0.58	-0.18 ± 0.54	0.939
HDL-cholesterol, mmol/L	-0.01 ± 0.26	0.01 ± 0.28	0.03 ± 0.18	0.625
Triglycerides, mmol/L ¹	-0.42 ± 1.15	-0.15 ± 1.48	-0.41 ± 1.02	0.643
Apolipoprotein B100, mmol/L ¹	3.81 ± 1.32	2.72 ± 1.21	3.25 ± 1.06	0.769
Apolipoprotein A1, mmol/L ¹	2.57 ± 1.25	2.97 ± 1.91	3.94 ± 1.67 †	0.700
hs-CRP, mmol/L ¹	0.28 ± 1.63	0.16 ± 1.90	-0.41 ± 1.08 †	0.313
IL-6, pg/mL ¹	-13.3 ± 8.3	-20.7 ± 10.8	-26.4 ± 6.8	0.937
TNF-α, pg/mL ¹	-17.0 ± 55.9	-23.6 ± 65.9 †	-24.5 ± 56.3 †	0.952
sICAM-1, ng/mL ¹	-30 ± 118	-48 ± 124 †	-60 ± 93 †	0.708
sVCAM-1, ng/mL ¹	108 ± 69	-123 ± 121	-237 ± 81 †	0.503
sE-selectin, ng/mL ¹	12.8 ± 4.6	18.8 ± 6.2	15.2 ± 3.1	0.716
oxLDL, U/mmol ¹	-2.5 ± 9.4	-4.5 ± 7.1	-5.9 ± 8.8 †	0.817
SaRHI	-0.14 ± 0.05	0.10 ± 0.06	0.19 ± 0.06 †	0.028

Values are given as mean ± SD or median ± interquartile range¹ except for qualitative

variables (expressed as n and %). SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; MET-h/wk, hours at a given metabolic equivalent level (units of energy expenditure in physical activity, 1 MET-min is roughly equivalent to 1 kcal); Hs-CRP, high sensitive C-reactive protein; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumour necrosis factor-alpha; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular adhesion molecule-1; sE-selectin, soluble E-selectin; oxLDL, oxidized LDL; saRHI, small artery reactive hyperemia index.

* p-value between changes of each group by chi-square test, Kruskal-Wallis, or ANOVA with Bonferroni post-hoc test, as appropriate.

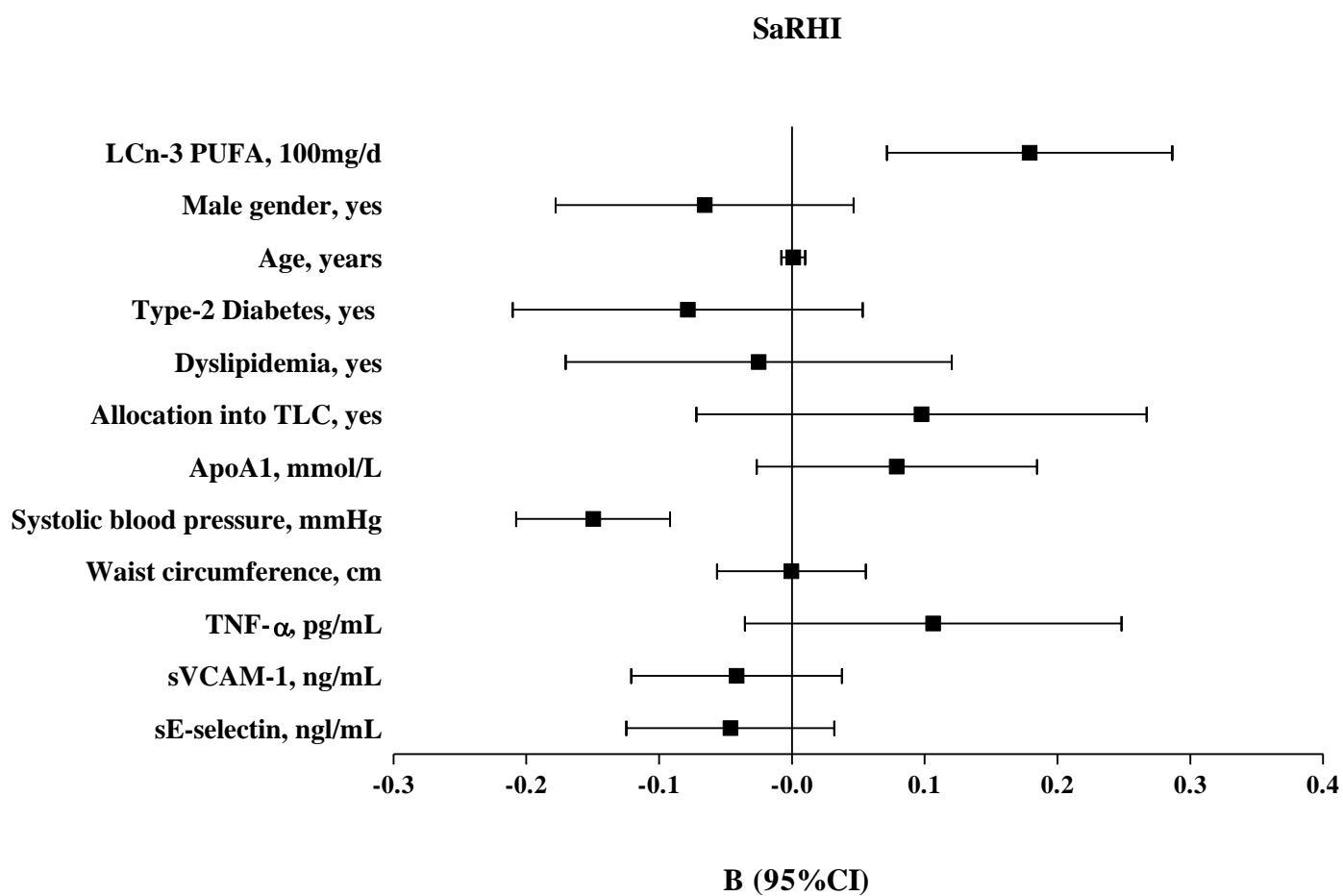
† Percent of smokers at baseline. Only between-group comparisons were assessed.

‡ p < 0.05 between baseline and end of follow-up by paired t-test or Wilcoxon test, as appropriate.

Table 3. Associations between 1-y changes of small artery reactive hyperemia index and 1-y changes of several vascular-risk related variables.

Independent variable	B (95%CI)
LCn-3PUFA intake	0.016 (0.006; 0.026)
Waist circumference	-0.280 (-0.536; -0.005)
Systolic blood pressure	-0.266 (-0.664; -0.031)
Diastolic blood pressure	-0.333 (-1.423; 0.557)
Glucose	-0.120 (-0.547; 0.330)
LDL-cholesterol	0.067 (-0.415; 0.549)
HDL-cholesterol	-0.020 (-0.131; 0.319)
Apolipoprotein A1	0.388 (0.018; 0.697)
Triglycerides	0.027 (-0.666; 0.720)
high sensitive C-reactive protein	-0.018 (-0.287; 0.251)
Interleukin-6	0.133 (-0.219; 0.484)
Tumor necrosis factor- α	-0.365 (-0.633; -0.007)
sICAM-1	-0.038 (-0.382; 0.307)
sVCAM-1	-0.279 (-0.417; -0.004)
Soluble E-selectin	-0.273 (-0.675; -0.018)
Oxidized LDL	-0.116 (-0.420; 0.188)

Data are presented for a 1 SD unit increase (except for LCn-3PUFA intake, expressed as an increase by 100 mg/d), analyzed by linear regression. sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular adhesion molecule-1.



6. Resultats

6. Resultats

Estudi 3; SaRHI – nivells baixos d'activitat física

Objectiu 1.1) *Avaluar els canvis en la funció endotelial de petita artèria en un grup de pacients amb risc cardiovascular moderat que participen en un programa comunitari d'activitat física de baixa intensitat.*

Després del programa d'activitat física de baixa intensitat es va observar una millora significativa en el valor de saRHI (1.97 ± 0.51 vs. 2.26 ± 0.07 , $P = 0.0043$). La variació en l'activitat física es va correlacionar de forma directa amb les variacions de saRHI ($r = 0.330$, $P = 0.027$).

Objectiu 1.2) *Avaluar l'efecte de les variacions en l'activitat física de baixa intensitat sobre biomarcadors de l'estrès oxidatiu, superòxid dismutasa i glutatión peroxidasa, i de la síntesi d'òxid nítric mitjançant les concentracions d'ADMA.*

Es va observar un increment significatiu en les variacions de les concentracions de SODe (2075 vs. 3331, $P < 0.001$) SODpl (3.8 vs. 4.7, $P < 0.05$), GPXpl (9506 vs 12628, $P < 0.001$) i disminució significativa de les concentracions d'ADMA (0.48 vs. 0.40, $P < 0.001$). L'augment en els nivells d'activitat física es van correlacionar de forma significativa amb les variacions de GPXpl ($r = 0.299$, $P = 0.05$).

6. Resultats

Objectiu 1.3) *Estudiar la relació entre els canvis en l'activitat física de baixa intensitat i els canvis en la freqüència cardíaca.*

Després del programa d'activitat física es va observar una disminució significativa en la freqüència cardíaca en repòs ($-6.6 \pm -9.8\%$, $P < 0.001$). La variació en els nivells d'activitat física es van correlacionar de forma inversa amb les variacions en la freqüència cardíaca ($r = -0.297$, $P = 0.047$). Els canvis en la freqüència cardíaca es varen correlacionar de forma inversa amb els canvis en el saRHI ($r = -0.364$, $P = 0.021$).

Objectiu 1.4) *Avaluar l'efecte de l'activitat física de baixa intensitat sobre els factors de risc cardiovascular clàssics, el pes corporal i la distribució de greix corporal.*

No es van observar diferències significatives en els factors de risc cardiovasculars clàssics després de la intervenció. No hi va haver diferències significatives en el pes (72.4 vs. 72.3, $P = \text{NS}$), en la disminució del perímetre abdominal (97 vs. 97, $P = \text{NS}$) o distribució del greix abdominal visceral (14 vs. 13, $P = \text{NS}$) o subcutani (16 vs. 15, $P = \text{NS}$).

Even low physical activity levels improve vascular function in overweight and obese postmenopausal women

Jordi Merino, MD,^{1,2} Raimon Ferré, PhD,^{1,2} Josefa Girona, PhD,^{1,2} Dolors Aguas, MD,³ Anna Cabré, PhD,^{1,2} Núria Plana, PhD,^{1,2} Angels Vinuesa, MD,^{4,5} Daiana Ibarretxe, MD,^{1,2} Josep Basora, PhD,^{4,5} Carme Buixadera, MD,^{1,2} and Lluís Masana, PhD^{1,2}

Abstract

Objective: Some individuals with cardiovascular risk are unable to achieve even the lower internationally recommended level of physical activity (PA). We aimed to study the impact of a lower-than-advised level of PA on small artery vascular function and oxidative stress in overweight and obese postmenopausal women.

Methods: Forty-seven overweight and obese postmenopausal women completed a 4-month program of 1-hour low-intensity PA for 2 days per week. Before and after the intervention, PA level (metabolic equivalent tasks/h/wk), endogenous antioxidant status (superoxide dismutase and erythrocyte lysate and glutathione peroxidase erythrocyte lysate concentrations, superoxide dismutase plasma and glutathione peroxidase plasma [GPXa] activities, and oxidized low-density lipoprotein), asymmetrical dimethylarginine concentrations, endothelial function by small artery reactive hyperemia index (saRHI), and resting heart rate (RHR) were assessed.

Results: After the intervention, a significant increase in GPXa and decreases in asymmetrical dimethylarginine concentrations and RHR ($P < 0.001$ for all) were observed. Increases in PA were positively associated with increases in saRHI ($r = 0.330$, $P = 0.027$) and GPXa ($r = 0.299$, $P = 0.05$) and a decrease in RHR ($r = -0.297$, $P = 0.047$). Multivariate analyses showed that the independent predictors of saRHI improvement were an increase in PA ($\beta = 2.63$; 95% CI, 1.24-4.19; $P = 0.019$), a decrease in RHR ($\beta = 1.96$; 95% CI, 1.01-5.03; $P = 0.048$), and an increase in GPXa ($\beta = 2.64$; 95% CI, 1.18-5.08; $P = 0.021$).

Conclusions: Even low-intensity PA improves antioxidant capacity, RHR, and saRHI in postmenopausal women. Advising postmenopausal women to increase their PA at any level seems warranted based on our preliminary and hypothesis-generating data.

Key Words: Physical activity – Postmenopause – Oxidative stress – Small artery endothelial function – Asymmetrical dimethylarginine – Physical activity intervention.

Received October 5, 2012; revised and accepted December 27, 2012.

From the ¹Vascular Medicine and Metabolism Unit and Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Rovira i Virgili University, Reus, Spain; ²Spanish Biomedical Research Network in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain; ³Reus Esport i Lleure, Ajuntament de Reus, Spain; ⁴Atención Primaria, Institut Català de la Salut, Tarragona, Spain; and ⁵Institut d'Investigació en Atenció Primària Jordi Gol, Catalunya, Spain.

J.M., R.F., N.P., J.B., and L.M. designed the study. J.M., C.B., D.I., D.A., A.V., R.F., and N.P. conducted research. A.C. and J.G. performed biochemical analyses. J.M., R.F., J.B., and L.M. performed statistical tests and wrote the final manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding/support: This study was supported by grants from the Spanish Atherosclerosis Society (to J.M.); Beca SEA/FEA 2010 para investigación clínico-epidemiológica. Aspectos clínico-epidemiológicos de la arteriosclerosis y sus factores de riesgo). Spanish Biomedical Research Network in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM) is an initiative of Instituto de Salud Carlos III, Spain.

Financial disclosure/conflicts of interest: None reported

Address correspondence to: Jordi Merino, MD, Vascular Medicine and Metabolism Unit and Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Rovira i Virgili University, 43201 Reus, Spain. E-mail: jordi.merino@urv.cat

Regular physical activity (PA) is associated with a reduced risk of cardiovascular events and is therefore a central component in the primary and secondary prevention of cardiovascular disease.^{1,2} Several major scientific bodies currently recommend and encourage at least 2.5 to 5 hours/week of moderate-intensity PA or aerobic exercise training, or 1 to 2.5 hours/week of vigorous-intensity exercise.^{3,4}

Increased PA modulates oxidative stress and nitric oxide (NO) bioavailability, both of which contribute to improved endothelial function and reduced cardiovascular risk.^{5,6} Sedentary men and women are known to have impaired endothelium-dependent dilatation. Endothelial function is carefully controlled mainly by the bioavailability of NO and by sympathetic and parasympathetic drive reflexes.⁷ NO bioavailability is, in part, the result of a balance between the production and the neutralization of reactive oxygen species. In this context, increased concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA), an endogenous L-arginine analogue, may uncouple endothelial NO synthase, which impairs NO production but also increases superoxide production in the vascular

endothelium.⁸ Human and animal data show a clear association between reactive oxygen species production and activation of the sympathetic drive, which may cause impairment of NO release and function.^{9,10} All of these factors are of particular interest in postmenopausal women because estrogen deficiency is associated with increases in both oxidative stress and sympathetic reflexes.^{11,12} Although PA has a clear positive impact on cardiovascular risk, some types and levels of PA have been associated with increased oxidation in the short term, and the impact on endothelial function is controversial.^{13,14} Moreover, the reported low adherence to PA interventions in large community-based studies reflects the difficulty of implementing a PA plan.^{15,16} This low adherence also contributes to the differences in the abovementioned studies. Engaging chronically sedentary groups with physical boundaries, such as aging and obesity, into a PA program is rather difficult. A low-intensity PA program could increase adherence. However, the real impact of this PA level on cardiovascular performance and intermediate factors for cardiovascular risk, such as oxidative stress, resting heart rate (RHR), and endothelial function, has not been assessed. In this work, we aim to determine whether implementing a low-intensity PA program in a group of sedentary overweight and obese postmenopausal women has any impact on oxidative stress and small artery vascular reactivity as a surrogate marker of endothelial function.

AQ5

METHODS

Design, population, clinical assessment, and intervention

This is a nested study from a primary care community program, “Step by Step,” involving all primary care centers in the city of Reus, Spain. According to the aim of the study, 47 overweight and obese postmenopausal women of the Step by Step Program were included. The inclusion criteria were as follows: postmenopausal, at least 1 year since the last menstruation, and either overweight (body mass index between 25 and 30 kg/m²) or obese (body mass index higher than 30 kg/m² or a waist circumference higher than 88 cm, as specified by the Adult Treatment Panel III clinical criteria for abdominal obesity). Exclusion criteria were as follows: previous cardiovascular disease; chronic renal, hepatic, pulmonary, or neurodegenerative conditions; and neoplasm antecedents or severe diseases that may interfere with the ability to comply with study protocol.

The Step by Step Program has been followed by more than 500 men and women at increased cardiovascular risk in the previous 8 years. The aim of this community program is to boost healthy lifestyle in people at increased cardiovascular risk. It consists of 1-hour low-intensity walking sessions twice a week. These sessions are directed by healthcare and physical education professionals. Before every session, participants signed an attendance list.

A complete physical examination—including lifestyle components (diet, PA, and smoking), anthropometry assessment, and biochemical, abdominal fat, and vascular studies (small

artery reactive hyperemia index [saRHI])—was performed before and after the 4-month follow-up period. The global coefficient of variation risk was assessed using the Framingham risk score. Leisure time PA was quantified as metabolic equivalent tasks (METs) per week using the Minnesota questionnaire adapted for the Spanish population.¹⁷ A validated semiquantitative food frequency questionnaire was used to evaluate dietary habits.¹⁸ Adherence to Mediterranean dietary pattern was assessed using the Mediterranean diet score (range, 0-55).¹⁸ Tobacco status was assessed using standardized questionnaires administered by healthcare providers.¹⁹ The women’s usual pharmacological treatment was maintained. To achieve 80% power to detect a difference between the means of 0.04 in saRHI, 0.02 in ADMA, and 0.01 in superoxide dismutase plasma (SODa) and glutathione peroxidase plasma (GPXa), with a level of significance (α) of 0.05 (two-tailed), we calculated the sample size using GraphPad StatMate 2.00. The sample size required was 45 participants.

This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human participants were approved by the Ethical and Clinical Investigation Committee of the hospital. A written informed consent form was obtained from all participants.

RHR and small artery function measurement

RHR and saRHI were measured using peripheral artery tonometry (PAT) (EndoPAT-2000; Itamar Medical Ltd., Israel). Both measurements were performed in a quiet temperature-controlled (22-24°C) room after the participants had fasted for 12 hours and had refrained from smoking or strenuous exercises for 24 hours. The participants lay in a relaxed, quiet, and evenly illuminated environment while the device recorded changes in pulse waves in the digital arteries. PAT has been described elsewhere.²⁰ A 5-minute baseline measurement is performed, after which the cuff is inflated enough above baseline systolic blood pressure to produce ischemia. After 5 minutes of occlusion, the cuff is rapidly deflated, and PAT tracing is recorded for an additional 5 minutes. Blood flow measurements from two fingertips on different hands—a test arm and a control arm—were compared after a stabilization period. A second pair of measurements for comparison was taken before and after 5 minutes of brachial ischemia in the test arm. The results were processed with specific software to calculate the postischemic reflex vasodilatation observed when measurements from the test arm (before and after ischemia) were compared with those from the control arm. The value generated was termed saRHI. Arterial stiffness, measured as augmentation index, was also determined during the same exploration and processed with specific software by analyzing the differences in pulse wave amplitude before and after ischemia in comparison with the control arm. We then calculated the augmentation index adjusted to 75 beats/minute.

Subcutaneous and visceral fat determination

A MyLab 50 X-Vision ultrasonograph (Esaote, Italy) equipped with a linear array ultrasound probe (7.5-12 MHz) was used to assess body fat according to the ultrasound image

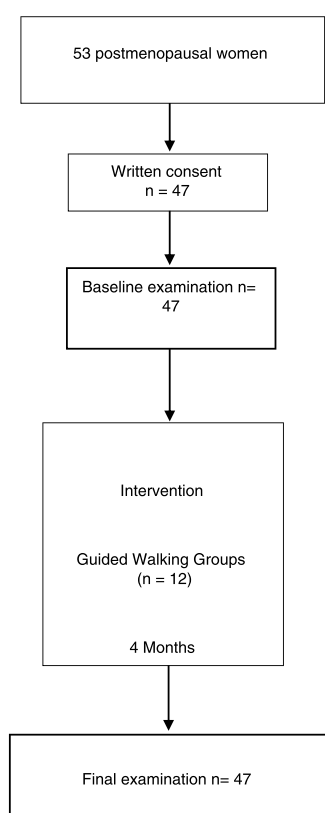


FIG. 1. Participants' flow diagram.

review consensus.²¹ Briefly, the thicknesses of subcutaneous fat and preperitoneal fat were measured by placing the probe perpendicular to the skin on the epigastrium. The thickness of subcutaneous fat is defined as the distance between the anterior surface of linea alba and the fat-skin barrier. Preperitoneal fat extends from the anterior surface of the liver (left lobe) to the posterior surface of linea alba.

Biochemical determinations

Standard biochemical parameters were determined via the usual methods. Glucose, cholesterol, triglyceride, Apo B100, Apo A-I, direct low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and high-sensitivity C-reactive protein were measured using enzymatic and immunoturbidimetric assays (Spinreact SA; Spain and Wako Chemicals GmbH, Germany) adapted to the Cobas Mira Plus autoanalyzer (Roche Diagnostics, Spain). The levels of superoxide dismutase and erythrocyte lysate (SODc), SODa, glutathione peroxidase erythrocyte lysate (GPXc), and GPXa were determined by commercially available assays according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical Co.). ADMA (ADMA-ELISA; Immunodiagnostik AG, Germany) and oxidized low-density lipoprotein cholesterol (oxLDL-ELISA; Mercodia, Sweden) plasma levels were determined by commercially available immunoassays according to the manufacturers' instructions. Fatty acid binding protein 4 (FABP4) levels were determined with

commercial ELISA kits (Bio Vendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic).

Statistical analyses

Data are presented as mean (SD) or median (interquartile range) for continuous variables and as frequencies for categorical variables. The normality of the distribution of variables was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between PA and anthropometric, biochemical, or vascular data were analyzed with analysis of variance or Kruskal-Wallis test for continuous variables or with χ^2 test for categorical variables. Univariate association was tested by Spearman correlation analysis. A multiple stepwise logistic regression test was performed to assess the determinants of saRHI in our study group participants. The dependent variable of interest was saRHI. Independent variables were selected based on univariate analysis and from variables known to be associated with the dependent variable, according to our previous studies. In this test, the independent variables were age, smoking, increase in METs/hour/week, decrease in waist circumference, and changes in GPXa, SODa, RHR, and ADMA. *P* values were calculated as two-sided; *P* < 0.05 was considered statistically significant. To avoid multiple comparisons bias, we applied Bonferroni correction when assessing the outcome variables (Table 2), considering *P* < 0.005 as the statistical significance threshold. SPSS version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses.

RESULTS

Among 53 postmenopausal women recruited from the Step by Step Program, 47 attended the final clinical exploration and completed the study protocol (Fig. 1). The mean attendance at PA sessions was 74%. After the intervention, an increase in METs/hour/week (7.3 [2.9] vs 14.2 [1.1], *P* < 0.001) was observed. Anthropometric measurements, Mediterranean diet score, body fat distribution, and general biochemical characteristics did not change during the intervention (Table 1).

Variations in antioxidant enzymes and vascular determinants between baseline and the end of the intervention are shown in Table 2. We observed significant increases in intraerythrocyte and plasma superoxide dismutase concentrations (SODc; 2,075 [874] vs 3,331 [1,055] U/grHb, *P* < 0.001) and intraerythrocyte GPXc (9,506 [3,488] vs 12,628 [2,472] $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{grHb}$, *P* < 0.001). saRHI increased (1.97 [0.51] vs 2.26 [0.77], *P* = 0.043, nonsignificant) according to a significant decrease in ADMA levels (0.48 [0.09] vs 0.40 [0.08] $\mu\text{mol}/\text{L}$, *P* < 0.001). Oxidized low-density lipoprotein cholesterol did not change significantly (83 [29] vs 77 [32] U/L, *P* = 0.291). RHR decreased by 6.6% (9.8%) after the intervention (*P* < 0.001).

Univariate tests showed that the increase in PA was positively associated with the increases in saRHI (*r* = 0.330, *P* = 0.027; Fig. 2A) and GPXc (*r* = 0.299, *P* = 0.05). Moreover, PA inversely correlated with changes in glucose (*r* = -0.310, *P* = 0.038), body weight (*r* = -0.451, *P* = 0.002), and RHR (*r* = -0.297, *P* = 0.047).

AQ6

TABLE 1. Differences in clinical, anthropometric, and biochemical data between baseline and postintervention

	Baseline (n = 47)	Postintervention (n = 47)	P
Age, mean (SD), y	62 (8)		
Smokers, %	12.7		
Obesity, %	52.7		
Type 2 diabetes mellitus, %	9.1		
Hypertension, %	36.4		
METs/h/wk, mean (SD)	7.3 (2.9)	14.2 (1.1)	<0.001
Mediterranean diet score, mean (SD), U	29 (11)	30 (9)	0.719
Body weight, mean (SD), kg	72.4 (12.4)	72.3 (13.3)	0.885
Body mass index, mean (SD), kg/m ²	29.94 (4.48)	29.87 (4.79)	0.720
Waist circumference, mean (SD), cm	97 (13)	97 (14)	0.366
SAT, median (IQR), mm	16 (4.6)	15 (5.2)	0.333
VAT, median (IQR), mm	14 (6)	13 (5)	0.106
Systolic blood pressure, median (IQR), mm Hg	130 (15)	135 (17)	0.081
Total cholesterol, mean (SD), mmol/L	5.45 (1.18)	5.40 (1.04)	0.752
LDLc, mean (SD), mmol/L	3.61 (1.01)	3.55 (0.89)	0.617
HDLc, median (IQR), mmol/L	1.30 (0.66)	1.29 (0.59)	0.680
Apo B100, mean (SD), mmol/L	1.22 (0.31)	1.22 (0.28)	0.984
Apo A-I, mean (SD), mmol/L	1.58 (0.34)	1.64 (0.26)	0.208
Triglycerides, median (IQR), mmol/L	1.10 (0.61)	1 (0.7)	0.731
FABP4, mean (SD), ng/mL	31.5 (14.9)	30.1 (12.6)	0.521
HsCRP, median (IQR), mg/L	4.54 (5.82)	3.92 (4.72)	0.496

Values were derived using analysis of variance or Wilcoxon test for continuous variables, or χ^2 test for categorical variables. MET, metabolic equivalent task; SAT, subcutaneous adipose tissue; IQR, interquartile range; VAT, visceral adipose tissue; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; FABP4, fatty acid binding protein 4; HsCRP, high-sensitivity C-reactive protein.

Changes in saRHI inversely correlated to changes in RHR ($r = -0.364$, $P = 0.021$; Fig. 2B). Participants with greater increases in saRHI had greater increases in SODc levels compared with participants who had smaller increases in saRHI (2,134 [411] vs 326 [286] U/grHb, $P = 0.04$).

A multiple stepwise logistic regression test was performed to assess the main determinants of endothelial function improvement, using saRHI increase as the dependent variable. The independent variables included age, smoking, increase in METs/hour/week, decrease in waist circumference, GPXc increase, SODc increase, changes in RHR, and ADMA decrease. After adjustment for interactions, the best predictor model (R^2 Nagelkerke = 0.427; 81.4% of correctly prognosticated values) included smoking, increase in METs/hour/week, changes in RHR, and increase in GPXc. When this test was forced, the increase in METs/hour/week ($\beta = 2.63$; 95% CI, 1.24-4.19; $P = 0.019$), changes in RHR ($\beta = 1.96$; 95% CI, 1.01-5.03; $P = 0.048$), and increase in GPXc ($\beta = 2.64$;

95% CI, 1.18-5.08; $P = 0.021$) remained independent predictors of saRHI improvement (Fig. 3).

F3

DISCUSSION

Our work shows that low-intensity PA applied to sedentary overweight and obese postmenopausal women improves several parameters associated with cardiovascular health and that there is high adherence to such a PA program. International recommendations by different scientific societies establish at least 2.5 to 5 hours/week of moderate-intensity walking to reduce cardiovascular risk.^{3,4} However, even this small amount of activity cannot be met by many older, handicapped, or metabolically limited people, such as those with obesity. Therefore, an evaluation of the impact of exercise levels below these recommendations is warranted. A low-intensity PA intervention results in an augmented antioxidant system, measured by the activity of the enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase. The increases in these enzymes

TABLE 2. Oxidative and vascular differences between baseline and postintervention

	Baseline (n = 47)	Postintervention (n = 47)	P
SODc, median (IQR), U/grHb	2,075 (874)	3,331 (1,055)	<0.001
SODa, mean (SD), U/mmol	3.8 (1.4)	4.7 (1.9)	0.018
GPXc, median (IQR), μ mol/min/grHb	9,506 (3,488)	12,628 (2,472)	<0.001
GPXa, mean (SD), μ mol/min/mL	40 (13)	36 (16)	0.103
ADMA, median (IQR), μ mol/L	0.48 (0.09)	0.40 (0.08)	<0.001
LDLox, median (IQR), U/L	83 (29)	77 (32)	0.291
saRHI, median (IQR), U	1.97 (0.51)	2.26 (0.77)	0.043
RHR, mean (SD), beats/min	71 (10)	65 (9.2)	<0.001
AIX@75, median (IQR), U	27.5 (14.2)	30.1 (17.7)	0.191

Baseline values were compared with postintervention values using paired t test or Wilcoxon test for continuous variables. $P < 0.005$ (adjusted with Bonferroni correction) is the statistical significance threshold. SODc, superoxide dismutase and erythrocyte lysate; IQR, interquartile range; SODa, superoxide dismutase plasma; GPXc, glutathione peroxidase erythrocyte lysate; GPXa, glutathione peroxidase plasma; ADMA, asymmetrical dimethylarginine; LDLox, oxidized low-density lipoprotein cholesterol; saRHI, small artery reactive hyperemia index; RHR, resting heart rate; AIX@75, augmentation index adjusted to 75 beats/minute.

LOW PHYSICAL ACTIVITY AND VASCULAR FUNCTION

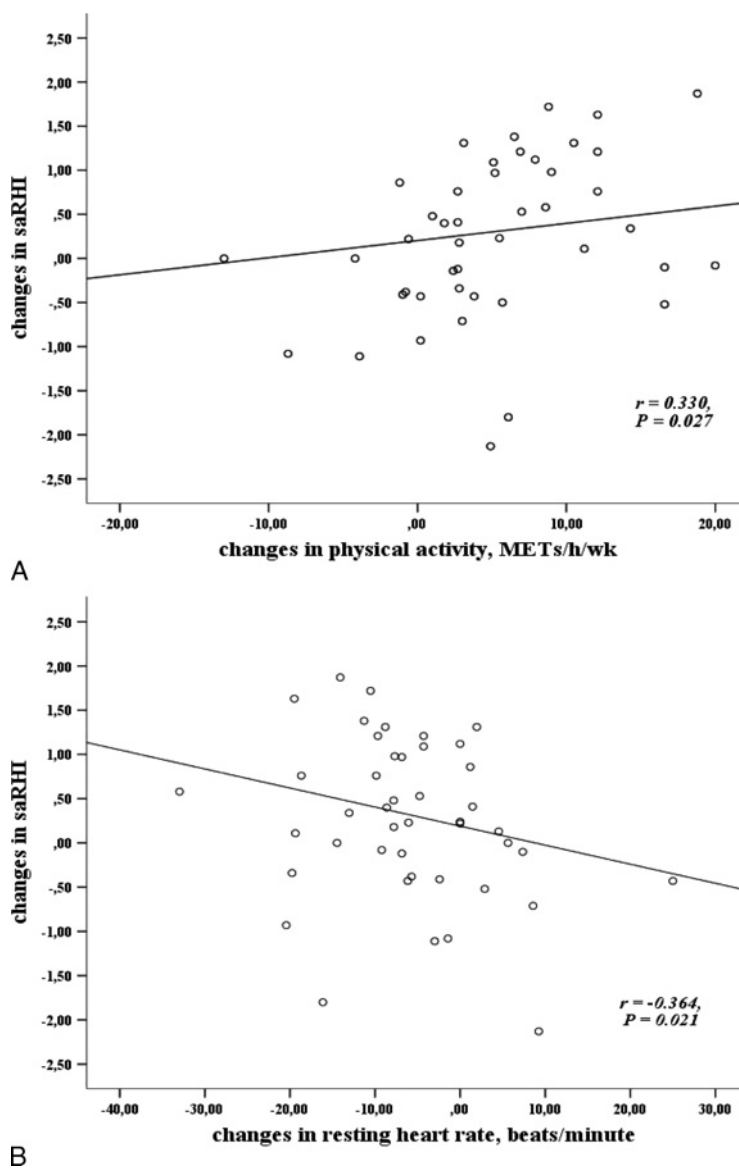


FIG. 2. A: Association between changes in small artery reactive hyperemia index (saRHI) and changes in physical activity. Univariate associations were derived from Spearman correlation analysis. **B:** Association between changes in small artery reactive hyperemia index and changes in resting heart rate. Univariate associations were derived from Spearman correlation analysis. MET, metabolic equivalent task.

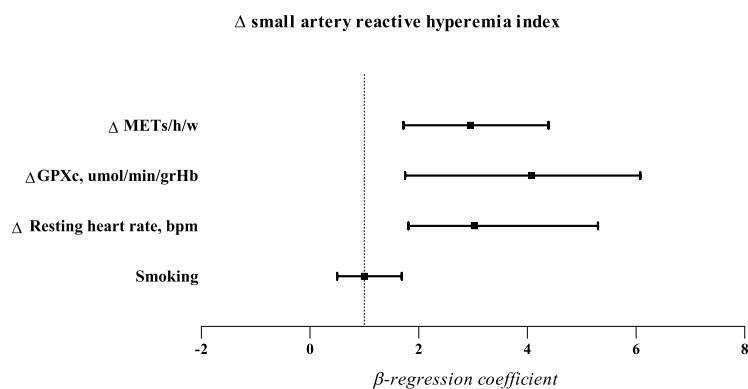


FIG. 3. Determinants of small artery reactive hyperemia. Dependent variable: small artery reactive hyperemia index (saRHI) changes between baseline and postintervention. Independent variables: smoking, increase in metabolic equivalent tasks (METs)/hour/week, changes in resting heart rate, and increase in glutathione peroxidase erythrocyte lysate (GPXc). R^2 Nagelkerke = 0.42; 81.4% of correctly prognosticated values.

suggest better antioxidant status, although we did not observe any effect on plasma lipid oxidation, as measured with oxidized low-density lipoprotein levels. saRHI, a surrogate of endothelial function, showed a nonstatistically significant improvement trend. Albeit nonsignificant, the saRHI increase was positively associated with the increase in PA and the improvement in oxidative parameters, and inversely associated with ADMA levels and RHR, in concordance with an overall benefit on cardiovascular health parameters.

AQ7

Current evidence suggests that PA improves several classical cardiovascular risk factors and measures of the new biomarkers of cardiovascular risk, including oxidative stress,^{1,2,22,23} endothelial wall dysfunction,^{5,6,13,23} and high RHR.¹¹ Weight loss, especially visceral fat loss²⁴ (but also subcutaneous fat loss),²⁵ is one of the main determinants of these changes. By assessing body fat patterns with standardized echography methods, we observed that our results were independent of changes in body weight loss or body fat distribution. Moreover, our group has recently published that a moderate increase in PA decreases a marker of adipose tissue distribution, such as FABP4 levels; specifically, an increase of 30 METs/hour/week decreases FABP4 by 10.3 U.²⁶ In the present study, the low increase in PA has not been associated with FABP4 changes.

We found that ADMA levels decrease significantly with low-intensity PA. Exercise training has been documented to decrease ADMA levels,²⁷ but no data on low-intensity PA are available. ADMA acts as a strong endogenous endothelial NO synthase inhibitor by blocking NO synthesis from the amino acid L-arginine, which contributes to the initiation and progression of atherosclerosis.⁸ Therefore, the reduction of ADMA and the increase in saRHI might also contribute to endothelial function improvement in postmenopausal women undergoing low-intensity PA. Even though we cannot obtain mechanistic data from this study, our results support improvements in oxidative status and small artery endothelial function markers. These results were confirmed in multivariate analyses showing that both PA and antioxidant enzymes play a role in the observed improvement in endothelial function.

Another relevant finding is the significant decrease in RHR observed after the intervention. High RHR has been identified as a potential accelerator of atherosclerosis via its negative effects on the endothelium attributed to shear and mechanical stress. In fact, modifications of the hemodynamic environment by an accelerated heart rate probably contribute to enhanced atherosclerosis in certain parts of the vascular tree.²⁸ It is known that physical exercise improves heart function by reducing RHR; however, small amounts of PA already have a positive impact. Interestingly, changes in RHR were among the determinants of saRHI changes, supporting the idea that heart functionality is linked to overall endothelial function. In accordance with this observation, clinical trials with ivabradine, a selective inhibitor of I_f channels, showed a relationship between decreased RHR and improved endothelial function.^{28,29} This association is not fully understood, but evidence derived from ivabradine studies produced two possible explanations for this effect. First, with slowing heart rate, shear stress becomes

more constant, and thus flow is more constant, leading to a reduced burden on arterial wall function.³⁰ Second, with high RHR (which is associated with mechanical stress from each heartbeat), the wall becomes stiffer; this is associated with accelerated endothelial cell turnover, premature senescence of the endothelium, and high shear stress.³¹ Our results support these observations and extend them to clinical practice, suggesting a benefit of low-intensity PA on overweight and obese postmenopausal women.

Study limitations

Our study has some limitations. Because the study was conducted in a specific group of overweight and obese postmenopausal women, the results cannot be generalized to other specific populations. Because the study has not introduced a control group, we cannot exclude from the results the effects of time and regression-to-the-mean phenomenon. Although not described, the pharmacological agents being taken by the participants or the interactions between the pharmacological agents and PA changes could have influenced changes in oxidative stress or endothelial function. PA is measured objectively by self-reports that may lead to misclassification and bias toward weaker PA or health benefit associations. Nevertheless, the PA sessions were directed by healthcare and physical education professionals, and participants signed an attendance list before every session. Considering that the intervention lasted for only 4 months, long-term follow-up may provide a better perspective of the observed changes.

CONCLUSIONS

Our preliminary hypothesis-generating study suggests that even low increases in PA have a positive impact on cardiovascular health markers in overweight and obese postmenopausal women. New long-term clinical trials are needed to establish clinical guidelines on implementing even low-intensity PA in groups with physical limitations.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the 47 study participants and the contributions of the Step By Step Program staff.

REFERENCES

1. Kones R. Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey. *Drug Des Dev Ther* 2011;5:325-380.
2. Mora S, Cook N, Buring JE, et al. Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation* 2007;116:2110-2118.
3. Physical activity guidelines for Americans. *Okla Nurse* 2008;53:25.
4. Physical Activity Guidelines Advisory Committee report, 2008. To the Secretary of Health and Human Services. Part A: executive summary. *Nutr Rev* 2009;67:114-120.
5. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;98:2709-2715.
6. DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, et al. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation* 2000;102:1351-1357.
7. Newsholme P, Homem De Bittencourt PI, O'Hagan C, De Vito G, Murphy C, Krause MS. Exercise and possible molecular mechanisms of

- protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide. *Clin Sci (Lond)* 2009;118:341-349.
8. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, et al. The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev* 2010;6:82-90.
 9. Pellegrin M, Alonso F, Aubert JF, et al. Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension* 2009;53:782-789.
 10. Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, et al. Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 2008;19:345-350.
 11. Earnest CP, Lavie CJ, Blair SN, et al. Heart rate variability characteristics in sedentary postmenopausal women following six months of exercise training: the DREW study. *PLoS One* 2008;3:e2288.
 12. Castela J, Gago-Dominguez M. Risk factors for cardiovascular disease in women: relationship to lipid peroxidation and oxidative stress. *Med Hypotheses* 2008;71:39-44.
 13. Pierce GL, Eskurza I, Walker AE, et al. Sex-specific effects of habitual aerobic exercise on brachial artery flow-mediated dilation in middle-aged and older adults. *Clin Sci (Lond)* 2011;120:13-23.
 14. Goel R, Majeed F, Vogel R, et al. Exercise-induced hypertension, endothelial dysfunction, and coronary artery disease in a marathon runner. *Am J Cardiol* 2007;99:743-744.
 15. Crouch R, Wilson A, Newbury J. A systematic review of the effectiveness of primary health education or intervention programs in improving rural women's knowledge of heart disease risk factors and changing lifestyle behaviours. *Int J Evid Based Healthc* 2011;9:236-245.
 16. Ferre R, Plana N, Merino J, et al. Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;22:95-102.
 17. Elosua R, Garcia M, Aguilar A, et al. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish women. Investigators of the MARATDON Group. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:1431-1437.
 18. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, et al. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med* 2007;44:335-340.
 19. DiClemente CC, Prochaska JO, Fairhurst SK, et al. The process of smoking cessation: an analysis of precontemplation, contemplation, and preparation stages of change. *J Consult Clin Psychol* 1991;59:295-304.
 20. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467-2474.
 21. Vlachos IS, Hatzioannou A, Perelas A, et al. Sonographic assessment of regional adiposity. *AJR Am J Roentgenol* 2007;189:1545-1553.
 22. Pansini F, Cervellati C, Guariento A, et al. Oxidative stress, body fat composition, and endocrine status in pre- and postmenopausal women. *Menopause* 2008;15:112-118.
 23. Wycherley TP, Brinkworth GD, Noakes M, et al. Effect of caloric restriction with and without exercise training on oxidative stress and endothelial function in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2008;10:1062-1073.
 24. Bemelmans RH, van der Graaf Y, Nathoe HM, et al. Increased visceral adipose tissue is associated with increased resting heart rate in patients with manifest vascular disease. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:834-841.
 25. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007;116:1234-1241.
 26. Lazaro I, Ferre R, Plana N, et al. Lifestyle changes lower FABP4 plasma concentration in patients with cardiovascular risk. *Rev Esp Cardiol* 2012;65:152-157.
 27. Schlager O, Giurgea A, Schuhfried O, et al. Exercise training increases endothelial progenitor cells and decreases asymmetric dimethylarginine in peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *Atherosclerosis* 2011;217:240-248.
 28. Custodis F, Baumhakel M, Schlimmer N, et al. Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2008;117:2377-2387.
 29. Drouin A, Gendron ME, Thorin E, et al. Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol* 2008;154:749-757.
 30. Heusch G, Skyschally A, Gres P, et al. Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J* 2008;29:2265-2275.
 31. Thorin E, Thorin-Trescases N. Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res* 2009;84:24-32.

6. Resultats

7. Discussió

7. Discussió

La malaltia cardiovascular és la responsable de la majoria de morts en tot el món, i és actualment l'amenaça més perniciosa de la salut pública global ^{201,241}. Estudis previs han demostrat que la millora en 3 comportaments ambientals: deixar de fumar, consumir una dieta equilibrada i un nivell d'activitat física adequat, és una estratègia efectiva en disminuir la repercussió de les malalties no transmissibles, particularment l'obesitat, la diabetis, la malaltia coronària i el càncer ^{11, 129, 242}. Aquest fet és probablement degut a que l'arteriosclerosi es considera un procés dinàmic i gradual de disfunció endotelial, d'etiologia multifactorial, resultat de diferents factors genètics i ambientals. La presència de factors de risc cardiovascular accelera el procés de disfunció endotelial i interfereix en la integritat anatòmica de l'endoteli, que pot ser el precursor de malaltia vascular i d'events clínics molts anys abans de que es manifesti ^{243, 244}. Així, la determinació de la funció endotelial de petita artèria mitjançant el mètode PAT ha estat recentment homologada per la Food and Drug Administration (FDA) com a eina d'avaluació de la funció endotelial i cribatge del risc cardiovascular ^{45,47}. La importància de detectar la disfunció endotelial de petita artèria és degut a que aquestes alteracions vascular precediran alteracions morfològiques i funcionals de les artèries de major diàmetre com les musculars o les de conducció. S'ha evidenciat que la disfunció endotelial de petita artèria té especial repercussió sobre la rigidesa arterial i el desenvolupament de hipertensió arterial, sobre alteracions en la circulació del teixit adipós i repercussió sobre la circulació de les artèries de la substància blanca del cervell. Tot i aquesta diferent associació entre la disfunció endotelial de petita artèria i la disfunció endotelial d'artèria de conducció, alguns mecanismes de disfunció endotelial podrien ser comuns en artèries de major i menor diàmetre. Dades del nostre grup conclouen que la determinació de la funció endotelial per PAT s'associa de forma inversa a

7. Discussió

les concentracions plasmàtiques de sE-selectina, suggerint que almenys alguns mecanismes estan compartits en la disfunció endotelial de gran i petita artèria ²⁴⁵. Altres exemples d'aquests mecanismes compartits podrien ser la inflamació local, que pot afectar a una artèria de conducció o una de resistència, o la incapacitat de reparar el dany físic sobre la cèl·lula endotelial que condueix a una senescència endotelial caracteritzada per un patró de comportament pro-inflamatori i pro-aterogènic ^{238, 246}.

Diferents estudis clínics aleatoritzats han estudiat l'efecte de la composició de la ingesta sobre la funció endotelial utilitzant el mètode FMD, amb resultats no convinents degut a diferents motius com la no estandardització dels criteris de definició de la ingesta, diferent composició dels tipus de greixos consumits o la situació postprandial en la determinació de la funció endotelial ^{185-194, 197, 198}. Per augmentar l'especificitat i sensibilitat de la valoració de la ingesta es va utilitzar, en el primer estudi, un mètode validat que classifica els individus en funció del gradient de percentatges en carbohidrats, greixos i proteïnes en relació al consum total de calories consumides al dia, el Low Carbohydrate diet Score (LCDS). Estratificant els pacients de l'estudi 1 en funció del valor del LCDS, es va observar que uns valors elevats en aquest índex (27 punts (Q4)) que representa un 29% carbohidrats, 24% proteïnes i 44% greixos, es relacionaven de forma significativa amb una pitjor funció endotelial de petita artèria avaluada pel saRHI en comparació amb els individus amb una puntuació baixa (14 punts (Q1)), que representa 45% carbohidrats, 20% proteïnes i 32% greixos). Es van observar diferències significatives entre el quartil superior del LCDS i l'inferior de LCDS en situacions patològiques com l'obesitat abdominal, la diabetis tipus 2 o la síndrome metabòlica. De fet, el valor del LCDS va ser l'únic determinant

7. Discussió

independent associat a una millor funció endotelial de petita artèria en un model multivariant ajustat. Tot i que els marcadors bioquímics de funció endotelial, inflamació i oxidació no van variar de forma significativa entre els quartils de distribució de la ingesta, sí que es va observar una tendència en el mateix sentit que el test clínic de determinació de la funció endotelial de petita artèria. Aquests resultats van en el mateix sentit que les observacions prèvies, on dietes baixes o molt baixes en hidrats de carboni poden repercutir sobre la funció endotelial de petita i mitjana artèria. Aquesta relació amb els estudis previs és important, ja que, tot i que les alteracions de la funció endotelial varien segons el territori arterial, alguns mecanismes de disfunció endotelial podrien ser comuns independentment del territori afectat.

En l'estudi 2 es va voler profunditzar en aquesta observació prèvia i es va voler estudiar els components alimentaris que podien modular la funció endotelial de petita artèria. Per això es avaluar l'efecte prospectiu del consum de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 sobre el saRHI. L'evidència respecte al consum de greixos omega-3 i els beneficis sobre el sistema cardiovascular ha estat àmpliament estudiada i demostrada. Ara bé, els estudis realitzats utilitzant suplementes de greixos omega-3, ja sigui de cadena llarga o de cadena mitjana, ofereixen resultats conflictius en relació a la millora clínica de la funció endotelial quan s'avalua per FMD ^{156,157,160-163,165,166}. Fins a l'actualitat, només hi ha dos estudis que relacionen els greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 amb la determinació de la funció endotelial de petita artèria, i aquests estudis aporten resultats diferents. Un estudi conduït en 25 adolescents obesos durant 3 mesos amb la suplementació diària d'1.2gr EPA + DHA va observar una millora significativa en el saRHI i en la inflamació després de la intervenció ¹⁶⁴. Per altra

7. Discussió

banda, en un estudi conduït amb 26 pacients amb HTG moderada es va realitzar un estudi creuat de 8 setmanes d'intervenció a una exposició de 0.85gr EPA + DHA i 3.4gr EPA+DHA. No es van observar diferències significatives en la determinació de la funció endotelial de petita artèria en cap de les dues branques de suplementació ⁸⁶. Dividint els individus en tertils de la variació de la ingesta de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3, es va observar que l'augment en la ingesta de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 (T3, increment de 125 a 989mg/dia) es relacionava de forma significativa amb el saRHI. Es va observar una millora inter-tertil per aquells individus que havien augmentat el consum en greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3, i es va observar una millora en el diferencial del saRHI quan es va comparar els individus que havien augmentat la ingesta en relació als que l'havien disminuït. Aquest efecte es va poder explicar, en part, per l'efecte beneficiós de l'augment de la ingesta d'aquests tipus de greixos en marcadors d'inflamació (PCR, TNF-a), proteïnes d'adhesió (sE-selectina ICAM-1, VCAM-1), augment de les HDL i marcadors d'estrès oxidatiu (LDLox). En el present estudi, l'associació amb totes aquestes variables (excepte per la sE-selectina) va perdre la seva significança estadística quan es va ajustar pel consum de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3. Aquest resultat va suggerir que l'efecte final dels greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 sobre el saRHI podria estar mediat a través d'una disminució de la inflamació (disminució dels nivells de TNF-a i PCR), disminució de les molècules d'adhesió circulants (VCAM-1, ICAM-1), disminució de marcadors d'estrès oxidatiu (LDLox) i millora de la funcionalitat de les partícules HDL (augment d'ApoA1), ja que quan es van ajustar els models estadístics per l'augment del consum de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 (augment de 100mg/dia) es va perdre la significança d'aquestes

7. Discussió

variables relacionades prèviament amb els canvis en el saRHI. L'efecte observat en el present estudi dels greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 sobre la inflamació, les molècules d'adhesió i l'estrès oxidatiu, ha estat reportat en diferents estudis i sembla un mecanisme ben estudiat atribuïble a la ingesta d'aquest tipus de greixos. Referent a l'actuació sobre les HDL, l'efecte observat podria ser especulatiu, degut a que no s'han determinat activitats enzimàtiques per poder afirmar que l'efecte dels greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 condueix a una millora de la funcionalitat de les HDL. Tot i així, diferents estudis clínics han demostrat que la suplementació amb greixos omega-3 s'associa a un increment de les partícules HDL grans i/o disminució de les HDL petites ²⁴⁷. A més del consum dels greixos poliinsaturats de cadena llarga omega 3, la pràctica habitual d'activitat física i deixar de fumar, són eines efectives que contribueixen de manera significativa a l'augment de les concentracions d'HDL ²⁴⁸. Els estudis actuals relacionen la pràctica d'activitat física d'intensitat baixa o moderada amb una disminució del risc d'events cardiovasculars, atribuït a l'activitat física un component central en la prevenció primària i secundària de la malaltia cardiovascular. Les societats científiques recomanen un mínim de 2.5 a 5h/setmana d'activitat física d'intensitat moderada o baixa, o almenys d'1 a 1.5h/setmana d'activitat física intensa per disminuir el risc cardiovascular. Tot i així, no hi ha evidències sobre l'activitat física de menor intensitat i la relació amb la millora de la funció endotelial en persones que tenen limitacions per aconseguir uns nivells mínims d'activitat física com recomanen les societats internacionals.

L'objectiu de l'estudi 3 va ser avaluar l'efecte de l'activitat física de baixa intensitat sobre la funció endotelial de petita artèria, l'oxidació, l'estrès oxidatiu i el greix abdominal en un grup de dones postmenopàusiques amb sobrepès o

7. Discussió

obesitat. Es va observar que l'augment d'activitat física de baixa intensitat, un increment en 2 hores a la setmana de caminar a ritme baix (corresponent a un increment de 7 METs/hora/setmana), es va relacionar amb un augment de les defenses antioxidants, avaluat per la concentració i activitat dels enzims SOD i GPx i de la funció endotelial, avaluat mitjançant les concentracions d'ADMA i el saRHI. L'augment d'aquests enzims va suggerir un millor estat antioxidant, tot i que no es van observar diferències significatives en l'oxidació dels lípids plasmàtics mesurats amb LDLox. Una possible explicació d'aquest fet podria ser que les partícules LDLox plasmàtiques són eliminades ràpidament via hepàtica i amb la millora de la resposta antioxidant no s'observin diferències significatives sobre aquestes partícules, però sí que la millora d'aquest sistema antioxidant es podria relacionar amb la menor oxidació de partícules LDL oxidades a l'espai subendotelial ^{30, 249}, tot i que en el nostre estudi no es van avaluar.

L'evidència actual suggereix que l'activitat física millora els factors de risc cardiovascular clàssics, així com nous biomarcadors de risc cardiovascular com l'estrès oxidatiu^{1, 2, 250}, la inflamació ¹¹³ o la disfunció endotelial ^{31,251,252}. Es coneix que la pèrdua de pes, especialment a partir de greix visceral ²⁵³ però també de greix subcutani ²⁵⁴, és un dels majors determinats d'aquests canvis. Avaluant el patró de greix abdominal mitjançant un mètode validat i estandarditzat d'ultrasons, hem observat que els resultats d'aquest estudi van ser independents a la pèrdua de pes o a la variació en la composició del greix abdominal. Hem observat que les concentracions d'ADMA disminueixen de forma significativa amb un exercici de baixa intensitat. Fins al moment, no hi havia dades que un exercici de baixa intensitat pogués disminuir el nivells d'ADMA en un grup de dones postmenopàusiques amb sobrepès o obesitat.

7. Discussió

Un altre resultat rellevant del treball va ser la disminució significativa en la freqüència cardíaca en repòs (FCR). La FCR ha estat associada com un potencial accelerador del procés d'arteriosclerosi via els seus efectes negatius sobre l'endoteli degut a l'estrès mecànic de flux i l'estrès tensional. De fet, les modificacions en l'ambient hemodinàmic degudes a l'acceleració de la FCR contribueixen a promoure l'arteriosclerosi en certes zones de l'arbre arterial ²⁵⁵. És conegut que l'activitat física millora la funció cardíaca disminuint la FCR; tot i així, és important assenyalar que petites variacions en el nivell d'activitat física tenen un efecte positiu. Els canvis en la FCR van ser un dels principals determinants de la millora del saRHI, fet que sosté en concepte que la funcionalitat cardíaca està lligada a la funció endotelial i viceversa. D'acord amb aquestes observacions, els estudis clínics amb ivabradina, un inhibidor selectiu dels canals $I_{(f)}$, mostren una relació forta entre la disminució de la freqüència cardíaca i la millora de la funció endotelial ^{255, 256}. Aquesta associació no està completament entesa, però l'evidència dels estudis amb ivabradina descriu dues possibles explicacions de la relació entre la millora de la FCR i la funció endotelial. La primera és que disminuint la freqüència cardíaca l'estrès tensional és més constant, conduint a un flux més constant que ajuda a una disminució del dany que ocasiona el flux no laminar sobre la paret arterial ²⁵⁷. El segon està associat amb l'estrès mecànic de cada batec cardíac. A una freqüència més elevada, la paret arterial es converteix en més rígida, fet que s'associa amb un nivell accelerat de recanvi endotelial degut al major dany, una senescència prematura de l'endoteli i un estrès tensional més elevat ³⁹. Els nostres resultats van estar d'acord amb l'efecte global que la freqüència cardíaca es relaciona amb la millora de la funció endotelial d'artèria petita i es podran fer extensius a la

7. Discussió

pràctica clínica suggerint un benefici de l'activitat física de baixa intensitat en un grup de dones postmenopàusiques amb sobrepès o obesitat.

Els nostres resultats reforcen el concepte que els canvis terapèutics sobre l'estil de vida tenen una repercusió important sobre el risc cardiovascular global i la funció endotelial. Aquesta tesi aporta evidències que un patró de consum amb un percentatge de macronutrients similar al patró de consum mediterrani té un efecte significatiu sobre la funció endotelial de petita artèria. Estudiant els greixos alimentaris hem observat que el consum de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 tenen un paper beneficiós sobre la millora de la inflamació, oxidació, biomarcadors de funció endotelial i la funció endotelial de petita artèria. A més la pràctica d'activitat física d'intensitat baixa, augmentar 7METs/h/setmana, té un efecte beneficiós enfront a la oxidació, freqüència cardíaca i funció endotelial de petita artèria.

Els nostres estudis tenen diferents limitacions. Una d'important i inherent a la ubicació de la Unitat, és que els pacients dels estudis són pacients en prevenció primària amb un risc cardiovascular moderat o alt (estudi 1 i 2), fet que fa que els resultats no siguin extrapolables a la població general o a la població en prevenció secundària. Tot i que es va realitzar una història clínica completa i les medicacions que prenen els pacients es van considerar en els tests estadístics, una altra limitació important podria ser la interferència que hi pot haver entre les variables estudiades i els fàrmacs que prenen els pacients. Una altra limitació relacionada amb els estudis que avaluen la composició nutricional amb variables de risc cardiovascular, és que poden no tenir en compte la composició o les variacions en la composició de micronutrients o oligonutrients, ja que aquests

7. Discussió

sovint no apareixen a les taules de composició nutricional degut a que la variabilitat sobre el mateix aliment és significativa. Una limitació destacable de l'estudi 1 és que es tracta d'un estudi observacional, per tant no es pot interpretar una causalitat entre els resultats de millora de la funció endotelial de petita artèria i els diferents percentatges de consum de macronutrients. A més, en aquest estudi es va utilitzar una metodologia per estratificar la ingesta que ha estat desenvolupada a partir de la ingesta d'una població representativa dels Estats Units. Tot i així, estudis recents mostren que el patró de consum dels participants del nostre territori amb risc cardiovascular moderat o alt és semblant al consum que es realitza als Estats Units ²⁵⁸.

La major limitació de l'estudi 3 és que el temps d'intervenció és relativament curt, i que les dades sobre l'activitat física estan reportades directament pels participants. Una perspectiva més àmplia de temps i una activitat física mesurada per altres mètodes més precisos, ens podrien donar una major informació sobre l'efecte de l'estrès oxidatiu, les concentracions d'ADMA i la freqüència cardíaca en repòs sobre la disfunció endotelial de petita artèria.

8. Conclusions

8. Conclusions

Dels resultats obtinguts dels estudis documentats en aquesta tesi doctoral es pot concloure que els canvis terapèutics de l'estil de vida tenen un efecte beneficiós significatiu sobre la millora de la funció endotelial de petita artèria. Els nostres resultats estan en concordança amb la majoria d'evidències prèvies reportades sobre canvis terapèutics de l'estil de vida i disfunció endotelial, avaluada per altres mètodes clínics o mitjançant mètodes bioquímics d'avaluació de la funció endotelial. En concret es pot concloure que:

1- Un patró de consum alimentari elevat en greixos i proteïnes i baix en hidrats de carboni es relaciona amb una pitjor funció endotelial de petita artèria, especialment en les alteracions metabòliques més freqüents, i que comporten més risc cardiovascular com l'obesitat abdominal, la diabetis tipus 2 o la síndrome metabòlica.

2- L'efecte saludable dels greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 sobre l'índex saRHI reforça la idea que aquests àcids grassos poden actuar com a agents protectors vasculars en les artèries petites. Els resultats de la present tesi van ser observats en el context de variacions en la ingesta enlloc de la utilització de suplementos nutricionals, reforçant la noció que, tot i petites variacions en el consum de proteïna, hidrats de carboni, greixos o l'augment del consum de greixos poliinsaturats de cadena llarga omega-3 a llarg termini, en el context de canvis factibles en el consum es relaciona amb la millora de la salut cardiovascular.

8. Conclusions

3- Els nostres resultats són consistents en que l'activitat física presenta un rol important en la prevenció primària i secundària de la malaltia cardiovascular. Hem observat que fins i tot quan es fomenta la pràctica d'activitat física de baixa intensitat, sobretot en persones amb limitacions o poca adherència a programes d'activitat física, s'observen resultats significatius sobre la millora de la funció endotelial de petita artèria, la freqüència cardíaca i la capacitat antioxidant.

Tot i així, són necessaris estudis amb un període d'intervenció més llarg, que incloguin un major nombre de pacients ben caracteritzats de diferents zones geogràfiques i controlant al màxim les possibles variables confusores per poder establir un nivell d'evidència científica superior en relació als canvis terapèutics de l'estil de vida i la funció endotelial de petita artèria.

9. Perspectives Futures

9. Perspectives Futures

Degut a que els canvis terapèutics de l'estil de vida tenen la capacitat de modular el funcionament de l'endoteli vascular de petita artèria, la inflamació, l'estrès oxidatiu i l'expressió de citoquines del teixit adipós, seria convenient conèixer millor les vies metabòliques i de senyalització cel·lular implicades en aquests beneficis, amb la finalitat de poder optimitzar al màxim el tipus d'intervenció sobre el canvi d'estil de vida. En el camp de la nutrició, la nutrigenòmica i la nutrigenètica són una realitat a curt termini ja que en funció de les característiques individuals es poden optimitzar processos metabòlics. Tot i així, amb el coneixement de les noves modulacions epigenètiques i regulació per micro ARN, queda un llarg camí per entendre com l'alimentació pot jugar un paper en la prevenció de les malalties cardiovasculars. A més en els camps del tabaquisme o l'activitat física no es coneixen gaire els moduladors de resposta beneficosa per la salut, fet que és una mancança per poder abordar aquestes situacions de la millor forma possible.

Com s'ha demostrat en diferents estudis clínics i al llarg d'aquesta tesi doctoral, els canvis terapèutics de l'estil de vida tenen la capacitat de millorar la funció endotelial de petita artèria. És probable que a mig termini tinguem dades que aquestes millores en la funció endotelial de petita artèria es relacionin amb una menor morbi-mortalitat cardiovascular. Per tant, aprofitar o fonamentar una acció tant senzilla com un estil de vida saludable, referent a l'alimentació, activitat física o hàbit tabàquic, pot tenir una repercussió molt gran en tots els sentits, començant per la salut del pacient i acabant per la salut del nostre sistema sanitari.

10. Referències

10. Referències

- [1] World Health Organization report. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011, In, World Health Organization, 2011.
- [2] Banegas, JR, Rodriguez-Artalejo, F, Graciani, A, et al., Mortality attributable to cardiovascular risk factors in Spain, *Eur J Clin Nutr*, 2003;57 Suppl 1:S18-21.
- [3] Ross, R, The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature*, 1993;362:801-809.
- [4] Gould, AL, Davies, GM, Alemao, E, et al., Cholesterol reduction yields clinical benefits: meta-analysis including recent trials, *Clin Ther*, 2007;29:778-794.
- [5] Law, M, Wald, N and Morris, J, Lowering blood pressure to prevent myocardial infarction and stroke: a new preventive strategy, *Health Technol Assess*, 2003;7:1-94.
- [6] Vijan, S and Hayward, RA, Pharmacologic lipid-lowering therapy in type 2 diabetes mellitus: background paper for the American College of Physicians, *Ann Intern Med*, 2004;140:650-658.
- [7] Wang, Y, Tuomilehto, J, Jousilahti, P, et al., Lifestyle factors in relation to heart failure among Finnish men and women, *Circ Heart Fail*, 2011;4:607-612.
- [8] Iqbal, R, Anand, S, Ounpuu, S, et al., Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: results of the INTERHEART study, *Circulation*, 2008;118:1929-1937.
- [9] Perk, J, De Backer, G, Gohlke, H, et al., European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by

10. Referències

representatives of nine societies and by invited experts), *Eur Heart J*, 2012;33:1635-1701.

[10] Kokkinos, P and Myers, J, Exercise and physical activity: clinical outcomes and applications, *Circulation*, 2010;122:1637-1648.

[11] Lloyd-Jones, DM, Hong, Y, Labarthe, D, et al., Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond, *Circulation*;121:586-613.

[12] Salas-Salvado, J, Rubio, MA, Barbany, M, et al., [SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria], *Med Clin (Barc)*, 2007;128:184-196; quiz 181 p following 200.

[13] Despres, JP and Lemieux, I, Abdominal obesity and metabolic syndrome, *Nature*, 2006;444:881-887.

[14] Van Gaal, LF, Merten, IL, De Block CE, Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease, *Nature*, 2006;444:857-880.

[15] Soriguer, F, Goday, A, Bosch-Comas, A, et al., Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study, *Diabetologia*, 2012;55:88-93.

[16] Arca, M, Pigna, G and Favocchia, C, Mechanisms of diabetic dyslipidemia: relevance for atherogenesis, *Curr Vasc Pharmacol*, 2012;10:684-686.

[17] Reaven, GM, Insulin resistance and human disease: a short history, *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 1998;9:387-406.

[18] Civelek, M, Hagopian, R, Pan, C, et al., Genetic regulation of human adipose microRNA expression and its consequences for metabolic traits, *Hum Mol Genet*, 2013; In press.

10. Referències

- [19] Albert, K, Eckel, RH, Grundy, S, et al., Harmonizing the metabolic syndrome, a joint interim statement of the IDF, NHI, AHA, WHO, IAS and IASO, *Circulation* 2009;120:1640-1645.
- [20] Hsia, J, Wu, L, Allen, C, et al., Physical activity and diabetes risk in postmenopausal women, *Am J Prev Med*, 2005;28:19-25.
- [21] Buckler, H, The menopause transition: endocrine changes and clinical symptoms, *J Br Menopause Soc*, 2005;11:61-65.
- [22] Lerner, DJ and Kannel, WB, Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population, *Am Heart J*, 1986;111:383-390.
- [23] Hu, FB, Stampfer, MJ, Manson, JE, et al., Trends in the incidence of coronary heart disease and changes in diet and lifestyle in women, *N Engl J Med*, 2000;343:530-537.
- [24] Sheng, JZ, Arshad, F, Braun, JE, et al., Estrogen and the Ca²⁺-mobilizing agonist ATP evoke acute NO synthesis via distinct pathways in an individual human vascular endothelium-derived cell, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008;294:C1531-1541.
- [25] Pines, A, Bornstein, NM and Shapira, I, Menopause and ischaemic stroke: basic, clinical and epidemiological considerations. The role of hormone replacement, *Hum Reprod Update*, 2002;8:161-168.
- [26] Milewicz, A, Tworowska, U and Demissie, M, Menopausal obesity--myth or fact?, *Climacteric*, 2001;4:273-283.
- [27] Colpani, V, Oppermann, K, Spritzer, PM, et al., Association between habitual physical activity in premenopausal, perimenopausal and postmenopausal women: a population based study, *Menopause*, 2012;In Press.

10. Referències

- [28] Lee, JS, Hayashi, K, Mishra, G, et al ., Independent association between age at natural menopause and hypercholesterolemia, hypertension and diabetes: Japan nurse's health study, *J Atheros and Tromb*, 2013;2:161-169.
- [29] Philips, MD, Patrizi, RM, Cheek, DJ, et al., Resistance training rduces subclinical inflammation in obese postmenopausal women, *Med Sci Sports Exerc*, 2012;11:2099-2110.
- [30] Ribeiro, F, Alves, AJ, Duarte, JA, et al., Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation?, *Int J Cardiol*, 2010;141:214-221.
- [31] Pierce, GL, Eskurza, I, Walker, AE, et al., Sex-specific effects of habitual aerobic exercise on brachial artery flow-mediated dilation in middle-aged and older adults, *Clin Sci (Lond)*, 2011;120:13-23.
- [32] Swift DL, F, Earnest CP, AJ, Blair, SN, et al., The effect of different doses of aerobic exercise training on endothelial function in postmenopausal women with elevated blood pressure: results from the DREW study, *Br J Sports Med*, 2010;10:753-758.
- [33] Muñoz Marin, D, Olcina, G, Timón, R, et al., Effect of different exercise intensities on oxidative stress markers and antioxidant response in trained cyclists, *J Esports Med Phys Fitness*, 2010;1:93-98.
- [34] Power, SM, Nelson, WB, Hudson, MB, et al., Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences, *Free Radic Biol Med*, 2011;5:942-50.
- [35] Lusis, AJ, Atherosclerosis, *Nature*, 2000;407:233-241.
- [36] Libby, P, Ridker, PM and Hansson, GK, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis, *Nature*, 2011;473:317-325.

10. Referències

- [37] Kodama, T, Freeman, M, Rohrer, L, et al., Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils, *Nature*, 1990;343:531-535.
- [38] Selwyn, AP, Kinlay, S, Creager, M, et al., Cell dysfunction in atherosclerosis and the ischemic manifestations of coronary artery disease, *Am J Cardiol*, 1997;79:17-23.
- [39] Thorin, E and Thorin-Trescases, N, Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat, *Cardiovasc Res*, 2009;84:24-32.
- [40] Warboys, CM, Amini, N, de Luca, A, et al., The role of blood flow in determining the sites of atherosclerotic plaques, *F1000 Med Rep*, 2011;3:5.
- [41] Stellos, K, Sauter, R, Fahrleitner, M, et al., Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo--brief report, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012;32:2017-2020.
- [42] Furchgott, RF and Zawadzki, JV, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*, 1980;288:373-376.
- [43] Ludmer, PL, Selwyn, AP, Shook, TL, et al., Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries, *N Engl J Med*, 1986;315:1046-1051.
- [44] Celermajer, DS, Sorensen, KE, Gooch, VM, et al., Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis, *Lancet*, 1992;340:1111-1115.
- [45] Dhindsa, M, Sommerlad, SM, DeVan, AE, et al., Interrelationships among noninvasive measures of postischemic macro- and microvascular reactivity, *J Appl Physiol*, 2008;105:427-432.

10. Referències

- [46] Lekakis, J, Abraham, P, Balbarini, A, et al., Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation, *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2011;18:775-789.
- [47] Schnabel, RB, Schulz, A, Wild, PS, et al., Noninvasive vascular function measurement in the community: cross-sectional relations and comparison of methods, *Circ Cardiovasc Imaging*, 2011;4:371-380.
- [48] Grassi, G, Seravalle, G, Scopelliti, F, et al., Structural and functional alterations of subcutaneous small resistance arteries in severe human obesity, *Obesity (Silver Spring)*, 2010;18:92-98.
- [49] Voghel, G, Thorin-Trescases, N, Farhat, N, et al., Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors, *Mech Ageing Dev*, 2007;128:662-671.
- [50] Hodis, HN, Mack, WJ, LaBree, L, et al., The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events, *Ann Intern Med*, 1998;128:262-269.
- [51] Lorenz, MW, Markus, HS, Bots, ML, et al., Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis, *Circulation*, 2007;115:459-467.
- [52] O'Leary, DH, Polak, JF, Kronmal, RA, et al., Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group, *N Engl J Med*, 1999;340:14-22.
- [53] Greenland, P, Alpert, JS, Beller, GA, et al., 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the

10. Referències

American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, *J Am Coll Cardiol*, 2010;56:e50-103.

[54] Reiner, Z, Catapano, AL, De Backer, G, et al., ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS), *Eur Heart J*, 2011;32:1769-1818.

[55] Polak, JF, Szklo, M, Kronmal, RA, et al., The value of carotid artery plaque and intima-media thickness for incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis, *J Am Heart Assoc*, 2013;2:e000087.

[56] Iwamoto, Y, Maruhashi, T, Fujii, Y, et al., Intima-media thickness of brachial artery, vascular function, and cardiovascular risk factors, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012;32:2295-2303.

[57] Poredos, P, Orehek, M and Tratnik, E, Smoking is associated with dose-related increase of intima-media thickness and endothelial dysfunction, *Angiology*, 1999;50:201-208.

[58] Ried-Larsen, M, Grontved, A, Froberg, K, et al., Physical activity intensity and subclinical atherosclerosis in Danish adolescents: The European Youth Heart Study, *Scand J Med Sci Sports*, 2013;3:168-77.

[59] Ferre, R, Plana, N, Merino, J, et al., Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2012;22:95-102.

[60] Murie-Fernandez, M, Irimia, P, Toledo, E, et al., Carotid intima-media thickness changes with Mediterranean diet: a randomized trial (PREDIMED-Navarra), *Atherosclerosis*, 2011;219:158-162.

10. Referències

- [61] Giudice, R, Izzo, R, Manzi, MV, et al., Lifestyle-related risk factors, smoking status and cardiovascular disease, *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2012;19:85-92.
- [62] Sala-Vila, A, Cofan, M, Perez-Heras, A, et al., Fatty acids in serum phospholipids and carotid intima-media thickness in Spanish subjects with primary dyslipidemia, *Am J Clin Nutr*, 2010;92:186-193.
- [63] Buil-Cosiales, P, Irimia, P, Berrade, N, et al., Carotid intima-media thickness is inversely associated with olive oil consumption, *Atherosclerosis*, 2008;196:742-748.
- [64] Liese, AD, Nichols, M, Hodo, D, et al., Food intake patterns associated with carotid artery atherosclerosis in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study, *Br J Nutr*, 2010;103:1471-1479.
- [65] Palatini, P, Puato, M, Rattazzi, M, et al., Effect of regular physical activity on carotid intima-media thickness. Results from a 6-year prospective study in the early stage of hypertension, *Blood Press*, 2011;20:37-44.
- [66] Rubinshtein, R, Kuvin, JT, Soffler, M, et al., Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events, *Eur Heart J*, 2010;31:1142-1148.
- [67] Akiyama, E, Sugiyama, S, Matsuzawa, Y, et al., Incremental prognostic significance of peripheral endothelial dysfunction in patients with heart failure with normal left ventricular ejection fraction, *J Am Coll Cardiol*, 2012;60:1778-1786.
- [68] Charakida, M, Masi, S, Luscher, TF, et al., Assessment of atherosclerosis: the role of flow-mediated dilatation, *Eur Heart J*, 2010;31:2854-2861.
- [69] Davignon, J and Ganz, P, Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis, *Circulation*, 2004;109:III27-32.

10. Referències

- [70] Moens, AL, Goovaerts, I, Claeys, MJ, et al., Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool?, *Chest*, 2005;127:2254-2263.
- [71] Deanfield, JE, Halcox, JP and Rabelink, TJ, Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance, *Circulation*, 2007;115:1285-1295.
- [72] Yeboah, J, Sutton-Tyrrell, K, McBurnie, MA, et al., Association between brachial artery reactivity and cardiovascular disease status in an elderly cohort: the cardiovascular health study, *Atherosclerosis*, 2008;197:768-776.
- [73] Bonetti, PO, Pumper, GM, Higano, ST, et al., Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia, *J Am Coll Cardiol*, 2004;44:2137-2141.
- [74] Kuvin, JT, Patel, AR, Sliney, KA, et al., Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude, *Am Heart J*, 2003;146:168-174.
- [75] Hamburg, NM, Keyes, MJ, Larson, MG, et al., Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study, *Circulation*, 2008;117:2467-2474.
- [76] Haller, MJ, Stein, J, Shuster, J, et al., Peripheral artery tonometry demonstrates altered endothelial function in children with type 1 diabetes, *Pediatr Diabetes*, 2007;8:193-198.
- [77] Hamburg, NM, Palmisano, J, Larson, MG, et al., Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: the Framingham heart study, *Hypertension*, 2011;57:390-396.
- [78] Kuvin, JT, Mammen, A, Mooney, P, et al., Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting, *Vasc Med*, 2007;12:13-16.

10. Referències

[79] Hamburg, NM and Benjamin, EJ, Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry, *Trends Cardiovasc Med*, 2009;19:6-11.

[80] Morris, AA, Patel, RS, Binongo, JN, et al., Racial differences in arterial stiffness and microcirculatory function between black and white americans, *J Am Heart Assoc*, 2013;2:e002154.

[81] Aversa, A, Bruzziches, R, Francomano, D, et al., Weight loss by multidisciplinary intervention improves endothelial and sexual function in obese fertile women, *J Sex Med*, 2013;10:1024-1033.

[82] Torimoto, K, Okada, Y, Mori, H, et al., Relationship between fluctuations in glucose levels measured by continuous glucose monitoring and vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus, *Cardiovasc Diabetol*, 2013;12:1.

[83] Westerink, J, Deanfield, JE, Imholz, BP, et al., High-dose statin monotherapy versus low-dose statin/ezetimibe combination on fasting and postprandial lipids and endothelial function in obese patients with the metabolic syndrome: The PANACEA study, *Atherosclerosis*, 2013;227:118-124.

[84] Flammer, AJ, Martin, EA, Gossl, M, et al., Polyphenol-rich cranberry juice has a neutral effect on endothelial function but decreases the fraction of osteocalcin-expressing endothelial progenitor cells, *Eur J Nutr*, 2013;52:289-296.

[85] Mellor, DD, Madden, LA, Smith, KA, et al., High-polyphenol chocolate reduces endothelial dysfunction and oxidative stress during acute transient hyperglycaemia in Type 2 diabetes: a pilot randomized controlled trial, *Diabet Med*, 2012;30:478-483.

[86] Skulas-Ray, AC, Kris-Etherton, PM, Harris, WS, et al., Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial

10. Referències

function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia, *Am J Clin Nutr*, 2011;93:243-252.

[87] Fukao, K, Shimada, K, Hiki, M, et al., Effects of calcium channel blockers on glucose tolerance, inflammatory state, and circulating progenitor cells in non-diabetic patients with essential hypertension: a comparative study between azelnidipine and amlodipine on glucose tolerance and endothelial function--a crossover trial (AGENT), *Cardiovasc Diabetol*, 2011;10:79.

[88] Ferre, R, Aragones, G, Plana, N, et al., High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1 levels strongly influence the reactivity of small peripheral arteries, *Atherosclerosis*, 2011;216:115-119.

[89] Matsuzawa, Y, Sugiyama, S, Sugamura, K, et al., Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women, *J Am Coll Cardiol*, 2010;55:1688-1696.

[90] Aversa, A, Vitale, C, Volterrani, M, et al., Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes, *Diabet Med*, 2008;25:37-44.

[91] Bonetti, PO, Lerman, LO and Lerman, A, Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003;23:168-175.

[92] Merino, J, Megias-Rangil, I, Ferre, R, et al., Body weight loss by very-low-calorie diet program improves small artery reactive hyperemia in severely obese patients, *Obes Surg*, 2012;23:17-23.

[93] Aragones, G, Ferre, R, Lazaro, I, et al., Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes, *Atherosclerosis*, 2010;213:329-331.

10. Referències

- [94] Lazaro, I, Ferre, R, Plana, N, et al., Lifestyle changes lower FABP4 plasma concentration in patients with cardiovascular risk, *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2012;65:152-157.
- [95] Aragones, G, Ferre, R, Girona, J, et al., Small artery dilation and endothelial markers in cardiovascular risk patients, *Eur J Clin Invest*, 2012;42:34-41.
- [96] Ruitter, MS, van Golde, JM, Schaper, NC, et al., Diabetes impairs arteriogenesis in the peripheral circulation: review of molecular mechanisms, *Clin Sci (Lond)*, 2010;119:225-238.
- [97] Collins, RG, Velji, R, Guevara, NV, et al., P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *J Exp Med*, 2000;191:189-194.
- [98] Ridker, PM, Hennekens, CH, Roitman-Johnson, B, et al., Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men, *Lancet*, 1998;351:88-92.
- [99] Malik, I, Danesh, J, Whincup, P, et al., Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis, *Lancet*, 2001;358:971-976.
- [100] De Caterina, R, Basta, G, Lazzerini, G, et al., Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997;17:2646-2654.
- [101] Hulthe, J, Wikstrand, J, Mattsson-Hulten, L, et al., Circulating ICAM-1 (intercellular cell-adhesion molecule 1) is associated with early stages of atherosclerosis development and with inflammatory cytokines in healthy 58-year-old men: the Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) study, *Clin Sci (Lond)*, 2002;103:123-129.

10. Referències

- [102] Saetre, T, Enoksen, E, Lyberg, T, et al., Supervised exercise training reduces plasma levels of the endothelial inflammatory markers E-selectin and ICAM-I in patients with peripheral arterial disease, *Angiology*, 2011;62:301-305.
- [103] Chen, YW, Chen, JK and Wang, JS, Exercise affects platelet-promoted tumor cell adhesion and invasion to endothelium, *Eur J Appl Physiol*, 2009;105:393-401.
- [104] Roldan, V, Marin, F, Lip, GY, et al., Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature, *Thromb Haemost*, 2003;90:1007-1020.
- [105] Meigs, JB, Hu, FB, Rifai, N, et al., Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus, *Jama*, 2004;291:1978-1986.
- [106] Fung, TT, McCullough, ML, Newby, PK, et al., Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction, *Am J Clin Nutr*, 2005;82:163-173.
- [107] Lopez-Garcia, E, Schulze, MB, Fung, TT, et al., Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction, *Am J Clin Nutr*, 2004;80:1029-1035.
- [108] Lopez-Garcia, E, Schulze, MB, Meigs, JB, et al., Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction, *J Nutr*, 2005;135:562-566.
- [109] Berg, AH and Scherer, PE, Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease, *Circ Res*, 2005;96:939-949.
- [110] Min, JK, Kim, YM, Kim, SW, et al., TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells, *J Immunol*, 2005;175:531-540.

10. Referències

- [111] Kiecolt-Glaser, JK, Belury, MA, Andridge, R, et al., Omega-3 supplementation lowers inflammation in healthy middle-aged and older adults: a randomized controlled trial, *Brain Behav Immun*, 2012;26:988-995.
- [112] Wu, SH, Shu, XO, Chow, WH, et al., Soy food intake and circulating levels of inflammatory markers in Chinese women, *J Acad Nutr Diet*, 2012;112:996-1004, 1004 e1001-1004.
- [113] Allison, MA, Jensky, NE, Marshall, SJ, et al., Sedentary behavior and adiposity-associated inflammation: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, *Am J Prev Med*, 2012;42:8-13.
- [114] Yudkin, JS, Kumari, M, Humphries, SE, et al., Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?, *Atherosclerosis*, 2000;148:209-214.
- [115] Casas-Agustench, P, Lopez-Uriarte, P, Bullo, M, et al., Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011;21:126-135.
- [116] Verma, S, Wang, CH, Li, SH, et al., A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis, *Circulation*, 2002;106:913-919.
- [117] Balducci, S, Zanuso, S, Cardelli, P, et al., Changes in physical fitness predict improvements in modifiable cardiovascular risk factors independently of body weight loss in subjects with type 2 diabetes participating in the Italian Diabetes and Exercise Study (IDES), *Diabetes Care*, 2012;35:1347-1354.
- [118] Sahlman, J, Seppa, J, Herder, C, et al., Effect of weight loss on inflammation in patients with mild obstructive sleep apnea, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2012;22:583-590.

10. Referències

[119] O'Loughlin, J, Lambert, M, Karp, I, et al., Association between cigarette smoking and C-reactive protein in a representative, population-based sample of adolescents, *Nicotine Tob Res*, 2008;10:525-532.

[120] Tome-Carneiro, J, Gonzalvez, M, Larrosa, M, et al., Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial, *Mol Nutr Food Res*, 2012;56:810-821.

[121] Unverdorben, M, von Holt, K and Winkelmann, BR, Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease: part II: role of cigarette smoking in cardiovascular disease development, *Biomark Med*, 2009;3:617-653.

[122] Mansikkaniemi, K, Juonala, M, Taimela, S, et al., Cross-sectional associations between physical activity and selected coronary heart disease risk factors in young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, *Ann Med*, 2012;44:733-744.

[123] Saha, SP, Bhalla, DK, Whayne, TF, Jr., et al., Cigarette smoke and adverse health effects: An overview of research trends and future needs, *Int J Angiol*, 2007;16:77-83.

[124] Rallidis, LS, Lekakis, J, Kolomvotsou, A, et al., Close adherence to a Mediterranean diet improves endothelial function in subjects with abdominal obesity, *Am J Clin Nutr*, 2009;90:263-268.

[125] Eriksson, MK, Franks, PW and Eliasson, M, A 3-year randomized trial of lifestyle intervention for cardiovascular risk reduction in the primary care setting: the Swedish Bjorknas study, *PLoS One*, 2009;4:e5195.

10. Referències

[126] Aadahl, M, von Huth Smith, L, Pisinger, C, et al., Five-year change in physical activity is associated with changes in cardiovascular disease risk factors: the Inter99 study, *Prev Med*, 2009;48:326-331.

[127] Lind, L, Elmstahl, S, Bergman, E, et al., EpiHealth: a large population-based cohort study for investigation of gene-lifestyle interactions in the pathogenesis of common diseases, *Eur J Epidemiol*, 2013;28:189-197.

[128] Chiuve, SE, McCullough, ML, Sacks, FM, et al., Healthy lifestyle factors in the primary prevention of coronary heart disease among men: benefits among users and nonusers of lipid-lowering and antihypertensive medications, *Circulation*, 2006;114:160-167.

[129] Stampfer, MJ, Hu, FB, Manson, JE, et al., Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle, *N Engl J Med*, 2000;343:16-22.

[130] Khaw, KT, Wareham, N, Bingham, S, et al., Combined impact of health behaviours and mortality in men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study, *PLoS Med*, 2008;5:e12.

[131] Ford, ES, Bergmann, MM, Kroger, J, et al., Healthy living is the best revenge: findings from the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition-Potsdam study, *Arch Intern Med*, 2009;169:1355-1362.

[132] Bronte-Stewart, B, Keys, A and Brock, JF, Serum-cholesterol, diet, and coronary heart-disease; an inter-racial survey in the Cape Peninsula, *Lancet*, 1955;269:1103-1108.

[133] Sofi, F, Abbate, R, Gensini, GF, et al., Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis, *Am J Clin Nutr*, 2010;92:1189-1196.

10. Referències

- [134] de Lorgeril, M, Salen, P, Martin, JL, et al., Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study, *Circulation*, 1999;99:779-785.
- [135] Estruch, R, Ros, E, Salas-Salvado, J, et al., Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet, *N Engl J Med*, 2013;368:1279-1290.
- [136] Panagiotakos, DB, Pitsavos, C, Arvaniti, F, et al., Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore, *Prev Med*, 2007;44:335-340.
- [137] Barzi, F, Woodward, M, Marfisi, RM, et al., Mediterranean diet and all-causes mortality after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial, *Eur J Clin Nutr*, 2003;57:604-611.
- [138] Foo, SY, Heller, ER, Wykrzykowska, J, et al., Vascular effects of a low-carbohydrate high-protein diet, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009;106:15418-15423.
- [139] Klonizakis, M, Alkhatib, A, Middleton, G, et al., Mediterranean diet- and exercise-induced improvement in age-dependent vascular activity, *Clin Sci (Lond)*, 2013;124:579-587.
- [140] Cioni, G, Boddi, M, Fatini, C, et al., Peripheral-Arterial Tonometry for Assessing Endothelial Function in Relation to Dietary Habits, *J Investig Med*, 2013 In Press.
- [141] Fernandez, JM, Rosado-Alvarez, D, Da Silva Grigoletto, ME, et al., Moderate-to-high-intensity training and a hypocaloric Mediterranean diet

10. Referències

enhance endothelial progenitor cells and fitness in subjects with the metabolic syndrome, *Clin Sci (Lond)*, 2012;123:361-373.

[142] Marin, C, Delgado-Lista, J, Ramirez, R, et al., Mediterranean diet reduces senescence-associated stress in endothelial cells, *Age (Dordr)*, 2011;34:1309-1316.

[143] Thomazella, MC, Goes, MF, Andrade, CR, et al., Effects of high adherence to mediterranean or low-fat diets in medicated secondary prevention patients, *Am J Cardiol*, 2011;108:1523-1529.

[144] Marin, C, Ramirez, R, Delgado-Lista, J, et al., Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium, *Am J Clin Nutr*, 2011;93:267-274.

[145] Perez-Martinez, P, Moreno-Conde, M, Cruz-Teno, C, et al., Dietary fat differentially influences regulatory endothelial function during the postprandial state in patients with metabolic syndrome: from the LIPGENE study, *Atherosclerosis*, 2010;209:533-538.

[146] Buscemi, S, Verga, S, Tranchina, MR, et al., Effects of hypocaloric very-low-carbohydrate diet vs. Mediterranean diet on endothelial function in obese women*, *Eur J Clin Invest*, 2009;39:339-347.

[147] Fuentes, F, Lopez-Miranda, J, Perez-Martinez, P, et al., Chronic effects of a high-fat diet enriched with virgin olive oil and a low-fat diet enriched with alpha-linolenic acid on postprandial endothelial function in healthy men, *Br J Nutr*, 2008;100:159-165.

[148] Cortes, B, Nunez, I, Cofan, M, et al., Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function, *J Am Coll Cardiol*, 2006;48:1666-1671.

10. Referències

[149] Zuchi, C, Ambrosio, G, Luscher, TF, et al., Nutraceuticals in cardiovascular prevention: lessons from studies on endothelial function, *Cardiovasc Ther*, 2010;28:187-201.

[150] Chiva-Blanch, G, Urpi-Sarda, M, Ros, E, et al., Dealcoholized red wine decreases systolic and diastolic blood pressure and increases plasma nitric oxide: short communication, *Circ Res*, 2012;111:1065-1068.

[151] Perez-Martinez, P, Garcia-Quintana, JM, Yubero-Serrano, EM, et al., Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study, *Clin Sci (Lond)*, 2012;119:251-261.

[152] Cruz-Teno, C, Perez-Martinez, P, Delgado-Lista, J, et al., Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study, *Mol Nutr Food Res*, 2012;56:854-865.

[153] Scoditti, E, Calabriso, N, Massaro, M, et al., Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer, *Arch Biochem Biophys*, 2012;527:81-89.

[154] Harris, WS, Park, Y and Isley, WL, Cardiovascular disease and long-chain omega-3 fatty acids, *Curr Opin Lipidol*, 2003;14:9-14.

[155] Din, JN, Archer, RM, Harding, SA, et al., Effect of omega-3 fatty acid supplementation on endothelial function, endogenous fibrinolysis and platelet activation in male cigarette smokers, *Heart*, 2013;99:168-174.

[156] Mackay, I, Ford, I, Thies, F, et al., Effect of Omega-3 fatty acid supplementation on markers of platelet and endothelial function in patients with peripheral arterial disease, *Atherosclerosis*, 2012;221:514-520.

10. Referències

[157] Hileman, CO, Carman, TL, Storer, NJ, et al., Omega-3 fatty acids do not improve endothelial function in virologically suppressed HIV-infected men: a randomized placebo-controlled trial, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2012;28:649-655.

[158] van den Elsen, LW, Noakes, PS, van der Maarel, MA, et al., Salmon consumption by pregnant women reduces ex vivo umbilical cord endothelial cell activation, *Am J Clin Nutr*, 2011;94:1418-1425.

[159] de Mello, VD, Schwab, U, Kolehmainen, M, et al., A diet high in fatty fish, bilberries and wholegrain products improves markers of endothelial function and inflammation in individuals with impaired glucose metabolism in a randomised controlled trial: the Sysdimet study, *Diabetologia*, 2011;54:2755-2767.

[160] Sanders, TA, Hall, WL, Maniou, Z, et al., Effect of low doses of long-chain n-3 PUFAs on endothelial function and arterial stiffness: a randomized controlled trial, *Am J Clin Nutr*, 2011;94:973-980.

[161] Newens, KJ, Thompson, AK, Jackson, KG, et al., DHA-rich fish oil reverses the detrimental effects of saturated fatty acids on postprandial vascular reactivity, *Am J Clin Nutr*, 2011;94:742-748.

[162] West, SG, Krick, AL, Klein, LC, et al., Effects of diets high in walnuts and flax oil on hemodynamic responses to stress and vascular endothelial function, *J Am Coll Nutr*, 2010;29:595-603.

[163] Moertl, D, Hammer, A, Steiner, S, et al., Dose-dependent effects of omega-3-polyunsaturated fatty acids on systolic left ventricular function, endothelial function, and markers of inflammation in chronic heart failure of nonischemic origin: a double-blind, placebo-controlled, 3-arm study, *Am Heart J*, 2011;161:915 e911-919.

10. Referències

- [164] Dangardt, F, Osika, W, Chen, Y, et al., Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents, *Atherosclerosis*, 2010;212:580-585.
- [165] Wong, CY, Yiu, KH, Li, SW, et al., Fish-oil supplement has neutral effects on vascular and metabolic function but improves renal function in patients with Type 2 diabetes mellitus, *Diabet Med*, 2010;27:54-60.
- [166] Rizza, S, Tesauro, M, Cardillo, C, et al., Fish oil supplementation improves endothelial function in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes, *Atherosclerosis*, 2009;206:569-574.
- [167] Mozaffarian, D and Wu, JH, Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events, *J Am Coll Cardiol*, 2011;58:2047-2067.
- [168] Kim, W, Khan, NA, McMurray, DN, et al., Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling, *Prog Lipid Res*, 2010;49:250-261.
- [169] Gawrisch, K and Soubias, O, Structure and dynamics of polyunsaturated hydrocarbon chains in lipid bilayers-significance for GPCR function, *Chem Phys Lipids*, 2008;153:64-75.
- [170] Hertz, R, Magenheimer, J, Berman, I, et al., Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha, *Nature*, 1998;392:512-516.
- [171] Forman, BM, Chen, J and Evans, RM, Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997;94:4312-4317.
- [172] Vedin, I, Cederholm, T, Freund-Levi, Y, et al., Reduced prostaglandin F2 alpha release from blood mononuclear leukocytes after oral supplementation of omega3 fatty acids: the OmegAD study, *J Lipid Res*, 2010;51:1179-1185.

10. Referències

[173] Serhan, CN, Chiang, N and Van Dyke, TE, Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, *Nat Rev Immunol*, 2008;8:349-361.

[174] Serhan, CN, Yacoubian, S and Yang, R, Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators, *Annu Rev Pathol*, 2008;3:279-312.

[175] Krauss, RM, Eckel, RH, Howard, B, et al., AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association, *Circulation*, 2000;102:2284-2299.

[176] Cummings, S, Parham, ES and Strain, GW, Position of the American Dietetic Association: weight management, *J Am Diet Assoc*, 2002;102:1145-1155.

[177] Flock, MR and Kris-Etherton, PM, Dietary Guidelines for Americans 2010: implications for cardiovascular disease, *Curr Atheroscler Rep*, 2010;13:499-507.

[178] Noakes, M, Keogh, JB, Foster, PR, et al., Effect of an energy-restricted, high-protein, low-fat diet relative to a conventional high-carbohydrate, low-fat diet on weight loss, body composition, nutritional status, and markers of cardiovascular health in obese women, *Am J Clin Nutr*, 2005;81:1298-1306.

[179] Sacks, FM, Bray, GA, Carey, VJ, et al., Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates, *N Engl J Med*, 2009;360:859-873.

[180] Larsen, TM, Dalskov, SM, van Baak, M, et al., Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance, *N Engl J Med*, 2010;363:2102-2113.

[181] The Look AHEAD Research Group, Cardiovascular effects of intensive lifestyle intervention in type 2 diabetes, *N Engl J Med*, 2013;In Press.

10. Referències

[182] de Koning, L, Fung, TT, Liao, X, et al., Low-carbohydrate diet scores and risk of type 2 diabetes in men, *Am J Clin Nutr*, 2011;93:844-850.

[183] Fung, TT, van Dam, RM, Hankinson, SE, et al., Low-carbohydrate diets and all-cause and cause-specific mortality: two cohort studies, *Ann Intern Med*, 2010;153:289-298.

[184] Lagiou, P, Sandin, S, Lof, M, et al., Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women: prospective cohort study, *Bmj*, 2010;344:e4026.

[185] Khoo, J, Piantadosi, C, Duncan, R, et al., Comparing effects of a low-energy diet and a high-protein low-fat diet on sexual and endothelial function, urinary tract symptoms, and inflammation in obese diabetic men, *J Sex Med*, 2011;8:2868-2875.

[186] Johnstone, AM, Lobley, GE, Horgan, GW, et al., Effects of a high-protein, low-carbohydrate v. high-protein, moderate-carbohydrate weight-loss diet on antioxidant status, endothelial markers and plasma indices of the cardiometabolic profile, *Br J Nutr*, 2011;106:282-291.

[187] Bladbjerg, EM, Larsen, TM, Due, A, et al., Effects on markers of inflammation and endothelial cell function of three ad libitum diets differing in type and amount of fat and carbohydrate: a 6-month randomised study in obese individuals, *Br J Nutr*, 2011;106:123-129.

[188] Wycherley, TP, Brinkworth, GD, Keogh, JB, et al., Long-term effects of weight loss with a very low carbohydrate and low fat diet on vascular function in overweight and obese patients, *J Intern Med*, 2010;267:452-461.

[189] Dod, HS, Bhardwaj, R, Sajja, V, et al., Effect of intensive lifestyle changes on endothelial function and on inflammatory markers of atherosclerosis, *Am J Cardiol*, 2010;105:362-367.

10. Referències

[190] Volek, JS, Ballard, KD, Silvestre, R, et al., Effects of dietary carbohydrate restriction versus low-fat diet on flow-mediated dilation, *Metabolism*, 2009;58:1769-1777.

[191] Miller, M, Beach, V, Sorkin, JD, et al., Comparative effects of three popular diets on lipids, endothelial function, and C-reactive protein during weight maintenance, *J Am Diet Assoc*, 2009;109:713-717.

[192] Keogh, JB, Brinkworth, GD, Noakes, M, et al., Effects of weight loss from a very-low-carbohydrate diet on endothelial function and markers of cardiovascular disease risk in subjects with abdominal obesity, *Am J Clin Nutr*, 2008;87:567-576.

[193] Phillips, SA, Jurva, JW, Syed, AQ, et al., Benefit of low-fat over low-carbohydrate diet on endothelial health in obesity, *Hypertension*, 2008;51:376-382.

[194] Keogh, JB, Brinkworth, GD and Clifton, PM, Effects of weight loss on a low-carbohydrate diet on flow-mediated dilatation, adhesion molecules and adiponectin, *Br J Nutr*, 2007;98:852-859.

[195] Clifton, PM, Keogh, JB, Foster, PR, et al., Effect of weight loss on inflammatory and endothelial markers and FMD using two low-fat diets, *Int J Obes (Lond)*, 2005;29:1445-1451.

[196] Keogh, JB, Grieger, JA, Noakes, M, et al., Flow-mediated dilatation is impaired by a high-saturated fat diet but not by a high-carbohydrate diet, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005;25:1274-1279.

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

10. Referències

- [198] Pierce, GL, Beske, SD, Lawson, BR, et al., Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults, *Hypertension*, 2008;52:72-79.
- [199] Brook, RD, Obesity, weight loss, and vascular function, *Endocrine*, 2006;29:21-25.
- [200] Morris, JN, Heady, JA, Raffle, PA, et al., Coronary heart-disease and physical activity of work, *Lancet*, 1953;265:1053-1057; contd.
- [201] Kones, R, Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey, *Drug Des Devel Ther*, 2011;5:325-380.
- [202] Mora, S, Cook, N, Buring, JE, et al., Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms, *Circulation*, 2007;116:2110-2118.
- [203] Donnelly, CM, Blaney, JM, Lowe-Strong, A, et al., A randomised controlled trial testing the feasibility and efficacy of a physical activity behavioural change intervention in managing fatigue with gynaecological cancer survivors, *Gynecol Oncol*, 2011;122:618-624.
- [204] Lofgren, B, Dencker, M, Nilsson, JA, et al., A 4-year exercise program in children increases bone mass without increasing fracture risk, *Pediatrics*, 2012;129:e1468-1476.
- [205] Tsarouhas, K, Karatzaferi, C, Tsitsimpikou, C, et al., Effects of walking on heart rate recovery, endothelium modulators and quality of life in patients with heart failure, *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2011;18:594-600.
- [206] Physical Activity Guidelines Advisory Committee report, 2008. To the Secretary of Health and Human Services. Part A: executive summary, *Nutr Rev*, 2009;67:114-120.

10. Referències

- [207] Helis, E, Augustincic, L, Steiner, S, et al., Time trends in cardiovascular and all-cause mortality in the 'old' and 'new' European Union countries, *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2011;18:347-359.
- [208] Taylor, RS, Brown, A, Ebrahim, S, et al., Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Am J Med*, 2004;116:682-692.
- [209] Linke, A, Erbs, S and Hambrecht, R, Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease, *Front Biosci*, 2008;13:424-432.
- [210] Pialoux, V, Brown, AD, Leigh, R, et al., Effect of cardiorespiratory fitness on vascular regulation and oxidative stress in postmenopausal women, *Hypertension*, 2009;54:1014-1020.
- [211] Rowley, NJ, Dawson, EA, Birk, GK, et al., Exercise and arterial adaptation in humans: uncoupling localized and systemic effects, *J Appl Physiol*, 2011;110:1190-1195.
- [212] Green, DJ, Maiorana, A, O'Driscoll, G, et al., Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans, *J Physiol*, 2004;561:1-25.
- [213] Green, DJ, Walsh, JH, Maiorana, A, et al., Comparison of resistance and conduit vessel nitric oxide-mediated vascular function in vivo: effects of exercise training, *J Appl Physiol*, 2004;97:749-755; discussion 748.
- [214] Glantz, S and Gonzalez, M, Effective tobacco control is key to rapid progress in reduction of non-communicable diseases, *Lancet*, 2012;379:1269-1271.
- [215] Wu, J and Sin, DD, Improved patient outcome with smoking cessation: when is it too late?, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2011;6:259-267.

10. Referències

- [216] Kotseva, K, Wood, D, De Backer, G, et al., EUROASPIRE III. Management of cardiovascular risk factors in asymptomatic high-risk patients in general practice: cross-sectional survey in 12 European countries, *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2010;17:530-540.
- [217] Shah, AM, Pfeffer, MA, Hartley, LH, et al., Risk of all-cause mortality, recurrent myocardial infarction, and heart failure hospitalization associated with smoking status following myocardial infarction with left ventricular dysfunction, *Am J Cardiol*, 2010;106:911-916.
- [218] Anthonisen, NR, Skeans, MA, Wise, RA, et al., The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial, *Ann Intern Med*, 2005;142:233-239.
- [219] He, J, Vupputuri, S, Allen, K, et al., Passive smoking and the risk of coronary heart disease--a meta-analysis of epidemiologic studies, *N Engl J Med*, 1999;340:920-926.
- [220] Law, MR, Morris, JK and Wald, NJ, Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence, *Bmj*, 1997;315:973-980.
- [221] Steenland, K, Risk assessment for heart disease and workplace ETS exposure among nonsmokers, *Environ Health Perspect*, 1999;107 Suppl 6:859-863.
- [222] Ambrose, JA and Barua, RS, The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update, *J Am Coll Cardiol*, 2004;43:1731-1737.
- [223] Csiszar, A, Podlutzky, A, Wolin, MS, et al., Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking, *Front Biosci*, 2009;14:3128-3144.

10. Referències

- [224] Rose, JE, Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction, *Psychopharmacology (Berl)*, 2006;184:274-285.
- [225] Armani, C, Landini, L, Jr. and Leone, A, Molecular and biochemical changes of the cardiovascular system due to smoking exposure, *Curr Pharm Des*, 2009;15:1038-1053.
- [226] Newby, DE, McLeod, AL, Uren, NG, et al., Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis, *Circulation*, 2001;103:1936-1941.
- [227] Celermajer, DS, Sorensen, KE, Georgakopoulos, D, et al., Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults, *Circulation*, 1993;88:2149-2155.
- [228] Guthikonda, S, Sinkey, C, Barenz, T, et al., Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers, *Circulation*, 2003;107:416-421.
- [229] Jaimes, EA, DeMaster, EG, Tian, RX, et al., Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004;24:1031-1036.
- [230] Raveendran, M, Wang, J, Senthil, D, et al., Endogenous nitric oxide activation protects against cigarette smoking induced apoptosis in endothelial cells, *FEBS Lett*, 2005;579:733-740.
- [231] Loft, S, Vistisen, K, Ewertz, M, et al., Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index, *Carcinogenesis*, 1992;13:2241-2247.

10. Referències

- [232] Czernin, J and Waldherr, C, Cigarette smoking and coronary blood flow, *Prog Cardiovasc Dis*, 2003;45:395-404.
- [233] Boari, GE, Rizzoni, D, De Ciuceis, C, et al., Structural alterations in subcutaneous small resistance arteries predict changes in the renal function of hypertensive patients, *J Hypertens*, 2010;28:1951-1958.
- [234] Blacher, J and Safar, ME, Large-artery stiffness, hypertension and cardiovascular risk in older patients, *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2005;2:450-455.
- [235] Elosua, R, Garcia, M, Aguilar, A, et al., Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group, *Med Sci Sports Exerc*, 2000;32:1431-1437.
- [236] Ainsworth, BE, Haskell, WL, Herrmann, SD, et al., 2011 Compendium of Physical Activities: a second update of codes and MET values, *Med Sci Sports Exerc*, 2011;43:1575-1581.
- [237] Halton, TL, Willett, WC, Liu, S, et al., Low-carbohydrate-diet score and the risk of coronary heart disease in women, *N Engl J Med*, 2006;355:1991-2002.
- [238] Celermajer, DS, Reliable endothelial function testing: at our fingertips?, *Circulation*, 2008;117:2428-2430.
- [239] Stein, JH, Korcarz, CE, Hurst, RT, et al., Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine, *J Am Soc Echocardiogr*, 2008;21:93-111; quiz 189-190.
- [240] Vlachos, IS, Hatzioannou, A, Perelas, A, et al., Sonographic assessment of regional adiposity, *AJR Am J Roentgenol*, 2007;189:1545-1553.

10. Referències

- [241] Despres, JP, Arsenault, BJ, Cote, M, et al., Abdominal obesity: the cholesterol of the 21st century?, *Can J Cardiol*, 2008;24 Suppl D:7D-12D.
- [242] Guidelines on diet, nutrition, and cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. The American Cancer Society 1996 Advisory Committee on Diet, Nutrition, and Cancer Prevention, *CA Cancer J Clin*, 1996;46:325-341.
- [243] Widlansky, ME, Gokce, N, Keaney, JF, Jr., et al., The clinical implications of endothelial dysfunction, *J Am Coll Cardiol*, 2003;42:1149-1160.
- [244] Yeboah, J, Burke, GL, Crouse, JR, et al., Relationship between brachial flow-mediated dilation and carotid intima-media thickness in an elderly cohort: the Cardiovascular Health Study, *Atherosclerosis*, 2008;197:840-845.
- [245] Versari, D, Daghini, E, Viridis, A, et al., Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease, *Diabetes Care*, 2009;32 Suppl 2:S314-321.
- [246] Bacon, SL, Lavoie, KL, Arsenault, A, et al., The research on endothelial function in women and men at risk for cardiovascular disease (REWARD) study: methodology, *BMC Cardiovasc Disord*, 2011;11:50.
- [247] Burillo, E, Martin-Fuentes, P, Mateo-Gallego, R, et al., Omega-3 fatty acids and HDL. How do they work in the prevention of cardiovascular disease?, *Curr Vasc Pharmacol*, 2012;10:432-441.
- [248] Salonen, JT, Hamynen, H, Leino, U, et al., Relation of alcohol, physical activity, dietary fat and smoking to serum HDL and total cholesterol in young Finnish men, *Scand J Soc Med*, 1985;13:99-102.
- [249] Newsholme, P, Homem De Bittencourt, PI, C, OH, et al., Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide, *Clin Sci (Lond)*, 2009;118:341-349.

10. Referències

[250] Wycherley, TP, Brinkworth, GD, Noakes, M, et al., Effect of caloric restriction with and without exercise training on oxidative stress and endothelial function in obese subjects with type 2 diabetes, *Diabetes Obes Metab*, 2008;10:1062-1073.

[251] Hambrecht, R, Fiehn, E, Weigl, C, et al., Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure, *Circulation*, 1998;98:2709-2715.

[252] DeSouza, CA, Shapiro, LF, Clevenger, CM, et al., Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men, *Circulation*, 2000;102:1351-1357.

[253] Bemelmans, RH, van der Graaf, Y, Nathoe, HM, et al., Increased visceral adipose tissue is associated with increased resting heart rate in patients with manifest vascular disease, *Obesity (Silver Spring)*, 2012;20:834-841.

[254] Pou, KM, Massaro, JM, Hoffmann, U, et al., Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study, *Circulation*, 2007;116:1234-1241.

[255] Custodis, F, Baumhakil, M, Schlimmer, N, et al., Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Circulation*, 2008;117:2377-2387.

[256] Drouin, A, Gendron, ME, Thorin, E, et al., Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice, *Br J Pharmacol*, 2008;154:749-757.

10. Referències

[257] Heusch, G, Skyschally, A, Gres, P, et al., Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction, *Eur Heart J*, 2008;29:2265-2275.

[258] Costa, B, Barrio, F, Cabre, JJ, et al., Delaying progression to type 2 diabetes among high-risk Spanish individuals is feasible in real-life primary healthcare settings using intensive lifestyle intervention, *Diabetologia*, 2012;55:1319-1328.

