



UNIVERSIDAD  
DE  
CÓRDOBA



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**Departamento de Medicina**

**FUNCIÓN ENDOTELIAL Y CAPACIDAD  
REGENERATIVA DEL ENDOTELIO: BENEFICIOS  
DE UN MODELO DE DIETA MEDITERRÁNEA  
COMBINADO CON UN PROGRAMA DE  
EJERCICIO FÍSICO**

Trabajo presentado por Daniel Rosado Álvarez, licenciado en Medicina y  
Cirugía, para optar al grado de Doctor

**Fdo: Daniel Rosado Álvarez**

**Córdoba, 2 de Julio de 2012**

TITULO: *FUNCIÓN ENDOTELIAL Y CAPACIDAD REGENERATIVA DEL  
ENDOTELIO : BENEFICIOS DE N MODELO DE DIETA  
MEDITERRANEA COMBINADO CON N PROGRAMA DE EJERCICIO  
FISICO.*

AUTOR: *DANIEL ROSADO ÁLVAREZ*

---

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

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)

[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



*El presente trabajo se ha realizado en la Unidad de Investigación de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía/Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), con la financiación de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, para la Investigación Biomédica y en Ciencias de la Salud en Andalucía, Orden de 19 de Julio de 2007 (BOJA nº 140 de fecha 30 de Julio de 2007).*



UNIVERSIDAD  
DE  
CORDOBA



**TÍTULO DE LA TESIS:** FUNCIÓN ENDOTELIAL Y CAPACIDAD REGENERATIVA DEL ENDOTELIO: BENEFICIOS DE UN MODELO DE DIETA MEDITERRÁNEA COMBINADO CON UN PROGRAMA DE EJERCICIO FÍSICO

**DOCTORANDO:** DANIEL ROSADO ÁLVAREZ

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

**D. JUAN MARCELO FERNÁNDEZ Y D. FRANCISCO FUENTES JIMÉNEZ,**

**HACEN CONSTAR:**

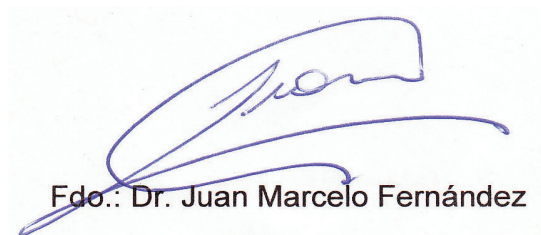
Que el trabajo titulado “FUNCIÓN ENDOTELIAL Y CAPACIDAD REGENERATIVA DEL ENDOTELIO: BENEFICIOS DE UN MODELO DE DIETA MEDITERRÁNEA COMBINADO CON UN PROGRAMA DE EJERCICIO FÍSICO” ha sido realizado por D. Daniel Rosado Álvarez bajo nuestra dirección, en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis, grupo de Nutrigenómica y Síndrome Metabólico, adscrito al IMIBIC/HURS/UCO.

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

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

Córdoba, 2de Julio de 2012

Firma de los directores



Fdo.: Dr. Juan Marcelo Fernández



Fdo.: Dr. Francisco Fuentes Jiménez



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho de este trabajo una realidad.

A los **doctores D. Juan Marcelo Fernández y D. Francisco Fuentes Jiménez**, directores ejemplares de esta tesis sin los que habría sido imposible su realización. Ambos han sido un ejemplo de conocimiento, inquietud científica y un gran apoyo tanto personal como científico en los momentos difíciles. De ellos destaco, su cercanía personal.

A los **Profs. Dr. D. José López Miranda y D. Francisco Pérez Jiménez**, quienes despiertan en mí una profunda admiración por la excelencia que imprimen a todo lo que hacen. Unido a ello, una gran calidad humana y sensibilidad que les hacen especiales.

Al **Prof. Dr. D. Fernando López Segura**, quien supone un punto de inflexión en mi vida. Excelencia en lo que hace y ejemplo a seguir de los que empezamos. Pero por encima de todo, quisiera destacar y agradecer particularmente el haberme permitido conocerlo como persona, porque es su mejor virtud. Máxima disponibilidad dentro y fuera del Hospital. Alguien muy especial para mí.

A los **doctores D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Ángeles Blanco Molina, D. Rafael Angel Fernández de la Puebla y D. José Luis Ogea García**, maestros que me enseñaron a vivir la Medicina y que en todo momento me han brindado su apoyo incondicional.

A **Leslie Landaeta**. Compañera y amiga. Gracias por tu ayuda.

Al **resto de compañeros de residencia y de profesionales que componen la Unidad Clínica de Medicina Interna**, que me han ayudado en mi formación como profesional y como persona.



A los **doctores Oriol Rangel y M<sup>a</sup> José Gómez**, por su ayuda incondicional en todo momento, siempre con una disponibilidad absoluta.

A **todos mis amigos**, que me hacéis la vida más fácil.

A **toda mi familia. Especialmente, a mi tío Paco**. Ellos para mí son todo.

A la familia que no nos puede acompañar. Especialmente, **a mis abuelos**

A **Lucía**, el amor de mi vida y la futura madre de nuestro hijo.

A **mis padres, José Antonio y M<sup>a</sup> Teresa**, a los que debo lo que soy. Para que siempre quede escrito en el recuerdo lo mucho que os quiero, GRACIAS. Esta tesis, al igual que todo lo que consiga en la vida, es vuestro.

**A todos, GRACIAS**

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. SÍNDROME METABÓLICO.....</b>	<b>19</b>
1.1. Historia .....	19
1.2. Criterios definitorios del Síndrome Metabólico .....	19
1.2.1. Introducción .....	19
1.2.2. Definiciones .....	20
1.2.2.1. Organización Mundial de la Salud .....	21
1.2.2.2. European Group for the Study of Insulin Resistance.....	21
1.2.2.3. National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III	21
1.2.2.4. American Association of Clinical Endocrinologists.....	22
1.2.2.5. International Diabetes Federation.....	22
1.2.2.6. American Heart Association y National Heart, Lung, and Blood Institute .....	22
1.3. Epidemiología.....	25
1.3.1. Prevalencia según la definición empleada .....	25
1.3.2. Prevalencia estimada según género y raza/etnia.....	25
1.3.3. Prevalencia estimada según edad.....	26
1.3.4. Prevalencia ajustada por estatus socioeconómico, tabaquismo, alcohol y nivel educativo .....	26
1.4. Fisiopatología .....	27
1.4.1. Concepto de resistencia insulínica .....	27
1.4.2. La obesidad como factor desencadenante de la resistencia insulínica..	27
1.4.3. Resistencia insulínica a nivel del tejido adiposo, hígado y músculo.....	28
1.4.4. Hipertensión y resistencia a la insulina.....	29
1.4.5. Moléculas proinflamatorias, estrés del retículo endoplásmico y su intervención en el desarrollo de resistencia insulínica y síndrome metabólico	30
<b>2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y CÉLULAS PRECURSORAS DE ENDOTELIO COMO MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN EL SÍNDROME METABÓLICO .....</b>	<b>33</b>
2.1. Disfunción endotelial .....	33
2.1.1. El endotelio .....	33
2.1.2. El óxido nítrico .....	33
2.1.3. Evaluación de la función endotelial .....	34
2.2. Células precursoras de endotelio .....	35
2.2.1. ¿Qué son?.....	35
2.2.2. Caracterización.....	36

2.2.3. Reclutamiento, movilización y diferenciación .....	36
2.2.4. Asentamiento y potencial regenerativo.....	37
2.2.5. Células precursoras de endotelio y factores de riesgo cardiovascular...	38
<b>3. NUTRICIÓN Y SÍNDROME METABÓLICO .....</b>	<b>41</b>
3.1. Alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos .....	41
3.2. Alteraciones en el metabolismo lipídico.....	43
3.3. Nutrición y tensión arterial .....	44
3.4. Obesidad y nutrición.....	45
<b>4. DIETA MEDITERRÁNEA Y SÍNDROME METABÓLICO .....</b>	<b>47</b>
4.1. Dieta mediterránea y factores de riesgo cardiometabólicos.....	49
4.2. Dieta mediterránea y función endotelial .....	51
4.3. Dieta mediterránea y células precursoras de endotelio .....	52
<b>5. EJERCICIO FÍSICO Y SÍNDROME METABÓLICO .....</b>	<b>55</b>
5.1. Ejercicio y factores de riesgo cardiometabólicos.....	55
5.2. Ejercicio y función endotelial .....	59
5.3. Ejercicio y células precursoras de endotelio .....	62
<b>III. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>65</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	71
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	71
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
1. POBLACIÓN .....	75
1.1. Proceso de selección de la muestra.....	75
1.2. Cálculo del tamaño muestral .....	75
1.3. Criterios de inclusión .....	75
1.4. Criterios de exclusión .....	76
2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	77
3. INTERVENCIÓN DIETÉTICA.....	79
4. Intervención con ejercicio físico de moderada a alta intensidad.....	81
4.1. Sesiones de ejercicio supervisado .....	81
4.2. Sesiones de ejercicio no supervisado .....	81
5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS, PROCESAMIENTO Y DETERMINACIONES.....	83
5.1. Determinaciones bioquímicas .....	83
5.1.1. Perfil lipídico .....	83
5.1.2. Glucemia e insulinemia.....	83
5.2. Células precursoras del endotelio .....	83
5.3. Estudio de la Función Endotelial microvascular .....	85
5.4. Tests físicos .....	86
5.4.1. Test de ejercicio submáximo sobre cicloergómetro .....	86

---

5.4.2. Test de caminata de seis minutos (T6MC) .....	87
5.4.3. Test de sentarse y levantarse (TSyL) .....	87
<b>6. ESTADÍSTICA .....</b>	<b>89</b>
<b>7. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>91</b>
<b><i>VI. RESULTADOS.....</i></b>	<b><i>93</i></b>
1. POBLACIÓN Y ADHERENCIA A LOS TRATAMIENTOS.....	95
2. CÉLULAS PRECURSORAS DE ENDOTELIO .....	99
3. CAPACIDAD CARDIORRESPIRATORIA .....	101
4. FACTORES DE RIESGO CARDIOMETABÓLICOS .....	103
5. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN .....	107
<b><i>VII. DISCUSIÓN .....</i></b>	<b><i>109</i></b>
<b><i>VIII. CONCLUSIONES .....</i></b>	<b><i>117</i></b>
1. CONCLUSIÓN PRINCIPAL.....	119
2. CONCLUSIONES SECUNDARIAS.....	119
<b><i>IX. ABREVIATURAS.....</i></b>	<b><i>121</i></b>
<b><i>X. REFERENCIAS .....</i></b>	<b><i>127</i></b>
<b><i>XI. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS .....</i></b>	<b><i>149</i></b>



## I. RESUMEN



**Introducción:** Desde que se conoce que las células precursoras de endotelio (CPEs) contribuyen activamente en la reparación endotelial, un descenso en su número puede explicar el desarrollo y progresión de la arteriosclerosis. La ingesta de un patrón dietético mediterráneo mejora los factores de riesgo cardiovascular y la disfunción endotelial en individuos con síndrome metabólico (SMet). Aunque un programa de entrenamiento con ejercicio regular ha sido propuesto para inducir un incremento en los niveles de CPEs, parece que un protocolo de entrenamiento con ejercicio progresivo puede ser un estímulo más efectivo sobre el endotelio y la capacidad cardiorrespiratoria en sujetos sedentarios con SMet.

**Hipótesis:** Determinar que un modelo de dieta mediterránea hipocalórica asociada a un programa de ejercicio aeróbico progresivo de moderada/alta intensidad induce una mejoría mayor en la capacidad cardiorrespiratoria y regenerativa del endotelio en pacientes sedentarios con síndrome metabólico, a través de un incremento en el número de CPEs, que un tratamiento basado sólo en dieta mediterránea hipocalórica.

**Objetivo principal:** Analizar los efectos de una dieta mediterránea hipocalórica asociada o no a un protocolo de entrenamiento con ejercicio aeróbico progresivo de moderada/alta intensidad sobre el número de CPEs y la capacidad cardiorrespiratoria en pacientes sedentarios con SMet.

**Objetivos secundarios:** Comparar los beneficios de un modelo de dieta mediterránea hipocalórica, con o sin un programa de ejercicio aeróbico progresivo de moderada/alta intensidad, sobre los factores de riesgo cardiometabólicos y función endotelial en pacientes sedentarios con SMet.

**Diseño y metodología:** 45 sujetos (edad  $57.7 \pm 4.5$  años) fueron randomizados a dos intervenciones de 12 semanas duración, donde a un grupo se le administraba una dieta mediterránea hipocalórica (MED) y, al otro, una dieta de idénticas características asociada a un programa de entrenamiento progresivo (MEDE). La restricción calórica fue del 40% de la ingesta energética habitual. El porcentaje de distribución de los nutrientes y la selección de alimentos se basó en un patrón alimentario típicamente mediterráneo, siendo la ingesta proteica de 0.8gr/kg/día. El programa de entrenamiento con ejercicio aeróbico progresivo incluía dos sesiones semanales supervisadas (30 min; con una intensidad del 80% de la frecuencia cardiaca máxima; utilizando cicloergómetro y ergómetro de brazo) y una sesión semanal no supervisada (de 30 a 60 min; con una intensidad del 65-75% de la frecuencia cardiaca máxima) de caminata con monitorización continua de frecuencia cardiaca. Los cambios sobre: a) número de CPEs (CD34+KDR+), b) capacidad cardiorrespiratoria; c) factores de riesgo cardiometabólicos; y d) función endotelial medida mediante test de hiperemia reactiva post-isquemia, fueron determinadas al inicio y final del periodo de intervención.

**Resultados:** 40 sujetos completaron las 12 semanas de intervención (20 en cada grupo). El grupo MEDE presentó un incremento en el número de CPEs y una mejora de la capacidad cardiorrespiratoria significativamente mayor que el grupo MED ( $p < 0.001$ ).



Además, se observó una correlación positiva entre el aumento del número de CPEs y la capacidad cardiorrespiratoria en el grupo MEDE ( $r=0.72$ ;  $r^2=0.52$ ;  $p<0.001$ ). El índice de masa corporal, la sensibilidad a la insulina, los niveles de triglicéridos plasmáticos y la presión arterial diastólica mostró una reducción significativamente mayor en el grupo de dieta y ejercicio respecto al grupo con tratamiento dietético exclusivo. Asimismo, la función endotelial medida por el test de hiperemia reactiva post-isquemia sólo mejoró en el grupo de intervención MEDE.

**Conclusión:** La adherencia a una dieta mediterránea hipocalórica combinada con un programa de entrenamiento con ejercicio aeróbico progresivo induce una mejoría mayor en la capacidad cardiorrespiratoria y regenerativa del endotelio en pacientes con SMet. Además, este tratamiento disminuye la disfunción endotelial y mejora los factores de riesgo cardiovascular.

## II. INTRODUCCIÓN



## 1. SÍNDROME METABÓLICO

### 1.1. Historia

Aunque el concepto de síndrome metabólico (SMet) ha sido ampliamente utilizado desde principios de 2001 por *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP:ATPIII)*, el concepto de conjunto de alteraciones metabólicas y factores de riesgo cardiovascular (FRCV) ha sido discutido por la comunidad científica durante décadas.

En 1920, Kylin<sup>1</sup> documentó la conexión existente entre hipertensión (HTA), hiperglucemia y gota. Posteriormente, Marañón<sup>2</sup>, fundador de la endocrinología moderna en España, señaló en 1927 de manera explícita que «la HTA es un estado prediabético... este concepto también se aplica a la obesidad... y debe haber alguna forma de predisposición de carácter general para la asociación de la diabetes mellitus (DM) con la HTA, la obesidad y quizá también con la gota... de manera que la dieta es esencial para la prevención y el tratamiento de todas estas alteraciones».

En 1947 el Dr. Jean Vague hizo una interesante observación sobre la obesidad troncular y la predisposición a diabetes mellitus tipo 2 (DM2), aterosclerosis, gota y cálculos<sup>3</sup>. En 1967, Avogaro y Crepaldi denominaron *síndrome plurimetabólico*<sup>4</sup> a la coexistencia de obesidad, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Sin embargo, fueron Mehnert y Kuhlmann<sup>5</sup> en 1968 quienes definieron el *síndrome de bienestar* para hacer referencia a la relación entre determinadas anomalías metabólicas y algunos hábitos nutricionales y de estilo de vida. En 1977, Haller<sup>6</sup> utilizó el término SMet para definir a un conjunto de alteraciones metabólicas como la obesidad, DM2, hiperlipoproteinemia, hiperuricemia y esteatosis hepática cuando describió los efectos aditivos de los factores de riesgo sobre la aterosclerosis. Entre 1977 y 1978, Gerald B. Phillips objetivó que distintos FRCV que aumentaban el riesgo de infarto de miocardio formaban parte de una constelación de alteraciones que se relacionaban no sólo con enfermedad cardíaca sino también con el envejecimiento, la obesidad y otras situaciones clínicas, relacionando dicho factor con las hormonas sexuales<sup>7</sup>. En 1988, Reaven acuñó el término de *síndrome X* para describir la asociación entre la resistencia insulínica (RI), HTA, DM2 y enfermedad cardiovascular (ECV)<sup>8</sup>. Kaplan<sup>9</sup> lo denominó posteriormente en 1989 *cuarteto mortal*, refiriéndose a la confluencia de factores de riesgo de enfermedad arterial coronaria y Bjorntorp<sup>10</sup> en 1991, destacó la existencia de alteraciones metabólicas en presencia de obesidad abdominal, la cual no había sido incluida en la definición de Reaven al constatar este la presencia de sujetos no obesos con RI.

### 1.2. Criterios definitorios del Síndrome Metabólico

#### 1.2.1. Introducción

El Síndrome Metabólico es un estado fisiopatológico multifactorial que engloba una constelación de factores (obesidad abdominal, RI, HTA, dislipemia, disfunción

endotelial y un estado sistémico protrombótico y proinflamatorio) que incrementan el riesgo de desarrollar DM2 y ECV<sup>11</sup>.

En un reciente informe conjunto de la *American Diabetes Association (ADA)* y la *European Association for the Study of Diabetes*<sup>12</sup> (*EASD*) recuerda que el término “síndrome” abarca un conjunto de síntomas y signos que conforman un proceso morboso y suelen obedecer a un proceso fisiopatológico único, y cuya combinación confiere un riesgo diferente del ocasionado por su suma. En relación con estos aspectos, establece determinadas críticas al reconocimiento como entidad del denominado SMet y al valor clínico de su diagnóstico: a) los criterios diagnósticos pueden ser ambiguos o incompletos debido a una definición, que no siempre es racional, de los valores de los diversos parámetros; b) no hay una opinión unívoca sobre la RI como mecanismo común fisiopatológico subyacente. En este sentido, la inclusión de la DM en la definición puede ser cuestionable; c) no disponemos de razones suficientes para incluir o excluir otros FRCV en las posibles definiciones; d) el riesgo cardiovascular (CV) es variable y dependería del riesgo específico de los factores presentes, por lo que el riesgo asociado al SMet podría no ser superior al atribuible a la suma de sus componentes; e) el tratamiento del SMet no difiere del tratamiento que pueda requerir cada uno de sus componentes. Por lo tanto, y hasta que nuevos estudios arrojen luz sobre algunos de estos problemas, el informe de la *ADA/EASD* formula las siguientes propuestas: a) los adultos con un FRCV mayor deben ser evaluados para descartar la presencia asociada de otros factores; b) establecer la etiqueta diagnóstica del SMet puede crear la impresión de que el riesgo CV es mayor que el de sus componentes o de otros factores de riesgo; c) todos los FRCV deben ser tratados de forma individual e intensa y no debería asumirse como tratamiento unificador exclusivo del SMet el empleo de fármacos que reducen la RI.

No existe una definición aceptada de forma universal para el SMet y, desde la descripción de Reaven, el conjunto de varios FRCV que confluyen en un individuo ha recibido varios nombres, si bien el más aceptado de forma global es el de SMet. De la misma manera, los criterios empleados para identificar a los pacientes con SMet han sido modificados a lo largo de los últimos años aunque todos tienen una serie de características comunes: obesidad, RI, dislipemia e HTA.

### 1.2.2. Definiciones

Al perfilar el diagnóstico del SMet han surgido diversos criterios, los más conocidos son los propuestos por la *Organización Mundial de la Salud (OMS)* y por el *European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*, ambos en 1999, y por el informe del *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* en 2001. Con posterioridad, en 2003, han surgido recomendaciones de la *American Association of Clinical Endocrinologists (AACE)*, con el fin de tratar de identificar los factores o circunstancias propicias para detectar la RI. Más recientemente, en 2005, la *International*

*Diabetes Federation (IDF)* ha establecido unos criterios en los que la obesidad visceral es una condición *sine qua non* para el diagnóstico.

#### 1.2.2.1. Organización Mundial de la Salud

La primera definición formal fue propuesta en 1998 por la *OMS* y se fundamenta en la RI como principal papel etiopatogénico en el desarrollo del SMet. La RI según la *OMS* se define por una de las siguientes condiciones: DM2, glucemia alterada en ayunas (IFG), intolerancia hidrocarbonada (IGT) o, en aquellos individuos con tolerancia normal a la glucosa, un resultado del test de resistencia insulínica medido por *Homeostasis Model Assessment* (HOMA) por debajo del cuartil inferior para la población a estudio. Junto con la RI, deben existir al menos dos de los siguientes criterios: dislipemia aterogénica, determinada por una cifra de triglicéridos (TG) en plasma  $> 150$  mg/dL, HDL-c  $\leq 35$  mg/dL en varones,  $\leq 39$  mg/dL en mujeres; obesidad determinada por un índice de masa corporal (IMC)  $> 30$  kg/m<sup>2</sup> y/o un índice cintura/cadera  $> 0.9$  en varones,  $> 0.85$  en mujeres; microalbuminuria determinada por una excreción urinaria de albúmina  $\geq 20$  µg/min o un cociente albúmina/creatina urinario  $\geq 30$  mg/g. La HTA es considerada un criterio de SMet y se define, según la *OMS*, por una PAS  $\geq 140$  mmHg y/o PAD  $\geq 90$  mmHg<sup>13</sup>.

Esta definición ha sido criticada por la inclusión de la microalbuminuria y medición de RI como componentes definitorios del SMet por la dificultad clínica que entraña la determinación de dichos parámetros en la práctica clínica. Igualmente, la determinación de la obesidad central mediante el ratio cintura-cadera parece inapropiado puesto que este índice representa una acumulación relativa de la grasa abdominal, sin embargo, el perímetro de cintura es un índice que determina la cantidad absoluta de grasa abdominal y se correlaciona mejor con los depósitos de grasa visceral cuando se ha comprobado mediante tomografía computerizada<sup>14</sup>.

#### 1.2.2.2. European Group for the Study of Insulin Resistance

Este grupo en 1999 propuso una versión modificada de la definición de la *OMS* para ser usada en pacientes no diabéticos. Parten también de la RI como aspecto fundamental en el diagnóstico del SMet, definiéndola los autores como una cifra de insulina en ayunas por encima del percentil 75 entre pacientes no diabéticos. Además, para hacerse el diagnóstico se deben cumplir al menos dos de los siguientes cuatro criterios: dislipemia definida por cifra de TG  $> 178$  mg/dL y/o un HDL-c  $< 39$  mg/dL en ambos sexos, glucemia en ayunas  $\geq 110$  mg/dL, obesidad determinada mediante perímetro cintura  $\geq 94$  cms en varones y  $\geq 88$  cms en mujeres e HTA definida como cifras  $\geq 140/90$  mmHg o recibir tratamiento antihipertensivo<sup>15</sup>.

#### 1.2.2.3. National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III

La definición que planteó la *NCEP:ATPIII* en 2001 formaba parte de un programa educacional para la prevención de enfermedad coronaria y se diferenciaba de las dos definiciones anteriores en dos aspectos fundamentalmente. Por un lado, no incluye la

RI como criterio definitorio y, por otro, todos los componentes que proponen tienen la misma importancia y, por lo tanto, no necesita obligatoriamente la presencia de uno de los criterios para hacer el diagnóstico de SMet. De este modo, el diagnóstico se establece cuando coexisten tres o más de los siguientes criterios<sup>16</sup>: obesidad central definida por un perímetro de cintura  $\geq 102$  cms en varones y  $\geq 88$  cms en mujeres, hipertrigliceridemia  $>150$  mg/dL, niveles plasmáticos de HDL-c  $< 40$  mg/dL en varones y  $< 50$  mg/dL en mujeres, glucemia en ayunas  $\geq 110$  mg/dL que posteriormente se redujo a  $100$  mg/dL en una modificación realizada en 2004 por la *American Diabetes Association*<sup>17,18,19</sup> e HTA definida por cifras  $\geq 130/85$  mmHg o recibir tratamiento antihipertensivo.

Esta definición pone de manifiesto que la situación de RI no es imprescindible, si bien es cierto, que la mayoría de los pacientes que reúnen criterios de SMet por esta definición presentan esta condición.

#### 1.2.2.4. American Association of Clinical Endocrinologists

Esta definición vuelve a incidir en la importancia de la RI y excluye a los individuos con DM2. El diagnóstico de SMet se fundamenta en la presencia de IGT y dos de los siguientes criterios: obesidad central determinada mediante perímetro de cintura  $> 101.6$  cms en varones y  $> 88.9$  cms en mujeres, hipertrigliceridemia  $> 150$  mg/dL, niveles plasmáticos de HDL-c  $< 40$ mg/dL en varones y  $< 50$  mg/dL en mujeres, HTA definida como cifras  $\geq 130/85$  mmHg y glucosa plasmática  $\geq 110$  mg/dL<sup>20</sup> que posteriormente fue modificada a  $100$  mg/dL por la *ADA*<sup>17,18,19</sup>.

#### 1.2.2.5. International Diabetes Federation

En 2004 la *IDF* reconoció la dificultad de identificar criterios definitorios de SMet aplicables a la población general sin tener en cuenta las distintas etnias. De este modo, la *IDF* argumentó que las múltiples definiciones dificultan la comparación de datos entre diferentes estudios y hace imposible la unificación de criterios para identificar la presencia de SMet. Por esto, la *IDF* confiere un papel central en su definición a la obesidad central, condición indispensable para hacer el diagnóstico de SMet. Esta obesidad central presentará unos puntos de corte distintos en función de la raza y etnia de donde proceda la población a estudio.

Así pues, el diagnóstico de SMet se establece por la presencia de obesidad central definida por un perímetro de cintura determinado según la raza y etnia de la población estudiada más dos de los siguientes cuatro criterios: TG  $> 150$  mg/dL o recibir tratamiento específico, HDL -c  $< 40$  mg/dL en varones o  $< 50$  mg/dL en mujeres o recibir tratamiento específico, glucemia en ayunas  $> 100$  mg/dL o diagnóstico previo de DM2 e HTA definida como cifras  $\geq 130/85$  mmHg<sup>14</sup> o recibir tratamiento antihipertensivo.

#### 1.2.2.6. American Heart Association y National Heart, Lung, and Blood Institute

Tras las críticas ofrecidas por la *ADA/EASD*, la *American Heart Association (AHA)* y el *National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)* han publicado declaraciones

científicas acerca del SMet, en las que se recoge una clasificación de la *NCEP:ATP-III* actualizada, a las que se han unido recientemente otras sociedades científicas. En esta nueva definición no se considera necesario el criterio del incremento del perímetro de cintura en los pacientes en los que hay otros tres factores de riesgo y se contempla una disminución del valor umbral del perímetro de cintura en lo relativo al riesgo, sobre todo en las personas de origen asiáticoamericano. Esta versión actualizada de la definición *NCEP:ATP-III* y los criterios propuestos por la *IDF* permiten establecer el diagnóstico de SMet básicamente en los mismos pacientes, pues los criterios y las recomendaciones respecto al tratamiento son virtualmente idénticos<sup>21</sup>.

A continuación se exponen de forma resumida los diferentes criterios diagnósticos del SMet según los distintos organismos científicos (**tabla 1**).



**Tabla 1.** Criterios diagnósticos del síndrome metabólico según los diferentes organismos científicos<sup>22</sup>

Organismo	1º, Obesidad		2º, Dislipemia		3º, Presión arterial	4º, Glucosa	5º, Insulinorresistencia	6º, Otros
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres				
OMS (4º o 5º + ≥2 criterios), 1998	RCC > 0.90 y/o IMC > 30 kg/m <sup>2</sup>	RCC > 0.85 y/o IMC > 30 kg/m <sup>2</sup>	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 35 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 39 mg/dL	≥ 140/90 mmHg	DM IGT IGF	Hiperinsulinemia	Excreción urinaria de albúmina ≥ 20 µg/min o un cociente albúmina/creatinina urinario ≥ 30 mg/g
EGIR (5º + ≥2 criterios), 1999	PC ≥ 94 cm	PC ≥ 80 cm	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 40 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 39 mg/dL	≥ 140/90 mmHg o en tratamiento	Glucemia basal en ayunas > 110mg/dL	Insulina en ayunas > del percentil 75 entre pacientes no diabéticos	-
NCEP-ATPIII (≥3 criterios), 2001	PC ≥ 102cm	PC ≥ 88	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 40 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 50 mg/dL	≥ 130/85 mmHg o en tratamiento	Glucemia basal en ayunas > 110mg/dL (2004 → > 100mg/dL)	-	-
AACE (4º + ≥2 criterios), 2003	-	-	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 40 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 50 mg/dL	≥ 130/85 mmHg	IGT	-	-
AHA/NHLBI (≥3 criterios), 2005	PC ≥ 102cm (Asiáticos ≥90 )	PC ≥ 88cm (Asiáticos ≥80 )	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 40 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 50 mg/dL	≥ 130/85 mmHg o en tratamiento	Glucemia basal en ayunas > 100mg/dL	-	-
IDF (1º + ≥2 criterios), 2006	Obesidad central definida por PC según etnia/raza	Obesidad central definida por PC según etnia/raza	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 40 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL; HDL-c < 50 mg/dL	≥ 130/85 mmHg o en tratamiento	Glucemia basal en ayunas > 100mg/dL	-	-

OMS: Organización Mundial de la Salud; EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance; NCEP-ATPIII: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III; AACE: American Association of Clinical Endocrinologists; AHA/NHLBI: American Heart Association y National Heart, Lung, and Blood Institute; IDF: International Diabetes Federation; RCC: ratio cintura-cadera; IMC: índice de masa corporal; PC: perímetro de cintura; TG: triglicéridos; HDL-c: lipoproteínas de alta densidad; IGT: intolerancia oral a la glucosa; IGF: glucemia basal alterada; DM2: diabetes mellitus tipo 2.

### 1.3. Epidemiología

La prevalencia del SMet está aumentando a lo largo del mundo<sup>23</sup>, sin embargo, ésta depende de la definición utilizada para su diagnóstico así como del sexo, edad, raza y etnia de la población estudiada. Por otro lado, parece que los estilos de vida y el estatus socioeconómicos también pueden modificar su prevalencia.

#### 1.3.1. Prevalencia según la definición empleada

La prevalencia del SMet difiere dependiendo de la definición utilizada (*NCEP:ATPIII*, *OMS*, *IDF*, *EGIR*), siendo del 20-25%<sup>24,25</sup> en la población general de Estados Unidos mayor de 20 años y próxima al 15% en la europea<sup>26</sup>. Sin embargo, cuando ajustamos por edad, la prevalencia estimada según las diferentes definiciones varía dentro de las dos cohortes americanas de la *National Health and Examination Survey (NHANES 1988-1994 y NHANES 1999-2002)*<sup>24,27,28,29</sup>. De forma resumida, la prevalencia es mayor cuando se usan definiciones menos restrictivas como las utilizadas por la *IDF* y *NCEP:ATPIII* revisada y menor cuando tomamos los criterios propuestos por la *OMS* y *NACEP:ATPIII*. Estas diferencias relacionadas con las distintas definiciones están presentes entre los distintos países del mundo aunque de forma inconsistente, pudiendo ser atribuido en parte a las directrices definidas por la *IDF* en lo que a perímetro de cintura basado en las distintas raza se refiere.

En nuestro país la prevalencia oscila entre un 19.3% según la definición de la *OMS*, 15.5% según la *EGIR* y 14.2% según la *NCEP:ATPIII*<sup>30</sup>, siendo difícil establecer la frecuencia definitiva por la escasez de estudios y las diferencias metodológicas existentes, en especial en edad y sexo. Por otro lado, aunque las diferencias encontradas entre las definiciones de la *OMS* y *NCEP:ATPIII* se van igualando con la edad, datos más recientes apuntan a que la frecuencia podría ser superior a la antes indicada e incluso que habría diferencias regionales<sup>31</sup>.

#### 1.3.2. Prevalencia estimada según género y raza/etnia

En España, la prevalencia es similar en ambos géneros<sup>31</sup>, siendo del 24.5% en hombres y 24.3% en mujeres, sin embargo, en Estados Unidos la prevalencia varía, siendo esta diferencia inconsistente entre las cohortes estudiadas. De este modo, en la cohorte *NHANES 1988-1994* la prevalencia fue menor en mujeres (23.9% vs 27.8%), mientras que en la de *1999-2002* la proporción se invirtió, siendo menor en hombres (30.3% vs 28%). Este incremento dramático del SMet en la población femenina puede ser debida, en parte, a cambios en la composición de la cohorte en cuanto a raza y etnia se refiere.

Por otro lado, el trabajo de *San Antonio Heart Study* muestra una interacción entre el género y la raza/etnia<sup>32</sup> en la prevalencia del SMet en adultos americanos de edad media de manera que es mayor en varones de raza caucásica no hispánicos y similar en hombres y mujeres mejicanos-americanos.

Con todo esto es fácil deducir que las diferencias en la prevalencia del SMet ajustadas por género no son universales y que la variabilidad que podemos encontrar dentro de determinados países puede ser debida a variaciones en el estatus socioeconómico, actividad física relacionada con el trabajo, culto del cuerpo y *fitness*.

### 1.3.3. Prevalencia estimada según edad

En la población adulta, no es sorprendente que el SMet sea más prevalente en cada década de la vida, aumentando de forma paralela al incremento de la obesidad, y más concretamente, de la obesidad central<sup>33,34</sup>. En las cohortes *NHANES*, la prevalencia del SMet aumenta con la edad hasta la sexta década de forma paralela en ambos sexos y, a partir de aquí, se produce un incremento en el sexo femenino mientras que los hombres presentan una estabilización e incluso un ligero descenso en su prevalencia<sup>35,36</sup>. Esto pone de manifiesto que puede existir una interacción entre la edad y el género aunque el tipo de definición utilizada puede afectar a dicha interacción. De cualquier forma, el SMet aumenta de forma consistente con la edad entre los 12 y 60 años en los Estados Unidos y en el resto del mundo independientemente del sexo<sup>37,38,39</sup>.

Finalmente, la variabilidad en la prevalencia de SMet a partir de la sexta década probablemente sea debida al efecto de la supervivencia porque aquellos individuos más obesos presentan un mayor riesgo de mortalidad antes de alcanzar estas edades.

### 1.3.4. Prevalencia ajustada por estatus socioeconómico, tabaquismo, alcohol y nivel educativo

Pocos estudios han valorado el impacto de los estilos de vida y nivel socioeconómico sobre la prevalencia del SMet, sin embargo, las cohortes *NHANES* observaron un mayor riesgo de SMet en hombres fumadores, sedentarios y con alta ingesta de carbohidratos. Por otro lado, las mujeres que reportaban un consumo moderado de alcohol tenían un riesgo reducido de desarrollar SMet mientras que aquellas fumadoras y/o con bajo nivel adquisitivo mostraban un riesgo aumentado. El nivel educativo no parecía influenciar el riesgo de desarrollar SMet en ninguno de los dos sexos<sup>25</sup>.

La asociación entre nivel socioeconómico y SMet dentro de Estados Unidos parece que puede verse modificada según la raza y etnia de la población estudiada de manera que los hombres y mujeres afroamericanos de mayor nivel educativo presentaban un riesgo de desarrollar SMet reducido cuando se comparaban con aquellos de menor nivel cultural<sup>40</sup>. Aunque existen escasos estudios epidemiológicos valorando el impacto del nivel socioeconómico sobre la prevalencia del SMet hay datos que sugieren una relación similar a la encontrada en Estados Unidos en otros países occidentales<sup>41,42</sup>.

Por último, a pesar de que los datos son inconsistentes<sup>43</sup>, parece existir una prevalencia mayor de SMet en zonas urbanas respecto a asentamientos rurales en países en vía de desarrollo<sup>44,45</sup>.

## 1.4. Fisiopatología

Los mecanismos fisiopatogénicos que conducen hacia el SMet no están completamente establecidos en la actualidad aunque parece que la obesidad visceral y la RI son los dos pilares fundamentales en el desarrollo de la enfermedad y de sus distintos componentes definitorios.

### 1.4.1. Concepto de resistencia insulínica

Un individuo es definido como sensible o resistente a la insulina en función de su respuesta a una sobrecarga de glucosa. De esta manera, las personas insulinosensibles fenotípicamente presentan un peso normal sin obesidad abdominal ni visceral con unos hábitos de vida saludables que incluyen ejercicio físico regular y una baja ingesta de grasas saturadas. Por el contrario, los insulinoresistentes presentan una glucemia basal alterada o intolerancia oral a la glucosa, niveles elevados de glucosa en ayunas y/o hiperglucemia, o disminución de la acción insulínica tras la administración intravenosa de insulina (técnica de *clamp* euglucémico) con un descenso del aclaramiento glucémico mediado por la insulina y/o reducción de la supresión de la producción endógena de glucosa. Fenotípicamente, estos individuos tienen tendencia hacia el sobrepeso/obesidad<sup>46</sup> y presentan un consumo elevado de grasas de forma global o específicamente de grasas saturadas.

La sensibilidad insulínica no es simplemente una dicotomía entre ser o no ser resistente a la insulina, es un continuo donde la capacidad del páncreas para secretar insulina en respuesta a una carga glucémica puede también poner de manifiesto la RI a nivel de la célula  $\beta$ . Para definir esto, Bergman propuso un índice de disponibilidad que representa una medida cuantitativa para establecer la relación existente entre la sensibilidad de la célula  $\beta$  y la sensibilidad insulínica<sup>47,48</sup>, de modo que en individuos metabólicamente normales, los cambios en la sensibilidad insulínica se ven acompañados de alteraciones en la respuesta de la célula  $\beta$  de forma compensatoria. En la práctica, el índice de disponibilidad es definido como el producto del índice de sensibilidad insulínica y la función de la célula  $\beta$  medida por la respuesta aguda de la insulina ante un estímulo glucémico, poniéndose de manifiesto una relación que típicamente se representa por un trazado que describe una hipérbola inversa. El estudio del movimiento continuo de la respuesta adaptativa de la célula  $\beta$  a los distintos grados de sensibilidad insulínica es mucho más complejo de lo que el modelo implica, y el mecanismo molecular por el cual la función y la sensibilidad a la insulina de las células  $\beta$  son corregulados para crear un ambiente homeostático, no está aún dilucidado.

### 1.4.2. La obesidad como factor desencadenante de la resistencia insulínica

La combinación de obesidad, sedentarismo y consumo de dietas aterogénicas está llevando asociado un incremento en la incidencia de RI<sup>29</sup> y SMet, así como un aumento de la ECV y DM2. Sin embargo, aunque no todos los individuos con sobrepeso u obesidad son metabólicamente enfermos, si es cierto que la mayoría presentan RI<sup>49</sup>.

En un primer momento, la normoglucemia se consigue mediante un aumento en la masa de células  $\beta$  a nivel pancreático o incremento de su actividad secretora, solventado así el problema de resistencia periférica<sup>50</sup>. Los mecanismos compensatorios de esta respuesta adaptativa parecen estar relacionados con una red de señalización intracelular (glucocinasa) que actúa como sensor glucémico para la liberación de insulina en la célula  $\beta$  y con la activación del gen del receptor del sustrato de insulina 2 (IRS-2) que facilita la acción de la insulina e inhibe la gluconeogénesis hepática<sup>51</sup>. Sin embargo, esta respuesta adaptativa no es capaz de mantenerse en el tiempo, constituyendo la antesala de la DM2<sup>52</sup>.

#### 1.4.3. Resistencia insulínica a nivel del tejido adiposo, hígado y músculo

La RI a nivel del tejido adiposo induce una lipólisis acelerada mediada por la lipasa sensible a hormonas (HSL)<sup>53</sup> y lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL)<sup>54</sup> que conduce a un aumento plasmático de ácidos grasos libres (AGL), hecho que, a su vez, favorece el estado de RI. Además, la grasa visceral<sup>55,56</sup> es más sensible a esta lipólisis y, dado que su drenaje desemboca en el sistema portal, se produce un gran flujo de AGL a nivel hepático (teoría portal)<sup>57</sup>. Por otro lado, el tejido graso también contribuye al desarrollo del SMet mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias que interactúan con la acción insulínica a nivel local y periférico (músculo e hígado)<sup>58</sup>.

El flujo excesivo de AGL hacia hígado interactúa con la acción de la insulina, de modo que se produce una mayor liberación hepática de glucosa, síntesis de citoquinas proinflamatorias y cambios en el metabolismo de las lipoproteínas<sup>57</sup>. Así pues, el exceso de AGL conlleva un incremento en la síntesis y almacenamiento de TG y, su exceso, es secretado al torrente sanguíneo en forma de VLDL contribuyendo de esta manera a la dislipemia asociada al SMet. Junto a la hipertrigliceridemia, los individuos con SMet presentan niveles reducidos de HDL-c debido, en parte, a la absorción de ésteres de colesterol procedentes de lipoproteínas ricas en TG, reacción catalizada por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP). Esta acción genera HDL-c pequeñas y ricas en TG convirtiéndolas en un mejor sustrato de la lipasa hepática donde se hidrolizan en partículas fácilmente aclaradas a nivel renal. De este modo, distintos polimorfismos de CETP modifican tanto la actividad de la enzima como las concentraciones de HDL-c, relación que ha sido asociada con la obesidad abdominal y RI<sup>59</sup>.

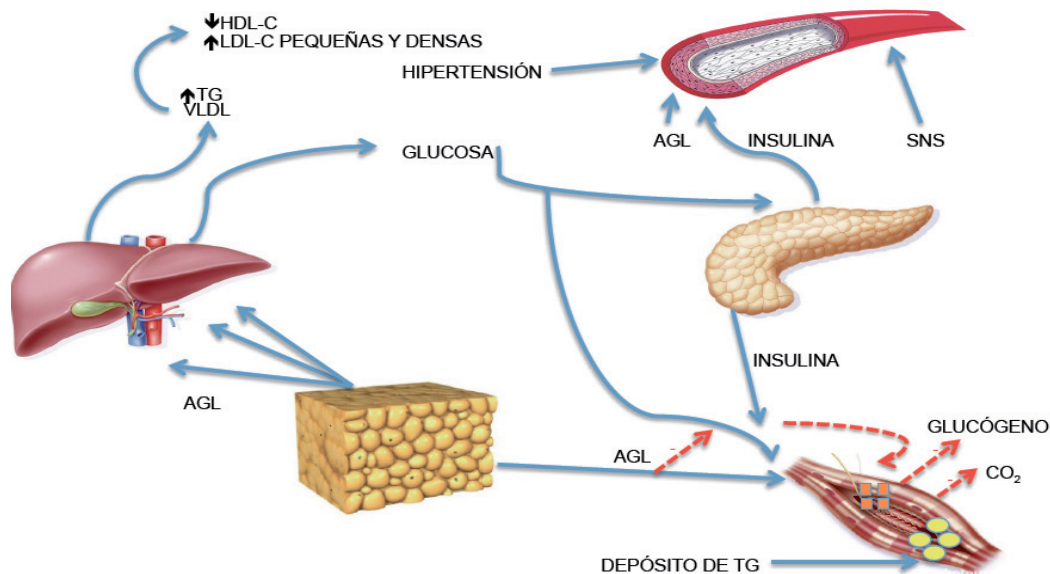
A nivel del músculo esquelético la RI se relaciona con el efecto inhibitorio que los AGL ejercen sobre el mecanismo de transporte de glucosa dependiente de insulina, de forma que se ha hipotetizado que la acumulación de TG en el músculo juega un papel fundamental en la etiopatogenia de la RI. Por otro lado, existen evidencias de una relación inversa entre la sensibilidad insulínica y la concentración de TG a nivel muscular<sup>60,61</sup>.

#### 1.4.4. Hipertensión y resistencia a la insulina

La relación entre HTA y RI está bien establecida en la actualidad aunque se han propuesto diversos mecanismos etiopatogénicos potenciales. En primer lugar, señalar que la insulina posee un doble efecto, por un lado produce vasodilatación cuando se administra por vía endovenosa en individuos con normopeso, y por otro, posee un efecto sobre la reabsorción de sodio a nivel renal de manera que en individuos caucásicos con SMet se incrementa dicha reabsorción, hecho que no se ha demostrado en la población africana ni asiática. Un tercer mecanismo por el que la insulina puede contribuir a la HTA es mediante la activación del sistema nervioso simpático. De este modo, es posible que en individuos con SMet se pierda la función vasodilatadora de la insulina pero se conserva tanto la capacidad reabsortiva de sodio a nivel renal como la capacidad estimuladora sobre el sistema nervioso simpático<sup>62</sup>. Sin embargo, cuando se evalúa los niveles de insulina mediante su concentración en ayunas o mediante el índice HOMA, se pone de manifiesto que la RI contribuye de manera moderada al desarrollo de HTA en el SMet.

Por otro lado, debido a que el tejido adiposo es fuente de angiotensinógeno, no es sorprendente que exista una asociación entre hiperaldosteronismo, HTA y SMet. Además, estudios recientes sugieren que la elevación de la resistina y leptina de origen adipocítico contribuye a la patogénesis de la HTA en pacientes con RI<sup>63-65</sup>.

**Figura 1.** Fisiopatología del síndrome metabólico<sup>66</sup>



AGL: ácidos grasos libres; TG: triglicéridos; SNS: sistema nervioso simpático; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL-c: colesterol vehiculado por lipoproteínas de baja densidad; HDL-c: colesterol vehiculado por lipoproteínas de alta densidad; CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono.

Los AGL liberados por el tejido graso inducen a nivel hepático un aumento en la síntesis de glucosa y TG junto a una secreción aumentada de VLDL que se acompaña de alteraciones lipídicas plasmáticas (aumento de LDL-c pequeñas y densas y disminución de HDL-c). El exceso de AGL se almacenan a nivel muscular disminuyendo la sensibilidad insulínica e impidiendo tanto la captación de glucosa insulínica como su transformación a glucógeno. Niveles plasmáticos elevados de glucosa y AGL conducen a un aumento de secreción insulínica. Esta hiperinsulinemia induce un aumento en la reabsorción de sodio y activa el sistema nervioso simpático contribuyendo junto con los AGL a la hipertensión.

#### 1.4.5. Moléculas proinflamatorias, estrés del retículo endoplásmico y su intervención en el desarrollo de resistencia insulínica y síndrome metabólico

En la actualidad es bien conocido que en el SMet se produce un estado de inflamación sistémica que se pone de manifiesto por el aumento de moléculas proinflamatorias como proteína C reactiva (PCR), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), resistina plasmática e interleuquina 6 (IL-6) y 18 (IL-18) y descenso de adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina en clara relación con el aumento de la masa grasa que presentan estas personas. Además, cuantos más componentes del SMet estén presentes en un mismo individuo mayor es la actividad de los marcadores proinflamatorios<sup>62,67</sup>.

La PCR constituye un marcador general de inflamación y niveles elevados se asocian con aumento en el perímetro de cintura, RI, IMC e hiperglucemia y, como se ha mencionado anteriormente, sus valores aumentan a medida que el número de componentes del SMet están presentes<sup>68-70</sup>. Además, se ha demostrado que independientemente de la presencia o grado de SMet un individuo con niveles elevados de PCR presenta mayor riesgo de desarrollar ECV en el futuro, así pues, la PCR puede representar un predictor independiente de eventos cardiovasculares en el SMet<sup>71</sup>.

TNF $\alpha$  se expresa más intensamente en el tejido adiposo de personas obesas y, su grado de expresión, se relaciona directamente con los niveles de insulina plasmática, índice HOMA, peso, perímetro de cintura y TG e inversamente con las concentraciones séricas de HDL-c, de manera que las concentraciones de TNF $\alpha$  a nivel del tejido adiposo pueden estar relacionadas con la RI<sup>72</sup>. Sin embargo, se ha observado que la neutralización de esta citoquina induce cambios a nivel de composición corporal e interacciona con distintas adipocinas de forma que aunque mejoran los marcadores inflamatorios y niveles de adiponectina en pacientes con SMet, no mejora substancialmente la sensibilidad insulínica<sup>73</sup>.

Otra molécula proinflamatoria presente en el SMet es la resistina que se expresa tanto en adipocitos como en la mayoría de células inflamatorias del ser humano donde sus niveles plasmáticos se relacionan directamente con el perímetro de cintura, presión arterial sistólica (PAS) y TG; y de forma inversa con la concentración de HDL-c<sup>74</sup>. Por otro lado, la resistina sérica tiene un gran componente hereditario y comparte antecedentes genéticos relacionados con la RI, reforzando la hipótesis de que esta adipocina puede desempeñar un papel patogénico importante no sólo en el SMet, sino también en la DM2 y ECV<sup>75</sup>.

La IL-6 es liberada tanto a nivel muscular como tejido graso<sup>76</sup>, y a pesar de su doble efecto como molécula inflamatoria y antiinflamatoria, se relaciona directamente con el IMC y niveles preprandiales de insulina<sup>77</sup>; e inversamente con los niveles de HDL-c plasmáticos<sup>78</sup>. Los efectos deletéreos sobre la insulina pueden ser debido por su interacción con el receptor del sustrato de insulina 1 (IRS-1)<sup>79</sup>.

La IL-18 es una citoquina pleiotrópica proinflamatoria que ejerce un papel fundamental en la cascada inflamatoria promoviendo la producción de otras citoquinas como IL-6 y TNF $\alpha$ <sup>80</sup>. Sus niveles plasmáticos se relacionan de forma directa con el IMC, perímetro de cintura, PAS y PAD (presión arterial diastólica), glucosa e insulina preprandial; e inversamente con las concentraciones de adiponectina y HDL-c<sup>81,82</sup>.

Otras citoquinas de menor importancia son la IL-1 $\beta$  e IL-10. Por un lado, variantes genéticas de la primera se han asociado con indicadores de inflamación crónica y riesgo de SMet, siendo la influencia genética tanto más evidente cuanto menor era la ingesta de grasas poliinsaturadas n-3 (n-3, PUFA)<sup>83</sup>. Así pues, IL-1 $\beta$  reduce la expresión de IRS-1 y consecuentemente una alteración tanto en la acción como en las vías de señalización de la insulina participando junto con otras citoquinas en el desarrollo de la RI<sup>84</sup>. Por otro lado, la IL-10 es una citoquina predominantemente antiinflamatoria que se asocia con la RI, obesidad, SMet y DM2, presentando una correlación significativa con los niveles de adiponectina en el SMet<sup>62</sup>.

La visfatina, también llamada factor estimulante de colonias de células pre-B es una adiponectina que se expresa fundamentalmente en la grasa visceral y sus niveles plasmáticos se correlaciona con el grado de grasa visceral presente en los humanos. La asociación entre visfatina circulante y componentes del SMet puede estar directamente relacionada bien por el incremento de la masa grasa visceral bien como resultado del aumento de la expresión de la adipoquina a nivel del tejido graso visceral. De cualquier modo, tanto las concentraciones plasmáticas de visfatina como el nivel expresión de su ARNm en el tejido adiposo visceral, se relacionan de forma directa con el IMC y porcentaje de grasa corporal total<sup>85,86</sup>. Resultados del estudio *Pioglitazone and Statin in high cardiovascular risk patients (PIOSTAT)*<sup>87</sup> sugieren que aunque esta adipoquina puede ser un buen marcador del SMet, ni los FRCV ni la RI se asocian con sus niveles.

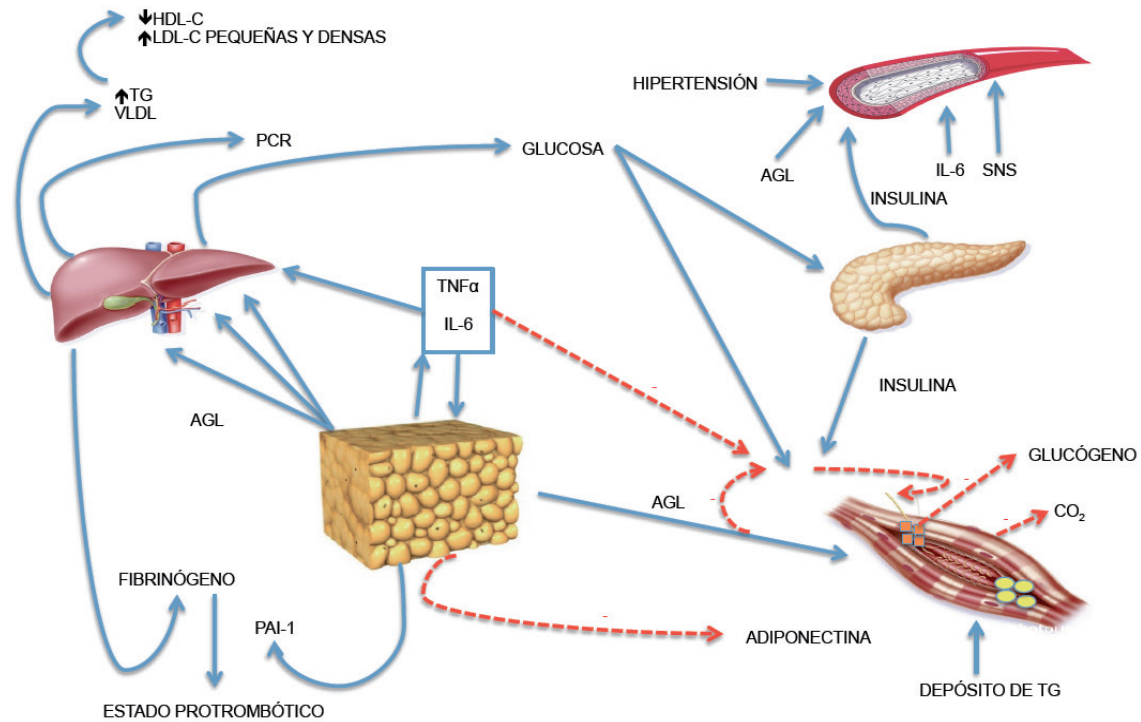
Finalmente, la adipoquina antiinflamatoria por excelencia, la adiponectina, se encuentra muy disminuida en individuos con SMet<sup>88</sup> y se relaciona inversamente con el peso, perímetro cintura, TG, IR, insulina preprandial, PAS y PAD; y directamente con los niveles plasmáticos de HDL-C<sup>89-91</sup>. Una subunidad de esta adipoquina, la adiponectina de alto peso molecular, posee una asociación significativa con la distribución de grasa central, hecho que no se pone de manifiesto con subunidad de bajo peso molecular<sup>92</sup>. Calcular el ratio adiponectina de alto peso molecular / adiponectina total parece tener una mayor potencia para predecir la presencia tanto de RI como SMet si lo comparamos con los niveles de adiponectina total<sup>93</sup>.

En la actualidad, sería de gran interés conocer si el defecto proinflamatorio inicial que ocurre en el tejido graso del SMet es debido a los adipocitos de gran tamaño, RI, infiltración y actividad de los macrófagos derivados de monocitos, o a la reducción en la síntesis y secreción de adiponectina.



En cuanto al papel del estrés del retículo endoplásmico (RE) en el desarrollo del estado de RI, distintos trabajos ponen de manifiesto que la acumulación de proteínas desplegadas en la luz del RE provocan un aumento en la actividad de la kinasa c-Jun N-terminal que provoca la fosforilación dependiente de serina de IRS-1 provocando una alteración en la regulación de la señalización insulínica contribuyendo al desarrollo de RI y, consecuentemente, SMet<sup>94,95</sup>.

**Figura 2.** Contribución del estado proinflamatorio al estado de insulinoresistencia<sup>66</sup>



PCR: proteína C reactiva; AGL: ácidos grasos libres; TG: triglicéridos; IL-6: interluquina 6; TNFα: Factor de necrosis tumoral α; SNS: sistema nervioso simpático; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL-c: colesterol vehiculado por lipoproteínas de baja densidad; HDL-c: colesterol vehiculado por lipoproteínas de alta densidad; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno 1; CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono.

La secreción de TNFα e IL-6 por adipocitos y macrófagos derivados de monocitos contribuye al estado de insulinoresistencia y aumento de AGL secundario a lipólisis del tejido graso. IL-6 y otras citoquinas actúan a nivel hepático aumentando la producción de glucosa y VLDL e induciendo insulinoresistencia a nivel muscular. El estado protrombótico se debe a que citoquinas y AGL aumentan la secreción hepática de fibrinógeno y PAI-1, complementando la sobreproducción de PAI-1 a nivel del tejido graso. La disminución de adiponectina contribuye a resistencia insulínica y al desarrollo del SMet.

## **2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y CÉLULAS PRECURSORAS DE ENDOTELIO COMO MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN EL SÍNDROME METABÓLICO**

### **2.1. Disfunción endotelial**

#### 2.1.1. El endotelio

El endotelio es actualmente reconocido como un órgano dinámico con importantes funciones autocrinas y paracrinas que le permiten mantener la homeostasis vascular a través de múltiples y complejas interacciones entre las células endoteliales y la luz de vaso. Las principales funciones homeostáticas del endotelio involucran: a) la regulación del tono vascular a través de una producción balanceada de factores vasodilatadores y vasoconstrictores; b) el mantenimiento de la fluidez y la coagulación de la sangre mediante la producción de factores que regulan la actividad plaquetaria, la cascada de coagulación y el sistema fibrinolítico; y c) la producción de citoquinas y moléculas de adhesión que regulan la función inflamatoria vascular<sup>96</sup>.

El término “función endotelial” (FE) se refiere específicamente a la conservación de esta amplia variedad de funciones, lo que desde un punto de vista fisiológico y clínico se expresa a través de la óptima dilatación del tejido vascular y la capacidad de prevenir la vasoconstricción anormal. Esta condición resulta en un fenotipo endotelial normal, capaz de evitar el desarrollo y expresión clínica de patologías como la arteriosclerosis<sup>97</sup>. Entre los compuestos responsables de la capacidad vasodilatadora del endotelio, el óxido nítrico (NO) es probablemente el principal factor relajante producido por la isoforma endotelial de la enzima óxido-nítrico sintetasa (eNOS). El NO se opone además a la lesión vascular y al desarrollo de patologías como la arteriosclerosis a través de su efecto antiagregante, antiproliferativo e inhibitorio de los fenómenos inflamatorios<sup>98</sup>. Por el contrario, las anormalidades de una o varias de las vías metabólicas que regulan la FE, como la producción y/o biodisponibilidad del NO, conducen a la disfunción endotelial. Esta última es característica de la ECV y frecuentemente se presenta de forma conjunta con los diferentes FRCV (HTA arterial, obesidad, DM, hipercolesterolemia, SMet, etc.), siendo un importante factor pronóstico sobre la morbilidad y mortalidad CV<sup>99</sup>.

#### 2.1.2. El óxido nítrico

El NO es un radical libre de naturaleza lipofílica sintetizado por las células del endotelio vascular que actúa como principal factor vasodilatador derivado de endotelio y regulador de un amplio número de procesos homeostáticos locales. Como vasodilatador, su mecanismo de acción se basa en la relajación directa de la célula muscular lisa a nivel local, a través de un incremento en la actividad de la guanilato ciclasa y en la concentración de guanosin monofosfato cíclico (cGMP). El NO además actúa como inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria, inhibidor de la proliferación de las células musculares lisas, inhibidor de la expresión de moléculas de adhesión e incluso como un antioxidante al compensar los efectos del anión superóxido<sup>100</sup>.

Aunque el endotelio posee una producción constitutiva de NO por actividad de la eNOS, ciertas condiciones como la inflamación activan vías paralelas y el NO puede ser sintetizado también a partir de la regulación positiva de la isoforma inducible de NOS<sup>101</sup>. Además, la síntesis constitutiva de NO está regulada en condiciones normales por diferentes factores ambientales como el ejercicio físico y la disponibilidad de nutrientes aportados por la dieta<sup>102</sup>. Estudios realizados con cultivos de células intactas demostraron que la síntesis de NO es altamente dependiente de la disponibilidad de glucosa<sup>103</sup> y que una deficiencia de esta última y/o proteínas provoca una reducción de la síntesis de NO a nivel del endotelio y en otras líneas celulares<sup>102</sup>. En consecuencia, la regulación de la NOS y la biodisponibilidad de su producto son aspectos críticos para la homeostasis de la FE, y pueden prevenir o favorecer la ocurrencia de lesiones endoteliales.

### 2.1.3. Evaluación de la función endotelial

El método de referencia para la evaluación de la FE consiste en medir la vasodilatación de las arterias coronarias a través de la infusión intracoronaria de un agonista como la acetilcolina. Este compuesto actúa sobre las células endoteliales provocando la liberación de NO y la dilatación de las arterias<sup>104</sup>. Sin embargo, existen importantes limitaciones en el uso de este método que vienen determinadas por su costo, el nivel de especialización que requiere para su realización y, sobre todo, por la naturaleza invasiva de la técnica<sup>105</sup>.

Una posible alternativa a la coronariografía surgió de la idea de que la respuesta vasodilatadora estimulada por el incremento en el flujo sanguíneo de una arteria periférica es mediada por su endotelio<sup>106</sup>. Tomando como base este concepto y con el objetivo de estandarizar una técnica más sencilla para valorar de forma indirecta la FE, Celermajer<sup>107</sup> creó la prueba de la hiperemia reactiva post-isquemia (HRPi), que permite medir la vasodilatación dependiente del endotelio en arterias periféricas (braquial, radial y femoral). La mencionada prueba consiste en el incremento de la irrigación sanguínea de un órgano o tejido por restitución del flujo tras liberar la oclusión transitoria de una arteria. En estas condiciones, la reperfusión ocasiona un aumento agudo de las fuerzas de cizalla sobre la pared vascular que conduce a la apertura de los canales de potasio y por consiguiente a la hiperpolarización de la célula endotelial<sup>108</sup>. Esta modificación del gradiente eléctrico provoca la entrada de calcio a la célula endotelial, incrementando la actividad de la NOS y la producción de NO, lo cual termina por inducir una respuesta vasodilatadora aguda<sup>109,110</sup>. Si bien otros factores también han sido involucrados en la vasodilatación mediada por el flujo, como es el caso de la regulación neuronal del tono vasomotor y la liberación de prostaglandinas<sup>111</sup>, es el estrés mecánico provocado por la restitución del flujo sanguíneo el principal responsable de la respuesta dilatadora dependiente del NO<sup>108</sup>.

La prueba de HRPi puede ser realizada con el soporte de diferentes tecnologías, como la ultrasonografía de alta resolución o la flujometría por *láser-doppler*. La ultrasonografía de la arteria braquial es una técnica ampliamente usada en investigación

clínica que permite medir la FE periférica<sup>112</sup>; observándose correlación de esta medida con la FE de las arterias coronarias<sup>113</sup>. Sin embargo, la realización de ultrasonografía aún conserva dos importantes limitaciones. Por un lado, la disponibilidad de un equipo tecnológico de alto costo junto con la necesidad de radiólogos o ultrasonografistas especializados<sup>105,114</sup>. Por otro lado, se trata de una técnica que requiere de al menos 30 minutos para su realización, con la consecuente dificultad para el estudio de la FE aguda tras una intervención dietética, farmacológica o de ejercicio físico.

Por otra parte, el *láser-doppler* usado para determinar el grado de dilatación arterial a través de flujometría es una opción relativamente sencilla, que requiere personal menos especializado y cuya técnica de realización no requiere más de 10 minutos. Si bien hasta la fecha no se ha demostrado una correlación directa con la FE medida en las arterias coronarias, diferentes estudios han demostrado que el *láser-doppler* tiene una aceptable sensibilidad para el estudio de la respuesta endotelial periférica<sup>115,116</sup>. Esta variable se relaciona además con diferentes factores que modulan la respuesta dilatadora del endotelio, como la biodisponibilidad del NO y la activación endotelial (ICAM, VCAM) afectadas por la ingesta dietética<sup>116</sup>. Por último, el *láser-doppler* ha mostrado tener una aceptable reproducibilidad en la medida de la respuesta vasodilatadora, con una variabilidad interestudio de 8,8% entre intervalos de medición de 3 semanas<sup>117,118</sup> y una variabilidad intraestudio de 8,7% sobre un total de 10 mediciones realizadas en sujetos sanos en el mismo día de estudio<sup>119</sup>.

## 2.2. Células precursoras de endotelio

### 2.2.1. ¿Qué son?

El endotelio juega un papel fundamental en la biología cardiovascular de manera que cualquier daño a dicho nivel condiciona un mayor riesgo de arteriosclerosis, trombosis, HTA y globalmente, una mayor incidencia de ECV. En este sentido el balance entre daño y reparación endotelial es de gran interés para la comunidad científica puesto cualquier medida que decline la balanza hacia un mayor potencial regenerativo condicionaría un descenso de los eventos cardiovasculares<sup>120</sup>. Por todo esto, y sabiendo que la capacidad regenerativa de las células endoteliales maduras es muy limitada, cobra un interés especial un grupo celular con alto potencial reparador procedente de la médula ósea llamado células precursoras de endotelio<sup>121</sup> (CPEs).

Las células precursoras son aquellas que, a diferencia de las células madre, no poseen o tiene una capacidad de autoreemplazamiento muy limitada además de una programación diseñada para diferenciarse hacia un linaje celular determinado, siendo importante diferenciarlas de aquellas células maduras con potencial de transdiferenciación (capacidad de adquirir alguna o todas las características de otra célula madura). Con todo esto, una CPE no debe ser capaz de reemplazarse perpetuamente y no representa en sí misma un linaje celular diferenciado, aunque bajo determinadas señales tiene capacidad de diferenciarse en células endoteliales maduras y, puede que en un pequeño número de células relacionadas<sup>121,122</sup>.

### 2.2.2. Caracterización

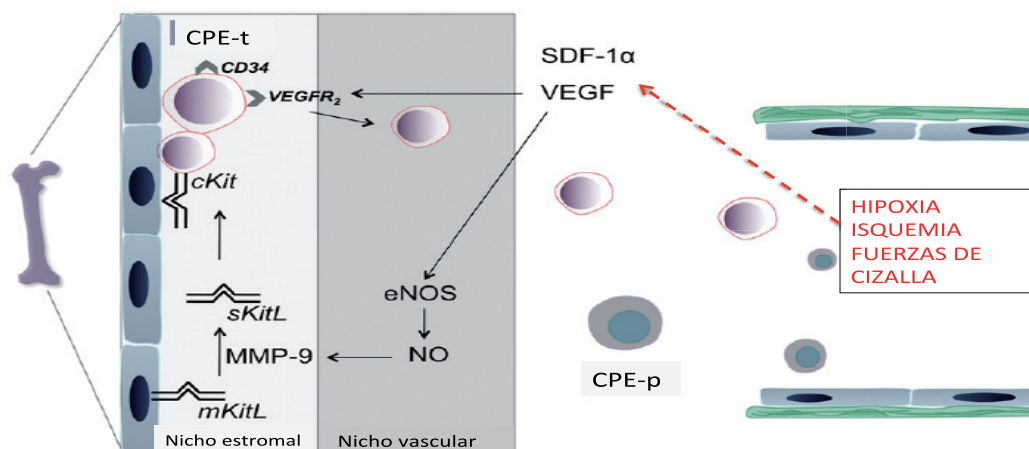
Asahara et al<sup>123</sup> describió por primera vez una población de CPEs aislada de sangre periférica que presentaba el marcador de superficie CD34+. Estas células cuando eran cultivadas sobre una capa de fibronectina crecían y se diferenciaban en células con características endoteliales. Sin embargo, algunos años más tarde se descubrieron tres marcadores de superficie que caracterizaban a una CPE precoz plenamente funcional. Estos marcadores eran CD133, CD34 y el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2<sup>124,125</sup> (VEGFR-2), siendo CD133 un marcador precoz hematopoyético de células madre y progenitoras de la médula ósea, hígado fetal y sangre periférica<sup>126</sup>. Un fenotipo mixto entre célula progenitora y endotelial contiene los siguientes marcadores CD133+/CD34+/VEGFR-2+, pero no expresaría la cadherina vascular endotelial ni el factor von Willebrand, de forma que estas células inmaduras se localizan fundamentalmente en médula ósea<sup>127</sup>. Sin embargo, durante su proceso madurativo, las CPEs en sangre periférica pierden el marcador de superficie CD133, y comienzan a expresar paulatinamente marcadores propios de células endoteliales como la molécula de adhesión endotelial a las plaquetas 1 (CD31), CD146, cadherina vascular endotelial, factor von Willebrand, eNOS y, bajo estimulación, E-selectina; reflejando así su transformación hacia células endoteliales maduras<sup>126,128</sup>. Recientemente, Hirschi y colaboradores distinguen dos poblaciones de CPEs en sangre periférica. Por un lado, denomina células angiogénicas circulantes o CPEs precoces a aquellas células derivadas del linaje monocítico-macrofágico que expresan marcadores endoteliales como VEGFR2, CD31, CD144 y factor von Willebrand. Estas células con escaso potencial proliferativo y sin capacidad de formar vasos sanguíneos *in vivo* contribuyen a la homeostasis vascular mediante un acción paracrina consistente en la liberación de citoquinas angiogénicas. Por otro lado, el segundo grupo celular posee un alto potencial proliferativo y se denominan células formadoras de colonias endoteliales o CPEs tardías. Estas células expresan marcadores de superficie CD34 y VEGFR2 pero no CD45, CD14 ni CD115 diferenciándose así del linaje hematopoyético. Estas células son las únicas que cumplen perfectamente la definición de CPEs, es decir, células circulantes con capacidad de producir células endoteliales y tubulización de las mismas *in vitro*, así como capacidad de reendotelización y neovascularización *in vivo*<sup>129</sup>.

### 2.2.3. Reclutamiento, movilización y diferenciación

La liberación de CPEs desde la médula ósea es regulada por un complejo sistema en el que intervienen factores de crecimiento, enzimas, ligandos y receptores de superficie. De este modo, la activación de la metaloproteinasa de matriz 9 mediante el NO promueve la transformación del ligando Kit unido a la membrana en un ligando soluble de manera que las células formadoras de colonias endoteliales o CPEs tardías se desplazan hacia la zona vascular de la médula ósea constituyendo el paso inicial de la liberación de estas células<sup>128,130</sup>. Las señales por las que estas células son liberadas al torrente sanguíneo son desconocidas en la actualidad, sin embargo, parece que

factores de crecimiento angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) liberados por el tejido hipóxico, desempeñan un papel decisivo en la liberación de esta estirpe celular hacia el tejido dañado (**figura 3**). De este modo, VEGF posee una doble función, por un lado, induce la liberación de CPEs desde la médula ósea y, por otro, activa la síntesis de NO a nivel del nicho vascular medular. De igual modo, el NO induce la activación de la metaloproteínasa de matriz 9 y favorece la salida de estas células al torrente sanguíneo hacia el endotelio dañado<sup>129</sup>.

**Figura 3.** Movilización de CPEs desde médula ósea<sup>129</sup>



*CPE-t: célula precursora del endotelio tardía; CPE-p: célula precursora de endotelio precoz; MMP-9: metaloproteínasa de matriz 9; mKitL: ligando Kit unido a membrana; sKitL: ligando Kit soluble; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR-2: receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2; SDF-1α: factor derivado de células estromales 1 alfa; eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial; NO: Óxido nítrico.*

1. Óxido Nítrico activa MMP-9. 2. MMP-9 transforma mKitL en sKitL. 3. sKitL interactúa con célula precursora (cKit\*) desplazándola hacia zona vascular de médula ósea. 4. Factores angiogénicos como VEGF y SDF-1α interactúan con sus correspondientes receptores en las CPEs para dirigir las hacia los tejidos dañados. 5. VEGF estimula la producción de NO en el nicho vascular de la médula ósea.

En la actualidad, se desconoce en qué punto exacto una CPE se convierte en una célula endotelial madura totalmente diferenciada *in vivo*. Una posibilidad es considerar la pérdida de CD133 junto con la expresión conjunta del factor von Willebrand y otros marcadores de superficie propios del linaje endotelial como el momento principal de la diferenciación, siendo la migración desde la médula ósea al torrente sanguíneo el momento crucial donde se suceden todos estos cambios. Así pues, tras su asentamiento, es decir, tras su adhesión e inserción entre células endoteliales vasculares maduras, el proceso de diferenciación y/o maduración finaliza<sup>128</sup>.

#### 2.2.4. Asentamiento y potencial regenerativo

Ante cualquier evento isquémico, las CPEs constituyen la primera línea celular encargada de reparar el endotelio dañado. Sin embargo, los mecanismos fisiopatogénicos por los que estas células se asientan y diferencian sobre el vaso dañado no son bien

conocidos. Recientes estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que las CPEs también poseen capacidad de diferenciarse en células musculares lisas<sup>131</sup> como respuesta al factor beta 1 transformante de crecimiento y al contacto intercelular. De este modo, las CPEs pueden estar envueltas en la regeneración del miocardio isquémico modulando la angiogénesis y miogénesis, apoptosis de cardiomiocitos y remodelando el tejido cardíaco isquémico<sup>132-134</sup>. Otros estudios también sugieren que estas células intervienen en la neovascularización tras un accidente vascular cerebral isquémico<sup>135</sup>.

Sabemos que durante el proceso de isquemia el pH del tejido afecto disminuye, al mismo tiempo que distintas enzimas proteolíticas se liberan desde los lisosomas dañados de los remanentes celulares necróticos. De este modo, la reperfusión de áreas infartadas resulta en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y, consecuentemente, metabolitos oxidados. Este estrés oxidativo se ve incrementado por la invasión del tejido afecto por neutrófilos y macrófagos que liberan radicales de oxígeno. Ante esta situación hostil las CPEs son capaces de sobrevivir y mantener su potencial angiogénico mediante un potente sistema antioxidante<sup>136</sup>. En este sentido, He y colaboradores<sup>137</sup> han demostrado que estas células poseen una enzima procedente de la familia de la superóxido dismutasa, la manganeso superóxido dismutasa, que le confiere el potencial antioxidante necesario para sobrevivir y ejercer su papel reparador en el endotelio dañado en situaciones de isquemia.

#### 2.2.5. Células precursoras de endotelio y factores de riesgo cardiovascular

En la actualidad existe suficiente evidencia para afirmar que los distintos FRCV afectan tanto al número como a la funcionalidad de las CPEs<sup>138</sup>, existiendo una relación inversa entre ambos. Así pues, el número de CPEs se correlaciona con la función endotelial y es un buen marcador de riesgo CV<sup>139</sup>.

La asociación entre el metabolismo lipídico y la biología de las CPEs ha sido ampliamente estudiada. De este modo, el número de unidades formadoras de colonias de CPEs se relaciona de forma inversa con los niveles plasmáticos de colesterol y LDL-c. Además, la funcionalidad de estas células definida por su capacidad proliferativa, migratoria, adhesiva, y vasculogénica *in vitro*, se ve alterada en pacientes con hipercolesterolemia<sup>138-140</sup>. Por otro lado, la exposición de estas células a concentraciones elevadas de LDL-c oxidadas condiciona un deterioro en su funcionalidad dosis-dependiente, acelera el envejecimiento, impide la diferenciación inducida por VEGF y disminuye sus niveles plasmáticos<sup>141,142</sup>. Además, niveles elevados de HDL-c se asocian inversamente con el riesgo de ECV. En este sentido, distintos estudios han observado que concentraciones elevadas de HDL-c estimulan la diferenciación de células precursoras de endotelio y potencian la angiogénesis inducida por isquemia<sup>143</sup>. En cuanto al metabolismo de los TG, distintos trabajos han demostrado que concentraciones elevadas de remanentes de lipoproteínas (remanentes de quilomicrones y VLDL), muy ricos en TG, condicionan un efecto negativo sobre las CPEs ya que aceleran el envejecimiento celular mediante dos mecanismos; por un lado, inhiben la telomerasa y, por otro, aumentan el

estrés oxidativo<sup>144,145</sup>. Este incremento del estrés oxidativo se debe fundamentalmente a la inhibición que ejercen los remanentes de lipoproteínas sobre la actividad de la eNOS que, consecuentemente, condiciona una menor biodisponibilidad de NO. De igual modo, concentraciones reducidas de NO favorecen la regulación negativa de la telomerasa asociada a la edad, dando paso a un envejecimiento celular acelerado. En consonancia, algunos trabajos<sup>144,145</sup> sugieren que los mismos remanentes de quilomicrones podrían inhibir directamente la actividad telomerasa y contribuir así a la senescencia de esta estirpe celular. Dicho esto, parece obvio que un perfil lipídico aterogénico caracterizado por niveles disminuidos de HDL-c y elevados de LDL-c oxidadas propio de individuos con SMet, condiciona tanto un descenso en el número como una funcionalidad alterada de las CPEs y, con ello, un riesgo CV aumentado.

Entre los diversos factores de riesgo, parece que la hipertensión es la que mejor predice el defecto migratorio de las CPEs. La angiotensina II interacciona con la actividad de la telomerasa constitutiva e induce y acelera el envejecimiento de las CPEs mediante un incremento del estrés oxidativo<sup>120,138</sup>.

La DM constituye otro FRCV importante muy relacionado con el SMet en el que también se ha objetivado tanto un descenso en el número como una importante disfunción de las CPEs. Estos hallazgos se han observado tanto para la DM1 como 2<sup>146,147</sup>, existiendo una relación inversa entre los niveles plasmáticos de HbA1c y el número y funcionalidad de CPEs. De este modo, se pone de manifiesto que el grado de control metabólico se relaciona con la fisiopatología de estas células ya que en un estado de hiperglucemia se inhibe tanto la producción de NO como la activación de la metaloproteínasa 9, siendo ambos procesos claves en la liberación de las CPEs desde la médula ósea<sup>148</sup>. Por otro lado, niveles elevados de glucosa en plasma también interfieren negativamente en la capacidad de migración e integración de estas células en endotelios dañados<sup>149</sup>.

Por último, otros factores de riesgo como el tabaquismo<sup>150</sup> y la hiperhomocisteinemia<sup>151</sup> también ejercen un papel negativo sobre las CPEs disminuyendo su número y funcionalidad.

Así pues, parece evidente que individuos con SMet tienen un riesgo de ECV aumentado debido a un *pool* de CPEs reducido secundario a la concomitancia de diversos FRCV (HTA, RI, dislipemia)<sup>120</sup>.





### 3. NUTRICIÓN Y SÍNDROME METABÓLICO

En la actualidad, existe el acuerdo generalizado de que cada uno de los componentes del SMet se relaciona con cambios en el estilo de vida. De esta forma, el sedentarismo, el desequilibrio entre las calorías ingeridas y consumidas, y la ingesta elevada de algunos alimentos en menoscabo de otros, se asocian con la presencia de cada uno de sus componentes. Por todo esto, resulta apropiado definir estilos de vida y patrones alimentarios que ayuden a la población general a prevenir el desarrollo de cada uno de los factores de riesgo asociados al SMet<sup>152</sup>.

#### 3.1. Alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos

Las alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado, ya sea intolerancia a los hidratos de carbono, glucemia basal alterada, DM2 o resistencia a la acción de la insulina son, según la OMS, componentes principales del SMet. Se han descrito múltiples factores de riesgo para el desarrollo de DM y aunque la mitad del riesgo se debe a factores genéticos<sup>153</sup>, el otro 50% es atribuible a factores ambientales, principalmente obesidad y sedentarismo. El rápido incremento de las últimas décadas en la incidencia de DM2 se debe al aumento alarmante del sobrepeso y la obesidad, siendo la obesidad el factor de riesgo independiente más importante para el desarrollo de DM<sup>154</sup>. Las recomendaciones nutricionales en el SMet tienen como objetivo mejorar la sensibilidad a la insulina y prevenir o tratar las alteraciones metabólicas. A pesar de que alguno de los nutrientes de la dieta pueden tener influencia en la sensibilidad de la insulina los principales beneficios se obtienen con la pérdida de peso.

Parece ser que las dietas con bajo contenido en carbohidratos son capaces de mejorar la sensibilidad a la insulina<sup>155,156</sup>, pero no existe evidencia a largo plazo de que las dietas bajas en carbohidratos sean superiores a aquellas bajas en grasa con restricción energética<sup>157</sup>. Otros factores a tener en cuenta son el índice glucémico (IG) definido como la relación entre el área bajo la curva de glucemia tras la ingesta de un determinado alimento y el de un alimento control (pan blanco o 50 g de glucosa) y la carga glucémica de los alimentos (IG multiplicado por la cantidad de carbohidratos en gramos de ese alimento y dividido entre 100). La elevada ingesta de carbohidratos con alto IG puede aumentar la resistencia a la insulina, ya sea por pérdida de la función pancreática, por excesiva secreción de insulina o por glucotoxicidad de la célula beta<sup>152,158,159</sup>, en cambio, el predominio de alimentos de bajo IG, ayuda a controlar la sensibilidad a la insulina<sup>155,160</sup>. Sin embargo, existe cierta controversia a este respecto, ya que una revisión de la biblioteca *Cochrane* sobre el consumo de carbohidratos de bajo IG no encontró diferencias en los valores de glucemia basal e insulina, aunque sí una discreta disminución en los niveles de colesterol y hemoglobina glicada<sup>161</sup>.

En cuanto a la ingesta de grasa se refiere, distintos estudios han puesto de manifiesto que más que el consumo global de grasa lo que parece estar relacionado con las alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado y el SMet es el tipo de grasa que se ingiere<sup>162</sup>. En este sentido, diversos estudios recomiendan disminuir el consumo de

ácidos grasos saturados, ácidos grasos trans-, y aumentar el consumo de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) dado que la grasa total y MUFA no se asocian al riesgo de desarrollar DM2, mientras que los ácidos grasos trans- aumentan dicho riesgo y los PUFA lo disminuyen<sup>163-166</sup>. En esta línea, el consumo de MUFA y PUFA favorece el control de la presión arterial, la coagulación, la función endotelial y la RI, teniendo efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento del SMet<sup>166</sup>. Además, mientras las dietas ricas en MUFA pueden mejorar el control glucémico, aquellas con predominio en PUFA pueden mejorar los niveles de TG en plasma. No obstante, los mecanismos por los que estas grasas (MUFA y PUFA) modulan el desarrollo de DM no están bien establecidos<sup>152</sup>.

La ingesta de fibra<sup>164</sup> a partir de cereales no purificados y minerales<sup>154</sup> tales como magnesio calcio, potasio, cinc, vanadio y cromo se relacionan de forma inversa con la RI y, por tanto, con una menor prevalencia de DM y SMet. Por otro lado, diversos estudios demuestran que a mayor consumo de café, tanto descafeinado como con cafeína, existe menor riesgo de desarrollar DM, y estos resultados podrían deberse al alto contenido en magnesio del café o al efecto termogénico y estimulador de la secreción pancreática de insulina de la cafeína<sup>167,168</sup>.

En cuanto a cambios en la alimentación que ayuden a prevenir la aparición de DM, Hu y sus colaboradores proponen mantener el IMC por debajo de 25 kg/m<sup>2</sup> realizando algunas modificaciones nutricionales como son: mantener una dieta rica en fibra y grasas poliinsaturadas respecto saturadas, disminuir la ingesta de grasas trans- procedentes de la hidrogenación de los ácidos grasos, y limitar la ingesta de alimentos con alto IG<sup>152</sup>. El beneficio de estas modificaciones se pone de manifiesto en otros estudios como es el *diabetes Nutrition and Complications Trial* donde se observa que la sustitución de los ácidos grasos saturados por mono o poliinsaturados mejora el control metabólico en sujetos diabéticos y disminuye la tasa de mortalidad CV<sup>163,164,166</sup>. Otro estudio de intervención muy relevante que propone modificaciones en el estilo de vida es el realizado por el *Finnish Diabetes Prevention Study Group*<sup>169</sup> donde al grupo de intervención se le proporcionó consejo dietético basado en una reducción de la grasa total y saturada, aumento del consumo de fibra y actividad física con el fin de reducir el peso corporal. Se concluyó que, por un lado, la disminución ponderal fue mayor en el grupo de intervención, y por otro, que la incidencia acumulada de DM tras 4 años de seguimiento era menor en dicho grupo, objetivándose que el mayor beneficio se conseguía en aquellas personas que consiguieron una mayor pérdida de peso.

Estos hallazgos ponen de manifiesto que junto a la dieta, el ejercicio físico regular es la otra medida no farmacológica esencial para la prevención de la DM y SMet<sup>170</sup>. Según la ADA, la actividad física tiene un nivel de evidencia B en la prevención de la DM y en la mejora del control glucémico, la sensibilidad a la insulina y la reducción las complicaciones.

### 3.2. Alteraciones en el metabolismo lipídico

El perfil de lípidos plasmáticos de los pacientes con SMet se caracteriza por la existencia de hipertrigliceridemia, descenso de HDL-c, y aumento de partículas pequeñas y densas de LDL-c, y de remanentes de lipoproteínas. Dicho patrón ha sido definido recientemente como dislipemia aterogénica<sup>152</sup> y se relaciona con un aumento del riesgo de ECV<sup>171,172</sup>. Entre los patrones dietéticos que se han relacionado con el SMet, un alto consumo de pan blanco (15-18% de las kilocalorías totales de la dieta) se ha asociado con la presencia de dislipemia aterogénica, tanto en hombres como en mujeres, aunque dicha asociación se pierde tras realizar un ajuste multivariante con otros nutrientes<sup>173</sup>. Además, el consumo diario de una o más bebidas no alcohólicas se ha relacionado con hipertrigliceridemia y descenso de los niveles plasmáticos de HDL-c en estudios longitudinales<sup>174</sup>. De igual modo, el *Nurses Health Study* observó cifras más elevadas de TG en ayunas y más bajas de HDL-c en relación con dietas con carga glucémica alta, sobre todo en mujeres con obesidad y sobrepeso<sup>175</sup>, estableciendo una relación inversa entre índice y carga glucémicos y cifras plasmáticas de HDL-c<sup>176,177</sup>. De este modo, la ingesta de menos raciones de bebidas azucaradas, zumos y *snacks* se ha asociado a cifras de HDL-c más elevadas. Por último, también se ha observado una correlación inversa entre niveles de HDL-c y carga glucémica, porcentaje global de carbohidratos y cantidad total de azúcares y fructosa de la dieta<sup>178</sup>.

De forma general, la ingestión de carbohidratos rápidamente digeribles, o monosacáridos como la fructosa, tienden a exacerbar la lipemia postprandial, mientras que la fibra no digerible induce respuestas lipídicas más atenuadas. Esta interacción puede producirse en distintos momentos, desde el procesamiento y absorción de las grasas en el tubo digestivo (reducción de la emulsificación de la grasa con dieta rica en fibra, o regulación de la expresión de receptores transportadores de ácidos grasos y colesterol en el enterocito mediada por glucosa o insulina, entre otros), hasta el periodo postabsortivo (sirva de ejemplo la inducción de la lipogénesis *de novo* hepática por fructosa)<sup>152</sup>.

En sujetos con RI, la respuesta lipémica postprandial aumenta con la adición de carbohidratos, sobre todo cuando se consumen alimentos con alto IG. La hiperglucemia e hiperinsulinemia originadas promueven la acumulación de partículas que contienen apoB-48 (derivada de quilomicrones) y apoB-100 (derivadas de VLDL), influyendo tanto en la fase intestinal como hepática de la generación de TG. No obstante, el mecanismo íntimo que regula estos procesos no ha sido bien definido, quedando por perfilar la acción de diferentes tipos de hidratos de carbono en la respuesta lipémica y el motivo de la gran variabilidad interindividual, probablemente debido a distintos polimorfismos en los genes implicados<sup>179</sup>.

Varios ensayos clínicos han valorado el efecto del ejercicio físico y/o dietas con distinta distribución de macronutrientes y alimentos sobre el perfil lipídico del SMet. De ellos parece deducirse un beneficio cuando se disminuyen el contenido de carbohidratos

de la dieta, sobre todo en lo que respecta a las cifras de TG y lipemia postprandial, puesto que los resultados para HDL-c han sido más inconsistentes<sup>180-182</sup>. No obstante, cuando se valora el efecto de patrones dietéticos saludables como la dieta *Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH)* y la dieta mediterránea (MED), puede presumirse que el consumo de hidratos de carbono complejos también favorece el perfil lipídico del SMet, sin embargo, por el diseño de estos estudios no es posible esclarecer el efecto específico de otros factores como los ácidos grasos monoinsaturados de la dieta MED, o los lácteos desnatados de la dieta *DASH*<sup>183,184</sup>. Pocos trabajos han valorado el papel de los ácidos grasos omega-3 en el SMet, aunque los datos revelan una mejoría de las cifras de TG, sin efectos claros sobre el HDL-c<sup>152</sup>.

Recientemente se está postulando que la respuesta a una dieta baja en grasa es menor cuando existe dislipemia aterogénica. Por una parte, se ha observado que los pacientes con SMet absorben menos colesterol procedente de la dieta, y además, la disminución de la ingesta de grasa favorecería la secreción endógena de lípidos hepáticos<sup>27</sup>. No obstante, no parece ser tan relevante el contenido total de la grasa dietética sino el tipo de ácidos grasos consumidos. Así, la sustitución de la grasa saturada por insaturada puede propiciar una elevación de las cifras de HDL-c (MUFA) y un descenso de los TG en partículas VLDL (n-3 y n-6, PUFA)<sup>28</sup>.

Por otro lado, las guías clínicas sobre el manejo de dislipemia en SMet propone como objetivo prioritario de control conseguir cifras óptimas de LDL-c<sup>29</sup>. En este sentido, gran parte de las dietas con escaso contenido en carbohidratos aportan un exceso de grasa, que cuando es saturada propicia una elevación de dichas lipoproteínas en plasma. Así, las guías americanas *NCEP:ATPIII* permiten en el SMet un máximo de 50% de las kilocalorías totales en forma de carbohidratos, sobre todo complejos (frutas, verduras y cereales integrales) y hasta el 35% como grasa (el exceso debe hacerse a partir de PUFA y MUFA). Además, sigue recomendando una ingesta de grasas saturadas inferior al 7% del aporte calórico diario, y un consumo de proteínas del 15%<sup>16</sup>.

### 3.3. Nutrición y tensión arterial

El papel de la HTA en el SMet como FRCV es indiscutible y, aunque en la mayor parte de los casos el tratamiento farmacológico va a ser la clave del éxito, desde un punto de vista dietético/nutricional es posible añadir algunos beneficios. Varios metanálisis y revisiones sistemáticas recientes han valorado el efecto de cambios del estilo de vida sobre la tensión arterial, observándose una reducción significativa tras dieta destinada al control ponderal (generalmente una combinación de reducción de grasa, restricción de sal y aumento del consumo de frutas y verduras), ejercicio físico aeróbico y limitación del consumo de sodio y alcohol<sup>185-187</sup>. Distintos minerales como el sodio, magnesio, potasio y calcio se han implicado en la modulación de la tensión arterial (TA) de manera que un consumo reducido de sodio y aumentado en potasio se relaciona con menores cifras de tensionales<sup>188</sup>. El magnesio también puede influenciar positivamente aunque los resultados son inconsistentes y sólo se ha demostrado una pequeña reducción de

TA dosis-dependiente. Por otro lado, el calcio tiene una capacidad hipotensora pequeña aunque significativa, aunque debido a la magnitud de su efecto, no se recomienda su suplementación para prevenir la HTA<sup>189</sup>. Por consiguiente, no existe una evidencia convincente sobre los beneficios de los suplementos de estos minerales, aunque si son consistentes los datos que relacionan la ingesta de suplementos de n-3, PUFA (>3 g/día) con una disminución moderada de la tensión arterial<sup>185,190</sup>. De otro lado, se ha descrito mayor disminución tensional tras la dieta con baja carga glucémica frente a la dieta hipograsa hipocalórica convencional<sup>191</sup>. En este sentido, estudios de intervención sugieren que tanto la ingesta de fibra dietética como dietas con mayor contenido en MUFA (aceite de oliva virgen) frente PUFA (aceite de girasol) disminuyen la tensión arterial y la necesidad de tratamiento hipotensor<sup>192,193</sup>.

El patrón dietético más estudiado en HTA es la dieta *DASH* que favorece el consumo de frutas, verduras, cereales integrales, lácteos desnatados, carne de ave, pescado y frutos secos, en detrimento de carne roja, dulces y bebidas azucaradas. Contiene, por tanto, menor cantidad de grasa total, grasa saturada y colesterol, y más fibra, proteínas, calcio, magnesio y potasio que la dieta media americana produciendo un mayor descenso tensional cuando se compara con esta<sup>194</sup>.

Las recomendaciones generales para el control de la TA se centran en la reducción ponderal, la disminución del consumo excesivo de alcohol, la promoción del ejercicio físico, la disminución de la ingesta de sal (<6 g/día) y de la grasa saturada, y en el aumento de frutas y verduras en la dieta cotidiana. De momento no se recomienda tratar la HTA aislada con suplementos de PUFA omega-3<sup>195-197</sup>.

### 3.4. Obesidad y nutrición

En cuanto a la obesidad, el aumento progresivo de peso, incluso de forma leve a lo largo de los años, favorece el desarrollo de SMet y de cada uno de sus componentes por separado; sin embargo, el control ponderal, independientemente del IMC inicial puede reducir su incidencia<sup>198</sup>. Sin duda pues, la prioridad preventiva/terapéutica en el SMet se centra en la reducción de peso y para ello los cambios en el estilo de vida son ineludibles.

Se ha discutido ampliamente sobre el reparto óptimo de macronutrientes en la dieta a prescribir. Un reciente metanálisis ha analizado la eficacia de dietas con restricción en carbohidratos (<20-30 g diarios en las primeras fases) con respecto a dietas con escaso contenido graso (< 30% de kilocalorías diarias), y aunque tras seis meses todos los parámetros analizados apuntaban hacia un mayor beneficio de las dietas con bajo contenido en carbohidratos, al año de seguimiento no se observaron diferencias en el peso perdido entre grupos. Según estos resultados, aún no existe suficiente evidencia para recomendar estrategias de modificación de proporciones de nutrientes como una medida eficaz para la pérdida de peso<sup>199</sup>. Sin embargo, la restricción calórica se presenta como la medida más eficaz para la pérdida ponderal de manera que, independientemente del patrón dietético utilizado (MED o *DASH*), la reducción de la

ingesta energética induce una pérdida de peso superior respecto a las dietas hipograsas con reparto saludable de macronutrientes<sup>183,184</sup>.

Así pues, las guías recomiendan una pérdida de peso entre el 7 y el 10% en 6-12 meses a través de dieta con un déficit de 500-1000 kilocalorías al día, ejercicio físico (30-60 minutos diarios de ejercicio aeróbico moderado-intenso, complementado con ejercicio de entrenamiento progresivo 2 días a la semana) y programas de terapia conductual. Incluso pequeñas pérdida ponderales pueden ser muy beneficiosas en el control de todos los factores implicados en el SMet<sup>29</sup>.

#### **4. DIETA MEDITERRÁNEA Y SÍNDROME METABÓLICO**

Basado en el análisis detallado de las características dietéticas que son beneficiosas para cada uno de los componentes del SMet, presentado en apartados anteriores, parece lógico pensar que la dieta típica MED podría representar un importante modelo de dieta cardiosaludable y con potenciales efectos terapéuticos para pacientes con SMet.

La dieta MED, definida como una dieta saludable, se caracteriza por un elevado consumo de verduras, legumbres, frutas, frutos secos, cereales integrales y aceite de oliva, bajo consumo de grasas saturadas, moderada-alta ingesta de pescado, moderado-bajo consumo de leche y queso, baja ingesta de carne roja y una moderada y regular ingesta de vino con las comidas<sup>152</sup> (**tabla 2**).

Sin embargo, se ha demostrado, que la mejora de los factores de riesgo presentes en el SMet, no sólo depende de la proporción de nutrientes, como las grasas y carbohidratos, sino también de diferentes compuestos minoritarios de la dieta, como los antioxidantes y compuestos biológicamente activos presentes en alimentos específicos. Por ello, un creciente interés ha surgido recientemente sobre el efecto de la dieta MED en los factores definitorios del SMet<sup>200</sup>. En esta línea, nuestro grupo ha mostrado antes, que la ingesta a largo plazo de una dieta MED, rica en aceite de oliva, mejora la función endotelial medida con *láser-doppler*<sup>119</sup> e induce un efecto antiinflamatorio<sup>201</sup>, debido en parte a su contenido en compuestos fenólicos, disminuyendo el estado oxidativo de pacientes con hipercolesterolemia<sup>119,202</sup>. Si hablamos de alimentos completos, diversos estudios en los que se sigue un patrón de dieta MED han demostrado disminuir tanto la incidencia de DM como la mortalidad global, así como por ECV y cáncer.



**Tabla 2.** Características principales en la ingesta diaria y semanal de alimentos de la dieta mediterránea

<b>DIETA MEDITERRÁNEA</b>	
<b>Grasa total:</b>	30-35%
<b>Aceites:</b>	Aceite de oliva 20-50 gramos/día
<b>Lácteos:</b>	Desnatados
<b>Frutos secos:</b>	≥ 3 veces/semana (30 gramos cada ración)
<b>Cereales y derivados integrales:</b>	Arroz, pasta, pan (todos integrales): 4-6 porciones/día Fibra total: 30 gramos
<b>Legumbres:</b>	≥ 3 veces/semana
<b>Carnes:</b>	Blancas (4 veces/semana): -Pollo y pavo: 2 veces/semana (1 pollo y 1 pavo) -Pescados blancos: 2 veces/semana
	Rojas (1 vez/10 días): - Cerdo magro, vacuno magro, jamón de york o serranos sin tocino
	Pescado azul: 1 vez/semana
<b>Consumo de vino:</b>	Tinto
<b>Frutas:</b>	3-5 veces/día
<b>Vegetales*:</b>	≥ 2 veces/día (al menos 1 cruda o en ensalada)
<b>Sofritos:</b> Se recomienda su consumo ≥ 2 veces/semana	
<b>Ingredientes:</b> tomate, ajo, cebolla o puerro, a fuego lento con aceite de oliva	

\*Baja en grasa: 2-3 veces cruda fresca + hasta 1 vez cocida.

#### 4.1. Dieta mediterránea y factores de riesgo cardiometabólicos

La obesidad visceral se considera hoy día uno de los factores más determinantes en la fisiopatología de la RI y otros componentes del SMet, siendo el perímetro de cintura su marcador más específico, asociándose tanto con el riesgo CV como con otros componentes del SMet, tales como la elevación de marcadores inflamatorios y endoteliales, TA, glucosa y TG, y niveles bajos de HDL-c<sup>203-206</sup>. Por otro lado, distintos componentes de la dieta MED como el cereal entero y la fibra se han relacionado inversamente con el IMC y el perímetro de cintura. Esta observación se ha mostrado consistente en distintos trabajos como el *Health Professionals Follow-up Study*<sup>207</sup> y *Coronary Artery Risk Development in Young Adults*<sup>208</sup>. De forma paralela, el estudio *Nurses' Health Study*<sup>209</sup> pone de manifiesto no sólo que la ganancia de peso se relaciona de forma inversa con la ingesta en fibra y cereales enteros sino que los cereales refinados se asociaban directamente con aumento de peso.

Como sabemos, la dieta MED es alta en grasas, fundamentalmente a expensas de MUFA procedentes del aceite de oliva virgen, y distintos estudios epidemiológicos han analizado el efecto de la cantidad total de grasa ingerida en relación con la de carbohidratos en el peso corporal y obesidad visceral sin obtener resultados consistentes. En este sentido, el estudio *Nurses' Health Study* objetiva una débil asociación entre la cantidad de grasa total ingerida y la ganancia de peso<sup>210</sup>, sin embargo, otros trabajos ponen de manifiesto que más que la grasa total es el tipo de grasa ingerida la que determina cambios en el peso corporal y obesidad central, de modo que tanto los MUFA como PUFA son oxidados más fácilmente que los ácidos grasos saturados (SFA). Dicho esto, el consumo de grasas animales, SFA y grasas trans- se asocian de forma directa con la ganancia de peso mientras que los MUFA y PUFA tienen una relación inversa frente a la ganancia ponderal<sup>211</sup>. Otros estudios como el SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) evalúan la posible asociación entre el consumo de aceite de oliva y la probabilidad de ganar peso, incidencia de sobrepeso u obesidad en una cohorte con dieta MED seguida durante 28.5 meses. Los autores concluyen que aunque el consumo basal se asocia con una baja probabilidad no significativa de ganancia de peso, los individuos con mayor consumo de aceite, incluyendo aquellos que durante el seguimiento aumentaron su ingesta, muestran un discreto incremento no significativo de desarrollar sobrepeso<sup>212</sup>. Por otro lado, la ingesta regular de nueces (ricas en grasas insaturadas) propia de la dieta MED también tiene un efecto positivo sobre la obesidad visceral, RI y otras alteraciones metabólicas del SMet, efecto atribuible fundamentalmente al aumento de la saciedad, termogénesis y malabsorción grasa<sup>212,213</sup>. Por último, el consumo de frutas y verduras también tienen un efecto protector frente la obesidad de modo que la adhesión a un patrón MED no solo no se asocia con un mayor riesgo de desarrollar sobrepeso en la población con IMC normal, sino que constituye una herramienta eficaz en el control de la obesidad<sup>214,215</sup>.

Muchos componentes de la dieta MED han sido considerados importantes en la modulación de la RI, especialmente el tipo de grasa y el IG de la dieta. Aunque distintos

estudios han encontrado que un consumo de una dieta con alta carga glicémica, especialmente cuando se asocia a una baja ingesta de fibra se relaciona con un mayor riesgo de DM2, los resultados son inconsistentes y parece que una vez más, es el tipo de grasa consumida la que tiene mayor impacto en el desarrollo de RI y DM2. De esta forma, la sustitución de SFA y grasas trans- por MUFA y PUFA protegen frente al desarrollo de RI aunque los resultados para esta última son inconsistentes<sup>152,189</sup>. No obstante, Laaksonen y colaboradores<sup>216</sup> demostraron una importante relación entre la composición de ácidos grasos del suero, un biomarcador de la ingesta grasa habitual, y el desarrollo de DM, de manera que se encontraron niveles plasmáticos elevados de SFA y bajos de PUFA en hombres que desarrollaron RI en 4 años de seguimiento.

Dado que la dislipemia aterogénica se asocia frecuentemente con el SMet, en los últimos años, distintas intervenciones dietéticas se han centrado en reducir niveles de LDL-c. Sin embargo, en la actualidad se reconoce que las estrategias dietéticas y no dietéticas encaminadas al aumento y descenso de HDL-c y TG respectivamente son objetivos importantes para la prevención y tratamiento del SMet<sup>189</sup>.

A este respecto, se ha objetivado que dietas bajas en carbohidratos se asocian con descenso de TG y aumento de niveles plasmáticos de HDL-c<sup>199</sup>, aunque el tipo de hidrato de carbono y grasa puede influenciar en el perfil lipoproteico<sup>189</sup>. Turley y colaboradores<sup>217</sup> encontraron que reemplazando SFA por carbohidratos procedentes de cereales, verduras, legumbres y frutas se producía un descenso de los niveles de colesterol total y LDL-c, aunque el efecto que tenía sobre HDL-c y TG era insignificante. Por otro lado, aunque distintos estudios<sup>218</sup> han demostrado que la ingesta de hidratos de carbono con alto IG se relaciona inversamente con los niveles de HDL-c y directamente con los de TG preprandiales, la asociación entre IG y dislipemia en la actualidad es controvertida<sup>219</sup>. En lo que al tipo de grasa se refiere, las dietas ricas en n-3, PUFA aumentan y descienden los niveles de HDL-c y TG respectivamente, reducen la activación endotelial y otros factores asociados con el SMet<sup>196</sup>. En cuanto al alcohol, la ingesta moderada de vino, típica de la dieta MED, protege frente la enfermedad coronaria mediante el aumento de HDL-c<sup>220</sup>. Así pues, un patrón MED de alimentación rico en fibra, n-3, PUFA y MUFA con consumo limitado de carbohidratos de alto IG es recomendable para incrementar los niveles plasmáticos de HDL-c y disminuir los de TG<sup>189</sup>.

No hay duda sobre el papel de la HTA como FRCV y su relación con el SMet, de modo que un mejor control tensional mediante una dieta saludable resulta importante. En este sentido, el estudio SUN muestra una reducción del 50% en la incidencia de HTA entre los individuos con alto consumo de lácteos desnatados, resultados que no se encontraron cuando los lácteos consumidos eran enteros, hecho que pone de manifiesto que la cantidad y tipo de grasa determina el efecto antihipertensivo<sup>221</sup>. Sin embargo, el efecto beneficioso de los lácteos desnatados puede ser debido a la composición del producto, de manera que el potasio, magnesio, calcio y algunas proteínas derivadas de la leche pueden ejercer el efecto hipotensor. De este modo, distintos componentes de

la dieta MED como el aceite de oliva, lácteos desnatados, vino tinto, frutas y verduras favorecen el descenso de las cifras tensionales<sup>222,223</sup>. El efecto del vino sobre la TA es controvertido, aunque todo apunta a que induce un efecto vasodilatador gracias a su alto contenido en polifenoles<sup>224</sup>.

Algunos componentes del SMet se relacionan con un estado proinflamatorio, sugiriendo que el mecanismo etiopatogénico subyacente del síndrome puede ser un estado inflamatorio y oxidativo de bajo grado crónico. Esto se pone de manifiesto por elevaciones de marcadores inflamatorios plasmáticos, tales como PCR e IL-6<sup>189</sup>. En este sentido, la adherencia a un patrón alimentario MED se asocia con un descenso de distintos parámetros inflamatorios plasmáticos. Por consiguiente, una dieta MED rica en aceite de oliva virgen, nueces, verduras, frutas, legumbres y pescado, también es una buena moduladora de la inflamación y oxidación fundamentalmente a través de ácidos grasos insaturados (MUFA y PUFA), fibra dietética o fitoquímicos<sup>225</sup>.

Finalmente, dado que las intervenciones sobre el estilo de vida interactúan con los distintos componentes del SMet a niveles que la farmacología no puede acceder, unos hábitos de vida saludables parecen ser más efectivos en la reducción de la prevalencia del SMet<sup>226</sup>.

#### **4.2. Dieta mediterránea y función endotelial**

La disfunción endotelial se considera en la actualidad un FRCV independiente y se relaciona ampliamente con la RI y el SMet, constituyendo un paso clave en la patogénesis de la arteriosclerosis<sup>227,228</sup>. Por otro lado, el daño endotelial también conlleva un aumento de la expresión y activación de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión leucocitaria (molécula soluble de adhesión intercelular 1, sICAM-1; molécula soluble de adhesión vascular 1, sVCAM-1). Muchas de estas moléculas de adhesión, incluida ICAM-1, son reguladas por el factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ) el cual se activa ante distintos estímulos como TNF $\alpha$ , LDL-c oxidadas y estrés oxidativo<sup>116</sup>.

En la literatura, existen gran variedad de trabajos que ponen de manifiesto que tanto la función vasomotora dependiente del endotelio como los niveles plasmáticos de moléculas de adhesión se ven afectados por la dieta y, más concretamente, por la cantidad y calidad de la grasa ingerida<sup>116,229</sup>. De este modo, un patrón dietético MED rico en grasas a expensas de ácidos grasos monoinsaturados procedentes del aceite de oliva induce una mayor biodisponibilidad de NOS en el periodo postprandial en individuos con SMet<sup>229</sup>. Este hecho, junto con una tendencia a incrementar los niveles plasmáticos de nitritos totales (nitratos más nitritos) tras una dieta MED, hacen pensar que la mejora de la función endotelial puede ser debida a un aumento del NO que es el vasodilatador endógeno más potente, el cual, además posee otras funciones como inhibición de la agregación plaquetaria, proliferación de músculo liso y adhesión de los monocitos a las células endoteliales. En cuanto a las moléculas de adhesión, las concentraciones de sICAM-1 postprandiales se ven reducidas cuando se compara una dieta MED con una baja en grasas y rica en carbohidratos<sup>229</sup>. Del mismo modo, una dieta enriquecida en

aceite de oliva induce una disminución del estrés oxidativo mediante la estabilización del sistema  $\text{NF}\kappa\beta$ <sup>230</sup>.

Con todo esto, parece claro que una dieta MED enriquecida con aceite de oliva induce una mejora de la función endotelial pre- y postprandial fundamentalmente gracias a su alto contenido en polifenoles con propiedades altamente antioxidantes independientemente de las mejoras en otros FRCV (obesidad, HTA, dislipemia, etc).

### 4.3. Dieta mediterránea y células precursoras de endotelio

A lo largo de los últimos años se ha demostrado que la disfunción endotelial constituye una etapa decisiva en el desarrollo de la arteriosclerosis. La conservación estructural y funcional del endotelio mediante un adecuado balance entre el daño y su capacidad regenerativa resulta de gran importancia para impedir el desarrollo de nuevos eventos cardiovasculares<sup>231</sup>. En este sentido, las CPEs constituyen una estirpe celular fundamental en la homeostasis endotelial mediante su acción de reemplazamiento de células endoteliales dañadas y activación de la angiogénesis. Por otro lado, el envejecimiento y la acumulación de FRCV afectan a su movilización desde la médula ósea y a su correcta integración en la pared vascular dañada<sup>232,233</sup>. Presumiblemente, alterando los factores de riesgo mediante la modulación del estrés oxidativo, actividad de NO y otros procesos fisiológicos se puede influenciar directamente la movilización y supervivencia de las CPEs<sup>234</sup>.

Actualmente hay poca información a cerca de la influencia de la dieta sobre las CPEs. Sin embargo, un estudio realizado en la población de Okinawa<sup>235</sup> mostró que mujeres sanas con ingesta elevada de verduras presentaban un incremento del número de CPEs respecto a sus controles sanos que no las consumían. Los autores atribuyen este efecto beneficioso de las verduras al alto contenido en fibra y folato dado que concentraciones plasmáticas elevadas de este último se relacionan inversamente con los niveles de homocisteína. En este sentido, el número de CPEs se asocia de forma inversa con los niveles plasmáticos de homocisteína de modo que, concentraciones disminuidas de esta, contribuyen a mantener un mayor número de células precursoras circulantes<sup>235,236</sup>. El mecanismo por el cual la homocisteína disminuye el número de CPEs no es bien conocido pero parece que puede actuar acelerando el envejecimiento celular<sup>237</sup>. Otro mecanismo propuesto para justificar el aumento de las células precursoras tras la ingesta de una dieta rica en verduras es su alto contenido en antioxidantes (tales como el  $\beta$  caroteno) que disminuyen las EROs al tiempo que mejoran las características de las lipoproteínas de baja densidad<sup>238,239</sup>, haciéndolas de mayor tamaño y disminuyendo su capacidad oxidativa, contribuyendo así al descenso de LDL-c pequeñas y densas; factores todos ellos relacionados con la disminución de la capacidad regenerativa del endotelio a través de su acción negativa sobre el número de CPEs<sup>141,235,240</sup>.

Por otro lado, una de las principales características de la dieta MED es el consumo moderado de vino tinto. Este tipo de vino es rico en polifenoles (resveratrol) altamente antioxidantes que ejercen una acción positiva sobre el perfil lipídico mediante una

reducción de la oxidación de las LDL-c<sup>241</sup>. Otras acciones beneficiosas del vino tinto son su capacidad de disminuir la agregación plaquetaria<sup>242</sup>, inhibir la proliferación y migración de células musculares lisas y mejorar la función endotelial mediante un incremento de la bioactividad de la NO<sup>243,244</sup>. En este sentido, estudios animales han puesto de manifiesto que el consumo moderado de vino tinto aumenta el número de CPEs en médula ósea y mejora la funcionalidad de estas células gracias fundamentalmente a su contenido elevado en polifenoles antioxidantes y a su capacidad de restablecer distintas vías de señalización angiogénicas en situaciones de estrés oxidativo elevado como lo son la hipercolesterolemia y el SMet<sup>241</sup>.

Con todo esto, es fácil predecir que un patrón de dieta MED caracterizado por un consumo elevado de frutas y verduras, vino tinto y aceite de oliva debe ejercer un impacto positivo sobre la capacidad regenerativa del endotelio actuando sobre el número de CPEs. Así pues, un estudio reciente realizado en ancianos sanos ha puesto de manifiesto que la adherencia a una dieta MED aumenta el número de CPEs circulantes prologando su supervivencia gracias al potencial antioxidante de este patrón dietético<sup>231</sup>. Esto se ha objetivado tras la determinación plasmática de  $\beta$  caroteno (carotenoide antioxidante más abundante en la naturaleza y más importante para la dieta humana), cuya concentración plasmática se encuentra elevada tras la ingesta prolongada de una dieta MED, relacionándose de forma directa con el número de células precursoras.

Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la existencia de estudios que hayan valorado el efecto sobre las CPEs de intervenciones de larga duración con dieta MED en poblaciones de pacientes con SMet.



## 5. EJERCICIO FÍSICO Y SÍNDROME METABÓLICO

Hoy día resulta indiscutible que el ejercicio físico (EF) es, tras la dieta, el segundo pilar fundamental en el tratamiento del SMet ya que favorece la reducción de la masa grasa y una significativa mejora de los FRCV<sup>152</sup>. En estos pacientes con riesgo CV incrementado, la adición de un programa de EF atenúa este exceso de riesgo no solo mediante el control de los factores de riesgo asociados al SMet (obesidad, HTA, RI y dislipemia) sino también mediante la mejora de la función endotelial, punto en el que las estrategias farmacológicas actuales de tratamiento sólo actúan discretamente<sup>245</sup>. Sin embargo, debido a la gran variabilidad en la duración e intensidad de los protocolos experimentales, así como en las propias modalidades de ejercicio investigado (ejercicios aeróbicos continuos o discontinuos o ejercicios de fuerza) existe una gran cantidad de evidencias científicas que precisan ser analizadas de forma sistemática y ordenada<sup>96</sup>.

La mayoría de los estudios proponen que estos efectos crónicos provocados por un programa sostenido de EF serían el resultado de una adaptación fisiológica provocada ante cada situación aguda de ejercicio diario. Posiblemente uno de los principales efectos agudos del ejercicio es la reducción en la magnitud y duración de la lipemia postprandial<sup>246,247</sup>, un efecto directamente relacionado con la mejora de la función endotelial mediada por el óxido nítrico<sup>248</sup>, así como una reducción del estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria sistémica<sup>249</sup>. Además, un incremento del gasto energético basal y de la oxidación de grasas de las reservas corporales<sup>250</sup> conduciría a un cambio progresivo de la composición corporal, un incremento de la masa metabólicamente activa y una reducción del exceso de grasa corporal<sup>251</sup>. Estos cambios, resultarían en una mejora sostenida de los factores que definen al SMet, de la FE<sup>245</sup> y de la acumulación lípidos a nivel de las arterias, lo cual fue observado en humanos a través de una reducción del grosor de la pared arterial (relación íntima/media)<sup>252</sup>.

Basado en estas evidencias científicas, se han propuesto recomendaciones específicas sobre la cantidad de actividad física y ejercicio que debería realizar diaria y semanalmente un adulto para obtener beneficios para su salud. En este sentido, el *American College of Sports Medicine*, ha reconocido la necesidad de incluir ejercicios de fuerza y ejercicios aeróbicos como parte de un programa combinado de ejercicio para el tratamiento y prevención de patologías crónicas<sup>253</sup>. Sin embargo, en la realidad actual, el EF está generalmente ausente en la vida de la mayoría de las personas y la actividad física diaria decrece con el transcurso de los años y el padecimiento de patologías como la obesidad y el SMet, que provocan una sobrecarga del aparato locomotor y afectan la anatomía y función del tejido óseo-muscular, empeorando aún más el estado de salud de los enfermos.

### 5.1. Ejercicio y factores de riesgo cardiometabólicos

La RI constituye uno de los principales pilares sobre los que gira la etiopatogenia del SMet, por lo que todas las medidas que actúan a dicho nivel son de gran relevancia en la práctica clínica. De hecho, distintos estudios han puesto de manifiesto que el



estado de RI e inactividad física se relacionan directamente con un mayor riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria. Mas aún, cuanto mayor son los niveles de glucemia preprandial y mayor es el grado de inactividad, mayor es el riesgo de presentar un evento coronario. En este sentido, el estudio *Aerobics Center Longitudinal* muestra que la mortalidad por ECV en pacientes con baja forma física y diagnosticados según los criterios de *NCEP:ATPIII* de SMet es de 31 muertes / 10000 hombres-año, mientras que las cifras caen a 11.9 muertes / 10000 hombres-año cuando los pacientes presentaban buen estado de forma<sup>254</sup>. Así pues, estos datos sugieren que un buen estado de forma CV atenúa el exceso de riesgo de ECV asociado al SMet<sup>255</sup>.

Por otro lado, el mecanismo por el cual se mejora la sensibilidad insulínica es controvertido. Distintos ensayos clínicos muestran que cambios en los estilos de vida incorporando EF es una medida efectiva para prevenir o revertir la RI presentes en los pacientes afectos de SMet<sup>256,257</sup>. En este sentido, varios trabajos han puesto de manifiesto que la sensibilidad insulínica medida mediante el índice HOMA mejora tras realizar EF, siendo la magnitud de este efecto tanto mayor cuanto mayor es el periodo de entrenamiento. Así pues, estos hallazgos muestran que el EF modifica la acción de la insulina mediante mecanismos agudos y crónicos<sup>255</sup>. Los mecanismos moleculares por los que el EF realiza esta acción aún no son bien conocidos aunque parece que, tras la realización de un ejercicio, se produce un aumento en el transporte de glucosa desde el torrente sanguíneo al músculo esquelético, paso mediado por una cascada enzimática intracelular independiente de la acción de la insulina que en definitiva induce un aumento de la proteína transportadora de glucosa 4 (GLUT-4) en la superficie celular<sup>258-260</sup>. Por otro lado, en ocasiones también se observa un aumento en la señalización intracelular mediada por insulina a través de IRS-1 asociado a fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K), aunque este mecanismo no parece ser necesario para inducir la mejora en el transporte de la glucosa<sup>259</sup>. Todos estos efectos se mantienen activos durante horas tras el ejercicio y parecen estar relacionados, al menos en parte, con la disponibilidad de carbohidratos y la depleción del glucógeno muscular<sup>258,261</sup>.

Otro mecanismo por el cual el EF mejora la sensibilidad a la insulina es mediante un incremento de la capacidad oxidativa a nivel muscular de ácidos grasos. Es bien conocido que sujetos con SMet presentan concentraciones elevadas de TG en el músculo esquelético y que este hecho, junto con la disminución de la actividad oxidativa de las enzimas mitocondriales, condiciona un estado de RI<sup>262</sup>. Esto es así, porque la acumulación de precursores lipídicos intracelulares inhiben el receptor de la insulina y su señalización mediante IRS-1<sup>263,264</sup>, así como una actividad oxidativa mitocondrial disminuida se relaciona directamente con un menor consumo de glucosa<sup>262</sup>. Dicho esto, encontramos algunos trabajos en la literatura que avalan estos datos de manera que el EF, cuantificado mediante el consumo máximo de oxígeno, se correlaciona intensamente con la actividad oxidativa mitocondrial<sup>255,265</sup>, siendo un potente predictor de la sensibilidad a la insulina independientemente de la obesidad central e historia familiar de DM2<sup>266,267</sup>.

La obesidad constituye uno de los componentes definitorios del SMet y su localización abdominal se relaciona directamente con la RI, de modo que la instauración de un programa de EF se presenta en estos individuos como una medida razonable. Son muchos los estudios epidemiológicos los que han puesto de manifiesto que un estilo de vida activo y/o un buen estado de forma en sujetos con sobrepeso u obesidad condiciona un descenso del riesgo de ECV y enfermedad coronaria cuando se comparan con aquellos sedentarios e incluso con sujetos delgados inactivos, indicando que el efecto beneficioso del EF va más allá de una simple reducción ponderal<sup>255</sup>. Dada la dificultad que entraña el manejo de la obesidad en estos pacientes para mantener reducciones de peso a largo plazo<sup>268,269</sup>, resulta interesante conocer que mantener un buen nivel de actividad física condiciona un menor riesgo CV independientemente de las modificaciones ponderales. No obstante, en la actualidad se precisan un mayor número de ensayos clínicos controlados y aleatorizados que comparen la eficacia de un estilo de vida activo sin grandes modificaciones del peso corporal frente intervenciones dirigidas a la reducción ponderal en la atenuación del riesgo CV en la población obesa<sup>255</sup>.

La dislipemia aterogénica definida por un descenso en la concentración de HDL-c y un incremento de TG y LDL-c pequeñas y densas que acompaña al SMet también se beneficia de un programa de EF. En este sentido, el entrenamiento físico no sólo actúa aumentando las concentraciones plasmáticas de HDL-c, sino que también modifica el tamaño medio de distintas lipoproteínas aterogénicas, de manera que se sustituyen LDL-c pequeñas y densas y HDL-c pequeñas por lipoproteínas de mayor tamaño medio, ejerciendo un papel antiaterogénico<sup>270,271</sup>. Este efecto beneficioso se consigue mediante una reducción en la actividad enzimática de CETP produciendo un intercambio lipídico neutral entre lipoproteínas ricas en TG y HDL-c y LDL-c<sup>255</sup>.

Por otro lado, la hiperlipemia postprandial se asocia con el SMet y contribuye a la formación de la placa de atheroma constituyendo un FRCV independiente<sup>272</sup>. Además, niveles elevados de TG en el postprandio afecta a la función endotelial causando una disminución de su capacidad vasomotora y ejerciendo un efecto aterogénico directo<sup>273</sup>. Puesto que el ser humano se encuentra la mayor parte del día en estado postprandial y las concentraciones elevadas de TG condicionan un mayor riesgo CV, mejorar esta situación forma parte del tratamiento integral del SMet. El descenso de los TG plasmáticos se considera más un efecto agudo del EF que no un efecto a largo plazo de un programa de entrenamiento, siendo la magnitud de su descenso tras una sesión de EF directamente proporcional al gasto energético e independiente de la intensidad del ejercicio<sup>274-276</sup>.

Distintos estudios han puesto de manifiesto que tanto un ejercicio de fuerza como uno aeróbico continuo o discontinuo mejoran la lipemia postprandial<sup>277,278</sup>. Sin embargo, mientras que en el ejercicio aeróbico el descenso de los niveles plasmáticos de TG dependen del gasto energético, parece que no es así cuando el programa de entrenamiento utilizado va encaminado a mejorar la fuerza<sup>279</sup>. Dado que los pacientes con SMet difícilmente consiguen adherirse a un programa estricto de EF y que el

descenso de la lipemia postprandial es directamente proporcional al gasto energético tras un EF aeróbico, es importante reconocer si tras un EF más liviano que induzca un pequeño gasto calórico (500 kilocalorías) se produce una respuesta lipémica postprandial favorable en individuos con SMet. En este sentido, un trabajo de Mestek ML<sup>280</sup> demuestra que un EF con escaso gasto energético induce un descenso de la lipemia postprandial y consecuentemente un descenso del riesgo CV en pacientes con SMet independientemente de la intensidad del ejercicio empleada. No obstante, este hecho que fue demostrado para un ejercicio aeróbico continuo, no fue reproducido tras un entrenamiento discontinuo. Sin embargo, aunque un trabajo<sup>278</sup> realizado sobre individuos sanos ha demostrado que un ejercicio aeróbico discontinuo (10 sesiones de 3 minutos de duración) es tan beneficioso como un entrenamiento continuo (sesión única de 30 minutos de duración) en la reducción de la lipemia postprandial, son necesarios más estudios en pacientes con SMet para generalizar esta recomendación.

En cuanto al mecanismo fisiológico por el cual se atenúa la respuesta postprandial parece que tras un ejercicio de fuerza se induce una sobreexpresión de lipoproteína lipasa (LPL) a nivel del grupo muscular entrenado<sup>279</sup>, mientras que tras un programa aeróbico se produce junto con una actividad LPL aumentada en músculo esquelético, un descenso en la secreción hepática de VLDL ricas en TG<sup>280</sup>.

La HTA es reconocida como un FRCV independiente y forma parte de las características clínicas del SMet. La mejora tensional a través del EF es bien conocida y se debe fundamentalmente a la mejora de la función endotelial y la reducción ponderal. Sin embargo, su asociación con una dieta hipocalórica potencia el efecto hipotensor a través de una mejora de la respuesta vasomotora dependiente del endotelio mediada por una reducción del estrés oxidativo y aumento tanto de la biodisponibilidad de NO como de la sensibilidad insulínica<sup>281</sup>.

Finalmente, en cuanto al estado de inflamación sistémica que acontece en el SMet, la realización de un programa de EF ejerce un efecto antiinflamatorio que se pone de manifiesto mediante la reducción de marcadores inflamatorios sistémicos como PCR y TNF $\alpha$ <sup>274</sup>. Distintos estudios epidemiológicos han mostrado descensos de PCR tras un entrenamiento, atribuyendo este efecto a la pérdida de masa grasa, aumento de la capacidad oxidativa del músculo esquelético e incremento en la producción de citoquinas antiinflamatorias por parte de células mononucleares<sup>282-284</sup>. En los últimos años, se ha señalado como un factor importante del efecto antiinflamatorio del EF la acción que ejerce el músculo esquelético sobre la liberación de IL-6. De este modo, esta citoquina ejerce su acción antiinflamatoria mediante varios mecanismos, por un lado, inhibe TNF $\alpha$  y favorece la liberación de su receptor soluble y, por otro, estimula la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y agonista del receptor de IL-1(IL-1RA)<sup>285-287</sup>. Aunque probablemente la liberación de IL-6 por parte del músculo esquelético en respuesta al ejercicio sea un mediador del efecto antiinflamatorio a largo plazo de la actividad física, son necesarios más estudios en esta área para poder confirmar estos hallazgos y encontrar mecanismos alternativos.

## 5.2. Ejercicio y función endotelial

El EF fue asociado primeramente a la mejora de la FE a partir de que Delp y colaboradores<sup>288</sup> publicaran a principios de los años noventa que 12 semanas de entrenamiento físico en ratas mejoraban la relajación endotelial en respuesta a la infusión de acetilcolina, un vasodilatador dependiente del endotelio. A partir de ello, una creciente cantidad de evidencias científicas continuaron mostrando el ejercicio como una potencial estrategia para la mejora de la FE.

Es bien conocido que la reducción en la bioactividad y/o biodisponibilidad del NO se relaciona con un deterioro de la FE en pacientes con SMet. En estos individuos, el estrés oxidativo explica el deterioro de la función vascular mediada por alteraciones en el sistema NO, de modo que durante el desequilibrio redox, el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) rápidamente reacciona inactivándolo y reduciendo la capacidad vasodilatadora del endotelio. Además, esta reacción conduce a la producción de peroxinitrito, un intermediario altamente reactivo que favorece la nitración de proteínas y el daño oxidativo de los lípidos circulantes, por lo que guarda una relación directa con la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad y la progresión del daño endotelial<sup>289</sup>. Por otra parte, la sobreproducción de  $O_2^{\cdot-}$  podría provocar la depleción de los sistemas antioxidantes endógenos, contribuyendo al deterioro de la FE y al proceso arteriosclerótico<sup>290</sup>. Existen distintas fuentes de producción de  $O_2^{\cdot-}$  a nivel endotelial, entre las que se encuentran principalmente: a) la actividad de células inmunitarias y las reacciones inflamatorias<sup>101</sup>, b) el complejo enzimático NAD(P)H oxidasa que cataliza la reducción del oxígeno molecular usando NAD(P)H<sup>291</sup>, y c) el sistema enzimático de la xantino oxidasa que cataliza la reducción de la hipoxantina a xantina durante el metabolismo de las purinas<sup>292</sup>. Además, diferentes hábitos de vida, como el tabaquismo y modelos dietéticos pobres en antioxidantes alimentarios o ricos en carbohidratos y/o grasas saturadas, pueden incrementar la producción de radicales libres provocando estrés oxidativo y deterioro de la FE<sup>289</sup>. En individuos con SMet, tanto la hipertrigliceridemia como hiperglucemia postprandial condiciona un deterioro de la función endotelial. Por un lado, la hipertrigliceridemia es uno de los principales fenómenos asociados al estrés oxidativo y a la reducción de la FE tras la ingesta aguda de comidas ricas en grasa saturada<sup>293</sup>, y por otro, la hiperglucemia ocasionada por la ingesta aguda de alimentos ricos en hidratos de carbono, así como aquella que ocurre crónicamente en DM2, es otro fenómeno asociado a la sobreproducción de  $O_2^{\cdot-}$  y a la disminución de la actividad de la eNOS y/o a la destrucción del NO disponible que condiciona el deterioro de la FE<sup>96</sup>.

### *a) Efectos agudos del ejercicio sobre la FE*

Se ha observado, tanto en jóvenes sedentarios como en aquellos físicamente entrenados, que una sesión única de ejercicio físico es suficiente para provocar un significativo incremento de la vasodilatación mediada por el flujo y de la biodisponibilidad de NO durante las siguientes 48 horas después de finalizado el esfuerzo<sup>294</sup>.

Este incremento en la respuesta dilatadora del endotelio parece estar determinado por dos efectos diferentes del ejercicio pero estrechamente relacionados entre sí: por un lado, estaría el potente estímulo mecánico que provoca el ejercicio sobre la pared vascular, por otro, el incremento de las necesidades metabólicas en los músculos activos que precisan de la captación de sustratos energéticos para mantener la contracción de las fibras. En ambos fenómenos, el NO parece tener el papel principal para determinar la respuesta endotelial frente al ejercicio, tal como fue demostrado a partir del incremento agudo en la síntesis y utilización de NO durante e inmediatamente después del ejercicio físico<sup>96</sup>.

#### *a-1) Efecto mecánico o físico provocado por el ejercicio*

Durante el ejercicio se produce un incremento en la velocidad del flujo sanguíneo a través de los vasos, lo cual provoca un aumento de las fuerzas de fricción sobre la pared vascular, de modo que el estrés mecánico resultante de este fenómeno está directamente relacionado con la velocidad y viscosidad de la sangre<sup>295</sup> y se constituye como el principal estímulo para la producción endotelial aguda de NO que tiene como objetivo incrementar proporcionalmente el diámetro del vaso. A nivel molecular, el estrés mecánico provoca un incremento en la transcripción del ARNm y proteína de la eNOS que, junto con la acumulación de nitritos (un compuesto estable que resulta de la degradación del NO), incrementan la capacidad que tiene la célula expuesta al estímulo de producir NO y subsiguientemente la dilatación del vaso<sup>296</sup>.

La intensidad del estrés mecánico generado es, por lo tanto, proporcional a la duración e intensidad del ejercicio físico realizado, así como a la masa muscular involucrada en el esfuerzo<sup>297</sup>. Además, el tipo de ejercicio también modula de forma directa la intensidad de las fuerzas de fricción y por consiguiente la producción del NO<sup>298,299</sup>.

#### *a-2) Efecto metabólico provocado por el ejercicio*

Durante el ejercicio el NO es también un potencial modulador del metabolismo del músculo esquelético que favorece la captación celular de combustibles como la glucosa. En este sentido, diferentes estudios realizados tanto en hombres como animales han observado que el incremento en la síntesis de NO durante el ejercicio responde a la necesidad del músculo de preservar las reservas energéticas favoreciendo la entrada de glucosa al músculo<sup>300,301</sup>. No obstante, los mecanismos exactos que explican la captación de glucosa mediada por el NO son aún parcialmente comprendidos, aunque se sabe que actúan de forma independiente y paralela a los mecanismos inducidos por la insulina (como la activación de los GLUT4) y que no resultan significativamente afectados cuando se inhibe experimentalmente la NOS<sup>302</sup>.

Por otra parte, diferentes estudios en vasculatura coronaria y periférica sugieren que tanto un ejercicio aeróbico como un entrenamiento de fuerza induce un remodelado de la pared vascular aumentando el calibre de la misma de forma crónica, siendo el NO

el principal agente causal de este proceso<sup>303</sup>. Sin embargo, el aumento del flujo y de la función endotelial objetivado tras un entrenamiento aeróbico no se reproduce tras un ejercicio de fuerza aunque sí se pone de manifiesto una disminución de las resistencias periféricas<sup>304</sup>.

#### *b) Efectos crónicos del ejercicio sobre la FE*

El incremento de los niveles de actividad física y de la capacidad cardiorrespiratoria inducida por el ejercicio está directamente relacionado con la reducción de la morbilidad y mortalidad por enfermedad coronaria. Entre los posibles mecanismos que determinan estos beneficios del ejercicio en la población general se encuentra la mejora de la FE<sup>305</sup>. En este sentido, Clarkson y colaboradores<sup>306</sup> observaron un significativo incremento de la vasodilatación dependiente del endotelio en la arteria braquial de individuos jóvenes y saludables tras realizar un programa de 10 semanas de entrenamiento de moderada intensidad que incluyó ejercicios aeróbicos (4,8 km de trote por día) y anaeróbicos (ejercicios de fuerza del hemicuerpo superior). Esta observación en una población saludable fue posteriormente reforzada por el hallazgo de una significativamente mayor vasodilatación mediada por el endotelio en adultos mayores (entre 61 a 83 años) con un alto nivel de entrenamiento físico ( $> 40 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  de  $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) con relación a sus pares sedentarios ( $\leq 27 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  de  $\text{VO}_{2\text{max}}$ )<sup>307</sup>. Resulta relevante destacar que en estos estudios el tipo de ejercicio analizado siempre condicionaba un significativo esfuerzo de los miembros inferiores, con un efecto vasodilatador que evidentemente no se limitó solamente a los vasos próximos a la masa muscular activa. Estas evidencias sugieren por lo tanto que la actividad local de grupos musculares del hemicuerpo inferior constituye un potente estímulo para el NO a nivel del cuerpo entero; y en consecuencia demuestra la importancia de las fuerzas físicas (como la elevación de la frecuencia cardíaca, presión sanguínea, viscosidad de la sangre etc.) que este tipo de deportes inducen sobre el lecho vascular en tejidos no necesariamente activos.

Sin embargo, otros estudios también han demostrado que algunos tipos de ejercicio físico localizado, por ejemplo aquellos que usan el hemicuerpo superior y en particular un solo brazo, no resultan suficientes para modificar la función endotelial periférica en sujetos sanos<sup>308,309</sup>. Esta ausencia de beneficios podría tener diferentes explicaciones, como un insuficiente estímulo mecánico derivado de la pequeña masa muscular reclutada y por consiguiente de la ocurrencia de fenómenos hemodinámicos de menor intensidad<sup>297</sup>. Además, la duración del programa de entrenamiento experimental y la trayectoria deportiva de los sujetos estudiados también podrían provocar una normalización estructural del estrés mecánico que induce el ejercicio y producir la ausencia de beneficios en términos de FE.

En otro sentido, hay evidencia científica suficiente que demuestra que la práctica regular de un programa de ejercicio físico mejora significativamente la FE en individuos con síndrome metabólico<sup>310</sup>. En estas condiciones, hay dos mecanismos principalmente que podrían explicar la mejora de FE mediada por el ejercicio de forma independiente

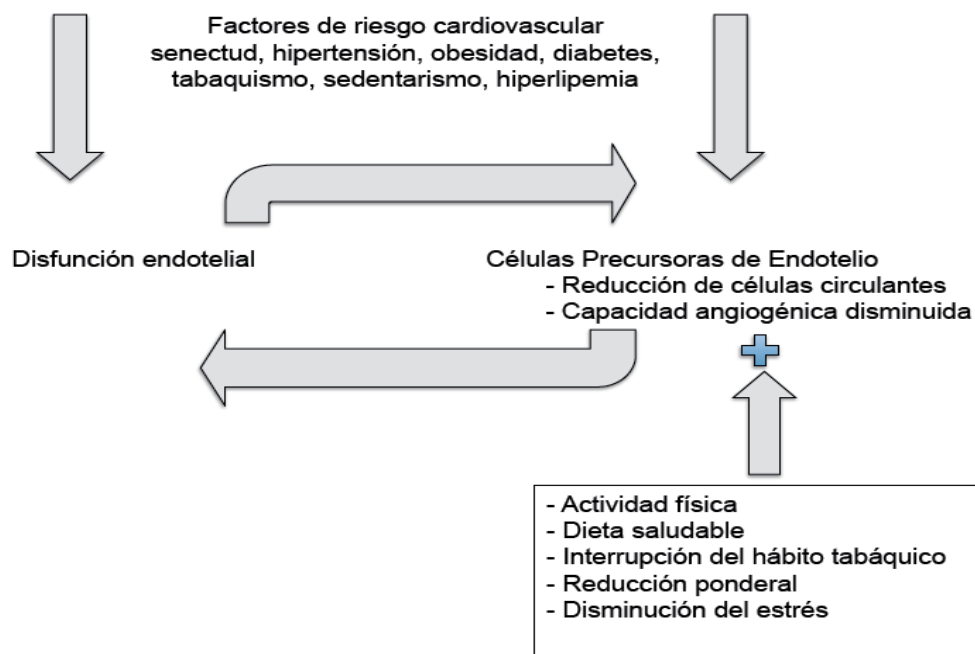
al cambio de los FRCV; por un lado, el ejercicio produciría una mejora en la síntesis y biodisponibilidad del NO<sup>311</sup> y, por otro, una significativa reducción de la lipemia postprandial, lo que favorecería no sólo una atenuación de la disfunción endotelial en el postprandio, sino también de aquella que ocurre incluso varias horas después de haber sido realizada la ingesta de una comida rica en grasas y carbohidratos<sup>276</sup>.

### 5.3. Ejercicio y células precursoras de endotelio

Estudios recientes muestran que una adecuada función vascular no sólo depende de la integridad de las células residentes dentro de la pared vascular, sino que también existe otro linaje celular procedente de la médula ósea (CPEs) que modula su función. En este sentido, se ha demostrado recientemente la importancia de las CPEs en el potencial regenerativo del endotelio, debido a que tras su producción en la médula ósea migran a través de la circulación sistémica hacia los sitios de lesión o recambio tisular para reemplazar a las células agudamente dañadas o muertas del endotelio vascular<sup>312</sup>. Además, las CPEs tienen la capacidad de modular diferentes procesos complejos de regeneración endotelial y miocárdica, como la angiogénesis, miogénesis y apoptosis de cardiomiocitos<sup>313</sup>. Por ello, el potencial regenerativo de las CPEs no solo funciona para restituir el daño celular agudo, sino también como un mecanismo dinámico de protección vascular a largo plazo, favoreciendo la FE y previniendo la arteriosclerosis y las ECV<sup>312</sup> (**figura 4**).

Por otro lado, sabemos que la acumulación de distintos FRCV (HTA, DM2, dislipemia, etc), hecho que habitualmente acontece en el SMet, se relaciona inversamente con el número de CPEs<sup>120</sup> circulantes. Este hecho se produce fundamentalmente por tres circunstancias: a) reducción en la movilización de estas células desde la médula ósea (disponibilidad de CPEs), b) incremento del área vascular sometida a lesiones (necesidad de CPEs) y, c) reducción en la vida media de las CPEs circulantes; condicionando todo ello un mayor riesgo de ECV<sup>314</sup>. Por todo esto, la realización de un programa de EF condiciona un menor riesgo CV mediante una mayor disponibilidad de CPEs secundaria a la atenuación de los distintos factores de riesgo (**figura 4**).

**Figura 4.** Influencia de los factores de riesgo cardiovascular sobre las CPEs y la función endotelial<sup>129</sup>



En individuos sanos existe evidencia de que la práctica regular de EF aeróbico previene el deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio asociada al envejecimiento por medio de su acción sobre las CPEs<sup>315</sup>. Así pues, estudios animales<sup>316</sup> muestran que un programa de entrenamiento regular incrementa el número y mejora la funcionalidad de esta estirpe celular por un mecanismo dependiente del NO que interacciona con su señal apoptótica. Resultados similares se obtuvieron en estudios en humanos donde la práctica de EF en individuos sanos condicionaba una mejora en el número y capacidad migratoria de las CPEs<sup>317</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que el cese del entrenamiento en personas mayores activas condiciona un descenso importante de las CPEs circulantes<sup>318</sup>.

En prevención secundaria, hoy día está bien documentado que la actividad física incrementa el número y mejora la funcionalidad de las CPEs en pacientes con ECV. Distintos trabajos ponen de manifiesto que el entrenamiento aeróbico en individuos con patología isquémica (enfermedad coronaria o enfermedad arterial periférica)<sup>319</sup> e insuficiencia cardíaca<sup>320</sup> induce una mejora de la función endotelial a través de un incremento del número y migración de las CPEs desde la médula ósea hacia el tejido dañado. Este proceso migratorio es mediado por distintas citoquinas angiogénicas (VEGF y factor derivado del estroma celular o SDF-1 $\alpha$ ) que son liberadas por el tejido hipóxico. Sin embargo, todo el efecto beneficioso de la actividad física es revertido



cuando el entrenamiento cesa, por lo que la mejora sostenida de la función endotelial depende del mantenimiento de un programa de ejercicio físico a largo plazo<sup>129</sup>.

De este modo, el EF ejerce una influencia positiva sobre las CPEs por medio de diversos mecanismos como: a) aumento de su número en médula ósea, sangre periférica y bazo en ratones, b) regulación positiva de estas células dependiente en parte de eNOS y VEGF, c) disminuye el ratio de apoptosis prolongando su vida media, d) mejora la neoangiogénesis, e) disminuye la formación de neoíntima (revestimiento interior vascular) tras un daño vascular y, f) tras 28 días de entrenamiento, existe una regulación positiva del número de CPEs circulantes en individuos con enfermedad coronaria<sup>129,316</sup>.

Contrariamente, hay suficiente evidencia que demuestra que la práctica de ejercicio físico se relaciona con un menor riesgo CV, aparentemente debido a una mayor capacidad regenerativa del endotelio. Esta hipótesis es apoyada por algunos estudios de intervención con programas de ejercicio físico en poblaciones de pacientes con enfermedad coronaria que han demostrado que la práctica sistemática de EF incrementa los niveles y funcionamiento de las CPEs. Sin embargo, existen pocos estudios con diferentes protocolos de ejercicio y variedad de poblaciones, por lo que se conoce poco sobre cuál puede ser un protocolo efectivo de ejercicio para incrementar el número de CPEs en sujetos con niveles reducidos y, por consiguiente, con riesgo CV elevado. De igual modo, no existen hasta la fecha suficientes datos en pacientes con SMet que permitan conocer cuál es el efecto de un programa de EF sobre la disponibilidad de CPEs. Además, aunque resulte lógico esperar que este tipo de intervenciones mejoren los niveles reducidos de CPEs en estos pacientes, se desconoce cuáles podrían ser los mecanismos que medien este efecto y cuál es la relación de esta mejora con el incremento de la capacidad cardiorrespiratoria en este grupo de pacientes. Paralelamente, en varios estudios realizados en seres humanos se ha observado que la mejora del estado oxidativo<sup>235,241</sup>, así como la reducción del peso corporal<sup>321</sup> y la mejora del perfil lipídico<sup>322</sup>, pueden incrementar significativamente el nivel de CPEs en pacientes que acumulan diversos factores de riesgo CV. Si bien estos estudios han investigado el comportamiento de los niveles de CPEs tras diferentes estrategias dietéticas o fármacos, resulta lógico pensar que los mismos estímulos, pero provocados por el ejercicio, pueden ser los responsables del efecto sobre la liberación de las CPEs. Además, determinados fenómenos metabólicos específicos provocados por cada sesión de ejercicio físico, como la isquemia fisiológica de algunos tejidos<sup>323</sup> y el incremento en la producción de NO tras el esfuerzo, tienen un demostrado efecto positivo sobre los niveles circulantes de CPEs.

### **III. HIPÓTESIS DE TRABAJO**



El síndrome metabólico (SMet) es una entidad patológica poligénica caracterizada por la coexistencia de varios FRCV como son la RI, HTA, incremento de los TG plasmáticos, descenso de los niveles de HDL-c y obesidad central. Los FRCV son capaces de provocar daño endotelial progresivo y una significativa disminución en el nivel de CPEs circulantes<sup>120</sup>. Este fenómeno provoca un desequilibrio entre los mecanismos de regeneración endotelial y muerte celular, deteriorando la protección vascular a largo plazo. Consecuentemente, la disminución de CPEs, se correlaciona con un mayor empeoramiento de la función endotelial y un incremento aún mayor del riesgo CV tal como se ha demostrado en estudios recientes <sup>314</sup>.

Varias dietas hipocalóricas, con distinta proporción de nutrientes, han sido estudiadas en pacientes con SMet. Se ha demostrado que la mejora de los factores de riesgo presentes en el SMet no solo depende de la proporción de nutrientes, como grasas y carbohidratos, sino también de distintos compuestos minoritarios de la dieta, como los antioxidantes y compuestos biológicamente activos presentes en alimentos específicos. Por ello, un creciente interés ha surgido recientemente sobre el efecto de la dieta mediterránea en los distintos componentes del SMet<sup>200</sup>. En esta línea, varios trabajos han mostrado que la ingesta a largo plazo de una dieta mediterránea mejora tanto los FRCV asociados al SMet como la función endotelial<sup>200,229</sup>.

Por otro lado, el ejercicio físico es considerado en la actualidad un pilar fundamental en el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico<sup>324</sup>. Así pues, se ha demostrado que la realización de ejercicio físico regularmente favorece, por un lado, la pérdida de peso y, por otro, mejora la RI<sup>325</sup>. Además, el entrenamiento ejerce otros efectos beneficiosos, de manera que mejora el control de la lipemia postprandial<sup>247</sup> y reduce tanto el estrés oxidativo como la respuesta inflamatoria sistémica<sup>249</sup>. Sin embargo, la mayoría de los protocolos de ejercicio diseñados para pacientes obesos o con síndrome metabólico utilizan ejercicios constantes, regulares y de baja intensidad, como por ejemplo, caminar o footing. En estos programas, el ejercicio de baja intensidad que puede ser realizado por pacientes con síndrome metabólico quienes eran previamente sedentarios puede resultar insuficiente para inducir una adaptación cardiometabólica significativa<sup>326</sup>. Por esta razón, otra alternativa puede ser la realización de ejercicios de moderada-alta intensidad desde el inicio del programa de entrenamiento. Aunque no existen datos sobre los efectos de estos tipos de programas sobre la capacidad regenerativa del endotelio; estudios recientes han mostrado que un ejercicio físico de alta intensidad induce una mejoría mayor en la capacidad cardiorrespiratoria, masa grasa y tolerancia glucémica, comparado con ejercicios físicos de baja intensidad<sup>327,328</sup>.

Basados en estos hechos, pretendemos demostrar que un modelo de dieta mediterránea hipocalórica asociada a un programa de ejercicio aeróbico progresivo de moderada/alta intensidad (MEDE) mejora más la capacidad regenerativa del endotelio en pacientes con síndrome metabólico, a través de un incremento en el número de CPEs, que un tratamiento basado sólo en dieta mediterránea hipocalórica (MED). Además, el tratamiento con ejercicio aportaría mayores beneficios sobre la capacidad

cardiorrespiratoria y los FRCV de estos pacientes que podrían explicar el aumento de las CPEs. Para ello se administrarán un modelo de dieta mediterránea hipocalórica o un modelo de dieta mediterránea hipocalórica asociada a un programa de ejercicio aeróbico progresivo de moderada/alta intensidad a dos grupos de pacientes con síndrome metabólico, obesidad abdominal y previamente sedentarios.

## **IV. OBJETIVOS**



### **1. OBJETIVO PRINCIPAL**

- Estudiar el efecto de un modelo de dieta mediterránea hipocalórica, asociada o no a un programa de ejercicio aeróbico progresivo de moderada/alta intensidad, sobre los niveles de células precursoras endoteliales y sobre la capacidad cardiorrespiratoria en pacientes sedentarios con SMet.

### **2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Comparar la efectividad de un modelo de dieta mediterránea hipocalórica, con o sin un programa de ejercicio aeróbico progresivo de moderada/alta intensidad, sobre la función endotelial en pacientes sedentarios con SMet.
- Comparar los beneficios de un modelo de dieta mediterránea hipocalórica, con o sin un programa de ejercicio aeróbico progresivo de moderada/alta intensidad, sobre los factores de riesgo cardiometabólicos en este grupo de pacientes.





## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. POBLACIÓN**

### **1.1. Proceso de selección de la muestra**

La población final consistió en 45 voluntarios (67% mujeres: n=30 y 33% hombres: n=15) con obesidad central y al menos tres criterios definitorios de síndrome metabólico según el panel de expertos de la *NCEP:ATP-III*<sup>16</sup>. Estos sujetos con edades comprendidas entre 50 y 66 años ( $57.92 \pm 5$  años) fueron seleccionados entre 150 voluntarios procedentes del área de consultas externas de la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía entre septiembre de 2009 y julio de 2010. Antes de ser admitidos, a todos los candidatos se les realizó una historia clínica completa, recogiendo información sobre el estilo de vida (actividad física, consumo de tabaco, bebidas con alcohol, té y café, tipo de alimentación habitual), antecedentes familiares (especialmente en relación con ECV precoz), antecedentes personales y consumo de medicamentos, suplementos o complejos vitamínicos; así como una exploración física exhaustiva recogiendo datos antropométricos (peso, altura, IMC, perímetro de cintura) y de presión arterial junto con varias determinaciones analíticas básicas.

A todos los sujetos se les hizo entrega de un consentimiento informado previo a la participación en el estudio. Del mismo modo, el protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

### **1.2. Cálculo del tamaño muestral**

El cálculo del tamaño muestral se realizó en base a las siguientes asunciones tomadas de nuestros estudios previos:

- Variable principal del estudio: número de células precursoras de endotelio circulantes
- Desviación estándar de la variable principal del estudio: 2.5
- Diferencia mínima esperada: 5 %
- Riesgo alfa = 0,05
- Potencia  $(1-\beta) = 0,90$
- Pérdida muestral en cada grupo= 10%

En base a estas premisas se precisan al menos 10 pacientes en cada grupo de estudio.

### **1.3. Criterios de inclusión**

1. Edad entre 50 y 70 años.
2. Hombres y mujeres.

Y al menos 3 de los siguientes criterios:

1. IMC  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup> o perímetro de cintura > 88 cms (mujeres) ó 102 cms (hombres).
2. Concentración plasmática de glucosa en ayunas mayor 100 mg/dL.
3. Concentración plasmática de triglicéridos (TG) en ayunas  $\geq 150$  mg/dL ó concentración plasmática de HDL-c < 40 mg/dL(hombres) y < 50 mg/dL (mujeres).
4. Cifras de tensión arterial sistólica y/o diastólica mayores de 130 y 85 mmHg respectivamente o estar recibiendo tratamiento antihipertensivo.

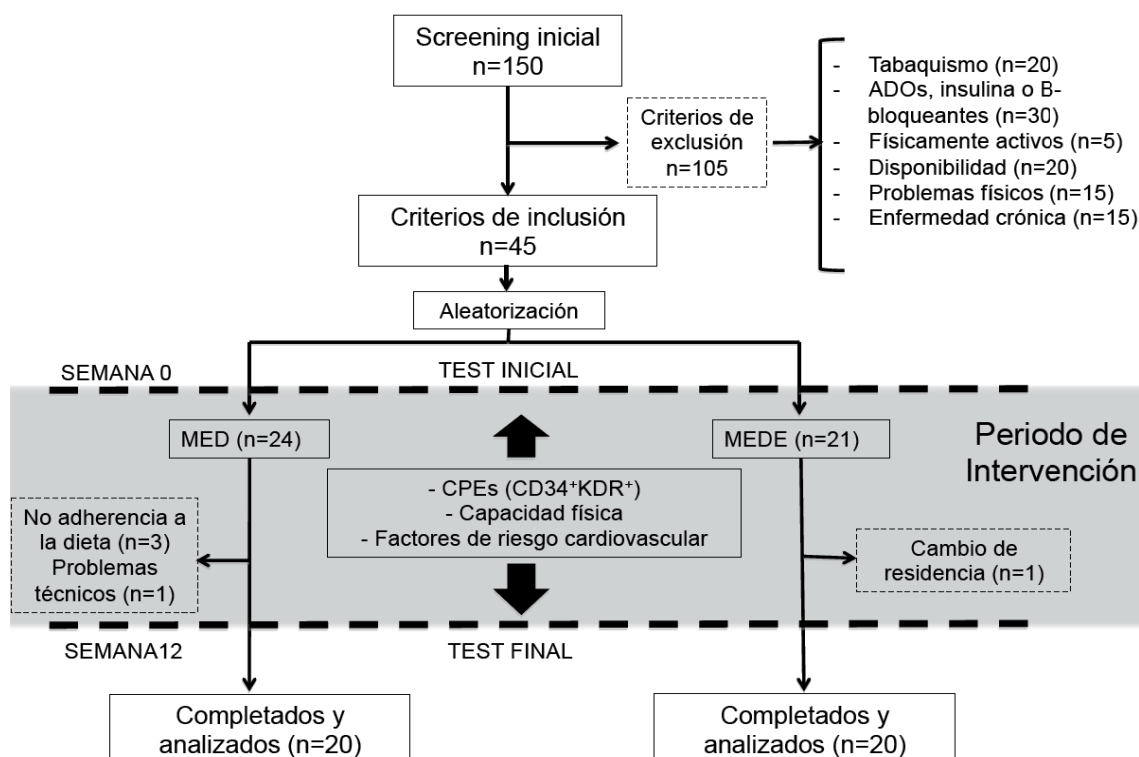
#### **1.4. Criterios de exclusión**

1. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
1. Consumo habitual de tabaco, complejos vitamínicos o más de 20 gr de alcohol al día.
2. Mostrar evidencia de enfermedad crónica (insuficiencia cardiaca, cardiopatía isquémica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia renal o hepática, diabetes tipo I o II y arteriopatía periférica)
3. Tratamiento con B-bloqueantes, insulina o antidiabéticos orales.
4. Práctica regular de ejercicio físico.
5. Incapacidad funcional para la realización de ejercicio o dolor intenso incapacitante.
6. Viajes en los próximos tres meses del inicio del estudio o falta de disponibilidad por las tardes.
7. Realización de un programa para la pérdida de peso en los seis meses previos al inicio del estudio.

## 2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Todos los sujetos reclutados para el estudio se asignaron de forma aleatoria a una de dos posibles intervenciones experimentales con una duración de 3 meses cada una. Por un lado, los participantes del primer grupo realizaron una dieta hipocalórica tipo mediterránea con un aporte normal de proteínas (MED), mientras que el segundo grupo cumplió las mismas recomendaciones dietéticas pero además realizó simultáneamente un programa de ejercicio físico de moderada a alta intensidad (MEDE). Ambos grupos fueron supervisados durante todo el periodo de intervención por nutricionistas y médicos a través de llamadas telefónicas semanales y entrevistas personales realizadas mensualmente a los participantes para promover la adherencia y adecuada implementación de los programas. Un registro dietario de la ingesta alimentaria de tres días, un cuestionario de frecuencia de ingesta cuali-cuantitativa de 132 alimentos y una versión española validada del cuestionario de actividad física empleado en el estudio *Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study*<sup>329</sup> fueron utilizados para estimar la ingesta dietética y el nivel de actividad física de los participantes al inicio y final del estudio. Por otro lado, la evaluación de los niveles de células precursoras del endotelio (CPEs), función endotelial, factores de riesgo cardiometabólicos, parámetros antropométricos y nivel de entrenamiento físico también se realizó antes y después de cada intervención.

**Figura 1.** Esquema general del diseño de investigación



*MED: dieta hipocalórica mediterránea; MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociado a un programa supervisado de entrenamiento; CPE: células precursoras de endotelio; ADO: antidiabéticos orales*



### **3. INTERVENCIÓN DIETÉTICA**

En primer lugar, a todos los voluntarios se les administró un cuestionario cuantitativo/cualitativo de frecuencia de ingesta alimentaria de los 12 meses previos al inicio del estudio para identificar los hábitos alimentarios y, así, poner de manifiesto los alimentos que debían ser sustituidos. También, al inicio y fin del estudio, los participantes fueron entrevistados por una nutricionista usando un registro de la ingesta alimentaria de 3 días (2 días entre semana y 1 día de fin de semana), según el método de diario alimentario y pesaje de alimentos. El análisis de los registros alimentarios se llevó a cabo utilizando un programa de análisis dietario (Dietsource version 2.0; Novartis SA, Barcelona, España).

A continuación, en ambos grupos (MED/MEDE), todos los voluntarios fueron informados sobre el patrón de dieta mediterránea, siendo aconsejados sobre grupos alimentarios específicos de este modelo dietético de forma que se les pidió que siguieran un plan alimentario específico diario y semanal. Basado en las necesidades energéticas y en la ingesta alimentaria de energía, se les prescribió una dieta hipocalórica típica mediterránea cuyo contenido calórico fue calculado en base a una restricción de 500 kcal o un aporte equivalente al 60% de su ingesta calórica previa para promover la pérdida de peso. Esta reducción calórica del 40% se hizo de forma progresiva, el primer mes se redujo un 20%, mientras que en el segundo y tercer mes la reducción fue del 10%. Para asegurar el cumplimiento de los requerimientos energéticos individuales se utilizaron réplicas de alimentos de alta calidad y fotografías para explicar a los participantes el tamaño de las porciones y la frecuencia de consumo diario de cada grupo alimentario. Los objetivos dietéticos en términos de porcentaje de macronutrientes fue el siguiente: 50% carbohidratos, 30% lípidos ( 20% monoinsaturados, 5% saturados y 5% poliinsaturados) y aproximadamente un 20-22% de proteínas. En este sentido, se instruyó a todos los participantes para realizar un consumo de 0.8 gr proteínas/kg/día durante toda la intervención para mantener una ingesta proteica normal.

Todos los planes dietéticos incluyeron la recomendación de consumo diario de aceite de oliva virgen, vino tinto, cereales enteros, productos lácteos desnatados, ensaladas, frutas y almendras crudas. El aceite de oliva constituyó la principal fuente de grasa, siendo este el objetivo fundamental del patrón dietético mediterráneo. Por otro lado, los participantes recibieron recomendaciones dietéticas para eliminar o reducir en gran medida el consumo de fritos, carnes grasas y procesadas, caramelos, bebidas edulcoradas, tartas y azúcares. El cumplimiento del patrón de dieta mediterránea durante todo el estudio se valoró mediante un cuestionario validado de adherencia a la dieta típica Mediterránea de 14 items<sup>330</sup> que fue cumplimentado por los voluntarios cada 4 semanas. El objetivo de este cuestionario fue también reforzar la selección y consumo de alimentos y preparaciones claves del patrón dietético mediterráneo.





#### **4. INTERVENCIÓN CON EJERCICIO FÍSICO DE MODERADA A ALTA INTENSIDAD**

El entrenamiento durante las 12 semanas consistió en tres sesiones semanales, dos de ellas supervisadas por personal especializado en el laboratorio, y una tercera no supervisada en su domicilio. En el entrenamiento supervisado se utilizaron dos ergómetros diferentes; un cicloergómetro para fortalecer miembros inferiores (Technogym Recline 500™, Gambettola, Italy), y un ergómetro de brazo (Technogym Ecxite™ 700, Gambettola, Italy) para entrenar los miembros superiores. Por otro lado, el entrenamiento no supervisado consistió en una caminata continua al aire libre. En todas las sesiones los sujetos utilizaron un monitor de frecuencia cardiaca (Polar Electro, FS1™, Kempele, Finland) para alcanzar la intensidad de ejercicio prescrita.

##### **4.1. Sesiones de ejercicio supervisado**

En estas sesiones, los sujetos debían realizar un ejercicio discontinuo que incluía series al 80% de la frecuencia máxima ( $F_{cmax}$ ) e intervalos de recuperación activa al 50%  $F_{cmax}$ . La duración de las fases de recuperación se establecieron con una progresión decreciente a lo largo de las 12 semanas del programa. El objetivo de las sesiones de ejercicio discontinuo era conseguir que al final del periodo de intervención el sujeto fuera capaz de realizar un ejercicio continuo de moderada a alta intensidad durante 30 minutos. Por otro lado, con el objeto de no interrumpir las sesiones de entrenamiento a causa de fatiga localizada, cada sesión se realizó con diferentes ejercicios que incluían el pedaleo de brazos y piernas con cicloergómetro y ergómetro de brazo respectivamente. Los detalles del protocolo utilizado en el ejercicio supervisado se muestran en la **tabla 1**.

##### **4.2. Sesiones de ejercicio no supervisado**

Estas sesiones consistían en un ejercicio continuo aeróbico (caminata continua) prescrito de forma que tanto la intensidad como la duración del mismo aumentaba según pasaban las semanas durante el periodo de intervención, tal y como muestra la **tabla 1**. Todos los individuos fueron instruidos para detener el entrenamiento en el caso de presentar dolor torácico u otra sintomatología relevante. Además, todos los sujetos recibieron información de la frecuencia cardiaca que debían mantener en cada sesión de entrenamiento; así como un registro sobre la percepción del esfuerzo experimentada por ellos durante el ejercicio, y que debía ser completado usando la escala de Borg. Finalmente, toda la información fue analizada en el laboratorio ( $F_{cmax}$ , puntuación de Borg, etc) para comprobar que tanto la intensidad como la duración del ejercicio correspondían con la prescrita para cada sesión.

**Tabla 1.** Protocolo de ejercicio supervisado y domiciliario

		<b>Ejercicio supervisado (2/semana)</b>		<b>Ejercicio domiciliario (1/semana)</b>	
		[cicloergómetro (10min) - ergómetro de brazo (10min) - cicloergómetro (10min)]		Caminata continua	
<b>Semana</b>	<b>Series<sup>a</sup></b>	<b>Recuperación activa<sup>b</sup></b>	<b>Duración de la sesión</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Duración de la sesión</b>
1	6 x 1 min	4 min	30 min	65%	25 min
2	6 x 1.5 min	3.5 min			30 min
3	6 x 2 min	3 min			30 min
4	6 x 2.5 min	2.5 min			30 min
5	6 x 3 min	2 min		70%	35 min
6	6 x 3.5 min	1.5 min			40 min
7	6 x 4 min	1 min			45 min
8	6 x 4.5 min	0.5 min			50 min
9	3 x 7 min	3 min		75%	45 min
10	3 x 8 min	2 min			50 min
11	3 x 9 min	1 min			55 min
12	1 x 30 min	0 min			60 min

<sup>a</sup> Intensidad de ejercicio del 80% de la frecuencia cardiaca máxima<sup>331</sup> para el cicloergómetro y ergómetro de brazo; <sup>b</sup> Recuperación activa a una intensidad del 50% de la frecuencia cardiaca máxima.

## **5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS, PROCESAMIENTO Y DETERMINACIONES**

En cada periodo de evaluación (inicio y final del tratamiento con dieta o dieta más ejercicio) los sujetos asistieron a la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía, donde se les realizó la recolección de muestras basales de sangre y orina de cada paciente. Después de cada extracción sanguínea, se procedió a la separación del plasma mediante ultracentrifugación (2500 rpm, 4°C, 15 minutos). Posteriormente, para evitar las variaciones interensayo, todas las muestras de plasma y orina fueron guardadas alicuotadas en un congelador a -80°C. En cada periodo se realizó además un análisis de la composición corporal mediante Impedanciometría Bioeléctrica y un perfil antropométrico completo (incluyendo la determinación de % de grasa corporal y % de masa muscular). La presión sanguínea y la frecuencia cardiaca de reposo fueron también determinadas en cada grupo tras 15 minutos de reposo, registrando la media de tres mediciones en decúbito supino utilizando un monitor de presión arterial oscilométrico (Omron M3™, Rosny-sous-Bois Cedex, Francia).

### **5.1. Determinaciones bioquímicas**

#### **5.1.1. Perfil lipídico**

Se analizaron las concentraciones de colesterol total, LDL-c, HDL-c, TG y apoproteínas A-I y B usando un autoanalizador modular DDPPII Hitachi (Roche, Basilea, Suiza) con reactivos de la casa comercial Boehringer-Mannheim. Las determinaciones de colesterol y TG se realizaron mediante test enzimáticos colorimétricos, con los métodos CHOP-PAP y GPO-PAP, utilizando un calibrador universal (Roche, Basilea, Suiza) y controles ciegos (Vitro). Para la determinación de HDL-c se usó un método enzimático colorimétrico tras precipitación con polietilenglicol 6000 (Peg-6000). El valor de LDL-c fue calculado mediante la fórmula de Friedewald.

#### **5.1.2. Glucemia e insulinemia**

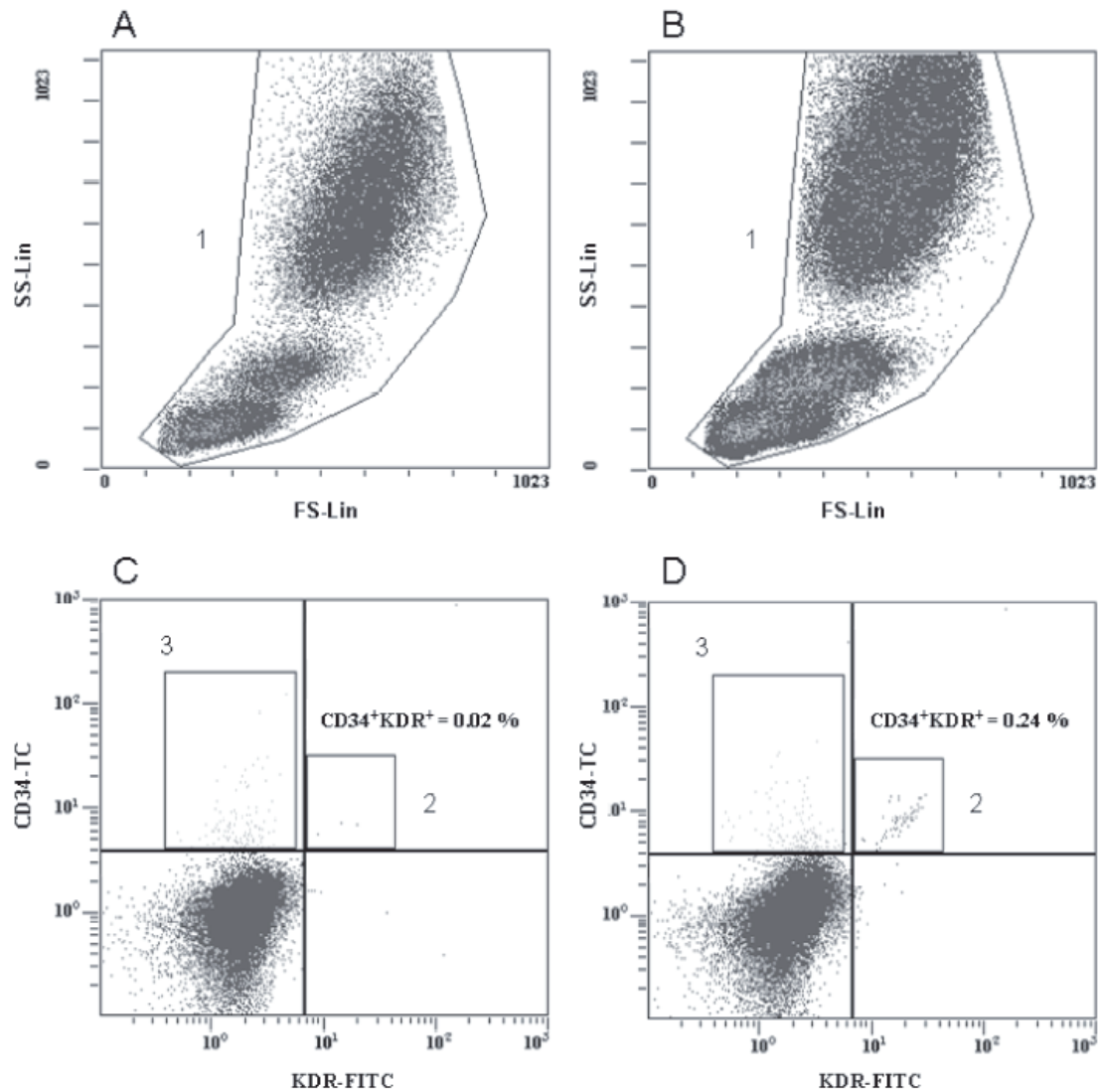
La concentración plasmática de glucosa fue determinada por espectrofotometría usando un analizador modular (ISE-4-DDPPEEPP. Hoffman-La Roche®, Basel, Switzerland). Los niveles plasmáticos de insulina fueron medidos por inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes usando un analizador (Architect i-4000Abbott®, Chicago, IL, USA). Con los valores de glucemia e insulinemia se calculó el valor del índice HOMA-IR según la fórmula:  $\text{Glucemia en ayunas [(mmol.L-1) x insulinemia (\mu\text{U. mL-1})/22.5]}$ , para valorar la función de la célula  $\beta$  y la resistencia a la insulina.

### **5.2. Células precursoras del endotelio**

Las células precursoras del endotelio son extremadamente raras en sangre periférica, representando entre el 0.01 y 0.0001% del total de células mononucleares periféricas<sup>332</sup>.

Para la determinación del número de CPEs (CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>) por citometría de flujo, se incubaron 100  $\mu$ L de sangre total durante 20 minutos a 4°C, y se realizó un doble marcaje con 10  $\mu$ L de anticuerpos monoclonales, *Conjugated Antihuman-CD34 Tri-color* (CD34-TC, Invitrogen, Frederick MD 21704, USA) y *Conjugated Antihuman-KDR Fluorescein Isothiocyanate* (FITC, R&D, Minneapolis, MN 55413, USA). Esta suspensión fue incubada durante 15 minutos con 2 mL de Versalyse (Beckman Coulter, Parkland, Washington, USA) para producir la lisis de glóbulos rojos y plaquetas y las células obtenidas fueron analizadas usando un citómetro de flujo (Beckman Coulter FC500, Parkland, Washington, USA). Cada análisis incluyó la adquisición de 150.000 eventos. Aquellas células con fenotipo CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> fueron consideradas como CPEs y cuantificadas por millón de células de sangre periférica (**figura 2**). Todos los datos fueron analizados usando un software provisto por la casa comercial (CXP analysis software 2.2, Beckman Coulter, USA).

**Figura 2.** Ejemplo de citogramas construidos para la cuantificación de CPEs en un sujeto del estudio antes (*plots A y C*) y después (*plots B y D*) de las 12 semanas de intervención.



La distribución general de todas las poblaciones celulares en las muestras de sangre evaluadas, se observa en el área 1 de los plots A y B. En el área 2 de los plots C y D se muestran las células con marcaje positivo doble para CD34 y KDR (definidas como CPEs) y en el área 3 de los mismos plots se observan aquellas células positivas sólo para CD34. CD34-TC: Conjugated Antihuman-CD34 Tri-color; FITC: antihuman-KDR Fluorescein isothiocyanate.

### 5.3. Estudio de la Función Endotelial microvascular

Un equipo de flujometría Periflux 5000 *láser-doppler* monitor (Perimed AB, Stockholm, Sweden) fue utilizado para medir la hiperemia reactiva post-isquemia (HRPi) antes y después del tratamiento con dieta y/o ejercicio. La HRPi es un parámetro relativamente sencillo capaz de mostrar cambios en la reactividad endotelial microvascular en condiciones basales<sup>333</sup>. Para su medición, se ubicó al paciente en posición supina y

en una habitación térmicamente estable (20°C-22°C), y a continuación se le colocó un manguito (HG Erkameter 300, Germany) 5cm por encima del codo del brazo dominante, mientras que el lector láser se adhiere a la superficie palmar del segundo dedo de la misma mano. Seguidamente se insufló el esfigmomanómetro hasta alcanzar una tensión entre 200-220 mm Hg. Se mantuvo de este modo cuatro minutos ( $t_i$ ), tras los cuales se deshinchó el manguito y se registró el flujo postisquemia durante un minuto más ( $t_d$ ). Se analizaron los valores de área bajo la curva (ABC) de los tiempos  $t_0$  y  $t_d$  (PeriSoft® para Windows). Con éstos se determinó el incremento de flujo postisquemia mediante la fórmula:  $(ABC_{t_d} - ABC_{t_0}) \times 100 / ABC_{t_0}$ . Además, se calculó la HRPi máxima (HRPimax) definida como el pico registrado durante la HRPi expresado en relación al valor basal de flujo según la siguiente fórmula:  $HRPimax = [(HRPipico) - \text{flujo en reposo}]$ .

#### 5.4. Tests físicos

##### 5.4.1. Test de ejercicio submáximo sobre cicloergómetro

El protocolo utilizado para realizar el test de ejercicio submáximo fue el propuesto por ACSM y YMCA<sup>334</sup>. Este protocolo consistió en una prueba multi-etapa que conlleva un incremento progresivo de la carga de trabajo según la respuesta de la frecuencia cardíaca del sujeto durante el ejercicio. Para ello, se utilizaron etapas de 3 minutos sobre un cicloergómetro (Technogym Recline 500™, Gambettola, Italy). Antes de comenzar la prueba, la distancia del sillín a los pedales se ajustó de acuerdo con la longitud de las piernas del individuo y se registró para utilizarla en sesiones posteriores. La frecuencia cardíaca (FC) fue monitorizada constantemente con un cardiotacómetro (Polar Electro™, Kempele, Finlandia). Además, antes de la prueba y al finalizar cada etapa, se midió la presión arterial mediante auscultación.

La etapa inicial de la prueba consistía en un calentamiento con una carga de 25w. La FC con la que los sujetos culminaban la primera etapa determinaba la carga de trabajo para la siguiente fase: 50w (FC: 100 lpm), 75w (FC: 90-100 lpm), 100w (FC: 80-89 lpm) o 125w (FC < 80 lpm). Consecuentemente, cada 3 minutos se cambiaba de etapa, incrementando en un 25% la carga de trabajo hasta que aconteciera alguno de los criterios previamente definidos para la finalización o suspensión de la prueba: a) signos y síntomas de intolerancia al ejercicio (mareo, disnea, desorientación, etc), fatiga o agotamiento precoz; b) FC por encima del 100% de la  $F_{cmax}$  estimada según la fórmula de Tanaka<sup>331</sup>, no obstante, se observó que todos los sujetos alcanzaron al menos el 85% de  $F_{cmax}$ ; c) respuesta anormal de presión arterial (aumento de la PAS por encima de 250 mmHg o PAD superior a 120 mmHg); d) imposibilidad de mantener el pedaleo con una cadencia de 50 rpm.

Las cargas utilizadas durante el primer test utilizando el protocolo ya mencionado fueron registradas para repetirlas en el segundo test después del periodo de intervención (12 semanas). La estimación del  $VO_{2max}$  (ml/kg/min) fue calculada utilizando las cargas de trabajo y FC de las dos últimas etapas del protocolo multi-etapa según la ecuación de predicción de  $VO_{2max}$ <sup>335</sup>.

#### 5.4.2. Test de caminata de seis minutos (T6MC)

Esta prueba es un test muy simple utilizado en personas obesas y en un amplio espectro de enfermedades ya que proporciona una medida válida de la capacidad aeróbica y funcional para la realización de las actividades físicas diarias. La prueba se realizó en un pasillo sin obstáculos de 45.72 metros de acuerdo con los estándares propuestos por la *ATS (Statement of the American Thoracic Society)*<sup>336</sup>. El objetivo del test consiste en cubrir la máxima distancia en 6 minutos, estando permitido parar y descansar durante ese tiempo, si así lo fuera necesario para el paciente. De acuerdo a ello, se pidió a todos los sujetos que caminaran tan rápido como les fuese posible al tiempo que eran animados cada minuto a conseguir la máxima distancia recorrida durante la prueba. La duración de la prueba se controló usando un cronómetro con cuenta regresiva. Los investigadores calcularon la distancia recorrida durante la T6MC después de completar la prueba de acuerdo a la siguiente fórmula: Distancia recorrida = [vueltas caminadas x distancia de cada vuelta (en metros)] + vuelta incompleta (en metros).

#### 5.4.3. Test de sentarse y levantarse (TSyL)

El TSyL se realizó con una silla de acero (0,40 m de altura y 0,36 m de profundidad). Los sujetos fueron instruidos para levantarse completamente y a continuación sentarse colocando sus nalgas en la silla en una posición sentada, realizando tantas repeticiones de este gesto como fue posible durante 30 segundos. La prueba comenzó y se detuvo cuando el examinador dijo: "inicio" o "fin", respectivamente. Antes de las mediciones, se realizaron ensayos de práctica sin esfuerzo máximo con el objetivo de que el paciente repitiese correctamente cada movimiento en la serie. Esta prueba se realizó dos veces con un intervalo de reposo de 2 minutos entre cada prueba y se registraron los datos correspondientes a la prueba con mayor número de repeticiones.





## **6. ESTADÍSTICA**

Todos los datos fueron expresados en términos de media  $\pm$  error estándar de la media ( $\pm$  E.E.M.). La normalidad de la muestra fue calculada usando el test de Shapiro-Wilk. El efecto de las diferentes intervenciones (MED y MEDE; variables independientes) sobre el número de CPEs,  $VO_{2max}$ , función endotelial y factores de riesgo cardiometabólicos (variables dependientes) fue analizado mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas de dos factores: [2 (grupos) x 2 (tiempos)]. La corrección de Tukey fue usada para ajustar los valores P en relación al número de contrastes realizados. Se considero como nivel de significancia estadística un  $P \leq 0.05$ . Los datos fueron codificados, introducidos y analizados usando el programa informático SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versión 15.0 para Windows.



## **7. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Para la revisión bibliográfica se usó el sistema *MEDLARS* (*Medical Literature Analysis and Retrieval System*) a través de su servicio informatizado *PubMed* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)), utilizando varias entradas o encabezamientos *MeSH* (Medical Subjects Headings) del *Index Medicus*. También se empleó *Ovid Technologies* que es un proveedor de información electrónica bibliográfica. El acceso a las bases de datos en este servicio se realizó por medio del *Ovid Web Gateway* ([www.gateway.ovid.com](http://www.gateway.ovid.com)). Así mismo, el acceso a ambas bases de datos se realizó, a su vez, a través de la aplicación electrónica Biblioteca Virtual del Sistema Sanitario Público de Andalucía ([www.bvsspa.es/profesionales/](http://www.bvsspa.es/profesionales/)).



## **VI. RESULTADOS**



## 1. POBLACIÓN Y ADHERENCIA A LOS TRATAMIENTOS

Tras el periodo de reclutamiento de la muestra, 45 individuos cumplieron los criterios de inclusión para el estudio; asignándose aleatoriamente 21 de ellos al tratamiento con el modelo hipocalórico de dieta mediterránea y ejercicio de moderada a alta intensidad (MEDE), y 24 al tratamiento individual con el modelo hipocalórico de dieta mediterránea (MED). Transcurridas las 12 semanas de intervención, 40 voluntarios (20 en cada tratamiento), habían completado su fase experimental y evaluaciones. En la **tabla 1** se muestran las principales características de los sujetos en cada grupo de tratamiento. En el tratamiento MED la pérdida muestral estuvo determinada por el incumplimiento sistemático e inevitable de la dieta por parte de 4 voluntarios; mientras que en MEDE fueron problemas de salud no asociados al entrenamiento físico (cirugía no prevista) la causa del abandono de un participante.

**Tabla 1.** Características basales principales de los sujetos según las distintas intervenciones

Variables	MEDE (n=20)	MED (n=20)	P
Edad (años)	59.05 (5.47)	57.2 (4.29)	NS
Género: nº (%)			
Mujer	13 (65)	14 (70)	NS
Hombre	7 (35)	6 (30)	NS
Medicación habitual: (nº)	3.73 (2.52)	3.23 (2.09)	NS
Número de factores de riesgo: nº (%)			
Obesidad abdominal	20 (100)	20 (100)	-
Hipertensión	18 (90)	16 (80)	-
Dislipemia	13 (65)	12 (60)	-
Glucemia basal alterada	12 (60)	13 (65)	-

Valores de edad expresados como la media  $\pm$  E.E.M. Valores de género y número de factores de riesgo expresados con número y porcentaje. MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea; NS: no significativo.



En relación a la ingesta dietética durante el periodo experimental, no se observaron diferencias significativas en la ingesta total de energía, hidratos de carbono, proteínas y grasa (total, monoinsaturadas, saturadas y poliinsaturadas) entre ambos grupos (**tabla 2**). Además, la adherencia al modelo dietético prescrito en ambos tratamientos fue muy buena, tal como se detalla en la **tabla 3**.

**Tabla 2.** Composición de la dieta ingerida y actividad física al inicio y a las 12 semanas de intervención en MEDE y MED

Variables	MEDE (n=20)		MED (n=20)	
	Basal	Semana 12	Basal	Semana 12
<b>Energía (Kcal/día)</b>	2126.37 (177.13)	<b>1206.18 (116.47)*</b>	2211.20 (155.97)	<b>1304.28 (93.77)*</b>
<b>CH (% de energía)</b>	47.19 (1.13)	48.11 (1.31)	46.85 (1.61)	47.03 (1.91)
<b>Proteínas (% de energía)</b>	18.25 (0.59)	<b>22.31 (0.61)*</b>	17.31 (0.93)	<b>22.39 (0.74)*</b>
<b>Grasas (% de energía)</b>	34.56 (1.51)	<b>29.42 (1.00)*</b>	35.85 (1.47)	<b>30.58 (1.33)*</b>
<b>SFA (% de energía)</b>	13.08 (0.45)	<b>7.54 (1.03)*</b>	13.74 (0.52)	<b>8.89 (1.28)*</b>
<b>MUFA (% de energía)</b>	14.02 (0.91)	<b>20.01 (0.78)*</b>	14.09 (1.10)	<b>20.33 (0.82)*</b>
<b>PUFA (% de energía)</b>	3.49 (0.23)	4.01 (0.61)	3.41 (0.26)	4.70 (0.74)
<b>Vitamina C (mg/día)</b>	99.59 (47.07)	<b>210.75 (60.39)*</b>	102.71 (57.96)	<b>220.06 (49.90)*</b>
<b>Actividad física total (MET/s)</b>	75.59 (9.02)	<b>97.59 (6.05)**</b>	70.77 (9.65)	75.00 (7.62)
<b>Actividades sedentarias (h/s)</b>	90.37 (3.84)	86.61 (4.20)	89.60 (6.24)	86.25 (7.34)
<b>Gasto energético total (MET/s)</b>	179.37 (10.79)	<b>201.25 (7.95)**</b>	173.84 (8.44)	176.26 (9.91)

Valores expresados como la media  $\pm$  E.E.M. CH: carbohidratos; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; SFA: ácidos grasos saturados; MET: equivalente metabólico del trabajo; MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea. \*Indica diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (basal vs semana 12). \*\*Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (MED vs MEDE).

**Tabla 3.** Adherencia al patrón de ingesta típico Mediterráneo y evolución del consumo de alimentos ricos en compuestos antioxidantes en MEDE y MEDE

Variables	MEDE (n=20)		MED (n=20)	
	Basal	Semana 12	Basal	Semana 12
<b>Score de dieta mediterránea (puntaje)<sup>a</sup></b>	6.45 (0.39)	<b>11.18 (0.58)*</b>	6.10 (0.39)	<b>10.50 (0.70)*</b>
<b>Consumo de verduras ≥ 2 raciones/día (al menos 1 de ellas en ensalada o cruda)</b>	10 (n=2)	<b>80 (n=16)*</b>	15 (n=3)	<b>85 (n=17)*</b>
<b>Consumo de frutas ≥ 3 piezas/día (incluyendo zumo natural) (% de adherencia)</b>	10 (n=2)	<b>95 (n=19)*</b>	10 (n=2)	<b>90 (n=18)*</b>
<b>Consumo de vino tinto ≥ 7 vasos/semana (% de adherencia)</b>	10 (n=2)	<b>45 (n=9)*</b>	15 (n=3)	<b>50 (n=10)*</b>
<b>Consumo de nueces ≥ 3 veces/semana (% de adherencia)</b>	15 (n=3)	<b>95 (n=19)*</b>	15 (n=3)	<b>90 (n=18)*</b>

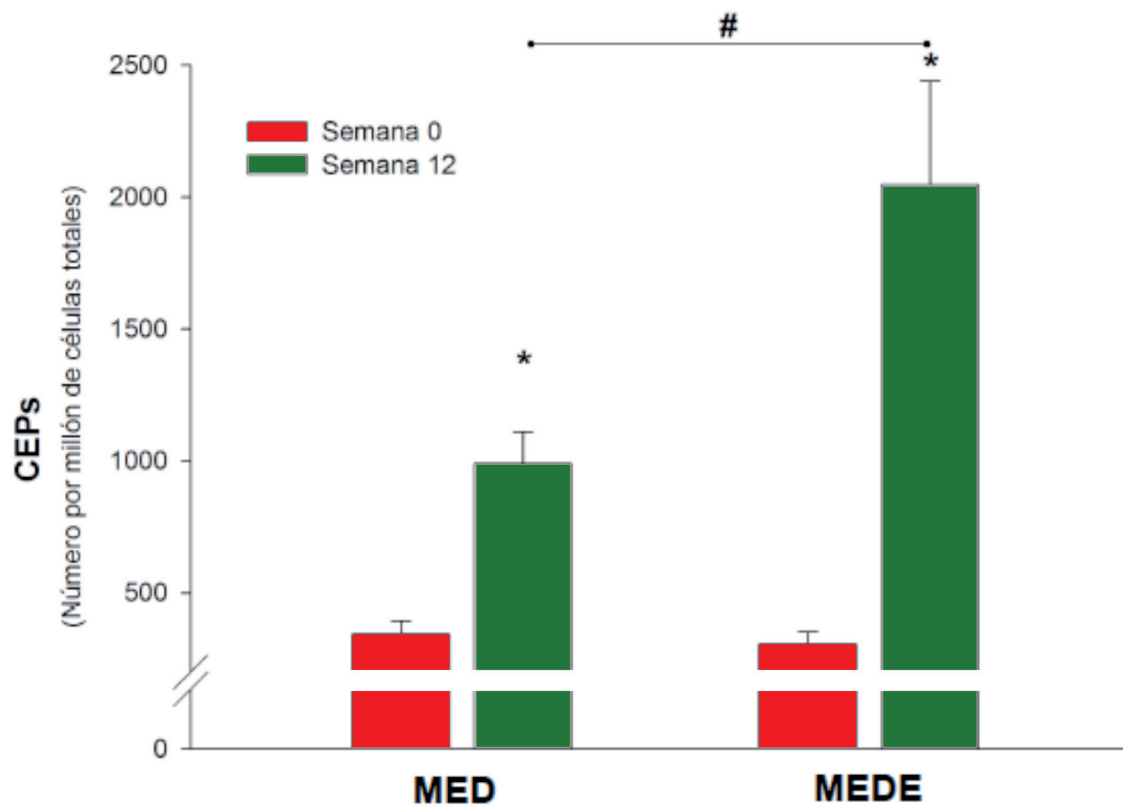
Valores expresados como la media  $\pm$  E.E.M. para la puntuación cuantitativa y % de adherencia a los ítems específicos de consumo de alimentos ricos en antioxidantes; <sup>a</sup>A cada ítem del cuestionario se le asignaron valores de 0 o 1 y la suma de los 14 valores resultantes determinó la puntuación final. MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea. \*Indica diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (basal vs semana 12).



## 2. CÉLULAS PRECURSORAS DE ENDOTELIO

Tras las 12 semanas de intervención con dieta o dieta y ejercicio físico, ambos tratamientos mostraron un incremento en el número de CPEs respecto a sus niveles basales. Este incremento fue significativamente mayor en el tratamiento que incluyó el ejercicio físico (**figura 1**).

**Figura 1.** Evolución de los niveles de CPEs en MED y MEDE



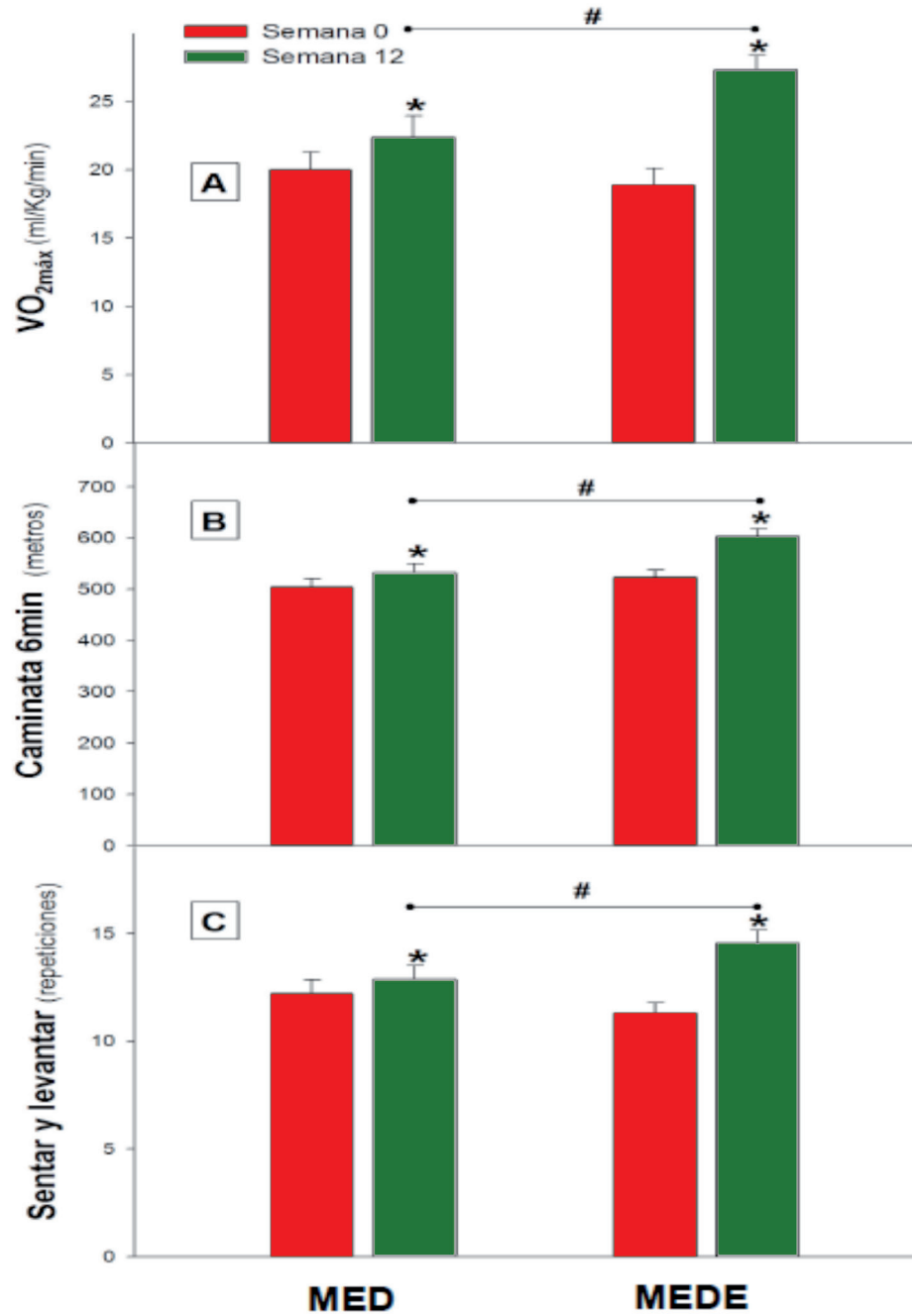
Valores expresados como la media  $\pm$  E.E.M.  $n=20$  sujetos en cada periodo de intervención; MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea. \*Indica diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (basal vs semana 12). #Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (MED vs MEDE).



### **3. CAPACIDAD CARDIORRESPIRATORIA**

Con el objetivo de determinar posibles cambios en la capacidad cardiorrespiratoria de los sujetos después de ambos tratamientos, se determinaron el consumo máximo de oxígeno ( $VO_{2max}$ ) y la capacidad de trabajo frente a un ejercicio físico de resistencia (test de caminata de los 6 minutos (T6MC) y test de sentar y levantar (TSyL)). No se observaron diferencias significativas para estas variables en la semana 0 entre los grupos de tratamientos. A las 12 semanas, MEDE incrementó significativamente más el  $VO_{2max}$  y el rendimiento tanto en T6MC como TSyL comparado con MED (**figura 2**).

**Figura 2.** Consumo máximo de oxígeno (A), test de caminata de los 6 minutos (B) y test de sentar y levantar (C) en los grupos MEDE y MED basalmente y a las 12 semanas de intervención



Valores expresados como la media  $\pm$  E.E.M.  $n=20$  sujetos en cada periodo de intervención; Barras negras: indica los resultados basalmente; Barras grises: indica los resultados a las 12 semanas; MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea; VO<sub>2max</sub>: Consumo máximo de oxígeno. \*Indica diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (basal vs semana 12). #Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (MED vs MEDE).

#### 4. FACTORES DE RIESGO CARDIOMETABÓLICOS

Ambos grupos presentaron un descenso significativo del peso, IMC y perímetro de cintura a las 12 semanas de intervención, sin embargo, tal y como era de esperar, la mejora en el peso e IMC fue mayor en el grupo que realizó dieta y ejercicio (peso: MEDE; -8.62% vs MED; -5.60%; IMC: MEDE -8.79% vs MED -5.43%,  $p < 0.05$ ). Por otro lado, en cuanto al control tensional, ambos grupos presentaron reducciones similares de la PAS al final del estudio, mientras que la PAD se redujo significativamente más en el grupo MEDE tras el periodo de intervención (MEDE; -13.44% vs MED; -3.95%,  $p < 0.05$ ) (**tabla 4.1**).

**Tabla 4.1.** Evolución de los parámetros antropométricos y tensión arterial en MEDE y MED

Variables	MEDE (n=20)		MED (n=20)	
	Basal	Semana 12	Basal	Semana 12
Peso (kg)	97.21 (2.46)	<b>88.83</b> <b>(2.22)**</b>	96.04 (3.54)	<b>90.66</b> <b>(3.37)*</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	37.05 (0.72)	<b>33.79</b> <b>(0.72)**</b>	38.44 (1.46)	<b>36.35</b> <b>(1.37)*</b>
Perímetro cintura (cm)	109.20 (2.00)	<b>105.02</b> <b>(2.09)*</b>	114.41 (2.56)	<b>110.69</b> <b>(2.71)*</b>
PAS (mmHg)	142.23 (2.76)	<b>124.42</b> <b>(3.45)*</b>	140.55 (3.67)	<b>126.07</b> <b>(3.51)*</b>
PAD (mmHg)	84.70 (1.71)	<b>73.31</b> <b>(2.30)**</b>	83.29 (1.71)	<b>80.00</b> <b>(2.19)*</b>

Valores expresados como la media  $\pm$  E.E.M. IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea. \*Indica diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (basal vs semana 12); \*\*Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (MED vs MEDE).

Respecto de la glucemia e insulinoresistencia, ambos grupos presentaron una reducción significativa de la glucemia preprandial, así como un descenso en el valor del índice de HOMA, observándose para éste último índice, un descenso significativamente mayor con el tratamiento que incluyó ejercicio físico (MEDE; -50.15 % vs MED; -17.56 %). Además, la insulinemia, sólo mostró una reducción significativa con MEDE tras las 12 semanas de intervención ( $p < 0.05$ ), **tabla 4.2**.



**Tabla 4.2.** Evolución del Índice HOMA, glucemia e insulinemia preprandial en MEDE y MED

Variables	MEDE (n=20)		MED (n=20)	
	Basal	Semana 12	Basal	Semana 12
Glucosa en ayunas (mg/dl)	102.52 (3.60)	<b>96.93 (4.50)*</b>	107.20 (2.34)	<b>101.80 (2.70)*</b>
Insulina en ayunas (mUI/L)	12.46 (1.08)	<b>6.42 (0.70)**</b>	13.25 (0.95)	11.22 (1.22)
Índice HOMA	3.13 (0.27)	<b>1.56 (0.18)**</b>	3.53 (0.29)	<b>2.91 (0.39)*</b>

Valores expresados como la media  $\pm$  E.E.M. HOMA: homeostasis model assessment (medida de insulinorresistencia); MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea. \*Indica diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (basal vs semana 12); \*\*Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (MED vs MEDE).

Por su parte, el perfil lipídico se vio mejorado en MED y MEDE de manera que tanto las cifras de colesterol total, como las de LDL-c se redujeron significativamente para ambos grupos y sin diferencia entre ellos. Sin embargo, aunque los niveles de TG también disminuyeron en ambos grupos, éste efecto fue más acentuado en el tratamiento con ejercicio físico al final del periodo de intervención (MEDE; -25.91 % vs MED; -6.68 %), **tabla 4.3**. Los niveles de HDL-c no se vieron modificados en ninguna de las dos intervenciones.

**Tabla 4.3.** Cambios en el perfil lipídico tras MEDE y MED

Variables	MEDE (n=20)		MEDE (n=20)	
	Basal	Semana 12	Basal	Semana 12
CT (mg/dl)	195.36 (8.88)	<b>178.37 (10.81)*</b>	203.47 (5.40)	<b>191.11 (6.17)*</b>
LDL-c (mg/dl)	126.25 (6.17)	<b>115.07 (7.72)*</b>	129.72 (4.63)	<b>120.07 (5.40)*</b>
HDL-c (mg/dl)	46.33 (2.70)	45.17 (1.93)	47.49 (2.31)	46.33 (2.31)
TG (mg/dl)	137.06 (10.03)	<b>101.54 (9.26)**</b>	132.81 (9.26)	<b>123.93 (10.42)*</b>

Valores expresados como la media  $\pm$  E.E.M. CT: colesterol total; LDL-c: lipoproteínas de baja densidad; HDL-c: lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea. \*Indica diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (basal vs semana 12); \*\*Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (MED vs MEDE).

La función endotelial microvascular medida mediante los índices iAUC (incremento del flujo post-isquemia) y HRPimax (diferencia entre la hiperemia máxima y el flujo basal) también presentaron una mejora superior en el tratamiento MEDE comparado con MED al finalizar las 12 semanas de intervención (iAUC; +50.57 % vs +0.05 %; HRPimax; +33.47 % vs +1.86 %), **tabla 4.4**.

**Tabla 4.4.** Estudio de la función endotelial tras MED y MEDE

Variables	MEDE (n=20)		MEDE (n=20)	
	Basal	Semana 12	Basal	Semana 12
iAUC (AUC) <sup>a</sup>	217.68 (25.10)	<b>327.77 (35.72)**</b>	226.90 (45.92)	227.03 (20.44)
HRPimax <sup>b</sup>	132.13 (18.89)	<b>176.36 (18.49)**</b>	166.02 (15.61)	169.11 (25.52)

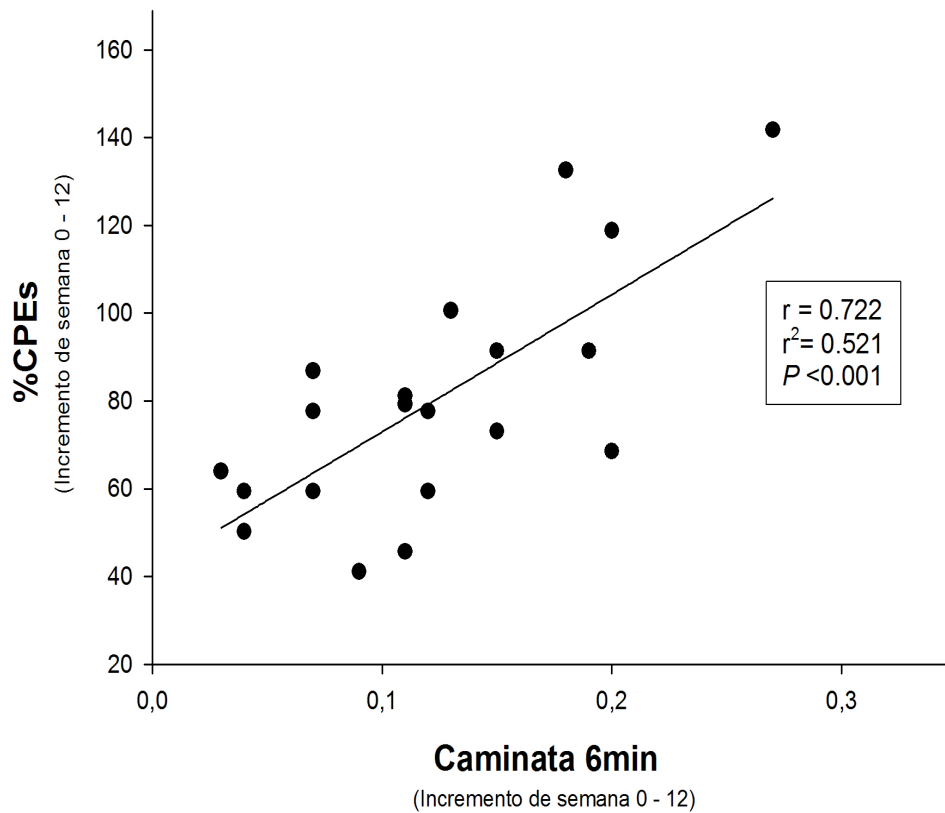
Valores expresados como la media  $\pm$  E.E.M. <sup>a</sup>iAUC (AUC): incremento del flujo post-isquemia estimado usando los valores bajo la curva del test con láser-doppler. <sup>b</sup>HRPimax: diferencia entre el valor máximo registrado tras 4 minutos de oclusión y nivel basal; MEDE: dieta hipocalórica mediterránea asociada a entrenamiento con ejercicio de moderada/alta intensidad; MED: dieta hipocalórica mediterránea. \*Indica diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo (basal vs semana 12); \*\*Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (MED vs MEDE).



## 5. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Finalmente, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre las diferentes variables estudiadas para cada tratamiento, hallándose una correlación positiva entre las mejoras post-tratamiento del número de CPEs (recuento por millón de células totales) y de la distancia recorrida en el test de caminata de los 6 minutos (metros recorridos) después del tratamiento con MEDE ( $r = 0.722$ ,  $r^2 = 0.521$ ,  $p < 0.001$ ) (figura 3).

**Figura 3.** Correlación entre la mejora en los niveles circulantes de CPEs y el rendimiento físico en el test de caminata de 6 minutos tras MEDE





## VII. DISCUSIÓN



En este estudio realizado sobre individuos con síndrome metabólico (SMet), sedentarios, no diabéticos y sin ECV se ponen de manifiesto dos hechos evidentes. Por un lado, se demuestra que la adherencia a un patrón dietético mediterráneo hipocalórico (MED) mejora la capacidad regenerativa del endotelio como resultado de un incremento en las CPEs. Además, el cumplimiento de este patrón alimentario también ejerce un efecto beneficioso sobre el resto de FRCV (tensión arterial, dislipemia, etc.). La segunda observación que se extrae del presente estudio es que cuando a la dieta mediterránea se le asocia un programa de entrenamiento físico de moderada a alta intensidad (MEDE) el incremento de las CPEs es mayor que cuando sólo se realiza el mismo tratamiento dietético (MED). Del mismo modo, como era de esperar tras la intervención combinada con ejercicio, se produjo un mayor aumento de la capacidad cardiorrespiratoria respecto al grupo MED, existiendo una buena correlación entre esta mejora cardiorrespiratoria y el incremento de CPEs. En el mismo sentido, la sensibilidad a la insulina, concentración plasmática de TG y tensión arterial presentaron un mayor descenso en el grupo MEDE. Finalmente, la función endotelial microvascular solo se vio mejorada en el grupo con tratamiento combinado.

Estudios recientes han puesto de manifiesto, al menos en individuos adultos sanos, que tanto la capacidad regenerativa del endotelio (medida por el número de CPEs) como el daño endotelial (liberación de micropartículas endoteliales) se ven mejorados significativamente tras la adherencia durante ocho semanas a un patrón dietético típicamente mediterráneo<sup>231</sup>. De acuerdo con esos resultados, nuestro trabajo muestra que el efecto beneficioso de una dieta mediterránea de similares características pero con restricción calórica, sobre los niveles de CPEs, es también extensible a individuos con SMet. Una posible explicación para este fenómeno podría radicar en el alto contenido en compuestos antioxidantes como los ácidos fenólicos (polifenoles y flavonoides) de la dieta mediterránea. Esta característica confiere a este patrón dietético un potencial antioxidante capaz de provocar una reducción del estrés oxidativo crónico y un incremento en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO)<sup>229</sup>. Ambas circunstancias han demostrado incrementar los niveles de CPEs en animales e individuos sanos<sup>231,337</sup> constituyendo en la actualidad un mecanismo plausible para explicar parcialmente nuestros resultados.

En línea con este posible mecanismo para el incremento de las CPEs, varios estudios han demostrado la relación entre el estado oxidativo y los niveles circulantes de CPEs tras diferentes estrategias dietéticas. Entre ellas, el consumo moderado de vino tinto, ha mostrado incrementar tanto el número de células precursoras como su funcionalidad<sup>241,337</sup>. Este fenómeno parece estar determinado por la capacidad antioxidante del vino tinto, basada en su alto contenido en resveratrol; una propiedad que parece incluso restablecer vías de señalización angiogénicas en situaciones de estrés oxidativo elevado como en el SMet<sup>241</sup>. En otro estudio, realizado sobre una población de mujeres sanas de Okinawa<sup>235</sup>, se demostró que una dieta con alto consumo de verduras durante dos semanas, también condiciona un incremento de los niveles de CPEs. Esta



mejora se relacionó fundamentalmente con dos factores, por un lado, el consumo de verduras condicionó un descenso de los niveles plasmáticos de homocisteína que se relacionó inversamente con el número de CPEs, debido posiblemente a un efecto positivo sobre el envejecimiento y muerte de esta línea celular; y por otro lado, el potencial antioxidante de las verduras podría haber provocado un descenso del estrés oxidativo<sup>235</sup>. El patrón de ingesta típico mediterráneo, como el que proponemos en nuestro trabajo, combina estas estrategias dietéticas, puesto que es rico en frutas, verduras y vino tinto, mejorando por lo tanto la capacidad regenerativa del endotelio a través de los mecanismos arriba explicados. La adherencia de los sujetos de nuestro trabajo a la dieta mediterránea (incluyendo además el consumo aceite de oliva virgen extra como única grasa vegetal y la reducción en la ingesta de grasas animales) queda puesta de manifiesto a través del incremento en el *score* cuantitativo de adherencia a la dieta mediterránea al final del estudio en ambos grupos MED y MEDE (**tabla 3**). Además, el análisis pormenorizado de este *score* reveló que los individuos que participaron en nuestro trabajo tuvieron un aumento significativo en el consumo diario y semanal de alimentos ricos en antioxidantes (verduras, frutas, vino tinto y nueces). De este modo, estos hallazgos soportan la hipótesis de que la mejora del estado oxidativo puede ser unos de los mecanismos involucrados en el aumento del número de células precursoras de endotelio en el grupo MED.

Por otro lado, hay suficiente evidencia en la literatura que demuestra que la práctica regular de ejercicio físico se relaciona con un menor riesgo CV, en parte atribuido a una mayor capacidad regenerativa del endotelio<sup>255</sup>. En este sentido, pocos estudios, fundamentalmente realizados sobre individuos con insuficiencia cardiaca, han estudiado el efecto del ejercicio físico sobre el número de CPEs<sup>338</sup>. En este tipo de pacientes, Gatta et al. encontró que un periodo corto de entrenamiento con ejercicios de resistencia (3 semanas) incrementaba el número de células CD34+KDR+ tras finalizar el periodo de entrenamiento<sup>338-340</sup>. Sin embargo, existen pocos estudios con diferentes protocolos de ejercicio y variedad de poblaciones, por lo que no se conoce exactamente cuál puede ser un protocolo efectivo de ejercicio para aumentar el número de CPEs en sujetos con niveles reducidos. Con todo esto, hasta donde conocemos, este es el primer estudio que utilizó un modelo de dieta mediterránea combinado con un programa supervisado de ejercicio físico progresivo de moderada a alta intensidad de 12 semanas de duración donde se muestra un incremento en el número de CPEs en pacientes con síndrome metabólico.

Aunque el presente estudio no fue diseñado para explicar mecánicamente los posibles cambios en los niveles de CPEs inducidos por las intervenciones, sabemos que el tratamiento combinado con ejercicio aeróbico de moderada a alta intensidad (MEDE) no solo incluyó sesiones de esfuerzo intermitentes que permitieron a los sujetos con SMet previamente sedentarios alcanzar esfuerzos de mayor intensidad, sino que también estaba organizado de una forma incremental o periodizada en lo que a intensidad del esfuerzo se refiere. Esta última característica del programa de entrenamiento posibilitó

la distribución de estímulos agudos de intensidad creciente a lo largo de las 12 semanas del periodo de intervención. En términos de fisiología vascular, esto podría significar una constante adaptación del endotelio vascular frente a nuevos estímulos semanales (cambios en el flujo sanguíneo y fenómenos de isquemia). Entre los fenómenos resultantes de la adaptación aguda a la realización de ejercicio físico, tienen especial relevancia el aumento en la disponibilidad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y el incremento de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) con el consecuente aumento de la biodisponibilidad de NO, que constituyen la respuesta aguda al incremento de las fuerzas de cizalla sobre la pared vascular<sup>297,341</sup>. Ambos, NO y VEGF, han demostrado jugar un papel fundamental en la liberación de CPEs desde la médula ósea.

Por su parte, el VEGF incrementa su concentración tras una sesión de ejercicio físico de intensidad moderada a alta, provocando una liberación tiempo-dependiente de CPEs<sup>342,343</sup>. Este fenómeno se debe a que este factor de crecimiento angiogénico estimula directamente la salida de las células precursoras de endotelio desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo, al tiempo que incrementa la actividad de la eNOS, aumentando la disponibilidad de NO<sup>129</sup>. Este último, activa la metaloproteinasa de matriz 9 que, a su vez, promueve la transformación del ligando Kit unido a la membrana en un ligando soluble que favorece el desplazamiento de CPEs hacia la zona vascular de la médula ósea. Además, el NO, parece desempeñar un papel fundamental en la funcionalidad de las CPEs a través de un efecto favorecedor de la interacción *célula-célula* de las CPEs, favoreciendo así los procesos de regeneración endotelial. Este efecto del NO, fue observado en otro estudio, al implantar CPEs procedentes de individuos con síndrome metabólico que, previamente habían realizado un entrenamiento de 8 semanas, en ratones con daño endotelial carotídeo. En estas condiciones, se producía un incremento de la biodisponibilidad de NO en las CPEs y una mejora tanto de la capacidad de reparación endotelial *in vivo* como de la vasodilatación dependiente del endotelio<sup>344</sup>.

En línea con estas evidencias, en nuestro trabajo solo el grupo con tratamiento combinado (MEDE) consiguió mejorar la vasodilatación dependiente del endotelio medida por *láser-doppler*. Este hallazgo se extrae del incremento que los individuos presentaron en el test de hiperemia reactiva post-isquemia (HRPi) observado tanto en el PORHmax (diferencia entre el pico máximo de hiperemia registrado tras 4 minutos de oclusión y el nivel basal de flujo) como en el iAUC (incremento del flujo post-isquemia estimado usando los valores bajo la curva del test con *láser-doppler*). Por esta razón, nuestra hipótesis sugiere que una mayor biodisponibilidad de NO quizás ocurrió tras la intervención con dieta y ejercicio. Esta hipótesis se sustenta en hallazgos de estudios previos donde se demostró que una mayor biodisponibilidad de NO se correlaciona con la mejora de la función endotelial microvascular en el test de hiperemia reactiva post-isquemia medido por *láser-doppler*<sup>231,345</sup>.

Otro hallazgo importante de este estudio fue el incremento de la capacidad cardiorrespiratoria ( $VO_{2max}$ ) principalmente en los individuos del grupo MEDE, al tiempo que mejoraron su rendimiento muscular a nivel local y su capacidad física, tal y como se observó en los test de levantar y sentar y caminata de 6 minutos marcha respectivamente, tras la intervención. Más importante, si cabe, fue la correlación positiva que encontramos entre el  $VO_{2max}$  y el aumento en el número de CPEs en el grupo de dieta y ejercicio. Esta relación entre el *fitness* cardiorrespiratorio y el nivel de CPEs, subraya la importancia que podría tener el programa de entrenamiento físico de moderada a alta intensidad, al provocar estímulos mecánicos y metabólicos lo suficientemente potentes como para conseguir no sólo una adaptación física y cardiorrespiratoria, sino también una adaptación vascular expresada en términos de una mejor capacidad regenerativa del endotelio. Una vez más, el protocolo de ejercicio utilizado en el grupo MEDE basado en un entrenamiento aeróbico de intensidad semanal progresiva parece haber sido el factor clave para que simultáneamente se induzca un incremento en los niveles de CPEs y una mejora de la capacidad cardiorrespiratoria. En este sentido, otros investigadores proponen que el aumento en el número de CPEs observado tras una intervención con ejercicio físico, es resultado de una adaptación a largo plazo frente al aumento del trabajo muscular, formación de nuevos vasos y los diferentes cambios en el flujo sanguíneo<sup>346,347</sup>.

Resulta necesario destacar que los individuos en el grupo de intervención con dieta exclusivamente (MED) también mostraron una mejora de su capacidad cardiorrespiratoria. Esta observación coincide con otros estudios en los que se observó que una reducción de peso provoca un incremento del  $VO_{2max}$ , principalmente debido a una mejoría del componente biomecánico y físico secundario a la reducción de la masa grasa<sup>348</sup>. Estas evidencias previas, nos permiten asumir que en el grupo MED, el ligero, pero significativo incremento del  $VO_{2max}$ , podría explicarse por un mejor desempeño físico tras la pérdida de peso observada. Más aún, este mecanismo podría explicar la ausencia de relación entre la capacidad cardiorrespiratoria y el aumento del número de CPEs en este grupo.

Por otra parte, en la actualidad existen suficiente evidencias que demuestran que los factores de riesgo convencionales del síndrome metabólico se relacionan negativamente con el número de CPEs en este tipo de pacientes<sup>349</sup>. Particularmente, la asociación entre el metabolismo lipídico y la biología de las CPEs ha sido ampliamente estudiada. De este modo, el número de CPEs (CD34+KDR+) se relaciona de forma inversa con los niveles plasmáticos de colesterol y LDL-c, existiendo además una relación directa entre la concentración de colesterol plasmático y la funcionalidad (capacidad migrativa tras estimulación con VEGF) de estas células<sup>138,139</sup>. En cuanto al metabolismo de los TG, distintos estudios han demostrado que concentraciones elevadas de remanentes de lipoproteínas (remanentes de quilomicrones y VLDL) muy ricas en TG tienen un efecto negativo sobre los niveles de células CD34+KDR+ ya que acelerarían el envejecimiento celular mediante dos mecanismos, por un lado, inhiben la telomerasa y,

por otro, aumentan el estrés oxidativo<sup>144,145</sup>. Este incremento del estrés oxidativo se debe fundamentalmente a la inhibición que ejercen los remanentes de lipoproteínas sobre la actividad de la eNOS que, consecuentemente, condiciona una menor biodisponibilidad de NO. De igual modo, concentraciones reducidas de NO favorecen la regulación negativa de la telomerasa asociada a la edad, dando paso a un envejecimiento celular acelerado. En consonancia, algunos trabajos<sup>144,145</sup> sugieren que los mismos remanentes de quilomicrones podrían inhibir directamente la actividad telomerasa y contribuir así a la senescencia de esta estirpe celular. La hipertensión y la hiperglucemia constituyen dos factores de riesgo muy prevalentes en pacientes con SMet y contribuyen tanto al descenso en el número de CPEs como a una funcionalidad alterada. Esto es así fundamentalmente porque la hipertensión condiciona, por un lado, un trastorno en la migración de las células CD34+KDR+, y por otro, acelera el envejecimiento de esta estirpe celular mediante una inhibición de la actividad de la telomerasa y un aumento del estrés oxidativo secundario a niveles elevados de angiotensina II<sup>120,138</sup>. Por otro lado, la hiperglucemia también contribuye negativamente en el equilibrio adecuado del número de CPEs (CD34+KDR+) ya que inhibe la producción de NO y la activación de la enzima metaloproteínasa de matriz 9, siendo ambos procesos decisivos en la liberación de las células precursoras desde la médula ósea al torrente circulatorio<sup>148</sup>.

En nuestro estudio observamos que aquellos individuos asignados al grupo MED redujeron sus cifras de glucemia basal, TG, colesterol total, LDL-c y presión arterial (PAS y PAD) al final de la intervención. En acuerdo con las evidencias existentes, esta mejora de los FRCV podría también explicar, al menos una parte, de los efectos beneficiosos de la dieta sobre el incremento del número de CPEs observado en el presente trabajo. Paralelamente, el grupo MEDE fue significativamente más efectivo en la pérdida de peso y en la mejora de algunos FRCV como los niveles plasmáticos de TG, PAD y sensibilidad insulínica medida mediante el índice HOMA. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados reportados por otros autores que muestran una mayor pérdida de peso asociada a una mejora de los FRCV tras realizar un programa de ejercicio similar en duración, frecuencia e intensidad (12 semanas; 3-5 veces/semana, 60-80% de la frecuencia cardiaca máxima) combinado con una dieta hipocalórica<sup>350</sup>. Así pues, estas mejoras sobre los FRCV y la adiposidad junto con los beneficios propios del ejercicio físico podrían explicar el mayor incremento del número de CPEs en el grupo MEDE. Esta hipótesis de un efecto acumulativo (FRCV y efecto CV del ejercicio) también explicaría la ausencia de una correlación entre los niveles de CPEs y la mejora de los FRCV en este grupo.

Por otro lado, nosotros también hallamos que aquellas células positivas para un solo marcaje (CD34+) incrementaron significativamente tras ambos tratamientos (MED y MEDE) y se correlacionaron inversamente con el índice HOMA (datos no mostrados en esta tesis). Este hallazgo es parcialmente concordante con distintos estudios observacionales que también han encontrado que las células CD34+ son el fenotipo celular que mejor se relaciona con los FRCV en pacientes con SMet<sup>351,352</sup>.

Este trabajo presenta algunas limitaciones. Por un lado, solo se ha determinado el número de CPEs y no su funcionalidad. Sin embargo, como muchos estudios publicados actualmente, el objetivo de este trabajo fue determinar el cambio en uno de los factores relacionados con la capacidad regenerativa del endotelio (número de CPEs). Por otro lado, futuros diseños podrían analizar si el incremento de los niveles de CPEs después del tratamiento con dieta mediterránea, con o sin ejercicio, se relaciona sinérgicamente o no, con su funcionalidad. Además, sólo uno de los posibles fenotipos de CPE (CD34+KDR+) ha sido valorado en nuestro estudio, si bien es cierto que, la combinación de CD34+KDR+ (prototipo de antígeno de una célula madre junto a un marcador del linaje endotelial), representa el fenotipo de CPE más aceptado. Consistentemente, esta combinación representa el único fenotipo de CPE que ha sido demostrado de forma repetida y convincente como marcador independiente del riesgo de presentar eventos cardiovasculares<sup>353</sup>. Además, aunque el trabajo no presenta un brazo con ejercicio físico como única intervención (sin dieta mediterránea), el objetivo principal del estudio fue conocer los efectos sobre los niveles de CPEs y la capacidad cardiorrespiratoria tras dos tratamientos que no habían sido estudiados con respecto a la capacidad regenerativa del endotelio y el estado de forma de los sujetos (dieta mediterránea hipocalórica asociada o no a un programa de entrenamiento aeróbico progresivo de moderada a alta intensidad).

Con todo esto, un punto que fortalece el trabajo realizado es la cuidadosa selección de los pacientes incluidos (sin enfermedades coexistentes ni morbilidades asociadas como diabetes, enfermedad vascular periférica o toma activa de medicación) así como el riguroso control en la adherencia a ambas intervenciones (MED o MEDE).

## **VIII. CONCLUSIONES**



### **1. CONCLUSIÓN PRINCIPAL**

- La ingesta de una dieta mediterránea hipocalórica y normoproteica mejora la capacidad regenerativa del endotelio y la capacidad cardiorrespiratoria en sujetos sedentarios con síndrome metabólico. Estos beneficios son potenciados cuando se asocia a este modelo dietético un programa de ejercicio físico aeróbico progresivo de moderada a alta intensidad. Esto queda reflejado por el mayor incremento en el número de células precursoras endoteliales y su correlación positiva con el aumento de la capacidad cardiorrespiratoria en estos pacientes.

### **2. CONCLUSIONES SECUNDARIAS**

- La asociación de un modelo de dieta mediterránea hipocalórica junto con un programa de ejercicio físico aeróbico progresivo induce una mejora de la función endotelial en pacientes sedentarios con síndrome metabólico.
- El consumo de una dieta mediterránea hipocalórica y normoproteica provoca una reducción del peso y presión arterial (PAS y PAD), así como un descenso en los niveles plasmáticos de glucosa, TG, colesterol total y LDL-c en pacientes sedentarios con síndrome metabólico.
- Una intervención combinada con dieta mediterránea hipocalórica y ejercicio físico aeróbico progresivo de moderada a alta intensidad resulta más efectiva en la pérdida de peso y en la mejora específica de los niveles plasmáticos de TG, PAD y sensibilidad insulínica medida mediante el índice HOMA en pacientes sedentarios con síndrome metabólico.





## **IX. ABREVIATURAS**



AACE: American Association of Clinical Endocrinologists  
ABC: área bajo la curva  
ADA: American Diabetes Association  
ADO: antidiabéticos orales  
AGL: ácidos grasos libres  
AHA: American Heart Association  
ANOVA: análisis de la varianza  
ApoB-100: apolipoproteína B-100  
ApoB-48: apolipoproteína B-48  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
ATGL: lipasa adiposa de triglicéridos  
ATS: Statement of the American Thoracic Society  
CD31: molécula de adhesión endotelial a las plaquetas 1  
CD34-TC: conjugated Antihuman-CD34 Tri-color  
CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol  
cGMP: guanosín monofosfato cíclico  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono  
CPE-p: célula precursora de endotelio precoz  
CPE-t: célula precursora de endotelio tardía  
CT: colesterol total  
CV: cardiovascular  
DE: desviación estándar  
DM: diabetes mellitus  
DM1: diabetes mellitus tipo 1  
DM2: diabetes mellitus tipo 2  
E.E.M: error estándar de la media  
EASD: European Association for the Study of Diabetes  
ECV: enfermedad cardiovascular  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EF: ejercicio físico

EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance

eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial

EROs: especies reactivas de oxígeno

FC: frecuencia cardíaca

F<sub>max</sub>: frecuencia cardíaca máxima

FE: función endotelial

FITC: conjugated antihuman-KDR Fluorescein isothiocyanate

FRCV: factores de riesgo cardiovascular

GLUT-4: proteína transportadora de glucosa

Gr: gramo

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HDL-c: colesterol vehiculizado por lipoproteínas de alta densidad

HOMA: Homeostasis Model Assessment

HRPi: hiperemia reactiva post-isquemia

HRP<sub>imax</sub>: diferencia entre la hiperemia máxima y el flujo basal

HSL: lipasa sensible a hormonas

HTA: hipertensión

iAUC: incremento del flujo post-isquemia

ICAM: molécula de adhesión intercelular

IDF: International Diabetes Federation

IG: índice glucémico

IGT: intolerancia a la glucosa

IL-1RA: agonista del receptor de interleuquina 1

IL: interleuquina

IMC: índice de masa corporal

IRS-1: receptor del sustrato de insulina 1

IRS-2: receptor del sustrato de insulina 2

KDR: kinase insert domain receptor

Kg: kilogramo

LDL-c: colesterol vehiculizado por lipoproteínas de baja densidad

LPL: lipoproteín lipasa  
LPM: latidos por minuto  
MED: dieta mediterránea  
MEDE: dieta mediterránea y ejercicio  
MEDLARS: Medical Literature Analysis and Retrieval System  
MeSH: Medical Subjects Headings  
MET: equivalente metabólico del trabajo  
mKitL: ligando Kit unido a membrana  
MMP-9: metaloproteínasa de matriz 9  
MUFA: ácidos grasos monoinsaturados  
n-3, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados n-3  
NCEP:ATPIII: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III.  
NDA(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NF-KB: factor nuclear Kappa B  
NHANES: National Health and Examination Survey  
NHLBI: National Heart, Lung, and Blood Insitute  
NO: óxido nítrico  
NS: no significativo  
O<sub>2</sub><sup>\*</sup>: anión superóxido  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PAD: presión arterial diastólica  
PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno 1  
PAS: presión arterial sistólica  
PC: perímetro de cintura  
PCR: proteína C reactiva  
PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinasa  
PIOSTAT: Pioglitazone and Statin in high cardiovascular risk patients  
RE: retículo endoplásmico  
RI: resistencia insulínica  
RPM: revoluciones por minuto

SDF-1 $\alpha$ : factor derivado de células estromales 1 alfa  
SFA: ácidos grasos saturados  
sICAM-1: molécula soluble de adhesión intercelular 1  
sKitL: ligando Kit soluble  
SMet: síndrome metabólico  
SNS: sistema nervioso simpático  
SPSS: Statiscal Package for the Social Sciences  
SUN: Seguimiento Universidad de Navarra  
sVCAM-1: molécula soluble de adhesión vascular 1  
T6MC: test de caminata de seis minutos  
TA: tensión arterial  
TG: triglicéridos  
TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
TSyL: test de sentarse y levantarse  
VCAM: molécula de citoadhesión vascular  
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular  
VEGFR-2: receptor del factor de crecimiento vacular endotelial 2  
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad  
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad  
VO<sub>2max</sub>: consumo máximo de oxígeno  
W: watos

## **X. REFERENCIAS**





1. Kylin E. "Studien ueber das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämie syndrom". *Zentralblatt fuer Innere Medizin*. 1923;44.
2. G M. "Condiciones prediabéticas. Tratados de las zonas fronterizas de la secreción interna". *Wissenschaftliche Verlags Buchhandlung Rudolf Novak*. 1927:12-42.
3. Vague J. La differentiation sexually, factor determinant des formes de l'ob sit. *presse médicale*. 1947;30:339-340.
4. Avogaro P CG. "First Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes". *Diabetologia*. 1965;1:137.
5. Mehnert H, Kuhlmann H. [Hypertension and diabetes mellitus]. *Deutsches medizinisches Journal*. 1968;19(16):567-71.
6. Haller H. [Epidemiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia]. *Zeitschrift für die gesamte innere Medizin und ihre Grenzgebiete*. 1977;32(8):124-8.
7. Phillips GB. Relationship between serum sex hormones and glucose, insulin and lipid abnormalities in men with myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(4):1729-33.
8. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.
9. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of internal medicine*. 1989;149(7):1514-20.
10. Björntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes care*. 1991;14(12):1132-43.
11. McNeill AM, Rosamond WD, Girman CJ, et al. The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes care*. 2005;28(2):385-90.
12. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(9):1684-99.
13. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1998;15(7):539-53.
14. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006;23(5):469-80.
15. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1999;16(5):442-3.
16. Anon. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;285(19):2486-97.
17. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus\*. Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3160-3167.
18. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109(3):433-8.

19. Shaw JE, Zimmet PZ, Alberti KGMM. Point: impaired fasting glucose: The case for the new American Diabetes Association criterion. *Diabetes care*. 2006;29(5):1170-2.
20. Bloomgarden ZT. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome: 25-26 August 2002, Washington, DC. *Diabetes care*. 2003;26(4):1297-303.
21. Levesque J, Lamarche B. The metabolic syndrome: definitions, prevalence and management. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*. 2008;1(3):100-8.
22. Gupta A, Gupta V. Metabolic syndrome: what are the risks for humans? *Bioscience trends*. 2010;4(5):204-12.
23. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(4):629-36.
24. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes care*. 2003;26(3):575-81.
25. Park Y-W, Zhu S, Palaniappan L, et al. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Archives of internal medicine*. 2003;163(4):427-36.
26. Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, et al. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Archives of internal medicine*. 2004;164(10):1066-76.
27. Knopp RH, Fish B, Dowdy A, et al. A moderate-fat diet for combined hyperlipidemia and metabolic syndrome. *Current atherosclerosis reports*. 2006;8(6):492-500.
28. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2004;23(4):447-56.
29. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Cardiology in review*. 13(6):322-7.
30. Martínez de Morentín BE, Rodríguez MC MJ. Síndrome metabólico , resistencia a la insulina y metabolismo tisular. *Endocrinol Nutr*. 2003;50(8):324-333.
31. Ascaso JF, Mangas A, Hernández A, et al. Diagnóstico del síndrome metabólico. Adecuación de los criterios diagnósticos en nuestro medio. *Clin Invest Arterioscl*. 2006;18(6):244-60.
32. Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes care*. 2007;30(1):8-13.
33. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, et al. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;286(10):1195-200.
34. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1998;22(1):39-47.
35. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes care*. 2004;27(10):2444-9.
36. Duncan GE, Li SM, Zhou X-H. Prevalence and trends of a metabolic syndrome phenotype among u.s. Adolescents, 1999-2000. *Diabetes care*. 2004;27(10):2438-43.

37. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, et al. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Archives of medical research*. 35(1):76-81.
38. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2004;33(2):351-75, table of contents.
39. Deepa M, Farooq S, Datta M, Deepa R, Mohan V. Prevalence of metabolic syndrome using WHO, ATPIII and IDF definitions in Asian Indians: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-34). *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2007;23(2):127-34.
40. Lucove JC, Kaufman JS, James SA. Association between adult and childhood socioeconomic status and prevalence of the metabolic syndrome in African Americans: the Pitt County Study. *American journal of public health*. 2007;97(2):234-6.
41. Hwang L-C, Bai C-H, Chen C-J. Prevalence of obesity and metabolic syndrome in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2006;105(8):626-35.
42. Leite MLC, Nicolosi A, Firmo JOA, Lima-Costa MF. Features of metabolic syndrome in non-diabetic Italians and Brazilians: a discriminant analysis. *International journal of clinical practice*. 2007;61(1):32-8.
43. Lim S, Jang HC, Lee HK, et al. A rural-urban comparison of the characteristics of the metabolic syndrome by gender in Korea: the Korean Health and Genome Study (KHGS). *Journal of endocrinological investigation*. 2006;29(4):313-9.
44. Abdul-Rahim HF, Husseini A, Bjertness E, et al. The metabolic syndrome in the West Bank population: an urban-rural comparison. *Diabetes care*. 2001;24(2):275-9.
45. Fezeu L, Balkau B, Kengne A-P, Sobngwi E, Mbanya J-C. Metabolic syndrome in a sub-Saharan African setting: central obesity may be the key determinant. *Atherosclerosis*. 2007;193(1):70-6.
46. Tsai C-huang. Metabolic syndrome in non-obese Taiwanese: new definition of metabolically obese, normal-weight individual. *Chinese medical journal*. 2009;122(21):2534-9.
47. Bergman RN, Ader M, Huecking K, Van Citters G. Accurate assessment of beta-cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 1:S212-20.
48. Bergman RN. Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes*. 1989;38(12):1512-27.
49. Stefan N, Kantartzis K, Machann J, et al. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Archives of internal medicine*. 2008;168(15):1609-16.
50. Weir GC, Bonner-Weir S. A dominant role for glucose in beta cell compensation of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):81-3.
51. Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, et al. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):246-57.
52. Wajchenberg BL. beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocrine reviews*. 2007;28(2):187-218.
53. Kraemer FB, Shen W-J. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of lipid research*. 2002;43(10):1585-94.
54. Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(52):40236-41.
55. Large V, Arner P. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes & metabolism*. 1998;24(5):409-18.

56. Arner P. Not all fat is alike. *Lancet*. 1998;351(9112):1301-2.
57. Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, et al. Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *The American journal of medicine*. 2007;120(2 Suppl 1):S3-8; discussion S29-32.
58. Sopasakis VR, Sandqvist M, Gustafson B, et al. High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obesity research*. 2004;12(3):454-60.
59. Sandhofer A, Tatarczyk T, Laimer M, et al. The Taq1B-variant in the cholesteryl ester-transfer protein gene and the risk of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2008;16(4):919-22.
60. Gan SK, Kriketos AD, Poynten AM, et al. Insulin action, regional fat, and myocyte lipid: altered relationships with increased adiposity. *Obesity research*. 2003;11(11):1295-305.
61. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(1):7-18.
62. Cornier M-A, Dabelea D, Hernandez TL, et al. The metabolic syndrome. *Endocrine reviews*. 2008;29(7):777-822.
63. Kim S, Soltani-Bejnood M, Quignard-Boulangé A, et al. The adipose renin-angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal renin-angiotensin system. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2006;2006(5):27012.
64. Whaley-Connell A, Johnson MS, Sowers JR. Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension. *Progress in cardiovascular diseases*. 52(5):401-9.
65. Takata Y, Osawa H, Kurata M, et al. Hyperresistinemia is associated with coexistence of hypertension and type 2 diabetes. *Hypertension*. 2008;51(2):534-9.
66. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 365(9468):1415-28.
67. Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. The metabolic syndrome and inflammation. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2004;2(2):82-104.
68. Guldiken S, Demir M, Arikan E, et al. The levels of circulating markers of atherosclerosis and inflammation in subjects with different degrees of body mass index: Soluble CD40 ligand and high-sensitivity C-reactive protein. *Thrombosis research*. 2007;119(1):79-84.
69. Deepa R, Velmurugan K, Arvind K, et al. Serum levels of interleukin 6, C-reactive protein, vascular cell adhesion molecule 1, and monocyte chemoattractant protein 1 in relation to insulin resistance and glucose intolerance--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES). *Metabolism: clinical and experimental*. 2006;55(9):1232-8.
70. González AS, Guerrero DB, Soto MB, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance and the inflammation markers C-reactive protein and ferritin. *European journal of clinical nutrition*. 2006;60(6):802-9.
71. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. 2003;107(3):391-7.
72. Bastard J-P, Maachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European cytokine network*. 2006;17(1):4-12.
73. Lo J, Bernstein LE, Canavan B, et al. Effects of TNF-alpha neutralization on adipocytokines and skeletal muscle adiposity in the metabolic syndrome. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2007;293(1):E102-9.

74. Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, et al. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2007;156(2):279-84.
75. Menzaghi C, Coco A, Salvemini L, et al. Heritability of serum resistin and its genetic correlation with insulin resistance-related features in nondiabetic Caucasians. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(7):2792-5.
76. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *Journal of muscle research and cell motility*. 2003;24(2-3):113-9.
77. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;286(3):327-34.
78. Zuliani G, Volpato S, Blè A, et al. High interleukin-6 plasma levels are associated with low HDL-C levels in community-dwelling older adults: the InChianti study. *Atherosclerosis*. 2007;192(2):384-90.
79. Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2004;53(9):2232-41.
80. Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Advances in immunology*. 1998;70:281-312.
81. Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, et al. Increased serum interleukin-18 concentration is associated with hypoadiponectinemia in obesity, independently of insulin resistance. *International journal of obesity (2005)*. 2007;31(2):221-5.
82. Hung J, McQuillan BM, Chapman CML, Thompson PL, Beilby JP. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(6):1268-73.
83. Shen J, Arnett DK, Peacock JM, et al. Interleukin1beta genetic polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of the metabolic syndrome. *The Journal of nutrition*. 2007;137(8):1846-51.
84. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 2007;148(1):241-51.
85. Sandeep S, Velmurugan K, Deepa R, Mohan V. Serum visfatin in relation to visceral fat, obesity, and type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. *Metabolism: clinical and experimental*. 2007;56(4):565-70.
86. Berndt J, Klötting N, Kralisch S, et al. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*. 2005;54(10):2911-6.
87. Pfützner A, Hanefeld M, Lübben G, et al. Visfatin: a putative biomarker for metabolic syndrome is not influenced by pioglitazone or simvastatin treatment in nondiabetic patients at cardiovascular risk -- results from the PIOSTAT study. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2007;39(10):764-8.
88. Kowalska I, Straczkowski M, Nikolajuk A, et al. Insulin resistance, serum adiponectin, and proinflammatory markers in young subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism: clinical and experimental*. 2008;57(11):1539-44.
89. Altinova AE, Toruner F, Bukan N, et al. Decreased plasma adiponectin is associated with insulin resistance and HDL cholesterol in overweight subjects. *Endocrine journal*. 2007;54(2):221-6.
90. Lee H-S, Lee M, Joung H. Adiponectin represents an independent risk factor for hypertension in middle aged Korean women. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2007;16(1):10-5.

91. Xydakis AM, Case CC, Jones PH, et al. Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2697-703.
92. Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Current opinion in lipidology*. 2007;18(3):263-70.
93. Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, et al. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes care*. 2006;29(6):1357-62.
94. Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *International journal of obesity (2005)*. 2008;32 Suppl 7:S52-4.
95. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(12):9047-54.
96. Juan Marcelo F, Fuentes-Jiménez F, López-Miranda J. Función endotelial y ejercicio físico. *Revista andaluza de medicina del deporte*. 2009;2(2):61-69.
97. Kasprzak JD, Kłosińska M, Drozd J. Clinical aspects of assessment of endothelial function. *Pharmacological reports : PR*. 2006;58 Suppl:33-40.
98. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
99. Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM. Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the “vulnerable” patient. *Circulation*. 2004;110(14):1926-32.
100. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2002;53(4 Pt 1):503-14.
101. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular pharmacology*. 49(4-6):134-40.
102. Wu G, Meininger CJ. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annual review of nutrition*. 2002;22:61-86.
103. Wu G, Haynes TE, Li H, Yan W, Meininger CJ. Glutamine metabolism to glucosamine is necessary for glutamine inhibition of endothelial nitric oxide synthesis. *The Biochemical journal*. 2001;353(Pt 2):245-52.
104. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(5):546-9.
105. Kuvin JT, Karas RH. Clinical utility of endothelial function testing: ready for prime time? *Circulation*. 2003;107(25):3243-7.
106. Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1990;16(2):349-56.
107. 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(8828):1111-5.
108. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91(5):1314-9.

109. Farouque HMO, Meredith IT. Inhibition of vascular ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels does not affect reactive hyperemia in human forearm. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2003;284(2):H711-8.
110. Bank AJ, Sih R, Mullen K, Osayamwen M, Lee PC. Vascular ATP-dependent potassium channels, nitric oxide, and human forearm reactive hyperemia. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2000;14(1):23-9.
111. Sun D, Huang A, Smith CJ, et al. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circulation research*. 1999;85(3):288-93.
112. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39(2):257-65.
113. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995;26(5):1235-41.
114. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003;108(17):2054-9.
115. Gomes MB, Matheus ASM, Tibiriçá E. Evaluation of microvascular endothelial function in patients with type 1 diabetes using laser-Doppler perfusion monitoring: which method to choose? *Microvascular research*. 2008;76(2):132-3.
116. Fuentes F, López-Miranda J, Pérez-Martínez 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. *The British journal of nutrition*. 2008;100(1):159-65.
117. Kubli S, Waeber B, Dalle-Ave A, Feihl F. Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2000;36(5):640-8.
118. Turner J, Belch JFF, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends in cardiovascular medicine*. 2008;18(4):109-16.
119. Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, et al. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(10):1864-8.
120. Shantsila E, Watson T, Lip GYH. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(7):741-52.
121. Patterson C. The Ponzio effect: endothelial progenitor cells appear on the horizon. *Circulation*. 2003;107(24):2995-7.
122. Szmitko PE, Fedak PWM, Weisel RD, et al. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*. 2003;107(24):3093-100.
123. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*. 1997;275(5302):964-7.
124. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95(3):952-8.
125. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000;95(10):3106-12.
126. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90(12):5002-12.



127. Quirici N, Soligo D, Caneva L, et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *British journal of haematology*. 2001;115(1):186-94.
128. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(7):1185-9.
129. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvascular research*. 2010;79(3):184-92.
130. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109(5):625-37.
131. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circulation research*. 2002;90(11):1189-96.
132. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103(5):634-7.
133. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001;104(9):1046-52.
134. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature medicine*. 2001;7(4):430-6.
135. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circulation research*. 2002;90(3):284-8.
136. Rössig L, Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells at work: not mature yet, but already stress-resistant. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(11):1977-9.
137. He T, Peterson TE, Holmuhamedov EL, et al. Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(11):2021-7.
138. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulation research*. 2001;89(1):E1-7.
139. Hill JM, Zalos G, Halcox JPI, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine*. 2003;348(7):593-600.
140. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, et al. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2004;107(3):273-80.
141. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2004;31(7):407-13.
142. Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug and chemical toxicology*. 2004;27(3):243-55.
143. Sumi M, Sata M, Miura S-ichiro, et al. Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):813-8.

144. Pu D-R, Liu L. Remnant like particles may induce atherosclerosis via accelerating endothelial progenitor cells senescence. *Medical hypotheses*. 2007;69(2):293-6.
145. Liu L, Wen T, Zheng X-yan, et al. Remnant-like particles accelerate endothelial progenitor cells senescence and induce cellular dysfunction via an oxidative mechanism. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):405-14.
146. Loomans CJM, de Koning EJP, Staal FJT, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(1):195-9.
147. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002;106(22):2781-6.
148. Kränkel N, Adams V, Linke A, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(4):698-703.
149. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, et al. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2005;183(1):163-7.
150. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(8):1442-7.
151. Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, et al. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;36(2):233-9.
152. Matía Martín P, Lecumberri Pascual E, Calle Pascual AL. [Nutrition and metabolic syndrome]. *Revista española de salud pública*. 81(5):489-505.
153. Eriksson J, Lindström J, Tuomilehto J. Potential for the prevention of type 2 diabetes. *British medical bulletin*. 2001;60:183-99.
154. Hussain A, Claussen B, Ramachandran A, Williams R. Prevention of type 2 diabetes: a review. *Diabetes research and clinical practice*. 2007;76(3):317-26.
155. Yancy WS, Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Annals of internal medicine*. 2004;140(10):769-77.
156. Stern L, Iqbal N, Seshadri P, et al. The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2004;140(10):778-85.
157. Pirozzo S, Summerbell C, Cameron C, Glasziou P. Should we recommend low-fat diets for obesity? *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003;4(2):83-90.
158. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England journal of medicine*. 2001;345(11):790-7.
159. Krishnan S, Rosenberg L, Singer M, et al. Glycemic index, glycemic load, and cereal fiber intake and risk of type 2 diabetes in US black women. *Archives of internal medicine*. 2007;167(21):2304-9.
160. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, et al. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *The New England journal of medicine*. 2003;348(21):2082-90.
161. Kelly S, Frost G, Whittaker V, Summerbell C. Low glycaemic index diets for coronary heart disease. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2004;(4):CD004467.
162. Frayn KN, Hodson L, Karpe F. Dietary fat and insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2010;53(5):799-801.

163. Salmerón J, Hu FB, Manson JE, et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;73(6):1019-26.
164. deKoning L AS. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. *N Engl J Med* 2003; 348: 2599-608. *Vasc Med*. 2004;9(2):145-6.
165. Hu FB. The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond. *The New England journal of medicine*. 2003;348(26):2595-6.
166. Anon. Diabetes Nutrition and Complications Trial: adherence to the ADA nutritional recommendations, targets of metabolic control, and onset of diabetes complications. A 7-year, prospective, population-based, observational multicenter study. *Journal of diabetes and its complications*. 20(6):361-6.
167. Huxley R, Lee CMY, Barzi F, et al. Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Archives of internal medicine*. 2009;169(22):2053-63.
168. Tuomilehto J, Hu G, Bidel S, Lindström J, Jousilahti P. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;291(10):1213-9.
169. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England journal of medicine*. 2001;344(18):1343-50.
170. Jeon CY, Lokken RP, Hu FB, van Dam RM. Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes care*. 2007;30(3):744-52.
171. McNeill AM, Katz R, Girman CJ, et al. Metabolic syndrome and cardiovascular disease in older people: The cardiovascular health study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2006;54(9):1317-24.
172. Bamba V, Rader DJ. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2181-90.
173. Wirfält E, Hedblad B, Gullberg B, et al. Food patterns and components of the metabolic syndrome in men and women: a cross-sectional study within the Malmö Diet and Cancer cohort. *American journal of epidemiology*. 2001;154(12):1150-9.
174. Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, et al. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation*. 2007;116(5):480-8.
175. Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, et al. Dietary glycemic load assessed by food-frequency questionnaire in relation to plasma high-density-lipoprotein cholesterol and fasting plasma triacylglycerols in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;73(3):560-6.
176. Ford ES, Liu S. Glycemic index and serum high-density lipoprotein cholesterol concentration among us adults. *Archives of internal medicine*. 2001;161(4):572-6.
177. Merchant AT, Anand SS, Kelemen LE, et al. Carbohydrate intake and HDL in a multiethnic population. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(1):225-30.
178. Slyper A, Jurva J, Pleuss J, Hoffmann R, Gutterman D. Influence of glycemic load on HDL cholesterol in youth. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(2):376-9.
179. Lairon D, Play B, Jourdheuil-Rahmani D. Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2007;18(4):217-27.
180. Volek JS, Sharman MJ, Gómez AL, et al. Comparison of a very low-carbohydrate and low-fat diet on fasting lipids, LDL subclasses, insulin resistance, and postprandial lipemic responses in overweight women. *Journal of the American College of Nutrition*. 2004;23(2):177-84.

181. Sharman MJ, Gómez AL, Kraemer WJ, Volek JS. Very low-carbohydrate and low-fat diets affect fasting lipids and postprandial lipemia differently in overweight men. *The Journal of nutrition*. 2004;134(4):880-5.
182. Samaha FF, Iqbal N, Seshadri P, et al. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *The New England journal of medicine*. 2003;348(21):2074-81.
183. Esposito K, Giugliano D. Beneficial effects of a Dietary Approaches to Stop Hypertension eating plan on features of the metabolic syndrome. *Diabetes care*. 2006;29(4):954; author reply 954-5.
184. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;292(12):1440-6.
185. Dickinson HO, Mason JM, Nicolson DJ, et al. Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomized controlled trials. *Journal of hypertension*. 2006;24(2):215-33.
186. Mulrow CD, Chiquette E, Angel L, et al. WITHDRAWN: Dieting to reduce body weight for controlling hypertension in adults. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2008;(4):CD000484.
187. Whelton SP, Chin A, Xin X, He J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Annals of internal medicine*. 2002;136(7):493-503.
188. Geleijnse JM, Kok FJ, Grobbee DE. Blood pressure response to changes in sodium and potassium intake: a metaregression analysis of randomised trials. *Journal of human hypertension*. 2003;17(7):471-80.
189. Babio N, Bulló M, Salas-Salvadó J. Mediterranean diet and metabolic syndrome: the evidence. *Public health nutrition*. 2009;12(9A):1607-17.
190. Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders ART, Kok FJ. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *Journal of hypertension*. 2002;20(8):1493-9.
191. Pereira MA, Swain J, Goldfine AB, Rifai N, Ludwig DS. Effects of a low-glycemic load diet on resting energy expenditure and heart disease risk factors during weight loss. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;292(20):2482-90.
192. Whelton SP, Hyre AD, Pedersen B, et al. Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials. *Journal of hypertension*. 2005;23(3):475-81.
193. Ferrara LA, Raimondi AS, d' Episcopo L, et al. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Archives of internal medicine*. 2000;160(6):837-42.
194. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *The New England journal of medicine*. 2001;344(1):3-10.
195. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of hypertension*. 2007;25(6):1105-87.
196. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106(21):2747-57.
197. Appel LJ, Brands MW, Daniels SR, et al. Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension*. 2006;47(2):296-308.
198. Lloyd-Jones DM, Liu K, Colangelo LA, et al. Consistently stable or decreased body mass index in young adulthood and longitudinal changes in metabolic syndrome components: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Circulation*. 2007;115(8):1004-11.

199. Nordmann AJ, Nordmann A, Briel M, et al. Effects of low-carbohydrate vs low-fat diets on weight loss and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of internal medicine*. 2006;166(3):285-93.
200. Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2006;145(1):1-11.
201. Jiménez-Gómez Y, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, et al. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):e70-6.
202. Fuentes F, López-Miranda J, Sánchez E, et al. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Annals of internal medicine*. 2001;134(12):1115-9.
203. Dobbelsteyn CJ, Joffres MR, MacLean DR, Flowerdew G. A comparative evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as indicators of cardiovascular risk factors. The Canadian Heart Health Surveys. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001;25(5):652-61.
204. Narisawa S, Nakamura K, Kato K, et al. Appropriate waist circumference cutoff values for persons with multiple cardiovascular risk factors in Japan: a large cross-sectional study. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association*. 2008;18(1):37-42.
205. Zhu S, St-Onge M-P, Heshka S, Heymsfield SB. Lifestyle behaviors associated with lower risk of having the metabolic syndrome. *Metabolism: clinical and experimental*. 2004;53(11):1503-11.
206. Nishida M, Moriyama T, Sugita Y, Yamauchi-Takahara K. Abdominal obesity exhibits distinct effect on inflammatory and anti-inflammatory proteins in apparently healthy Japanese men. *Cardiovascular diabetology*. 2007;6:27.
207. Koh-Banerjee P, Franz M, Sampson L, et al. Changes in whole-grain, bran, and cereal fiber consumption in relation to 8-y weight gain among men. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(5):1237-45.
208. Ludwig DS, Pereira MA, Kroenke CH, et al. Dietary fiber, weight gain, and cardiovascular disease risk factors in young adults. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;282(16):1539-46.
209. Liu S, Willett WC, Manson JE, et al. Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;78(5):920-7.
210. Field AE, Willett WC, Lissner L, Colditz GA. Dietary fat and weight gain among women in the Nurses' Health Study. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2007;15(4):967-76.
211. Koh-Banerjee P, Chu N-F, Spiegelman D, et al. Prospective study of the association of changes in dietary intake, physical activity, alcohol consumption, and smoking with 9-y gain in waist circumference among 16 587 US men. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;78(4):719-27.
212. Bes-Rastrollo M, Sánchez-Villegas A, de la Fuente C, et al. Olive oil consumption and weight change: the SUN prospective cohort study. *Lipids*. 2006;41(3):249-56.
213. García-Lorda P, Megias Rangil I, Salas-Salvadó J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *European journal of clinical nutrition*. 2003;57 Suppl 1:S8-11.
214. He K, Hu FB, Colditz GA, et al. Changes in intake of fruits and vegetables in relation to risk of obesity and weight gain among middle-aged women. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004;28(12):1569-74.
215. Vioque J, Weinbrenner T, Castelló A, Asensio L, Garcia de la Hera M. Intake of fruits and vegetables in relation to 10-year weight gain among Spanish adults. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2008;16(3):664-70.

216. Laaksonen DE, Lakka H-M, Niskanen LK, et al. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *American journal of epidemiology*. 2002;156(11):1070-7.
217. Turley ML, Skeaff CM, Mann JI, Cox B. The effect of a low-fat, high-carbohydrate diet on serum high density lipoprotein cholesterol and triglyceride. *European journal of clinical nutrition*. 1998;52(10):728-32.
218. Radhika G, Ganesan A, Sathya RM, Sudha V, Mohan V. Dietary carbohydrates, glycemic load and serum high-density lipoprotein cholesterol concentrations among South Indian adults. *European journal of clinical nutrition*. 2009;63(3):413-20.
219. Aston LM. Glycaemic index and metabolic disease risk. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2006;65(1):125-34.
220. Ellison RC, Zhang Y, Qureshi MM, et al. Lifestyle determinants of high-density lipoprotein cholesterol: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *American heart journal*. 2004;147(3):529-35.
221. Alonso A, Beunza JJ, Delgado-Rodríguez M, Martínez JA, Martínez-González MA. Low-fat dairy consumption and reduced risk of hypertension: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;82(5):972-9.
222. Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, et al. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(4):1012-8.
223. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2006;16(8):559-68.
224. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(2):220-30.
225. Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2010;69(3):333-40.
226. Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Mediterranean diet and the metabolic syndrome. *Molecular nutrition & food research*. 2007;51(10):1268-74.
227. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *The American journal of medicine*. 1999;107(1):85-97.
228. Chen NG, Holmes M, Reaven GM. Relationship between insulin resistance, soluble adhesion molecules, and mononuclear cell binding in healthy volunteers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(10):3485-9.
229. 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(2):533-8.
230. Brunelleschi S, Bardelli C, Amoruso A, et al. Minor polar compounds extra-virgin olive oil extract (MPC-OOE) inhibits NF-kappa B translocation in human monocyte/macrophages. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2007;56(6):542-9.
231. Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, et al. Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;93(2):267-74.
232. Zeoli A, Dentelli P, Brizzi MF. Endothelial progenitor cells and their potential clinical implication in cardiovascular disorders. *Journal of endocrinological investigation*. 2009;32(4):370-82.

233. Heiss C, Keymel S, Niesler U, et al. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(9):1441-8.
234. Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(11):1895-907.
235. Mano R, Ishida A, Ohya Y, Todoriki H, Takishita S. Dietary intervention with Okinawan vegetables increased circulating endothelial progenitor cells in healthy young women. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):544-8.
236. Zhu J, Wang X, Chen J, Sun J, Zhang F. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells from patients with hyperhomocysteinemia. *Archives of medical research*. 2006;37(4):484-9.
237. Zhu JH, Chen JZ, Wang XX, et al. Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;40(5):648-52.
238. Miller ER, Erlinger TP, Sacks FM, et al. A dietary pattern that lowers oxidative stress increases antibodies to oxidized LDL: results from a randomized controlled feeding study. *Atherosclerosis*. 2005;183(1):175-82.
239. Bunout D, Garrido A, Suazo M, et al. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*. 2000;16(2):107-10.
240. Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, et al. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood*. 2004;104(12):3591-7.
241. Lefèvre J, Michaud S-E, Haddad P, et al. Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(14):3845-52.
242. Olas B, Wachowicz B. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets*. 2005;16(5):251-60.
243. Dell'Agli M, Buscialà A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular research*. 2004;63(4):593-602.
244. Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, et al. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*. 2005;12(6):596-600.
245. Johnson JL, Slentz CA, Houmard JA, et al. Exercise training amount and intensity effects on metabolic syndrome (from Studies of a Targeted Risk Reduction Intervention through Defined Exercise). *The American journal of cardiology*. 2007;100(12):1759-66.
246. Herd SL, Kiens B, Boobis LH, Hardman AE. Moderate exercise, postprandial lipemia, and skeletal muscle lipoprotein lipase activity. *Metabolism: clinical and experimental*. 2001;50(7):756-62.
247. Pettitt DS, Cureton KJ. Effects of prior exercise on postprandial lipemia: a quantitative review. *Metabolism: clinical and experimental*. 2003;52(4):418-24.
248. Walther C, Gielen S, Hambrecht R. The effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans. *Exercise and sport sciences reviews*. 2004;32(4):129-34.
249. Gomez-Cabrera M-C, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(2):126-31.

250. Seip RL, Mair K, Cole TG, Semenkovich CF. Induction of human skeletal muscle lipoprotein lipase gene expression by short-term exercise is transient. *The American journal of physiology*. 1997;272(2 Pt 1):E255-61.
251. Okura T, Nakata Y, Ohkawara K, et al. Effects of aerobic exercise on metabolic syndrome improvement in response to weight reduction. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2007;15(10):2478-84.
252. Tanaka H, Seals DR, Monahan KD, et al. Regular aerobic exercise and the age-related increase in carotid artery intima-media thickness in healthy men. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2002;92(4):1458-64.
253. Anon. American College of Sports Medicine Position Stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. *Medicine and science in sports and exercise*. 1998;30(6):975-91.
254. Katzmarzyk PT, Church TS, Blair SN. Cardiorespiratory fitness attenuates the effects of the metabolic syndrome on all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Archives of internal medicine*. 2004;164(10):1092-7.
255. Gill JMR, Malkova D. Physical activity, fitness and cardiovascular disease risk in adults: interactions with insulin resistance and obesity. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2006;110(4):409-25.
256. Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, et al. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2005;142(8):611-9.
257. Katzmarzyk PT, Leon AS, Wilmore JH, et al. Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the HERITAGE Family Study. *Medicine and science in sports and exercise*. 2003;35(10):1703-9.
258. Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2005;99(1):338-43.
259. Christ-Roberts CY, Mandarino LJ. Glycogen synthase: key effect of exercise on insulin action. *Exercise and sport sciences reviews*. 2004;32(3):90-4.
260. Long YC, Widgren U, Zierath JR. Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2004;63(2):227-32.
261. Wojtaszewski JFP, Jørgensen SB, Frøsig C, et al. Insulin signalling: effects of prior exercise. *Acta physiologica Scandinavica*. 2003;178(4):321-8.
262. Bruce CR, Anderson MJ, Carey AL, et al. Muscle oxidative capacity is a better predictor of insulin sensitivity than lipid status. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(11):5444-51.
263. Hegarty BD, Furler SM, Ye J, Cooney GJ, Kraegen EW. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta physiologica Scandinavica*. 2003;178(4):373-83.
264. Schmitz-Peiffer C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cellular signalling*. 2000;12(9-10):583-94.
265. Bekedam MA, van Beek-Harmsen BJ, Boonstra A, et al. Maximum rate of oxygen consumption related to succinate dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres of chronic heart failure patients and controls. *Clinical physiology and functional imaging*. 2003;23(6):337-43.
266. Thamer C, Stumvoll M, Niess A, et al. Reduced skeletal muscle oxygen uptake and reduced beta-cell function: two early abnormalities in normal glucose-tolerant offspring of patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2003;26(7):2126-32.
267. Nyholm B, Nielsen MF, Kristensen K, et al. Evidence of increased visceral obesity and reduced physical fitness in healthy insulin-resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2004;150(2):207-14.



268. Ayyad C, Andersen T. Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000;1(2):113-9.
269. Lemmens VEPP, Oenema A, Klepp KI, Henriksen HB, Brug J. A systematic review of the evidence regarding efficacy of obesity prevention interventions among adults. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2008;9(5):446-55.
270. Slentz CA, Houmard JA, Johnson JL, et al. Inactivity, exercise training and detraining, and plasma lipoproteins. STRRIDE: a randomized, controlled study of exercise intensity and amount. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2007;103(2):432-42.
271. Griffin BA. Lipoprotein atherogenicity: an overview of current mechanisms. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1999;58(1):163-9.
272. Kolovou GD, Mikhailidis DP, Kovar J, et al. Assessment and Clinical Relevance of Non-fasting and Postprandial Triglycerides: An Expert Panel Statement. *Current vascular pharmacology*. 2011.
273. Lind L. Lipids and endothelium-dependent vasodilation--a review. *Lipids*. 2002;37(1):1-15.
274. Farah NMF, Malkova D, Gill JMR. Effects of exercise on postprandial responses to ad libitum feeding in overweight men. *Medicine and science in sports and exercise*. 2010;42(11):2015-22.
275. Hardman AE, Lawrence JE, Herd SL. Postprandial lipemia in endurance-trained people during a short interruption to training. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 1998;84(6):1895-901.
276. Gill JMR, Al-Mamari A, Ferrell WR, et al. Effects of prior moderate exercise on postprandial metabolism and vascular function in lean and centrally obese men. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(12):2375-82.
277. Singhal A, Trilk JL, Jenkins NT, Bigelman KA, Cureton KJ. Effect of intensity of resistance exercise on postprandial lipemia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2009;106(3):823-9.
278. Miyashita M, Burns SF, Stensel DJ. Exercise and postprandial lipemia: effect of continuous compared with intermittent activity patterns. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(1):24-9.
279. Pettitt DS, Arngrímsson SA, Cureton KJ. Effect of resistance exercise on postprandial lipemia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2003;94(2):694-700.
280. Mestek ML, Plaisance EP, Ratcliff LA, et al. Aerobic exercise and postprandial lipemia in men with the metabolic syndrome. *Medicine and science in sports and exercise*. 2008;40(12):2105-11.
281. Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2005;98(1):3-30.
282. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003;289(14):1799-804.
283. Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;281(18):1722-7.
284. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and science in sports and exercise*. 1999;31(7):987-97.
285. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2003;285(2):E433-7.

286. Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(8):884-6.
287. Steensberg A, Keller C, Starkie RL, et al. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2002;283(6):E1272-8.
288. Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 1993;75(3):1354-63.
289. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgraduate medical journal*. 2003;79(930):195-199; quiz 198-200.
290. Tsai W-C, Li Y-H, Lin C-C, Chao T-H, Chen J-H. Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2004;106(3):315-9.
291. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research*. 2000;86(5):494-501.
292. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*. 2000;87(10):840-4.
293. Esposito K, Ciotola M, Sasso FC, et al. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in patients with the metabolic syndrome: role of tumor necrosis factor-alpha. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2007;17(4):274-9.
294. Rognum O, Bjørnstad TH, Kahrs C, et al. Endothelial function in highly endurance-trained men: effects of acute exercise. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. 2008;22(2):535-42.
295. Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *The Journal of physiology*. 2005;568(Pt 2):357-69.
296. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *The American journal of physiology*. 1995;269(6 Pt 1):C1371-8.
297. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *The Journal of physiology*. 2004;561(Pt 1):1-25.
298. Green DJ, Bilsborough W, Naylor LH, et al. Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *The Journal of physiology*. 2005;562(Pt 2):617-28.
299. Thijssen DHJ, Dawson EA, Black MA, et al. Brachial artery blood flow responses to different modalities of lower limb exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. 2009;41(5):1072-9.
300. Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes*. 2001;50(2):241-7.
301. Khayat ZA, Patel N, Klip A. Exercise- and insulin-stimulated muscle glucose transport: distinct mechanisms of regulation. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquée*. 2002;27(2):129-51.
302. Hayashi T, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *The American journal of physiology*. 1997;273(6 Pt 1):E1039-51.
303. Brown MD. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Experimental physiology*. 2003;88(5):645-58.

304. Rakobowchuk M, McGowan CL, de Groot PC, et al. Endothelial function of young healthy males following whole body resistance training. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2005;98(6):2185-90.
305. Wang J, Widlansky ME. Lifestyle choices and endothelial function: risk and relevance. *Current vascular pharmacology*. 2009;7(2):209-24.
306. Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, et al. Exercise training enhances endothelial function in young men. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;33(5):1379-85.
307. Rinder MR, Spina RJ, Ehsani AA. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in older endurance-trained men. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2000;88(2):761-6.
308. Green DJ, Fowler DT, O'Driscoll JG, Blanksby BA, Taylor RR. Endothelium-derived nitric oxide activity in forearm vessels of tennis players. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 1996;81(2):943-8.
309. Green DJ, O'Driscoll JG, Blanksby BA, Taylor RR. Effect of casting on forearm resistance vessels in young men. *Medicine and science in sports and exercise*. 1997;29(10):1325-31.
310. Tjønnå AE, Lee SJ, Rognmo Ø, et al. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation*. 2008;118(4):346-54.
311. Roberts CK, Chen AK, Barnard RJ. Effect of a short-term diet and exercise intervention in youth on atherosclerotic risk factors. *Atherosclerosis*. 2007;191(1):98-106.
312. Goon PKY, Lip GYH. Endothelial progenitor cells, endothelial cell dysfunction and much more: observations from cardiac syndrome X. *Heart (British Cardiac Society)*. 2007;93(9):1020-1.
313. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2008;58(2):148-51.
314. Balbarini A, Barsotti MC, Di Stefano R, Leone A, Santoni T. Circulating endothelial progenitor cells characterization, function and relationship with cardiovascular risk factors. *Current pharmaceutical design*. 2007;13(16):1699-713.
315. DeSouza CA, Clevenger CM, Greiner JJ, et al. Evidence for agonist-specific endothelial vasodilator dysfunction with ageing in healthy humans. *The Journal of physiology*. 2002;542(Pt 1):255-62.
316. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004;109(2):220-6.
317. Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, et al. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2007;102(3):847-52.
318. Witkowski S, Lockard MM, Jenkins NT, et al. Relationship between circulating progenitor cells, vascular function and oxidative stress with long-term training and short-term detraining in older men. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2010;118(4):303-11.
319. Brehm M, Picard F, Ebner P, et al. Effects of exercise training on mobilization and functional activity of blood-derived progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *European journal of medical research*. 2009;14(9):393-405.
320. Sarto P, Balducci E, Balconi G, et al. Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2007;13(9):701-8.
321. Müller-Ehmsen J, Braun D, Schneider T, et al. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction. *European heart journal*. 2008;29(12):1560-8.

322. Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. *Coronary artery disease*. 2004;15(5):235-42.
323. Adams V, Lenk K, Linke A, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(4):684-90.
324. Tota-Maharaj R, Defilippis AP, Blumenthal RS, Blaha MJ. A practical approach to the metabolic syndrome: review of current concepts and management. *Current opinion in cardiology*. 2010;25(5):502-12.
325. Solomon TPJ, Sistrun SN, Krishnan RK, et al. Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2008;104(5):1313-9.
326. Hansen D, Dendale P, van Loon LJC, Meeusen R. The impact of training modalities on the clinical benefits of exercise intervention in patients with cardiovascular disease risk or type 2 diabetes mellitus. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. 2010;40(11):921-40.
327. Boutcher SH. High-intensity intermittent exercise and fat loss. *Journal of obesity*. 2011;2011:868305.
328. McNicol AJ, O'Brien BJ, Paton CD, Knez WL. The effects of increased absolute training intensity on adaptations to endurance exercise training. *Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia*. 2009;12(4):485-9.
329. Martínez-González MA, López-Fontana C, Varo JJ, Sánchez-Villegas A, Martínez JA. Validation of the Spanish version of the physical activity questionnaire used in the Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study. *Public health nutrition*. 2005;8(7):920-7.
330. Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Wright M, Gomez-Gracia E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *European journal of clinical nutrition*. 2004;58(11):1550-2.
331. Tanaka H, Monahan KD, Seals DR. Age-predicted maximal heart rate revisited. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37(1):153-6.
332. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. 2005;64(1):1-8.
333. Rasool AHG, Ghazali DM, Abdullah H, Halim AS, Wong AR. Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism and response to skin reactive hyperemia. *Microvascular research*. 2009;78(2):230-4.
334. Ehrman J. *ACSM's resource manual for Guidelines for exercise testing and prescription*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
335. Don Franks B HE. *Instructor's manual and test bank to accompany exercise physiology theory and application to fitness and performance*. 4th ed. Champaign, IL: Human Kinetics; 2003.
336. Anon. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(1):111-7.
337. Huang P-H, Chen Y-H, Tsai H-Y, et al. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(4):869-77.
338. Möbius-Winkler S, Linke A, Adams V, Schuler G, Erbs S. How to improve endothelial repair mechanisms: the lifestyle approach. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2010;8(4):573-80.
339. Gatta L, Armani A, Iellamo F, et al. Effects of a short-term exercise training on serum factors involved in ventricular remodelling in chronic heart failure patients. *International journal of cardiology*. 2010.

340. Erbs S, Höllriegel R, Linke A, Beck EB, Adams V, Gielen S, Möbius-Winkler S, Sandri M, Kränkel N, Hambrecht R SG. Exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb) promotes restoration of peripheral vasomotor function, induction of endogenous regeneration, and improvement of left ventricular function. *Circulation. Heart failure*. 2010;3(4):486-94.
341. Möbius-Winkler S, Höllriegel R, Schuler G, Adams V. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009;75(1):25-37.
342. Möbius-Winkler S, Hilberg T, Menzel K, et al. Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2009;107(6):1943-50.
343. Cubbon RM, Murgatroyd SR, Ferguson C, et al. Human exercise-induced circulating progenitor cell mobilization is nitric oxide-dependent and is blunted in South Asian men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(4):878-84.
344. Sonnenschein K, Horváth T, Mueller M, et al. Exercise training improves in vivo endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*. 2011;18(3):406-14.
345. Fernández JM, Da Silva-Grigoletto ME, Caballero-Villarraso J, et al. Pre-exercise intake of different carbohydrates modifies ischemic reactive hyperemia after a session of anaerobic, but not after aerobic exercise. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. 2010;24(6):1623-32.
346. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England journal of medicine*. 2005;353(10):999-1007.
347. Walther C, Gaede L, Adams V, et al. Effect of increased exercise in school children on physical fitness and endothelial progenitor cells: a prospective randomized trial. *Circulation*. 2009;120(22):2251-9.
348. de Souza SAF, Faintuch J, Sant'anna AF. Effect of weight loss on aerobic capacity in patients with severe obesity before and after bariatric surgery. *Obesity surgery*. 2010;20(7):871-5.
349. Jialal I, Fadini GP, Pollock K, Devaraj S. Circulating levels of endothelial progenitor cell mobilizing factors in the metabolic syndrome. *The American journal of cardiology*. 2010;106(11):1606-8.
350. Meckling KA, Sherfey R. A randomized trial of a hypocaloric high-protein diet, with and without exercise, on weight loss, fitness, and markers of the Metabolic Syndrome in overweight and obese women. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme*. 2007;32(4):743-52.
351. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Agostini C, Boscaro E, Tiengo A, Dimmeler S AA. Low CD34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):213-9.
352. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Agostini C, Boscaro E, Tiengo A, Dimmeler S AA. Low CD34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis*. 2009;207(1):213-9.
353. Devaraj S JI. Dysfunctional endothelial progenitor cells in metabolic syndrome. *Experimental diabetes Research*. (doi 10.1155/2012/585018).

## **XI. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**



# Moderate-to-high-intensity training and a hypocaloric Mediterranean diet enhance endothelial progenitor cells and fitness in subjects with the metabolic syndrome

Juan Marcelo FERNÁNDEZ\*†, Daniel ROSADO-ÁLVAREZ\*†,  
Marzo Edir DA SILVA GRIGOLETTO‡, Oriol Alberto RANGEL-ZÚÑIGA\*†,  
Leslie Lorena LANDAETA-DÍAZ\*†, Javier CABALLERO-VILLARRASO§,  
José LÓPEZ-MIRANDA\*†, Francisco PÉREZ-JIMÉNEZ\*† and  
Francisco FUENTES-JIMÉNEZ\*†

\*Lipids and Atherosclerosis Unit, Department of Medicine, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain, †CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ‡Andalusian Centre of Sports Medicine, Córdoba, Spain, and §Clinical Analysis Service, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

## A B S T R A C T

A reduction in EPC (endothelial progenitor cell) number could explain the development and progression of atherosclerosis in the MetS (metabolic syndrome). Although much research in recent years has focused on the Mediterranean dietary pattern and the MetS, the effect of this diet with/without moderate-to-high-intensity endurance training on EPCs levels and CrF (cardiorespiratory fitness) remains unclear. In the present study, the objective was to assess the effect of a Mediterranean diet hypocaloric model with and without moderate-to-high-intensity endurance training on EPC number and CrF of MetS patients. Thus 45 MetS patients (50–66 years) were randomized to a 12-week intervention with the hypocaloric MeD (Mediterranean diet) or the MeDE (MeD plus moderate-to-high-intensity endurance training). Training included two weekly supervised sessions [80% MaxHR (maximum heart rate); leg and arm pedalling] and one at-home session (65–75% MaxHR; walking controlled by heart rate monitors). Changes in: (i) EPC number [CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> (kinase insert domain-containing receptor)], (ii) CrF variables and (iii) MetS components and IRH (ischaemic reactive hyperaemia) were determined at the end of the study. A total of 40 subjects completed all 12 weeks of the study, with 20 in each group. The MeDE led to a greater increase in EPC numbers and CrF than did the MeD intervention ( $P \leq 0.001$ ). In addition, a positive correlation was observed between the increase in EPCs and fitness in the MeDE group ( $r = 0.72$ ;  $r^2 = 0.52$ ;  $P \leq 0.001$ ). Body weight loss, insulin sensitivity, TAGs (triacylglycerols) and blood pressure showed a greater decrease in the MeDE than MeD groups. Furthermore, IRH was only improved after the MeDE intervention. In conclusion, compliance with moderate-to-high-intensity endurance training enhances the positive effects of a model of MeD on the regenerative capacity of endothelium and on the fitness of MetS patients.

**Key words:** cardiorespiratory fitness, cardiovascular risk, endothelial progenitor cell, Mediterranean diet, microvascular reactivity, moderate-to-high-intensity training.

**Abbreviations:** AUC, area under the curve; BMI, body mass index; BP, blood pressure; CrF, cardiorespiratory fitness; EPC, endothelial progenitor cell; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA, homoeostasis model assessment; HR, heart rate; IRH, ischaemic reactive hyperaemia; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; KDR, kinase insert domain-containing receptor; maxHR, maximum HR; MeD, Mediterranean diet; MetS, metabolic syndrome; MeDE, MeD plus moderate-to-high-intensity endurance training; 6MWT, six-min walk test; StST, sit to stand test; TAG, triacylglycerol; VEGF, vascular endothelial growth factor;  $\dot{V}_{O_2 \max}$ , maximal oxygen consumption.

**Correspondence:** Dr Francisco Fuentes Jiménez (email [ffjuentesjimenez@yahoo.es](mailto:fjfuentesjimenez@yahoo.es)).



## INTRODUCTION

The MetS (metabolic syndrome) increases the risk of cardiovascular morbidity and mortality [1]. Recently, this phenomenon has been linked to EPCs (endothelial progenitors cells). The EPC is a bone marrow-derived cell subtype, which modulates different and complex processes of endothelial and myocardial regeneration, such as angiogenesis, myogenesis and apoptosis of cardiomyocytes [2]. A reduction in CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> (kinase insert domain-containing receptor) cells (a putative EPCs phenotype) has been observed in MetS patients [3]; moreover, this decrease has also been observed along with an impaired functionality of such cells as expressed by a decrease in repair function of the damaged endothelium or neovascularization [4,5]. Such a phenomenon would favour the onset of atherosclerotic disease or its long-term progression [6].

In the primary prevention of the MetS and its individual components, the MeD (Mediterranean diet) has proven not only effective, but it can also be easily adopted by everybody, regardless of their biological and cultural characteristics [7–9]. The MeD has a positive cardiovascular effect, reducing BP (blood pressure) and improving endothelial dysfunction [10,11]. Moreover, it has been observed that a quantitative modification in the fatty and/or caloric intake of the MeD may induce weight loss and lipidic control in obese subjects [12]. However, there are no objective data on the possible effects of a therapeutic model of hypocaloric MeD on the factors involved in the endothelial regeneration processes in MetS patients.

On the other hand, exercise training is now considered as a key component for the therapeutic approach on obesity and the MetS [13]. Regular endurance exercise favours weight loss and improves insulin resistance [14]; it also improves postprandial lipidic control [15] and reduces oxidative stress and systemic inflammatory response [16]. However, most exercise protocols designed for obese or MetS patients use regular steady-state exercise, such as walking and jogging. In such programmes, the low-intensity effort that may be undertaken by MetS patients who were previously sedentary could result in insufficiency to induce significant cardiometabolic adaptations [17]. For this reason, another alternative could be including moderate-to-high-intensity efforts from the onset of the training programme. One strategy for such a purpose is to periodize the training, increasing the duration of high-intensity effort progressively during the programme, until the subject can maintain high-intensity effort in a prolonged endurance exercise. Although there is no data about the effects of such programmes on the endothelium regenerative capacity; recent studies have shown that high-intensity exercise training leads to greater improvements in CrF (cardiorespiratory fitness),

fat mass and glucose tolerance, compared with low-intensity exercise training [18,19].

On the basis of the evidence discussed above, we aimed at investigating the effect of a model of hypocaloric MeD, by itself or combined with periodized moderate-to-high-intensity endurance training, on the endothelium regenerative capacity (i.e. EPC numbers), CrF and cardiovascular risk factors in previously sedentary MetS patients.

## MATERIALS AND METHODS

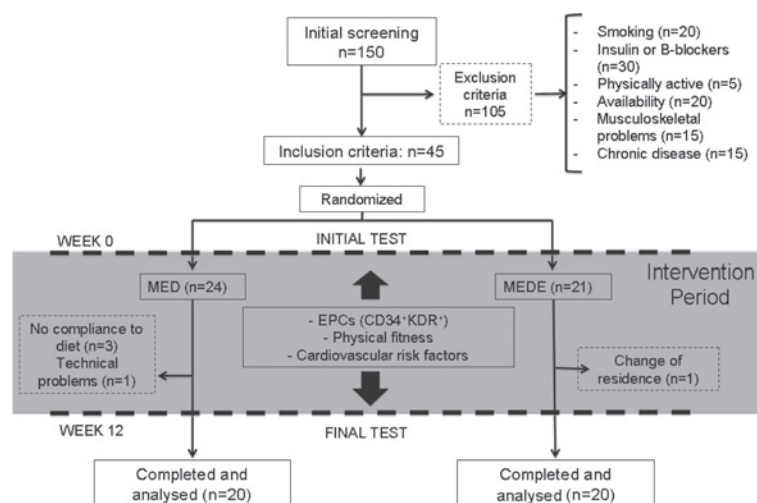
### Subjects

A total of 45 subjects (67% postmenopausal women,  $n=30$ ; and 33% men,  $n=15$ ), meeting three or more of the MetS criteria as proposed by the Third Report of the National Cholesterol Education Program ATP-III (NCEP ATP-III 2002), participated in the present study (40 completed). These subjects (age,  $57.92 \pm 5.00$  years; range, 50–66 years) were selected from 150 volunteers, both men and women, undergoing nutritional/medical screening at the Lipids and Atherosclerosis Unit at Reina Sofia University Hospital (Cordoba, Spain) between September 2009 and July 2010. The exclusion criteria were statin therapy, Type 1 or 2 diabetes, antecedent of unstable angina, heart failure or stroke and medical therapy able to modify heart frequency such as  $\beta$ -blockers. Other exclusion criteria were age  $>70$  years, smoking, significant chronic pulmonary illness, renal or hepatic insufficiency, exercise testing limited by angina or leg claudication and neurological or orthopaedic limitations. In addition, during the 6 months prior to the study, none of the subjects should have participated in any weight-loss programme, nor have practiced any regular physical exercise or intense physical activity ( $>5$  h of weekly vigorous activity). During the first appointment with the physician, the subjects underwent detailed clinical evaluation and a 12-lead resting ECG as a final filter to accept or reject participation in the study.

All subjects gave written informed consent to participate and the study had been previously approved by The Human Investigation Review Committee at Reina Sofia University Hospital.

### Study design

Upon enrollment, the participants were randomly assigned to a 12-week experimental intervention with either a model of hypocaloric normoproteic MeDE (MeD plus moderate-to-high-intensity endurance training) or to the same diet without exercise (MeD) (Figure 1). Both groups were closely supervised by a dietitian and a physician who made weekly phone calls and attended monthly appointments with participants in order to promote adherence and proper implementation of programmes. A 3-day food diary, a 132-food frequency



**Figure 1** Study flow diagram, dropouts and reasons of dropouts

questionnaire and a validated Spanish version of the physical activity questionnaire used in the Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study [20] were used to measure dietary intake and physical habits at both the beginning and the end of the study. During these sessions, fasting blood samples were collected to determine circulating EPCs and measure glucose, insulin and lipidic parameters. Vascular and physical fitness tests were measured in all participants at the beginning and at the end of the study. BP, body weight, height and waist circumference were also measured and BMI (body mass index) were calculated.

### Dietary intake and MeD prescription

At baseline and at the end of the intervention period, the volunteers were asked to keep two 3-day weighted food diaries and a qualitative/quantitative questionnaire of the frequency of food intake was administered by a registered dietitian. The weighted food intake over 2 week days and 1 weekend day was obtained by using scales provided by the investigators. The analysis of the food diaries and questionnaires of the frequency of food intake were carried out with the use of a dietary analysis software program (Dietsource version 2.0; Novartis).

At the beginning of the intervention period, all of the volunteers (in MeD and MeDE) were provided with information about the MeD. They were counselled on food groups and specific items on this type of eating pattern and they were asked to follow a specific daily and weekly food plan. The individual requirement of this plan was based on the restriction of 40% of habitual energy intake (~500 kcal/day; where 1 kcal = 4.168 kJ) in order to promote weight loss. This restriction was progressive: 20% during the first 4 weeks and 10% in each of the following 4 weeks until completion of the 12 weeks of intervention. High-quality replica foods

and photographs were used to explain the written prescription on size portions and frequency of each food group to be consumed daily in order to fulfil the individual energy requirements. The dietary targets for the percentage of macronutrients in the hypocaloric MeD model were: 50% carbohydrates, 30% lipids [20% MUFAs (mono-unsaturated fatty acids), provided by virgin olive oil, 5% SFAs (saturated fatty acids) and 5% PUFAs (polyunsaturated fatty acids)] and approximately 20–22% protein. In this line, the participants were instructed to consume 0.8 g protein/kg of body weight per day during the whole intervention period in order to maintain a normal protein intake.

Qualitatively, all food plans included daily consumption of extra virgin olive oil, red wine, whole-wheat grains and products, low-fat dairy products, salads, mixed fruits and whole raw almonds. The extra virgin olive oil as the main source of fat was supplied to the subject. Suggestions given to all subjects included the elimination or severe restriction of deep-fried foods, fatty and processed meats, candy, sweetened soft drinks, pies and sugars. The compliance throughout the study was assessed through a 14-item questionnaire of adherence to the traditional MeD [21], which was completed every 4 weeks. The objective of these 14-item questionnaires was also to reinforce the key principles of the MeD, including increased consumption of vegetables, fruits, red wine, nuts and the use of olive oil as main culinary fat.

### Exercise intervention

The 12-week endurance training regime consisted of 3 weekly sessions of moderate-to-high-intensity training. Of these, two were supervised training sessions at the laboratory, whereas the other session was performed at home. Weekly supervised training was performed using two different ergometers; a cycle-ergometer to exercise

**Table 1** Exercise prescription to hypocaloric MeDE group

\*Exercise intensity was 80 % of maximum heart rate [23] for the moderate-to-high-intensity series; †active recovery intensity was 50 % of maximum HR.

Week	Supervised exercise (two per week)			At home exercise (one per week)	
	Set*	Active recovery†	Session duration	Intensity	Session duration
	[Cyclergometer (10 min)–arm ergometer (10 min)–cyclergometer (10 min)]			Continue walking exercise	
1	6×1 min	4 min	30 min	65%	25 min
2	6×1.5 min	3.5 min			30 min
3	6×2 min	3 min			35 min
4	6×2.5 min	2.5 min			40 min
5	6×3 min	2 min		70%	35 min
6	6×3.5 min	1.5 min			40 min
7	6×4 min	2 min			45 min
8	6×4.5 min	0.5 min			50 min
9	3×7 min	3 min		75%	45 min
10	3×8 min	2 min			50 min
11	3×9 min	1 min			55 min
12	1×30 min	0 min			60 min

lower limbs (Technogym Recline 500™) and an arm ergometer for the upper limbs (Technogym Ecxite™ 700). Meanwhile, home-based training consisted of outdoor continuous walking. In all sessions, the subjects used a heart rate monitor (FS1™; Polar Electro) to obtain the assigned exercise intensity.

#### Supervised training sessions

A periodized training programme including series at 80 % of maxHR (maximum heart rate) and active recovery periods of decreasing duration were designed since evidence shows that intensity above 70 % maxHR produces important cardiometabolic benefits in obese and overweight patients [17]. Such periodization had as a goal to reach by the end of the intervention period a 30-min continuous exercise session at 80 % of maxHR. Different exercises (leg and arm pedalling) were used to avoid interrupting the session as a result of local fatigue. Details on the supervised exercise protocol are shown in Table 1.

#### At-home sessions

An at-home training programme was prescribed, including an increase in both exercise volume and intensity, as shown in Table 1. The patients were instructed to immediately stop home-based training if they had chest pain or any other distressing symptoms. In addition, all subjects recorded the sustained HR (heart rate) of each training session as well as the corresponding perceived exertion according to a 6–20 Borg scale. Subsequently, this information was analysed in the laboratory to check that exercise intensity and volume corresponded to what was prescribed for each session.

#### Anthropometric and BP measurements

Height and weight were recorded without shoes and wearing light clothing and waist circumference was measured at the level of the umbilicus. BP, measured after a 15-min rest, was recorded as the mean of three supine measurements using an oscillometric BP monitor (Omron M3™).

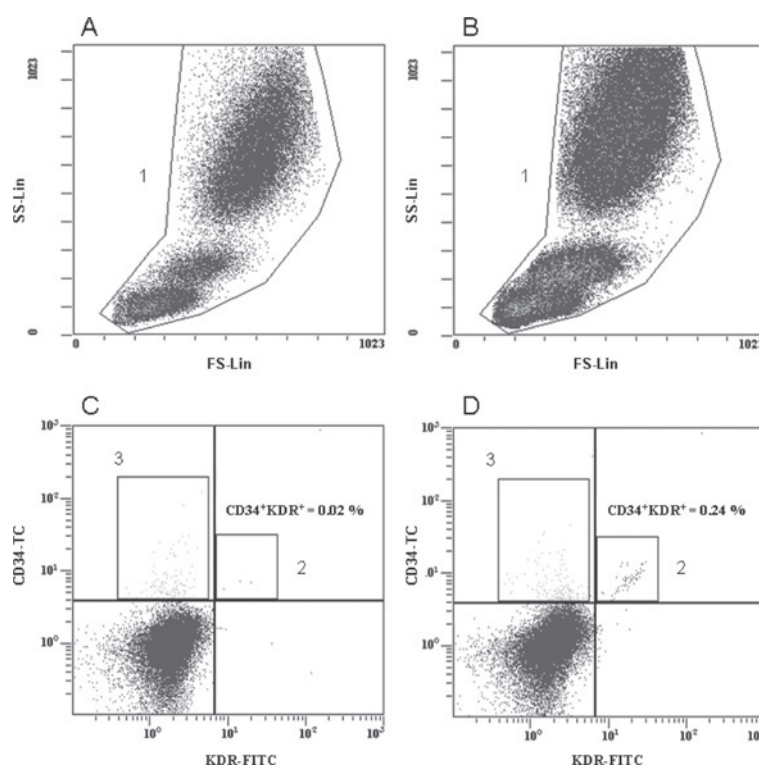
#### Analytic methods

##### Biochemical assays

Fasting venous blood was collected into tubes containing 1 g of EDTA and immediately centrifuged at 4 °C (15 min for 1500 g). Serum and plasma were stored at –85 °C for later determinations of levels of glucose, insulin, total cholesterol, HDL-c (high-density lipoprotein cholesterol) and TAGs. Glucose and plasma TAG concentrations were measured by spectrophotometry using a modular analyser (ISE-4-DDPPEPP; Hoffman La Roche). Plasma insulin levels were measured by chemiluminescent microparticle immunoassay using an analyser (Architect i-4000; Abbott).

##### Circulating EPC number

Much research has shown, in recent years, that EPCs represent approximately 0.01 % of total peripheral blood cells; their numbers vary depending on different factors such as antibody affinity, presence of cardiovascular risk factors, coronary artery disease or chronic heart failure [22]. For flow cytometric quantification of EPCs, 100 µl of whole blood was incubated during 20 min at 4 °C with 10 µl of TC (Tri colour)-conjugated anti-(human-CD34) antibody (Invitrogen) and FITC-conjugated anti-(human KDR) antibody (R&D Systems).



**Figure 2** Representative example for enumeration of EPCs before (A and C) and after (B and D) the intervention

The general distribution of all cell populations is seen on area 1 in (A) and (B). The combination of CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> on area 2 in (C) and (D) was quantified as EPCs. CD34<sup>+</sup> cells were enumerated within the area 3 in (C) and (D). TC, tri-colour.

Afterwards, erythrocytes and platelet were lysed with Versalyse (Beckman Coulter) and the remaining cells were analysed by flow cytometry (Cytometer FC500; Beckman Coulter). CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells were quantified and defined as EPCs. Each analysis included 150000 events passing the gate. The EPC level was considered as the number of CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells/ $\times 10^6$  peripheral blood cells (Figure 2). In addition, data from CD34<sup>+</sup> only cells were also extracted. All data were analysed using commercially available software (CXP analysis software 2.2; Beckman Coulter).

## Exercise tests

### Submaximal exercise test in cycle-ergometer

The protocol used for graded submaximal exercise test was the one proposed by ACSM (American College of Sports Medicine) and YMCA (Young Men Christian Association) [23]; this protocol is a multistage protocol involving a progressive increase in workload based on the subject's HR response during exercise. In brief, 3-min stages on a cycle-ergometer were used (Technogym Recline 500<sup>TM</sup>). Before starting, the length of the saddle was adjusted according to the subject's leg length and was registered for later exercise sessions. HR was constantly monitored with a cardiometer (Polar Electro<sup>TM</sup>).

Moreover, at the end of each stage, BP was measured by auscultation, by a physician with accredited experience. The subjects were asked to keep a pedalling cadence of 50–60 rev./min.

Before they were tested, the participants were familiarized with the cycle-ergometer exercise test and all tests were performed under identical environmental conditions (21–24 °C; 45–55 % relative humidity). The initial stage used for all testing was set at a load of 25 W, considered as a warm-up. The HR reached at the end of the first stage determined the load of the following stage: 50 W (HR, 100 beats/min), 75 W (HR, 90–100 beats/min), 100 W (HR, 80–89 beats/min) or 125 W (HR, <80 beats/min). Subsequently every 3-min stage was incremented by 25 W until one of the criteria established for interruption was met: (i) signs and symptoms of intolerance to exercise (dizziness, dyspnoea, disorientation, etc.) or for fatigue or precocious exhaustion; (b) HR over 100 % of the maxHR as estimated by Tanaka's formula [24]; however, it was sought that all subjects reached at least 85 % maxHR; (iii) an abnormal BP response (increase of systolic BP over 250 mmHg or diastolic BP over 120 mmHg); and (iv) impossibility of keeping a pedalling cadence of 50 rev./min. The loads used in the first test (baseline) following the above-mentioned protocol

were registered to be repeated in the second test after the intervention period (week 12).  $\dot{V}O_{2\max}$  (maximum oxygen consumption; in ml/kg of body weight per min) estimation was performed plotting the workloads and HR for the final two stages of the protocol into the multistage  $\dot{V}O_{2\max}$  prediction equation [25].

### 6MWT (6-min walk test)

The 6MWT is a simple test used in obesity and in a wide clinical spectrum of disease, it provides a valid assessment of functional exercise level for daily physical activities. The 6MWT was performed in a 45.72-m corridor according to the standards of the ATS [26]. The purpose is to cover as much distance as possible in 6 min, although stopping and resting were allowed during the test. For this, the patients were asked to walk at a maximum tolerated speed and were encouraged verbally every minute. A timer with a countdown function was used to time the 6 min. Investigators calculate the distance covered during the 6MWT test after the study is completed (Laps walked  $\times$  distance per lap (in metres) + partial lap).

### StST (sit to stand test)

The StST was performed using a steel-moulded chair (0.40 m height and 0.36 m depth). The subjects were asked to stand up from a sitting position and then to sit down as many times as fast as possible during 30 s. The subjects were instructed to stand up fully and to place their buttocks on the chair in a sitting position between repetitions. The test started and stopped when the examiner said 'Go' or 'Stop' respectively. Prior to the measurements, practice trials with submaximal effort were performed for positioning and learning of the task. The StST was performed two times with an interval of 2 min between trials and the highest number of repetitions was adopted for the individual data.

### IRH (ischaemic reactive hyperaemia)

A Periflux 5000 laser-Doppler monitor (Perimed) was used to measure PORH (post-occlusive reactive hyperaemia). The PORH was used because it provided a simple, swift method for measuring changes in acute microvascular endothelial reactivity in basal conditions [27]. In brief, with the patient lying in a supine position in a room with stable temperature (20–22°C), the BP cuff (HG Erkameter 300) was placed 5 cm above the elbow, whereas the laser probe was attached to the palmar surface of the second finger of the same dominant hand. After a 20-min resting period, basal capillary flow was measured for 1 min ( $t_0$ ). Thereafter, a 4-min distal ischaemia was induced by inflating the cuff to suprasystolic pressure (200–220 mmHg). Subsequently, the cuff was deflated and the flow was recorded for 1 min ( $t_d$ ). The data were recorded and stored using PeriSoft for Windows. The values of the AUC (area under the curve) of the  $t_0$  and  $t_d$

**Table 2** Characteristics of participants in MeD and MeDE groups at baseline

No significant differences were observed between the groups.

Variable	MeD group (n = 20)	MeDE group (n = 20)
Age (years)	57.2 $\pm$ 4.29	59.05 $\pm$ 5.47
Sex: no. (%)		
Female	14 (70)	13 (65)
Male	6 (30)	7 (35)
Routine medication (n)	3.23 $\pm$ 2.09	3.73 $\pm$ 2.52
Risk factors (n)		
Abdominal obesity	20 (100.00 %)	20 (100.00 %)
Hypertension	16 (80.00 %)	18 (90.00 %)
Dyslipidaemia	12 (60.00 %)	13 (65.00 %)
Impaired fasting glucose	13 (65.00 %)	12 (60.00 %)

times were analysed. These data were used to calculate the increase in post-ischaemic flow by means of the equation:  $iAUC = [(AUC_{t_d} - AUC_{t_0}) \times 100 / AUC_{t_0}]$ . In addition, PORHmax was defined as PORHpeak (the maximum value achieved after 4 min of flow occlusion) referred to the baseline skin value and was calculated:  $PORHmax = [PORHpeak - \text{baseline skin flux}]$

### Statistics

The results are presented as means and S.E.M. Sample normality was calculated using the Shapiro–Wilk test. The effect of the different interventions (MeD and MeDE; independent variables) on EPCs, CD34<sup>+</sup>,  $\dot{V}O_{2\max}$ , 6MWT, StST, cardiometabolic risk factors and IRH (dependent variables) was subjected to ANOVA with repeated measurement of two factors: group and time: [2 (group)  $\times$  2 (time)]. A Tukey correction was used to adjust the *P* value in relation to the number of contrasts performed. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ ; for all the statistical tests, the SPSS 15.0 package for Windows was used.

### RESULTS

Forty subjects completed all 12 weeks of the study, 20 in each group. The 'no-compliance to diet' was the most frequent complaint of dropouts in the MeD group, whereas 'change of residence' was the reason given in the MeDE group. There were no significant differences between the MeD and MeDE groups for age and sex (Table 2).

### Dietary intake and physical activity

The self-reported physical activity (including endurance exercise programme) and composition of the study diet consumed by MeD and MeDE during the 12-week study period are presented in Table 3. There were no differences in total energy, carbohydrates, protein,

**Table 3** Nutrient intake and physical activity at baseline and after 12 weeks in the MeD and MeDE groups

Values are means  $\pm$  S.E.M. \*Significant difference within group (baseline against week 12); †significant difference between groups (MeDE against MeD). MET, metabolic equivalent of task; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid.

Variable	MeD group (n = 20)		MeDE group (n = 20)	
	Baseline	Week 12	Baseline	Week 12
Energy (kcal/day)	2211.20 $\pm$ 155.97	1304.28 $\pm$ 93.77*	2126.37 $\pm$ 177.13	1206.18 $\pm$ 116.47*
Carbohydrate (% of energy)	46.85 $\pm$ 1.61	47.03 $\pm$ 1.91	47.19 $\pm$ 1.13	48.11 $\pm$ 1.31
Protein (% of energy)	17.31 $\pm$ 0.93	22.39 $\pm$ 0.74*	18.25 $\pm$ 0.59	22.31 $\pm$ 0.61*
Fat (% of energy)	35.85 $\pm$ 1.47	30.58 $\pm$ 1.33*	34.56 $\pm$ 1.51	29.42 $\pm$ 1.00*
SFA (% of energy)	13.74 $\pm$ 0.52	8.89 $\pm$ 1.28*	13.08 $\pm$ 0.45	7.54 $\pm$ 1.03*
MUFA (% of energy)	14.09 $\pm$ 1.10	20.33 $\pm$ 0.82*	14.02 $\pm$ 0.91	20.01 $\pm$ 0.78*
PUFA (% of energy)	3.41 $\pm$ 0.26	4.70 $\pm$ 0.74	3.49 $\pm$ 0.23	4.01 $\pm$ 0.61
Vitamin C (mg/day)	102.71 $\pm$ 57.96	220.06 $\pm$ 49.90*	99.59 $\pm$ 47.07	210.75 $\pm$ 60.39*
<b>Activity</b>				
Total physical activity (MET/W)	70.77 $\pm$ 9.65	75.00 $\pm$ 7.62	75.59 $\pm$ 9.02	97.59 $\pm$ 6.05*†
Sedentary activities (h/W)	89.60 $\pm$ 6.24	86.25 $\pm$ 7.34	90.37 $\pm$ 3.84	86.61 $\pm$ 4.20
Total energy expenditure (MET/W)	173.84 $\pm$ 8.44	176.26 $\pm$ 9.91	179.37 $\pm$ 10.79	201.25 $\pm$ 7.95*†

**Table 4** MeD diet score and changes in the consumption of key foods rich in antioxidant compounds according to 14-item questionnaire of adherence to the traditional MeD at baseline and after 12 weeks in the MeD and MeDE groups

Values are means  $\pm$  S.E.M. for the quantitative score and the percentage of compliance for specific items of 14-item questionnaire. Each item from the 14-item questionnaire was assigned values of 0 or 1 and summed for the total score. \*Significant difference within group (baseline against week 12).

Variable	MeD group (n = 20)		MeDE group (n = 20)	
	Baseline	Week 12	Baseline	Week 12
Total MeD score (points)	6.10 $\pm$ 0.39	10.50 $\pm$ 0.70*	6.45 $\pm$ 0.39	11.18 $\pm$ 0.58*
Vegetables consumption $\geq$ two servings/day (at least one of them in salad or raw) (% of compliance)	15 (n = 3)	85 (n = 17)*	10 (n = 2)	80 (n = 16)*
Fruits consumption $\geq$ three pieces/day (including fresh juice) (% of compliance)	10 (n = 2)	90 (n = 18)*	10 (n = 2)	95 (n = 19)*
Red wine consumption $\geq$ seven glasses/week (% of compliance)	15 (n = 3)	50 (n = 10)*	10 (n = 2)	45 (n = 9)*
Nuts consumption $\geq$ three times/week (% of compliance)	15 (n = 3)	90 (n = 18)*	15 (n = 3)	95 (n = 19)*

total, monounsaturated, saturated and polyunsaturated fat intakes between the groups. In addition, compliance with Mediterranean eating pattern was good in both exercising and non-exercising groups as shown in the MED score in Table 4.

### Weight and cardiometabolic risk factors

Both study groups exhibited significant weight loss, improvements in BMI and reductions in waist circumference between baseline and post-study measures but, as expected, weight and BMI showed greater changes in the MeDE group (Table 5). In addition, fasting glucose, total cholesterol, LDL-c (low-density lipoprotein cholesterol) and systolic BP were improved by a similar amount in both groups. However, plasma insulin concentration, TAGs, HOMA (homoeostasis model assessment) index and diastolic BP decreased in MeD and MeDE following the intervention, with a greater reduction observed in the exercising group. Analysis of HDL-c did not reveal

any effect of time or trial. Finally, we found statistically significant increase in PORHmax and iAUC after the 12-week treatment only with the MeDE (~50 and 90 % respectively) (Table 5).

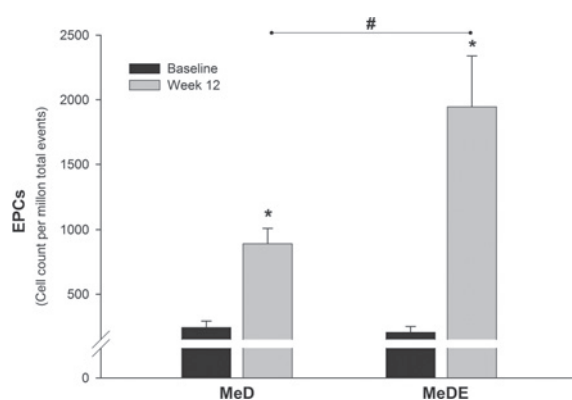
### Endothelial progenitor cells and cardiorespiratory fitness

The MeDE and MeD groups exhibited a significant increase in EPC numbers between baseline and 12 weeks measure but, adherence to the MeDE treatment resulted in greater concentration of circulating EPCs than after the MeD ( $P \leq 0.001$ ) (Figure 3). In order to measure whether improvements in CrF were achieved with and without exercise protocol, we estimated  $\dot{V}O_{2\max}$  using a submaximal cycle-ergometer test and a 6MWT and StST. There were no differences between the groups at baseline (Figure 4), but the MeDE resulted in a greater increase in  $\dot{V}O_{2\max}$ , in the distance covered in 6 min

**Table 5** Anthropometric, biochemical and clinical characteristics at baseline and after 12 weeks in MeD and MeDE groups

Values are means  $\pm$  S.E.M. \*Significant difference within group (baseline against week 12); †significant difference between groups (MeDE against MeD). iAUC, increase in post-ischaemic flow estimated using values from area under the curve of laser-Doppler test; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; PORHmax, maximum value achieved after 4 min of flow occlusion — baseline skin value.

Variable	MeD group (n = 20)		MeDE group (n = 20)	
	Baseline	Week 12	Baseline	Week 12
Body weight (kg)	96.04 $\pm$ 3.54	90.66 $\pm$ 3.37*	97.21 $\pm$ 2.46	88.83 $\pm$ 2.22*†
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	38.44 $\pm$ 1.46	36.35 $\pm$ 1.37*	37.05 $\pm$ 0.72	33.79 $\pm$ 0.72*†
Waist circumference (cm)	114.41 $\pm$ 2.56	110.69 $\pm$ 2.71*	109.20 $\pm$ 2.00	105.02 $\pm$ 2.09*
Fasting glucose (mmol/l)	5.95 $\pm$ 0.13	5.65 $\pm$ 0.15*	5.69 $\pm$ 0.20	5.38 $\pm$ 0.25*
Fasting insulin (pmol/l)	92.02 $\pm$ 6.66	77.92 $\pm$ 9.30	86.60 $\pm$ 7.57	44.58 $\pm$ 4.93*†
HOMA index	3.53 $\pm$ 0.29	2.91 $\pm$ 0.39*	3.13 $\pm$ 0.27	1.56 $\pm$ 0.18*†
Total cholesterol (mmol/l)	5.27 $\pm$ 0.14	4.95 $\pm$ 0.16*	5.06 $\pm$ 0.23	4.62 $\pm$ 0.28*
LDL-c (mmol/l)	3.36 $\pm$ 0.12	3.11 $\pm$ 0.14*	3.27 $\pm$ 0.16	2.98 $\pm$ 0.20*
HDL-c (mmol/l)	1.23 $\pm$ 0.06	1.20 $\pm$ 0.06	1.20 $\pm$ 0.07	1.17 $\pm$ 0.05
Triacylglycerols (mmol/l)	3.44 $\pm$ 0.24	3.21 $\pm$ 0.27*	3.55 $\pm$ 0.26	2.63 $\pm$ 0.24*†
Systolic BP (mmHg)	140.55 $\pm$ 3.67	126.07 $\pm$ 3.51*	142.23 $\pm$ 2.76	124.42 $\pm$ 3.45*
Diastolic BP (mmHg)	83.29 $\pm$ 1.71	80.00 $\pm$ 2.19*	84.70 $\pm$ 1.71	73.31 $\pm$ 2.30*†
iAUC (AUC)	226.90 $\pm$ 45.92	227.03 $\pm$ 20.44	217.68 $\pm$ 25.10	327.77 $\pm$ 35.72*†
PORHmax.	166.02 $\pm$ 15.61	169.11 $\pm$ 25.52	132.13 $\pm$ 18.89	176.36 $\pm$ 18.49*†



**Figure 3** Levels of circulating EPCs defined as CD34<sup>+</sup> KDR<sup>+</sup> at baseline and after 12 weeks in the MeD and MeDE groups n = 20 patients in each intervention period. Black bars indicate baseline; grey bars, 12 weeks of intervention. Values are means  $\pm$  S.E.M. \*Significant difference within group (baseline against week 12); #significant difference between groups (MeD against MeDE).

and in the number of repetitions in StST at the post-study measures ( $P \leq 0.001$ ). In addition, we found in the MeDE group, but not in the MeD group, a significant positive correlation between increase in EPCs and CRF, as expressed through 6MWT. Pearson's rank correlation is shown in Figure 5.

Moreover, the number of CD34<sup>+</sup> cells increased both in the MeD and MeDE groups after 12 weeks of treatment without observing significant differences between the two groups (570.46  $\pm$  153.8 to 2246.77  $\pm$  301.5 and

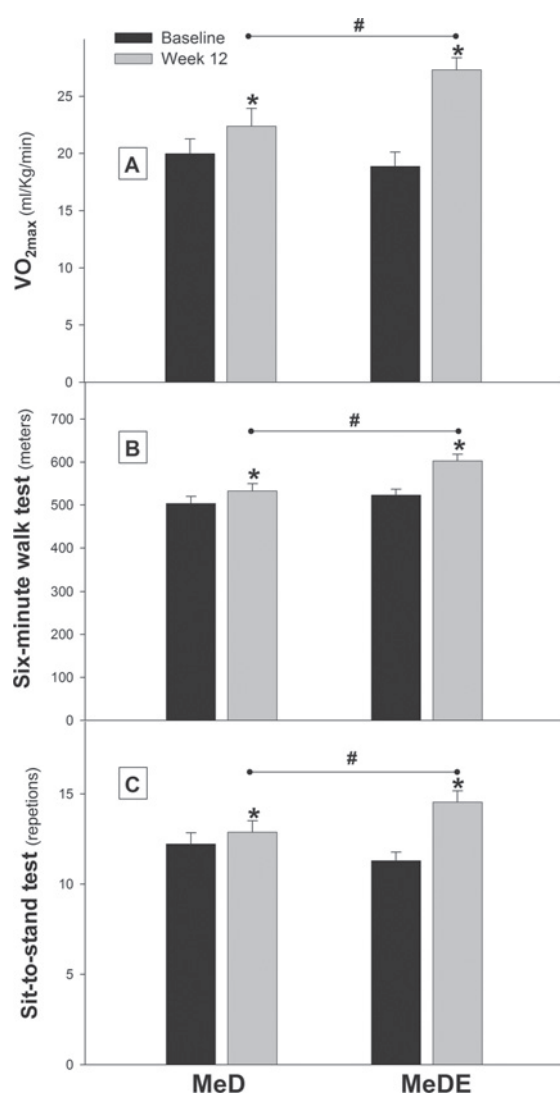
517.16  $\pm$  167.9 to 2369.45  $\pm$  488.9 respectively). The observed increase in CD34<sup>+</sup> cells in both groups was positively correlated with reductions in HOMA index ( $r = 0.41$ ,  $P < 0.05$ ; and  $r = 0.55$ ,  $P < 0.05$  respectively).

We found no significant correlation between EPCs or CD34<sup>+</sup> cells and the other studied variables.

## DISCUSSION

There are two main findings derived from the present study in non-diabetic MetS patients without manifested cardiovascular disease who were previously sedentary. On the one hand, it was observed that 12 weeks of a hypocaloric MeD model improved the endothelium regenerative capacity as a result of the increase in EPCs, improving, at the same time, cardiovascular risk factors. On the other hand, the application of the same dietetic model plus periodized moderate-to-high-intensity endurance training (MeDE) resulted in a greater increase in EPCs. In addition, as expected after the exercise intervention, cardiorespiratory fitness showed a greater improvement than the diet model alone. The observed improved fitness was positively correlated to the circulating levels of EPCs. Finally, insulin sensitivity, plasma TAG concentrations and BP showed greater decreases in the MeDE intervention; microvascular endothelial reactivity, however, only improved in the combined intervention.

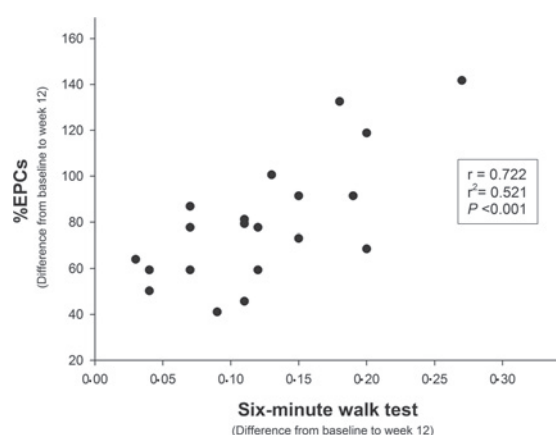
Recent reports by our group have shown that, at least in healthy adults, the endothelium regenerative capacity



**Figure 4** Maximal oxygen consumption (A), 6MWT (B) and StST (C) in the MeDE and MeD groups at baseline and after 12 weeks

Black bars indicate baseline; grey bars, 12 weeks of intervention.  $n = 20$  patients in each intervention period. Black bars indicate baseline; grey bars, 12 weeks of intervention. Values are means  $\pm$  S.E.M. \*Significant difference within group (baseline against week 12); #significant difference between groups (MeD against MeDE).

(circulating EPCs) and endothelial damage (release of endothelial microparticles), are significantly improved after an 8-week intervention with a close adherence to a Mediterranean-style diet [28]. In the present study, it has also been shown that, in MetS patients, the number of EPCs significantly increases using the same dietary pattern yet modified by means of caloric restriction. With regard to the possible mechanism implicated in this phenomenon, in other populations without the MetS, a reduction in oxidative stress and the up-regulation in NO



**Figure 5** Pearson's correlation ( $r$ ) between amount of circulating EPCs and distance covered in 6MWT, both expressed as differences from baseline to week 12

$n = 20$  patients.

bioavailability, have been proposed as the link between regular intake of a typical MeD and the increase in EPCs [28,29]. The abundant content in phenolic acids, polyphenols and flavonoids of a typical MeD seems to confer a potent beneficial effect on the oxidative balance [30,31]. In this regard, a close adherence to the MeD pattern (including consumption of vegetable fats, that is, extra virgin olive oil and the reduction of animal fat intake) was shown through an increase in total quantitative score of adherence to the MeD at the end of the present study in both the MeD and MeDE groups (Table 4). Furthermore, a significant increase in weekly and daily consumption of antioxidant-rich foods (vegetables, fruits, red wine and nuts) was achieved by the subjects in the present investigation as derived from the analysis of a 14-item questionnaire of the traditional MeD. These findings support the hypothesis that an improvement in oxidative state could be one of the mechanisms involved in the increase of EPCs in the MeD group.

On the other hand, a few studies, mainly assessing chronic heart failure patients, have studied the effect of physical exercise on EPC number [32]. In such patients, Gatta et al. [33] found that a short-training period with endurance exercise (3 weeks) increases the number of CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells and the proliferation of colony-forming units-endothelial cells after training. In healthy subjects and chronic heart failure patients, both VEGF (vascular endothelial growth factor), as well as the increase in eNOS (endothelial NO synthase) activity, seem to acutely respond to the shear stress produced by an intense endurance exercise session [34,35]. Both VEGF and NO have been proposed as determining factors of the activation of stem cell mobilization processes



from the bone marrow to the vascular area [36–38]; this would partly explain the time-dependent increase in CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells subsequently to an acute endurance exercise [39]. Specifically, a pivotal role for NO in EPCs mobilization was demonstrated in humans when inhibiting the acute NO production [using non-selective NO synthase inhibitor L-NMMA (*N*<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine) a complete blockade of EPCs mobilization in response to endurance exercise of moderate intensity was observed [40].

To the best of our knowledge, this is the first study using an MeD model showing that the combination with a 12-week moderate-to-high-intensity endurance training increases the CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells level in MetS patients. One possible explanation for this phenomenon is that an endothelial adaptation (i.e. increase in EPC mobilizing factors such as NO) may have resulted in greater EPC level in the MeDE group. In addition, this intervention with moderate-to-high-intensity exercise did not only include intermittent effort sessions (allowing the MetS and previously sedentary subjects to reach greater effort intensity since the beginning of training) but it also was a periodized programme, that is, it allowed for the distribution of acute stimuli of increasing intensity over the 12-week period. In terms of vascular physiology, a periodized programme as the one used in the present study could mean a constant endothelial adaptation against new weekly stimuli (i.e. blood flow changes and ischaemic phenomena). In line with this, an increase in NO availability of early EPCs, along with an improved *in vivo* endothelial repair capacity and better endothelium-dependent flow-mediated vasodilatation, were observed in mice with defined carotid endothelial injury after EPCs transplantation from MetS subjects after 8 weeks with exercise training [41]. Accordingly, the MeDE group was the only one showing an increase in IRH as measured by laser Doppler (PORHmax and iAUC). Although IRH, as measured in the present study, had no demonstrable relationship with coronary endothelial function, previous studies have shown that an improvement in microvascular reactivity as determined by using laser Doppler is significantly related to an increase in NO bioavailability [28,42]. For such reason, we hypothesize that a greater bioavailability in NO could have occurred after the MeDE intervention.

Another phenomenon that could potentially explain the greater EPCs increase in the MeDE would be a specifically exercise-induced shedding of endothelial cells that may have been misleadingly counted as EPCs in this group. Yet, we have found that both the MeDE and MeD had a similar increase in CD34<sup>+</sup> cells population when it should be expected to observe a greater number of these cells in the MeDE group, especially if exercise had triggered the increased release of endothelial cells. Therefore we deem that a shift in circulating CD34<sup>+</sup> cells towards CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells could have occurred

such as observed in previous studies after a single bout of exercise in healthy subjects [43]. Nevertheless, the observed increase in circulating CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells in MeDE should be interpreted with caution since this phenomenon could be merely part of a greater one. In other words, the potential benefit of a diet plus moderate-to-high-intensity endurance training on the endothelial regenerative capacity could be due not solely to an increase in CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells. In line with this, it can be observed, in a review by Urbich and Dimmeler [44], that cell populations, other than haemopoietic stem cells, can also give rise to endothelial cells, increasing tissue neovascularization after ischaemia and re-endothelialization after endothelial injury.

On the other hand, in the present study, it has been observed that subjects in the MeDE group increased their  $\dot{V}O_{2\max}$ , and in a specific way, they improved their local muscular performance and their physical work capacity with regard to an endurance exercise as was shown by StST and 6MWT respectively. Moreover, it has been observed that the increase in CrF was related to the increase in EPCs only in the MeDE group. This positive relation among variables such as EPCs and fitness highlights the importance, for the improvement of EPCs levels, of a training programme with mechanical and metabolic stimuli potent enough so as to reach significant cardiovascular and physical adaptation. Once more, the periodized moderate-to-high-intensity training used in the present study could have been a key factor to simultaneously induce the increase in EPCs and the improvement in CrF. In line with this, other researchers have found evidence to assume that the increased amount of EPCs observed in reference groups, or after exercise intervention, means a long-term adaptation to increased muscle work, new blood vessel formation and changes in blood flow [45,46]. Conversely, even though subjects in the MeD group also improved their physical fitness (6MWT and StST), this improvement, unlike what happened in the MeDE group, would be due to body weight loss and to biomechanical factors, but not to cardiovascular and metabolic adaptations. This mechanism would, therefore, explain the lack of relation between fitness and increased EPC levels observed in the MeD group. In other words, our findings would suggest that the cardiometabolic component of fitness is important for the mechanisms that explain the increased availability of EPCs. Conversely, the physical functioning (other component of fitness), which can be discreetly improved in obese patients with the MetS losing weight through diet, might not be important in this phenomenon.

Finally, the conventional risk factors of the MetS have also been proposed as variables related to EPCs reduction in this type of patient [5]. In the present study, it has been observed that the MeD reduced the fasting glycaemia and plasma concentration of TAG in the subjects analysed. Basically, the MeDE was more effective than the MeD

for weight loss and for improving the cardiometabolic risk factors, such as triglyceridaemia, BP and insulin sensitivity. Nevertheless, only the increase in CD34<sup>+</sup> cells, but not in CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cells, was positively and discretely correlated with a reduction in the HOMA index after the 12-week treatment in both groups (MeD and MeDE). This finding is partially in accordance with observational studies that have shown that CD34<sup>+</sup> cells are the phenotype which relates best to cardiovascular risk factors in MetS patients [4,47]. The present study was not designed; however, to elucidate which were the mechanisms by which exercise could generate an increase in EPCs levels or to understand risk modulation by means of these interventions. Conversely, it was designed to know the effects on the EPC number and CrF after two treatments that had not been studied with regard to endothelium regenerative capacity and the subjects' fitness (i.e. MeD alone and plus periodical moderate-to-high-intensity endurance training).

A potential limitation of the present study is that we determined the number of EPCs, but not the functionality. However, like most studies published to date, this study aims to determine the change in one of the factors related to endothelial regenerative capacity (i.e. EPC number). Future designs must analyse whether the EPCs increase after treatment with MeD, with or without exercise, is synergistically related, or not, to their functionality. Only one of the several putative EPCs phenotypes (CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>) was assessed since, to date, the CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> combination (a prototypical stem cell antigen plus a marker of the endothelial lineage) remains the most accepted EPCs phenotype. In essence, this combination is the only putative EPCs phenotype that has been repeatedly and convincingly demonstrated to be an independent predictor of cardiovascular outcomes [48]. The present study lacks an arm without the MeD (i.e. with exercise alone). Unlike other designs that examine the independent effect of exercise and diet, our aim was to determine the cumulative effect of moderate-to-high-intensity training along with a variant of the MeD, on circulating EPCs. A strength of the present study is the careful selection of patients included in the study (without coexistent diseases and morbidity such as diabetes and peripheral vascular disease or concomitant medications) as well as the rigorous control of adherence to interventions (diet or diet plus exercise).

In conclusion, a therapeutic model of hypocaloric MeD improves endothelium regenerative capacity and cardiometabolic risk factors in MetS patients without manifested cardiovascular disease. Likewise, the present findings show, for the first time, that a 12-week moderate-to-high-intensity endurance training combined with this diet model produces a greater increase in CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> cell levels; this fact coincides with a significant improvement in cardiorespiratory fitness and with a beneficial influence on IRH and cardiovascular risk.

## AUTHOR CONTRIBUTION

Francisco Fuentes-Jiménez conceived and designed the study, analysed and interpreted the data, drafted the paper, obtained funding, and had full access to and takes responsibility for the integrity of the data in the study; Juan Marcelo Fernández conceived and designed the study, acquired, analysed and interpreted the data, and drafted the paper; Marzo Edir Da Silva Grigoletto conceived and designed the study, provided statistical expertise and drafted the paper; Francisco Pérez-Jiménez conceived and designed the study, analysed and interpreted the data, supervised the study and provided critical revision of the paper for important intellectual content; Daniel Rosado-Álvarez acquired, analysed and interpreted the data, provided technical and logistical support, and drafted the paper; Oriol Alberto Rangel-Zúñiga acquired the data; Leslie Lorena Landaeta-Díaz acquired the data, and provided technical and logistic support; Javier Caballero-Villarraso provided technical and logistic support; José López-Miranda provided statistical expertise, supervised the study and made critical revisions of the paper for important intellectual content. All decisions regarding the design, conduct, collection, analysis or interpretation of the data and the decision to submit the paper for publication were made independently by the authors.

## FUNDING

This work was supported by the Consejería de Salud, Junta de Andalucía [grant number 118/08 (to F.F.-J.)], and CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

## REFERENCES

- Mottillo, S., Filion, K. B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P., Rinfret, S., Schiffrin, E. L. and Eisenberg, M. J. (2010) The metabolic syndrome and cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **56**, 1113–1132
- Hristov, M. and Weber, C. (2008) Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling. *Pharmacol. Res.* **58**, 148–151
- Fadini, G. P., Miorin, M., Facco, M., Bonamico, S., Baesso, I., Grego, F., Menegolo, M., de Kreutzenberg, S. V., Tiengo, A., Agostini, C. and Avogaro, A. (2005) Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1449–1457
- Fadini, G. P., de Kreutzenberg, S., Agostini, C., Boscaro, E., Tiengo, A., Dimmeler, S. and Avogaro, A. (2009) Low CD34<sup>+</sup> cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis* **207**, 213–219
- Jialal, I., Fadini, G. P., Pollock, K. and Devaraj, S. (2010) Circulating levels of endothelial progenitor cell mobilizing factors in the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* **106**, 1606–1608
- Goon, P. K. and Lip, G. Y. (2007) Endothelial progenitor cells, endothelial cell dysfunction and much more: observations from cardiac syndrome X. *Heart* **93**, 1020–1021

- 7 Esposito, K. and Giugliano, D. (2010) Mediterranean diet and the metabolic syndrome: the end of the beginning. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **8**, 197–200
- 8 Perez-Martinez, P., Ordovas, J. M., Garcia-Rios, A., Delgado-Lista, J., Delgado-Casado, N., Cruz-Teno, C., Camargo, A., Yubero-Serrano, E. M., Rodriguez, F., Perez-Jimenez, F. and Lopez-Miranda, J. (2011) Consumption of diets with different type of fat influences triacylglycerols-rich lipoproteins particle number and size during the postprandial state. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **21**, 39–45
- 9 Kastorini, C. M., Milionis, H. J., Esposito, K., Giugliano, D., Goudevenos, J. A. and Panagiotakos, D. B. (2011) The effect of mediterranean diet on metabolic syndrome and its components a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 1299–313
- 10 Rallidis, L. S., Lekakis, J., Kolomvoutsos, A., Zampelas, A., Vamvakou, G., Efstathiou, S., Dimitriadis, G., Raptis, S. A. and Kremastinos, D. T. (2009) Close adherence to a Mediterranean diet improves endothelial function in subjects with abdominal obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**, 263–268
- 11 Fuentes, F., López-Miranda, J., Pérez-Martínez, P., Jiménez, Y., Marín, C., Gómez, P., Fernández, J. M., Caballero, J., Delgado-Lista, J. and Pérez-Jiménez, F. (2008) 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.* **100**, 159–165
- 12 Buscemi, S., Verga, S., Tranchina, M. R., Cottone, S. and Cerasola, G. (2009) Effects of hypocaloric very-low-carbohydrate diet vs. Mediterranean diet on endothelial function in obese women. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 339–347
- 13 Tota-Maharaj, R., Defilippis, A. P., Blumenthal, R. S. and Blaha, M. J. (2010) A practical approach to the metabolic syndrome: review of current concepts and management. *Curr. Opin. Cardiol.* **25**, 502–512
- 14 Solomon, T. P., Sistrun, S. N., Krishnan, R. K., Del Aguila, L. F., Marchetti, C. M., O'Carroll, S. M., O'Leary, V. B. and Kirwan, J. P. (2008) Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *J. Appl. Physiol.* **104**, 1313–1319
- 15 Pettit, D. S. and Cureton, K. J. (2003) Effects of prior exercise on postprandial lipemia: a quantitative review. *Metab., Clin. Exp.* **52**, 418–424
- 16 Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E. and Viña, J. (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biol. Med.* **44**, 126–131
- 17 Hansen, D., Dendale, P., van Loon, L. J. and Meusen, R. (2010) The impact of training modalities on the clinical benefits of exercise intervention in patients with cardiovascular disease risk or type 2 diabetes mellitus. *Sports Med.* **40**, 921–940
- 18 McNicol, A. J., O'Brien, B. J., Paton, C. D. and Knez, W. L. (2009) The effects of increased absolute training intensity on adaptations to endurance exercise training. *J. Sci. Med. Sport* **12**, 485–489
- 19 Boutcher, S. H. (2011) High-intensity intermittent exercise and fat loss. *J. Obes.* **2011**, 868305
- 20 Martínez-González, M. A., López-Fontana, C., Varo, J. J., Sánchez-Villegas, A. and Martínez, J. A. (2005) Validation of the Spanish version of the physical activity questionnaire used in the Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study. *Public Health Nutr.* **8**, 920–927
- 21 Martínez-González, M. A., Fernández-Jarne, E., Serrano-Martínez, M., Wright, M. and Gomez-Gracia, E. (2004) Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**, 1550–1552
- 22 Khan, S. S., Solomon, M. A. and McCoy, J. P. (2005) Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* **64**, 1–8
- 23 American College of Sports Medicine (2010) ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription, 6th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- 24 Tanaka, H., Monahan, K. G. and Seals, D. S. (2001) Age-predicted maximal heart rate revisited. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**, 153–156
- 25 Don Franks, B. and Howley, E. T. (2003) Instructor's Manual and Test Bank to Accompany Exercise Physiology Theory and Application to Fitness and Performance, 4th edn, Human Kinetics, Champaign, IL
- 26 ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. (2002) ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 111–117
- 27 Rasool, A. H., Ghazali, D. M., Abdullah, H., Halim, A. S. and Wong, A. R. (2009) Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism and response to skin reactive hyperemia. *Microvasc. Res.* **78**, 230–234
- 28 Marin, C., Ramirez, R., Delgado-Lista, J., Yubero-Serrano, E. M., Perez-Martinez, P., Carracedo, J., Garcia-Rios, A., Rodriguez, F., Gutierrez-Mariscal, F. M., Gomez, P. et al. (2011) Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 267–274
- 29 Huang, P. H., Chen, Y. H., Tsai, H. Y., Chen, J. S., Wu, T. C., Lin, F. Y., Sata, M., Chen, J. W. and Lin, S. J. (2010) Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **30**, 869–877
- 30 Fitó, M., Guxens, M., Corella, D., Sáez, G., Estruch, R., de la Torre, R., Francés, F., Cabezas, C., López-Sabater, M. C., Marrugat, J. et al. (2007) Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch. Int. Med.* **167**, 1195–1203
- 31 Ruano, J., Lopez-Miranda, J., Fuentes, F., Moreno, J. A., Bellido, C., Perez-Martinez, P., Lozano, A., Gómez, P., Jiménez, Y. and Pérez Jiménez, F. (2005) Phenolic content of virgin olive-oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* **15**, 1864–1868
- 32 Möbius-Winkler, S., Linke, A., Adams, V., Schuler, G. and Erbs, S. (2010) How to improve endothelial repair mechanisms: the lifestyle approach. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **8**, 573–580
- 33 Gatta, L., Armani, A., Iellamo, F., Consoli, C., Molinari, F., Caminiti, G., Volterrani, M. and Rosano, G. M. (2012) Effects of a short-term exercise training on serum factors involved in ventricular remodeling in chronic heart failure patients. *Int. J. Cardiol.* **155**, 409–413
- 34 Möbius-Winkler, S., Höllriegel, R., Schuler, G. and Adams, V. (2009) Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease. *Cytometry.* **75**, 25–37
- 35 Green, D. J., Maiorana, A., O'Driscoll, G. and Taylor, R. (2004) Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J. Physiol.* **15**, 1–25
- 36 Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **9**, 1370–1376
- 37 Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravelleaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S. I., Isner, J. M. and Asahara, T. (2000) Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ. Res.* **86**, 1198–1202
- 38 Moebius-Winkler, S., Schuler, G. and Adams, V. (2011) Endothelial progenitor cells and exercise-induced redox regulation. *Antioxid. Redox Signaling* **15**, 997–1011
- 39 Möbius-Winkler, S., Hilberg, T., Menzel, K., Golla, E., Burman, A., Schuler, G. and Adams, V. (2009) Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. *J. Appl. Physiol.* **107**, 1943–1950
- 40 Cubbon, R. M., Murgatroyd, S. R., Ferguson, C., Bowen, T. S., Rakobowchuk, M., Baliga, V., Cannon, D., Rajwani, A., Abbas, A., Kahn, M. et al. (2010) Human exercise-induced circulating progenitor cell mobilization is nitric oxide-dependent and is blunted in South Asian men. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **30**, 878–884

- 41 Sonnenschein, K., Horváth, T., Mueller, M., Markowski, A., Siegmund, T., Jacob, C., Drexler, H. and Landmesser, U. (2011) Exercise training improves *in vivo* endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **18**, 406–414
- 42 Fernández, J. M., Da Silva-Grigoletto, M. E., Caballero-Villarraso, J., Gómez-Puerto, J. R., Viana-Montaner, B. H., Tasset-Cuevas, I., Túnez-Fiñana, I., Pérez-Martínez, P., López-Miranda, J. and Pérez-Jiménez, F. (2010) Pre-exercise intake of different carbohydrates modifies ischemic reactive hyperemia after a session of anaerobic, but not after aerobic exercise. *J. Strength Cond. Res.* **24**, 1623–1632
- 43 Van Craenenbroeck, E. M., Vrints, C. J., Haine, S. E., Vermeulen, K., Goovaerts, I., Van Tendeloo, V. F., Hoymans, V. Y. and Conraads, V. M. (2008) A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J. Appl. Physiol.* **104**, 1006–1013
- 44 Urbich, C. and Dimmeler, S. (2004) Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.* **95**, 343–353
- 45 Walther, C., Gaede, L., Adams, V., Gelbrich, G., Leichtle, A., Erbs, S., Sonnabend, M., Fikenzler, K., Körner, A., Kiess, W. et al. (2009) Effect of increased exercise in school children on physical fitness and endothelial progenitor cells: a prospective randomized trial. *Circulation* **120**, 2251–2259
- 46 Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., Böhm, M. and Nickenig, G. (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N. Engl. J. Med.* **353**, 999–1007
- 47 MacEneaney, O. J., Kushner, E. J., Westby, C. M., Cech, J. N., Greiner, J. J., Stauffer, B. L. and DeSouza, C. A. (2010) Endothelial progenitor cell function, apoptosis, and telomere length in overweight/obese humans. *Obesity* **18**, 1677–1682
- 48 Devaraj, S. and Jialal, I. (2012) Dysfunctional endothelial progenitor cells in metabolic syndrome. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 585018

Received 13 September 2011/3 April 2012; accepted 10 April 2012  
Published as Immediate Publication 10 April 2012, doi:10.1042/CS20110477



From: **EJPC** <[editorial.office@umcutrecht.nl](mailto:editorial.office@umcutrecht.nl)>  
Date: 2012/3/21  
Subject: Your Submission  
To: Francisco Fuentes-Jiménez <[j.marfer.lopez@gmail.com](mailto:j.marfer.lopez@gmail.com)>

Ref.: Ms. No. EJCPR-D-11-00567R1  
Mediterranean Diet, moderate-to-high intensity training and health-related quality of life in adults with metabolic syndrome.  
European Journal of Preventive Cardiology

Dear Dr. Fuentes-Jiménez,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in European Journal of Preventive Cardiology.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Diederick Grobbee, MD, PhD  
Editor in Chief  
European Journal of Preventive Cardiology

# European Journal of Preventive Cardiology

<http://cpr.sagepub.com/>

## **Mediterranean diet, moderate-to-high intensity training and health-related quality of life in adults with metabolic syndrome**

L. Landaeta-Díaz, J.M. Fernández, M. Da Silva-Grigoletto, D. Rosado-Alvarez, A Gómez-Garduño, F. Gómez-Delgado, J. López-Miranda, F. Pérez-Jiménez and F. Fuentes-Jiménez  
*European Journal of Preventive Cardiology* published online 10 April 2012  
DOI: 10.1177/2047487312445000

The online version of this article can be found at:  
<http://cpr.sagepub.com/content/early/2012/04/10/2047487312445000>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:

European Society of Cardiology



**EUROPEAN  
SOCIETY OF  
CARDIOLOGY®**

European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation



**EACPR**  
European Association for  
Cardiovascular Prevention  
and Rehabilitation  
A Registered Branch of the ESC

**Additional services and information for *European Journal of Preventive Cardiology* can be found at:**

**Email Alerts:** <http://cpr.sagepub.com/cgi/alerts>

**Subscriptions:** <http://cpr.sagepub.com/subscriptions>

**Reprints:** <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

**Permissions:** <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

>> [OnlineFirst Version of Record - Apr 10, 2012](#)

[What is This?](#)

# Mediterranean diet, moderate-to-high intensity training, and health-related quality of life in adults with metabolic syndrome

L Landaeta-Díaz\*, JM Fernández\*, M Da Silva-Grigoletto, D Rosado-Alvarez, A Gómez-Garduño, F Gómez-Delgado, J López-Miranda, F Pérez-Jiménez and F Fuentes-Jiménez

European Journal of Preventive  
 Cardiology

0(00) 1–10

© The European Society of  
 Cardiology 2012

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/2047487312445000

ejpc.sagepub.com



## Abstract

**Background:** Much recent research has focused on the benefits of the Mediterranean diet on risk factors of metabolic syndrome (MetS). In addition numerous investigations have also demonstrated that moderate and high-intensity endurance training may induce greater beneficial adaptations in body composition and cardiometabolic risk than low-intensity endurance training. How a model of Mediterranean diet with and without moderate-to-high intensity training influences health-related quality of life (HRQoL) and physical fitness in MetS patients is unknown.

**Design and methods:** A total of 45 sedentary MetS males and females (50–66 years) were randomly divided into two groups: (a) hypocaloric, normoproteic Mediterranean diet (MeD); and (b) the same diet plus periodized moderate-to-high intensity training (MeDE) for 12 weeks. HRQoL (EuroQol and SF-36 questionnaires), fitness, response to submaximal exercise, and risk factors of MetS were determined before and after treatment.

**Results:** MeD improved some physical and mental domains of HRQoL (physical function, vitality, general physical health, emotional role, and self-perception of health) and resulted in weight loss and improvement of MetS risk factors (intra-group  $p < 0.05$ ). Moreover, the MeDE intervention resulted in greater improvement in these domains and the improvement of other HRQoL components (physical role, bodily pain, social function, and health profile). MeDE increased physical fitness, resulted in a better physiological response to submaximal effort and caused a greater weight loss (intra-group and inter-group,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** A model of hypocaloric Mediterranean diet combined with periodized moderate-to-high intensity training may lead to greater improvement in HRQoL through a greater effect on physical and functional fitness, bodyweight, and risk factors than diet alone.

## Keywords

Endurance exercise, health-related quality of life, Mediterranean diet, metabolic syndrome, periodized training, physical fitness

Received 16 December 2011; accepted 21 March 2012

## Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is frequently associated with symptoms of depression, anxiety, and psychosocial stress,<sup>1,2</sup> which can favour changes in behaviour such as reduced physical activity and high energy intake. This lifestyle and a worsening of cardiovascular risk factors and body composition lead to a loss of physical and functional fitness and lower quality of life.<sup>3–5</sup> For this reason, weight loss and the control

IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain; and Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

\*These authors contributed equally to this work.

### Corresponding author:

F Fuentes-Jiménez, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Reina Sofía, Avda Menéndez Pidal s/n, Córdoba, 14004, Spain  
 Email: fjfuentesjimenez@yahoo.es



of cardiovascular risk factors can also lead to an improvement of the physical and psychological limitations of obese and MetS patients in carrying out normal daily activities and improve their quality of life.<sup>6</sup>

In this sense, adherence to a Mediterranean dietary pattern has produced moderate improvements in body-weight<sup>7</sup> and significant benefits in specific MetS factors and cardiovascular risk.<sup>8</sup> Nevertheless, there is little data to suggest that the Mediterranean diet may also improve quality of life in adults<sup>9</sup> and no reports to date studying objectively the possible benefits of a hypocaloric model of the Mediterranean diet (MeD) on health-related quality of life (HRQoL) in MetS patients.

On the other hand, changes in lifestyle that include a programme of physical exercise lead in general to an improved control of glucose and a greater reduction in bodyweight and blood pressure in patients with MetS.<sup>10,11</sup> In particular, recent studies in unfit adults and in patients with MetS have shown that both moderate-to-high intensity<sup>12,13</sup> and high-intensity training<sup>14,15</sup> lead to greater improvements in cardio-respiratory fitness, fat mass, and glucose tolerance, compared with low-intensity exercise training. In addition, since high-intensity exercise results in a greater energy expenditure than low-intensity exercise of the same duration, moderate-to-high intensity exercise could prove more attractive to individuals who need to reduce weight and have little free time.<sup>16</sup> Moreover, from a practical standpoint, it is difficult for an obese and previously sedentary MetS patient to carry out continuous exercise at an intensity over 65% of their MaxHR, and so the risk of drop-out during long-term training programmes increases.<sup>17</sup> One possible solution for implementing moderate-to-high intensity exercise in these patients is to introduce the training, increasing the duration of high-intensity effort progressively during the programme, until the subject can maintain high-intensity effort in a prolonged endurance exercise. However, there has been no research into possible changes in physical fitness and its relationship with improved HRQoL when MetS patients treated with a hypocaloric model of Mediterranean also follow moderate-to-high intensity training.

Based on the evidence discussed above, the objective of this study was to investigate how the different dimensions of HRQoL evolved in MetS patients after following a hypocaloric model of Mediterranean diet, combined (or not) with moderate-to-high intensity training.

## Methods

### Subjects

Forty-five obese subjects participated in this study (postmenopausal women  $n=30$ , 67%; men  $n=15$ ,

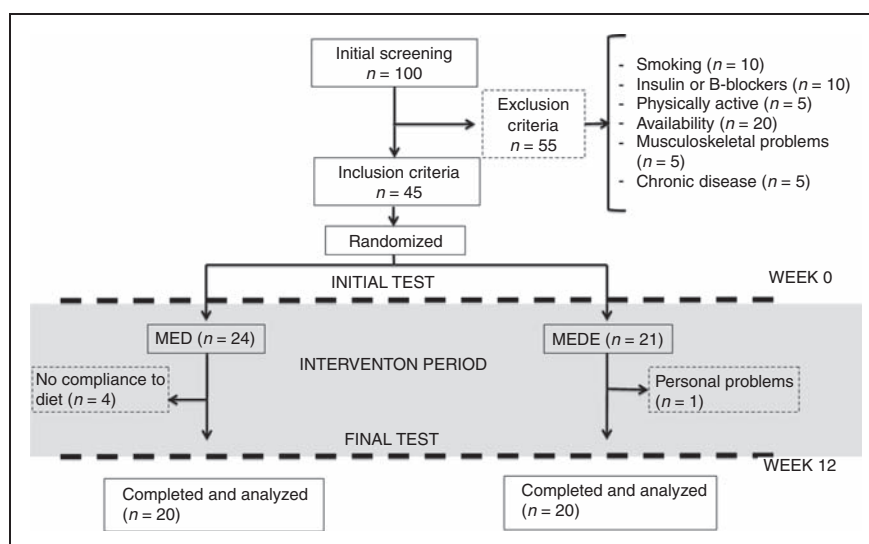
33%), meeting three or more MetS criteria, as proposed by the Third Report of the National Cholesterol Education Program ATP-III (National Cholesterol Education Program 2002), of which 40 completed the study. Exclusion criteria were statin therapy, type I or II diabetes, previous history of unstable angina, heart failure or stroke, and medical therapy which could modify heart frequency, such as beta-blockers. Other exclusion criteria were: age >70, being a current smoker, exercise testing limited by angina or leg claudication, and neurological or orthopaedic limitations. In addition, during the 6 months prior to the study, none of the subjects must have participated in any weight loss programme, nor have undertaken any regular physical exercise or intense physical activity (>5 h of weekly vigorous activity). All subjects gave their written informed consent to participate and the study had been previously approved by the Human Investigation Review Committee at Reina Sofia University Hospital.

### Study design

After enrolling, participants were randomly assigned to a 12-week experimental intervention with either a model of hypocaloric, normoproteic Mediterranean diet (MeD) or the same diet plus moderate-to-high intensity training (MeDE) (Figure 1). Both groups were closely supervised by a dietician and a physician who made weekly phone calls to participants and saw them during monthly appointments to make sure they did not give up and followed the programmes correctly. At both the beginning and the end of the study, fasting blood samples were collected to determine fasting glucose, insulin, and lipidic parameters. In addition, all volunteers were tested using the EuroQol EQ-5D instrument and the Medical Outcome Study Short Form-36 (SF36) as measures of the respondent's HRQoL. A submaximal cardiopulmonary test was also performed, at baseline and week 12, in order to determine their cardiovascular fitness and physiological response to physical exertion.

### Diet analysis and composition

At baseline and at the end of the intervention period, the volunteers were asked to keep two 3-d weighed food diaries using scales provided by the investigators. In addition, a qualitative/quantitative questionnaire of the frequency of food intake for the 12 months prior to the study was administered by a registered dietician to identify which food had to be modified. The analysis of the food diaries was carried out with the use of a dietary analysis software program (Dietsource version 2.0; Novartis, Barcelona, Spain).



**Figure 1.** Experimental protocol used in hypocaloric Mediterranean diet (MeD) or hypocaloric Mediterranean diet plus moderate-to-high intensity training (MeDE).

At the beginning of the intervention period, all the volunteers (in MeD and MeDE) were provided with information about the Mediterranean diet. They were counselled on food groups and specific items of this type of eating pattern, and asked to follow a specific daily and weekly food plan. The individual requirement of this plan was based on the restriction of 40% of normal energy intake ( $\sim 500$  Kcal/day) in order to promote weight loss. This restriction was progressive: 20% during the first 4 weeks and 10% in each of the following 4 weeks until completion of the 12 weeks of intervention. High-quality replica food and photographs were used to explain the size limits on portions and frequency of each food group to be consumed each day in order to fulfil the individual energy requirements. Dietary targets for the percentage of macronutrients in the hypocaloric Mediterranean diet model were: 50% carbohydrates, 30% lipids (20% monounsaturated fatty acids provided by virgin olive oil, 5% saturated fatty acids, and 5% polyunsaturated fatty acids), and approximately 20–22% protein (0.8 g/kg/day).

How well the subjects kept to the diet throughout the study was assessed through a 14-item questionnaire of adherence to the traditional Mediterranean diet,<sup>18</sup> completed every 4 weeks. The objective of these 14-item questionnaires was also to reinforce the key principles of Mediterranean diet, including increased consumption of vegetables, fruit, red wine, and nuts and the use of olive oil as the main culinary fat.

### Exercise intervention

The 12-week training regime consisted of three weekly sessions of moderate-to-high intensity endurance

training. Of these, two were supervised training sessions at the laboratory while the other session was carried out at home. Weekly supervised training was performed using two different ergometers; a cycle-ergometer to exercise lower limbs (Technogym Recline 500; Gambettola, Italy) and an arm ergometer for the upper limbs (Technogym Excite 700; Gambettola). Meanwhile, home-based training consisted of continuous outdoor walking. In all sessions, the subjects used a heart rate monitor (Polar Electro FS1; Kempele, Finland) to achieve the correct exercise intensity.

**Supervised training sessions.** A periodized training programme, including series at 80% of the maximum heart rate ( $HR_{max}$ ) and active recovery periods of decreasing duration, was used, since evidence shows that an intensity of over 75%  $HR_{max}$  produces major cardiometabolic benefits in obese and overweight patients.<sup>14</sup> Such periodization aimed as a goal to reaching a 30-min continuous exercise session at 80% of  $HR_{max}$  (Table 1) by the end of the intervention period. Exercises were varied (leg and arm pedalling) to avoid interrupting the session as a result of fatigue.

**At-home sessions.** The at-home training programme included increases in both exercise volume and intensity and its goal was to reach a 60-min continuous exercise session at 75% of  $HR_{max}$  (Table 1) by the end of the intervention period. Patients were instructed to stop home-based training immediately if they noticed chest pain or any other distressing symptoms.

**Table 1.** Exercise prescription for hypocaloric Mediterranean diet plus moderate-to-high intensity training

Week	Supervised (twice a week: cycle-ergometer 10 min, arm ergometer 10 min, cycle-ergometer 10 min)			At home (once a week, continued walking exercise)	
	Set <sup>a</sup>	Active recovery <sup>b</sup>	Session duration	Intensity	Session duration
1	6×1 min	4 min	30 min	65%	25 min
2	6×1.5 min	3.5 min			30 min
3	6×2 min	3 min			35 min
4	6×2.5 min	2.5 min			40 min
5	6×3 min	2 min		70%	35 min
6	6×3.5 min	1.5 min			40 min
7	6×4 min	2 min			45 min
8	6×4.5 min	0.5 min			50 min
9	3×7 min	3 min		75%	45 min
10	3×8 min	2 min			50 min
11	3×9 min	1 min			55 min
12	1×30 min	0 min			60 min

<sup>a</sup>Exercise intensity was 80% of maximum heart rate<sup>20</sup> for moderate-to-high intensity series. <sup>b</sup>Active recovery intensity was 50% of maximum heart rate.

### Biochemical determinations

Fasting venous blood was collected into tubes containing 1 g EDTA and immediately centrifuged at 4°C (15 minutes, 1500 rpm). Serum and plasma were stored at -85°C for later determinations of glucose levels, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and triglycerides. Glucose and plasma triglyceride concentrations were measured by spectrophotometry using a modular analyser (ISE-4-DDPPEEPP; Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland).

### Health-related quality of life

Before and after of treatment, HRQoL was measured with Spanish versions of the EuroQol EQ-5D instrument and the Medical Outcome Study short form-36 (SF36). EuroQol consists of a descriptive system (EQ-5D) and a visual analogue scale (E-VAS). In the EQ-5D descriptive system, respondents can classify their health state into three levels (no problem, some problems, and severe problems) on the following five dimensions: mobility, self-care, usual activities, pain/discomfort, and anxiety/depression.<sup>19</sup> Based on the combination of these five health states, a single index of health, called EQ-5D index, was calculated. The score on the EQ-5D index ranges from -0.171 to 1, where 0 indicates death, negative values are health states classified as "worse than death", and 1 indicates "no problem" in any of the dimensions recorded in EQ-5D. In E-VAS, respondents describe their own health status as a

self-rated health status using a vertical graduated scale from 0 (worst imaginable health) to 100 (best imaginable health). In addition, the SF36 health survey contains 36 questions to assess HRQoL according eight subscales measuring: physical functioning, role physical, bodily pain, general health, vitality, social functioning, role emotional, and mental health, with the higher scores (0-100 range) indicating a better state of health.

### Submaximal exercise test with cycle-ergometer

The protocol used for graded submaximal exercise test was the one proposed by ACSM and YMCA.<sup>20</sup> In brief, 3-min stages on a cycle-ergometer were used. The initial stage used for all testing was set at a load of 25 W, considered as a warm-up. The HR reached at the end of the first stage determined the load of the following stage: 100 bpm, 50 W; 90-100 bpm 75 W; 80-89 bpm, 100 W; < 80 bpm, 125 W. Subsequently, every 3-min stage was incremented by 25 W until one of the following criteria established for interruption was met: (a) signs and symptoms of intolerance to exercise (dizziness, dyspnoea, disorientation, etc.) or of fatigue or precocious exhaustion; (b) HR over 100% of the HR<sub>max</sub> as estimated by Tanaka's formula;<sup>21</sup> however, we wanted all subjects to reach at least 85% HR<sub>max</sub>; (c) an abnormal blood pressure response (systolic increase of over 250 or diastolic over 120); (d) impossibility of keeping up a pedalling cadence of 50 rpm. The loads used in the first test (baseline) following the above-mentioned protocol were registered in order to be repeated in the second test after the intervention

**Table 2.** General characteristics and metabolic components of metabolic syndrome in hypocaloric Mediterranean diet (MeD) or hypocaloric Mediterranean diet plus moderate-to-high intensity training (MeDE)

Variable	MeD (n = 20)		MeDE (n = 20)	
	Baseline	Week 12	Baseline	Week 12
Age (years)	57.2 ± 0.98	—	59.05 ± 1.22	—
Gender (male/female)	5/15	—	7/13	—
Anti-hypertensive (yes/no)	15/5	—	17/3	—
Total physical activity (MET/w)	70.77 ± 9.65	75.00 ± 7.62	75.59 ± 9.02	97.59 ± 6.05 <sup>a,b</sup>
Sedentary activities (h/w)	89.60 ± 6.24	86.25 ± 7.34	90.37 ± 3.84	86.61 ± 4.20
Bodyweight (kg)	96.04 ± 3.54	90.66 ± 3.37 <sup>a</sup>	97.21 ± 2.46	88.83 ± 2.22 <sup>a</sup>
Weight loss (%)	—	6.23 ± 0.83	—	8.45 ± 0.76 <sup>b</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	38.44 ± 1.46	36.35 ± 1.37 <sup>a</sup>	37.05 ± 0.72	33.79 ± 0.72 <sup>a,b</sup>
Fat mass (%)	40.0 ± 1.11	37.24 ± 1.51 <sup>a</sup>	39.0 ± 1.03	34.5 ± 1.21 <sup>a,b</sup>
Waist circumference (cm)	114.41 ± 2.56	110.69 ± 2.71 <sup>a</sup>	109.20 ± 2.00	105.02 ± 2.09 <sup>a</sup>
Systolic BP (mmHg)	140.55 ± 3.67	126.07 ± 3.51 <sup>a</sup>	142.23 ± 2.76	124.42 ± 3.45 <sup>a</sup>
Diastolic BP (mmHg)	83.29 ± 1.71	80.00 ± 2.19 <sup>a</sup>	84.70 ± 1.71	73.31 ± 2.30 <sup>a,b</sup>
Fasting glucose (mmol/l)	5.95 ± 0.13	5.65 ± 0.15 <sup>a</sup>	5.69 ± 0.20	5.38 ± 0.25 <sup>a</sup>
Total cholesterol (mg/dl)	203.68 ± 5.50	191.36 ± 6.56 <sup>a</sup>	195.65 ± 9.25	178.45 ± 11.03 <sup>a</sup>
LDLC (mg/dl)	129.89 ± 4.93	120.10 ± 5.66 <sup>a</sup>	126.40 ± 6.40	115.20 ± 7.81 <sup>a</sup>
HDLC (mg/dl)	47.84 ± 2.42	46.36 ± 2.35	46.45 ± 2.93	45.20 ± 2.29
Triglycerides (mg/dl)	132.94 ± 9.56	124.21 ± 10.52 <sup>a</sup>	137.10 ± 10.23	101.80 ± 9.42 <sup>a,b</sup>

Values are mean ± standard error. <sup>a</sup>Significant difference within group (baseline vs. week 12). <sup>b</sup>Significant difference between groups (MeD vs. MeDE). BMI, body mass index; BP, blood pressure; HDLC, high-density lipoprotein cholesterol; LDLC, low-density lipoprotein cholesterol; MET, metabolic equivalent of task.

**Table 3.** Nutrient intake and Mediterranean diet adherence at baseline and weeks 12 in hypocaloric Mediterranean diet (MeD) or hypocaloric Mediterranean diet plus moderate-to-high intensity training (MeDE)

Variables	MeD (n = 20)		MeDE (n = 20)	
	Baseline	Week 12	Baseline	Week 12
Energy (Kcal/day)	2211.20 ± 155.97	1304.28 ± 93.77 <sup>a</sup>	2126.37 ± 177.13	1206.18 ± 116.47 <sup>a</sup>
Carbohydrate (% of energy)	46.85 ± 1.61	47.03 ± 1.91	47.19 ± 1.13	48.11 ± 1.31
Protein (% of energy)	17.31 ± 0.93	22.39 ± 0.74 <sup>a</sup>	18.25 ± 0.59	22.31 ± 0.61 <sup>a</sup>
Fat (% of energy)	35.85 ± 1.47	30.58 ± 1.33 <sup>a</sup>	34.56 ± 1.51	29.42 ± 1.00 <sup>a</sup>
SFA (% of energy)	13.74 ± 0.52	8.89 ± 1.28 <sup>a</sup>	13.08 ± 0.45	7.54 ± 1.03 <sup>a</sup>
MUFA (% of energy)	14.09 ± 1.10	20.33 ± 0.82 <sup>a</sup>	14.02 ± 0.91	20.01 ± 0.78 <sup>a</sup>
PUFA (% of energy)	3.41 ± 0.26	4.70 ± 0.74	3.49 ± 0.23	4.01 ± 0.61
Total Mediterranean diet score (points) <sup>b</sup>	6.10 ± 0.39	10.50 ± 0.70 <sup>a</sup>	6.45 ± 0.39	11.18 ± 0.58 <sup>a</sup>

Values are mean ± standard error. MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid. <sup>a</sup>Indicates significant difference within group (baseline vs. week 12). <sup>b</sup>Each item from 14-item questionnaire was assigned values of 0 or 1 and added for the total score.

period (week 12).  $VO_{2max}$  (ml/kg/min) estimation was performed plotting the workloads and HR for the final two stages of the protocol into the multistage  $VO_{2max}$  prediction equation.<sup>22</sup> At the end of each stage, blood pressure was measured by auscultation, by a physician with accredited experience.

### Statistical analysis

The data are presented as mean ± standard error. Sample normality was calculated using the Shapiro–Wilk test. The effect of the different interventions (MeD and MeDE; independent variables) on

HRQoL,  $VO_{2max}$ , body composition, and biochemical parameters (dependent variables) was subjected to analysis of variance (ANOVA) with repeated measurement of two factors (within):  $2 \times 2$  group and time. A Tukey correction was used to adjust the  $p$ -value in relation to the number of contrasts performed. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ ; for all the statistical tests, the SPSS 15.0 package for Microsoft Windows was used (SPSS).

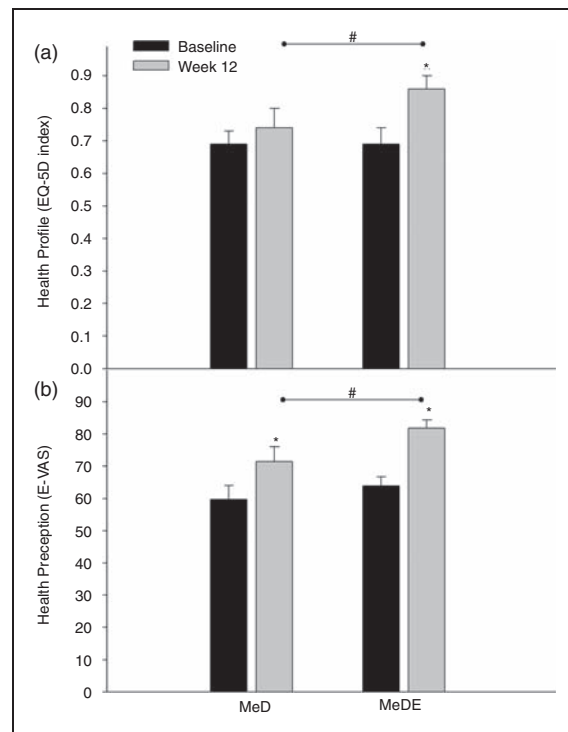
## Results

Forty volunteers, aged 50–66 years (mean  $57.92 \pm 5.00$  years), completed the 12 weeks of intervention with MeD and MeDE, 20 in each group. The basic characteristics and cardiovascular risk factors of the subjects are shown in Table 2. The compositions of the diets consumed in MeD and MeDE at the end of the study period are presented in Table 3. The compliance with the Mediterranean eating pattern was good in both exercising and non-exercising groups, as shown the Mediterranean diet score, which increased 4.4 points in MeD and 4.7 points in MeDE, without any statistical differences between groups.

Figure 2 shows that only patients in the MeDE group significantly improved their health profile (EQ-5D index) after 12 weeks of intervention. Meanwhile, health perception (E-VAS) improved in both groups at week 12 post intervention, and this change was greater in the MeDE group than in the MeD group.

Regarding the SF36 survey, physical function, general health, and vitality improved in both groups after the intervention period, although MeDE led to a greater improvement than MeD on these subscales. Emotional role similarly improved in MeD and MeDE, whereas physical role, bodily pain, and social function only improved in the MeDE group (Figures 3 and 4).

Table 4 presents comparisons of physical fitness and physiological response to submaximal cardiopulmonary tests between groups over the duration of the treatment. Physical fitness evaluated by  $VO_{2max}$ , improved in both groups, MeD and MeDE, with an increase of 2.39 vs. 8.44 ml/min/kg respectively ( $p < 0.05$ , between groups). Subjects in MeDE showed positive changes in HR, blood pressure, and perceived effort when they reached 85% of their maximum cardiac frequency in their second cardiopulmonary test performed at week 12 (all  $p < 0.05$ ). Positive correlations were found between the improvement in physical function (values of difference from baseline to week 12) and the percentage reduction in bodyweight at week 12 in both MeD and MeDE ( $r = 0.44$ ,  $p = 0.04$ ;  $r = 0.50$ ,  $p = 0.03$ , respectively). In addition, only in MeDE

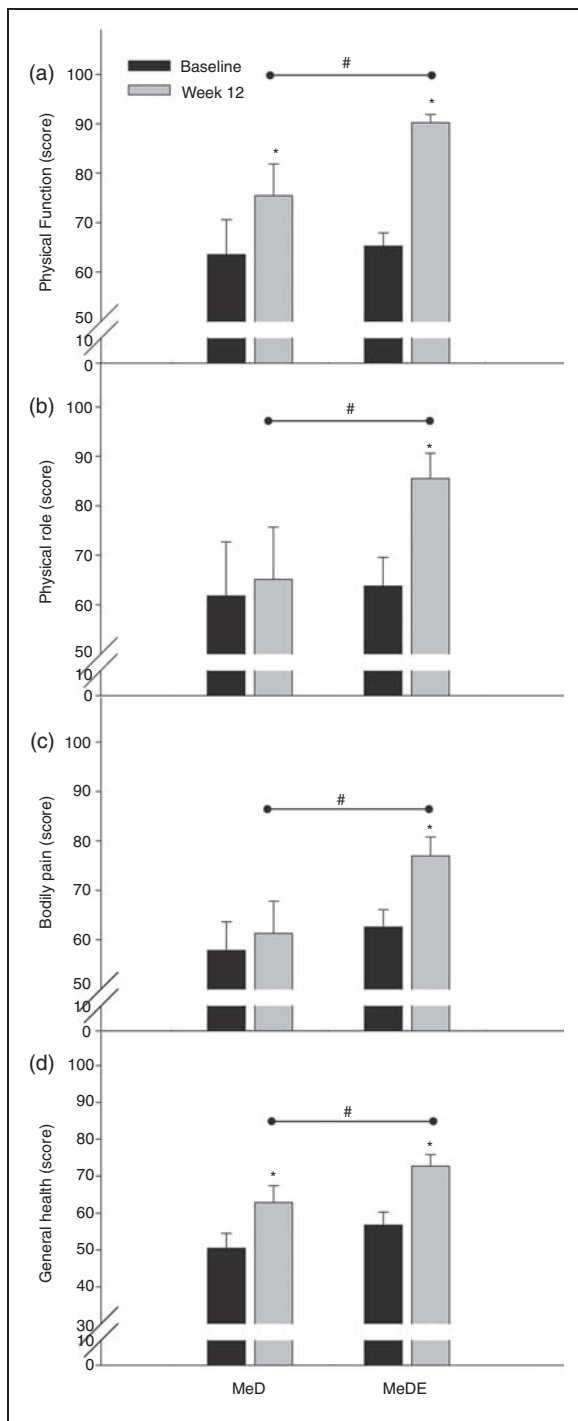


**Figure 2.** Health profile (a) and health perception (b) values at baseline and at week 12 in hypocaloric Mediterranean diet (MeD) or hypocaloric Mediterranean diet plus moderate-to-high intensity training (MeDE).

were positive correlations found between the improvement in the physical role (values of difference from baseline to week 12) and the improvement of perceived exertion at 85% of the  $HR_{max}$  in the cardiopulmonary test; and between the emotional role (SF36) and the percentage reduction in weight ( $r = 0.52$ ,  $p = 0.02$ ;  $r = 0.69$ ,  $p = 0.001$ , respectively).

## Discussion

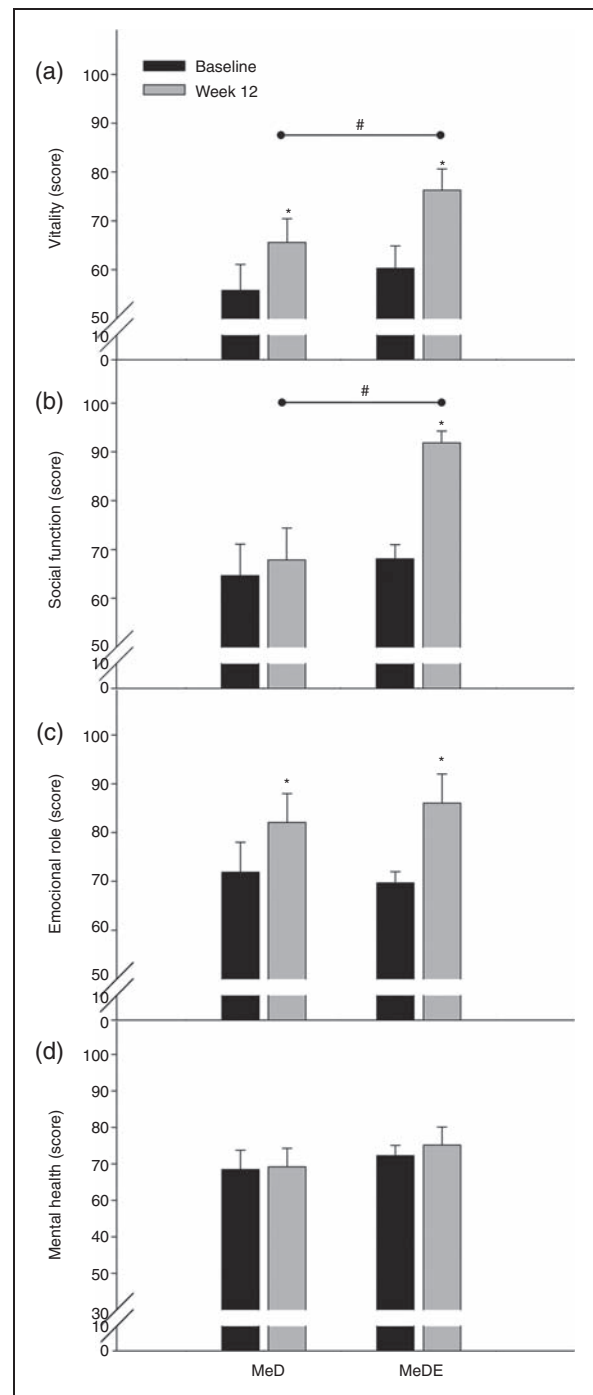
To the best of our knowledge, this is the first randomized trial to compare the effects of following a hypocaloric model of Mediterranean diet (MeD) or the same diet plus periodized moderate-to-high intensity training (MeDE) on HRQoL in obese adults with metabolic syndrome. The main findings of this study are that MeDE improved more than MeD the perception of health (E-VAS) and the domains of physical function, general health, and vitality, although both were beneficial. However, MeDE was alone capable of improving the health profile (EQ-5D), physical role, bodily pain, and social function in these patients. Moreover, after 12 weeks of treatment with MeDE, not only were major improvements observed in MetS components, but there were also greater benefits on bodyweight, physical fitness, and physiological response to submaximal



**Figure 3.** Physical domains of Medical Outcome Study short form-36 at baseline and at week 12 in hypocaloric Mediterranean diet (MeD) or hypocaloric Mediterranean diet plus moderate-to-high intensity training (MeDE).

physical effort, the latter being variables directly related to improvements in HRQoL in this group.

While the physical domains of functioning of HRQoL seem to be mainly worsened by the obesity in MetS,<sup>4,23</sup> a greater variety of factors influences the



**Figure 4.** Mental domains of Medical Outcome Study short form-36 at baseline and at week 12 in hypocaloric Mediterranean diet (MeD) or hypocaloric Mediterranean diet plus moderate-to-high intensity training (MeDE).

mental domains, including both the environment surrounding the subject and personal characteristics (e.g. a sense of optimism, degree of physical activity, diet).<sup>24</sup> In this study, we found significant benefits on HRQoL in patients treated with MeD. In particular, at the end

**Table 4.** Fitness and cardiovascular response at baseline and week 12 in hypocaloric Mediterranean diet (MeD) or hypocaloric Mediterranean diet plus moderate-to-high intensity training (MeDE)

Variables	MeD (n = 20)		MeDE (n = 20)	
	Baseline	Week 12	Baseline	Week 12
VO <sub>2max</sub> (ml/min/kg)	19.99 ± 1.28	22.38 ± 1.56 <sup>a</sup>	18.87 ± 1.25	27.31 ± 1.05 <sup>a,b</sup>
HR at 85% HR <sub>max</sub> (bpm)	138.00 ± 2.64	137.90 ± 2.82	136.75 ± 3.53	120.42 ± 2.35 <sup>a,b</sup>
SBP at 85% HR <sub>max</sub> (mmHg)	209.27 ± 7.11	208.00 ± 5.38	207.85 ± 5.12	186.31 ± 5.40 <sup>a,b</sup>
DBP at 85% HR <sub>max</sub> (mmHg)	105.40 ± 3.17	99.80 ± 2.73	104.15 ± 2.48	89.73 ± 3.02 <sup>a,b</sup>
Effort perception at 85% HR <sub>max</sub> (points)	15.50 ± 0.71	15.20 ± 0.80	15.89 ± 0.50	13.05 ± 0.61 <sup>a,b</sup>

Values are mean ± standard error. <sup>a</sup>Significant difference within group (baseline vs. week 12). <sup>b</sup>Significant difference between groups (MeD vs. MeDE). DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure; HR, heart rate.

of the study, improvements were observed in general health, vitality, and physical function. It was also noted that greater weight loss among the subjects of this group correlated positively with an improvement in physical function. These data suggest that weight loss could explain, at least partly, the improvements in HRQoL. Supporting the above hypothesis, a recent study has found that weight loss in obese patients induced by caloric restriction alone independently improves physical function and HRQoL in these patients.<sup>25</sup> Other previous studies also point to the importance of weight loss in improving most of the HRQoL domains, since it has a rapid influence on mobility and the daily functioning of MetS subjects.<sup>4,6</sup>

Unlike the published studies, this study included, both in MeD and MeDE, a Mediterranean diet model, i.e. a dietary pattern which is cardioprotective, varied, and culturally accepted.<sup>26</sup> Therefore, we believe that the improvement in some aspects of HRQoL, such as the emotional role (SF36) and self-rated health (E-VAS) at the end of study period, could be caused not only by weight loss, but also by the characteristics of the treatment. Firstly, following a traditional Mediterranean diet improves the ability of patients to lose weight, without excessive limitations on the selection of the different traditional foods which make up this varied dietary pattern.<sup>26,27</sup> Secondly, the typical Mediterranean diet has been widely promoted by the media and health institutions, which present it to the public as a healthy and desirable eating habit. This might have had a positive influence by increasing the perception of the benefits obtained by following the diet and improving the emotional state of these patients. If this hypothesis were true, the hypocaloric model of Mediterranean diet may also be useful for promoting a positive emotional environment, which is a key factor for achieving better perception of one's own HRQoL<sup>28</sup> and helps the patients to follow the treatment.

On the other hand, previous studies have shown that improved physical and functional fitness in obese

patients with MetS could be the key factor in improving HRQoL, regardless of changes in fat mass and weight at the end of an exercise programme.<sup>29,30</sup> However, other researchers have suggested (based on a less controlled intervention) that weight loss, but not increased fitness, can contribute significantly to improvements in most domains of HRQoL following a lifestyle treatment for obesity,<sup>6</sup> while recent data support the existence of a positive, independent effect of both factors: weight loss and improved fitness on HRQoL in obese subjects, which suggests that a combined treatment of diet and exercise is more effective.<sup>25</sup> In this respect, our data show that both weight loss and improved fitness jointly explain the greater improvement in HRQoL in the MeDE group. This idea is based on the fact that, with MeDE, both the weight loss percentage and the perception of effort during the cardiopulmonary test correlate similarly with improvements in physical function and physical role, respectively. The physical role is particularly influential on how the subjects perceive quality of life, since it represents the ability to perform different everyday activities without physical limitations (pain, discomfort, or fatigue).<sup>31</sup>

The specific improvement of some MetS components with MeDE could also have contributed towards enhancing the effect on the physical function and overall health profile in this group, such as the effect of MeDE lowering blood pressure at rest and during physical stress conditions after 12 weeks of treatment. In this regard, previous studies have shown that high blood pressure has an adverse effect on physical functioning and HRQoL.<sup>3,5</sup> Although the mechanisms explaining this effect are not sufficiently clear, some studies have reported that patients with hypertension tend to take on more of a role of sick patient, which is partially reversed the more their blood pressure is reduced.<sup>32</sup>

Another finding this study produced was that the domains of bodily pain and social function only improved in the MeDE group. Although previous

studies with obese patients and MetS found no positive effect of low-to-moderate intensity exercise on perception of bodily pain,<sup>6,30,33</sup> others with high-intensity exercise or strength exercise found a positive effect on the bodily pain score.<sup>29,34</sup> In addition, there is enough evidence to show that the Mediterranean diet leads to improvements in the oxidative state and inflammatory profile of MetS patients<sup>35,36</sup> and objectively reduces pain in obese patients with osteoarthritis,<sup>37</sup> which improves their physical functioning. Therefore, one possible hypothesis is that exercise and diet have produced a strong enough stimulus to reduce the self-perception of bodily pain.

Two recent studies<sup>30,38</sup> have shown evidence that a programme of high-calorie-expenditure exercise is capable of improving social function and psychological status in obese subjects with cardiovascular risk or with coronary heart disease. In line with these studies, our results support the hypothesis that a healthier lifestyle (Mediterranean diet plus a moderate-to-high intensity training) could result in a less stressful social environment for MetS patients, than diet alone. A crucial issue, for the reduction of psychosocial stress and improvement of psychological mood is that moderate-intensity exercise should be performed at intervals that allow for full physiological and structural recovery. During moderate-intensity exercise, the chemical messengers secreted (such as catecholamines, corticotrophin-releasing factor, corticotrophin) are psychologically and behaviourally arousing.<sup>39</sup> During recovery phases, higher levels of serotonin and dopamine, and lower levels of stress hormones (like cortisol) improve mood while cytokine-mediated neuroimmunological mechanisms promote neurological resilience.<sup>40</sup> Further research should be designed in such a way as to learn about the possible effects of brain chemistry on HRQoL in MetS patients undergoing diet plus moderate-to-high intensity training.

Finally, with MeDE, the benefits of periodized training lasting only 12 weeks could be linked to the moderate-to-high intensity used in each exercise session, which is an unusual feature in other interventions with MetS patients. To achieve this, two different strategies were used in the programme timetable in order to include high intensity exercise right from the start of training. In the supervised sessions, a gradual increase in exercise intensity was used (by changing the work:recovery ratio), while in the home sessions, priority was given to increasing the workload, since it was difficult to check that the MetS patients would carry out intense exercise without supervision or that setting longer exercise sessions without a time limit (as in a laboratory) would be feasible.

In conclusion, our findings suggest that a model of hypocaloric Mediterranean diet improves the HRQoL

in metabolic syndrome patients through weight loss and improvement in cardiovascular risk factors. However, a combination of this dietary model and a periodized moderate-to-high intensity exercise programme may lead to greater improvement in HRQoL through a greater effect on physical and functional fitness, bodyweight, and risk factors than diet alone. Therefore, this combination may well be a superior strategy for the treatment of the metabolic syndrome patients, helping them to live into old age with better quality of life.

### Acknowledgements

The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. The authors thank Diana Vaamonde Martin for excellent technical assistance.

### Funding

This work was supported by the Andalusian Health Council, Consejería de Salud, Junta de Andalucía (118/08 to FFJ).

### Conflict of interest

None of the authors has any conflict of interest or funding that could affect the performance of the work or the interpretation of the data.

### References

1. Faith MS, Butryn M, Wadden TA, et al. Evidence for prospective associations among depression and obesity in population-based studies. *Obes Rev* 2011; 12: 438–453.
2. Vetter ML, Wadden TA, Lavenberg J, et al. Relation of health-related quality of life to metabolic syndrome, obesity, depression and comorbid illnesses. *Int J Obes (Lond)* 2010; 35: 1087–1094.
3. Park SS, Yoon YS and Oh SW. Health-related quality of life in metabolic syndrome: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2005. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 91: 381–388.
4. Han JH, Park HS, Shin CI, et al. Metabolic syndrome and quality of life (QOL) using generalized and obesity-specific QOL scale. *Int J Clin Pract* 2009; 63: 735–741.
5. Corica F, Corsonello A, Apolone G, et al. Metabolic syndrome, psychological status and quality of life in obesity: the QUOVADIS Study. *Int J Obes* 2008; 32: 185–191.
6. Ross KM, Milsom VA, Rickel KA, et al. The contributions of weight loss and increased physical fitness to improvements in health-related quality of life. *Eat Behav* 2009; 10: 84–88.
7. Esposito K, Kastorini CM, Panagiotakos DB, et al. Mediterranean diet and weight loss: meta-analysis of randomized controlled trials. *Metab Syndr Relat Disord* 2011; 9: 1–12.
8. Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, et al. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components a meta-analysis of 50 studies and 543,906 individuals. *Am J Coll Cardiol* 2011; 57: 1299–1313.



9. Muñoz MA, Fito M, Marrugat J, et al. REGICOR and HERMES investigators. Adherence to the Mediterranean diet is associated with better mental and physical health. *Br J Nutr* 2009; 101: 1821–1827.
10. Strasser B and Schobersberger W. Evidence for resistance training as a treatment therapy in obesity. *J Obes* 2011; doi: 10.1155/2011/482564.
11. Häglin L, Lundström S, Kaati G, et al. All-cause mortality of patients with dyslipidemia up to 19 years after a multidisciplinary lifestyle modification programme: a randomized trial. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011; 18: 79–85.
12. Nybo L, Sundstrup E, Jakobsen MD, et al. High-intensity training versus traditional exercise interventions for promoting health. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42: 1951–1958.
13. Irving BA, Davis CK, Brock DW, et al. Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40: 1863–1872.
14. Hansen D, Dendale P, Van Loon LJ, et al. The impact of training modalities on the clinical benefits of exercise intervention in patients with cardiovascular disease risk or type 2 diabetes mellitus. *Sports Med* 2010; 40: 921–940.
15. Boutcher SH. High-intensity intermittent exercise and fat loss. *J Obes* 2011; doi: 10.1155/2011/868305.
16. Inelmen EM, Toffanello ED, Enzi G, et al. Predictors of drop-out in overweight and obese outpatients. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29: 122–128.
17. Perri MG, Anton SD, Durning PE, et al. Adherence to exercise prescriptions: effects of prescribing moderate versus higher levels of intensity and frequency. *Health Psychol* 2002; 21: 452–458.
18. Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, et al. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58: 1550–1552.
19. Dolan P. Modeling valuations for EuroQol health states. *Med Care* 1997; 35: 1095–1108.
20. American College of Sports Medicine. *ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription*. Philadelphia, USA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2010.
21. Tanaka H, Monahan KG and Seals DS. Age-predicted maximal heart rate revisited. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 153–156.
22. Don Franks B and Howley ET. *Instructor's manual and test bank to accompany exercise physiology theory and application to fitness and performance*. Champaign IL, USA: Human Kinetics, 2003.
23. Pan HJ, Cole BM and Geliebter A. The benefits of body weight loss on health-related quality of life. *J Chin Med Assoc* 2011; 74: 169–175.
24. Frisman GH and Kristenson M. Psychosocial status and health related quality of life in relation to the metabolic syndrome in a Swedish middle-aged population. *Eur J Cardiovasc Nurs* 2009; 8: 207–215.
25. Villareal DT, Chode S, Parimi N, et al. Weight loss, exercise, or both and physical function in obese older adults. *N Engl J Med* 2011; 364: 1218–1229.
26. Vernagione L. The Mediterranean diet: a matter of history, tradition, culture and health. *J Nephrol* 2009; 14: S149–S158.
27. Garaulet M and Pérez de Heredia F. Behavioural therapy in the treatment of obesity (II): role of the Mediterranean diet. *Nutr Hosp* 2010; 25: 9–17.
28. Molarius A, Berglund K and Ericksson C. Socioeconomic conditions, lifestyle factors and self-rated health among men and women in Sweden. *Eur J Public Health* 2007; 17: 125–133.
29. Levinger I, Goodman C, Hare DL, et al. The effect of resistance training on functional capacity and quality of life in individuals with high and low numbers of metabolic risk factors. *Diabetes Care* 2007; 30: 2205–2210.
30. Martin CK, Church TS, Thompson AM, et al. Exercise dose and quality of life: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2009; 169: 269–278.
31. Spirduso WW and Cronin DL. Exercise dose-response effects on quality of life and independent living in older adults. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: S598–S610.
32. Fogari R and Zoppi A. Effect of antihypertensive agents on quality of life in the elderly. *Drugs Aging* 2004; 21: 377–393.
33. Imayama I, Alfano CM, Cadmus Bertram LA, et al. Effects of 12-month exercise on health-related quality of life: a randomized controlled trial. *Prev Med* 2011; 52: 344–351.
34. Aoyagi Y, Park H, Park S, et al. Habitual physical and health-related quality of life in older adults: interactions between the amount and intensity of activity (the Nakanojo Study). *Qual Life Res* 2010; 19: 333–338.
35. Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 333–340.
36. Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Delgado-Lista J, et al. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 7 69–70.
37. Messier SP, Loeser RF, Miller GD, et al. Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1501–1510.
38. Pope L, Harvey-Berino J, Savage P, et al. The impact of high-calorie-expenditure exercise on quality of life in older adults with coronary heart disease. *J Aging Phys Act* 2011; 19: 99–116.
39. Borer KT. *Exercise endocrinology*. Champaign IL, USA: Human kinetics, 2003.
40. Eyre H and Baune BT. Neuroimmunological effects of physical exercise in depression. *Brain Behav Immun* 2012; 26(2): 251–266.