

Departament de Medicina
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

**EFFECTE DELS POLIFENOLS DE LA DIETA
EN ELS MARCADORS INFLAMATORIS
PREDICTORS D'ARTERIOSCLEROSI**

MÒNICA VÀZQUEZ AGELL

Barcelona, Febrer de 2008

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR PER LA
UNIVERSITAT DE BARCELONA
PROGRAMA DE DOCTORAT: BIOLOGIA I PATOLOGIA
CEL·LULARS, BIENNI 2003-2005, UB

Presentada per:

MÒNICA VÀZQUEZ AGELL

Directors:

Dr. Ramon Estruch Riba i Dr. Emilio Sacanella Meseguer

Departament de Medicina Interna
Hospital Clínic de Barcelona

Tesi Doctoral finançada per les següents ajudes:

- Ajuda concedida per l'Institut d'Investigació i Tecnologia Agrària i Alimentària (INIA), referència: VINO1-006 (2002-2004).
- Ajuda concedida pel Fons d'Investigació Sanitària (FIS) de l'Institut de Salut Carles III, expedient: PI020611 (2003-2005).
- Ajuda concedida pel Ministeri de Ciència i Tecnologia, referència: AGL2004-08378-C02-02/ALI (2004-2007).
- Ajuda concedida pel FIS de l'Institut de Salut Carles III, expedient: RED G03/140 (2003-2005).
- Ajuda concedida pel FIS de l'Institut de Salut Carles III, expedient: PI041837 (2004-2007).
- Ajuda concedida pel Centre Investigació Biomèdica En Red (CIBER) de fisiopatologia de la obesitat i nutrició de l'Institut de Salut Carles III, referència: CB06/03 (2006-2009).

Als meus pares i
al Xevi, per tot.

AGRAÏMENTS

La realització d'aquesta Tesis Doctoral ha estat possible gràcies a la valuosa col·laboració de nombroses persones tant a nivell professional com personal, per aquest motiu vull mostrar el meu agraïment a:

Als directors de la tesi, Dr. Ramon Estruch Riba i Dr. Emilio Sacanella Meseguer, per ser els pares científics d'aquest document. Dos reconegudes referències científiques del camp, que han encaminat el projecte durant aquests anys, dipositant la confiança en mi per realitzar-lo.

Als membres del grup d'estudi de les malalties relacionades amb el consum d'alcohol, Dr. Josep Maria Nicolàs, Dr. Joaquim Fernández-Solà i Emili Ros per la seva col·laboració i especialment a la Dra. Emilia Antúnez per la seva ajuda il·limitada no solament professional sinó també personal.

A l'Ester, no ets ni una companya ni una amiga, per mi ets com la meva germana. T'estic i t'estaré eternament agraïda per tot el teu suport incondicional i no oblidaré mai els teus consells i, sobretot, la teva alegria i el teu humor tant fresc per superar els moments difícils. Ets l'ànima alegre i contagiosa per tot aquella persona que et coneix, gràcies per incloure-m'hi en la teva llista de "col·leguis". Un petonàs molt fort, et mereixes tot lo millor. A més, sense la teva ajuda en tots els àmbits, amb el "cacau westerns", i una llista interminable de tècniques, no existiria ni de bon tros aquesta tesi.

A la Rosa, ets com la meva segona germana, ens coneixem relativament poc però es com si et conegués de tota la vida. Gràcies per la teva amistat tant desinteressada i ajudar-me tant a nivell professional com personal, m'encanta la teva fesomia tan riallera i desenfadada que fa que tot sigui més fàcil i amè. I, també, agraeixo al teu Carles, l'ajuda i suport donats en el disseny de la tesi.

A les *lab girls* de l'IDIBAPS: Glòria, Ester L., Mari Pau i Constans amb qui he compartit les inacabables hores de laboratori i, també, a la Vane que és l'ànima musical del laboratori. I els *lab boys*, Nasir i Marc que han permès trencar l'esquema de laboratori exclusiu per noies.

A les ex-companyes ja doctores: Eva, Sònia, Marta i Dori en breu. I molt especialment a Maria una gran professional amb un cor immens disposada a ajudar-me en qualsevol moment, i a la Bea, que tot i la seva curta estada pel laboratori va ser molt entranyable.

A les infermeres i dietistes, els granets de sorra que sense la seva aportació no seria possible obtenir els resultats d'aquesta memòria. Gràcies Conxa, Mercè i Neus per ser uns "solets" i, sobretot, a la Laura una companya i amiga genial que no ha dubtat en ajudar-me quan l'he necessitat.

A Juanjo Barceló per resoldre qualsevol dubte que li plantegés i per les converses acompanyades de 'Depeche Mode' que feien més amenes les llargues hores, dies i anys de lectura i anàlisi de multitud de mostres en el citòmetre.

Als veïns de Neumo: Jordi, Maria, Mireia i Àsun amb qui he compartit en moltes ocasions material i experiències científiques amb un toc d'humor picaresc i saludable.

Al personal investigador del Departament de Bromatologia i Nutrició de Farmàcia: Cristina Lacueva, Rosa Maria Lamuela, Raúl Zamora i Elena Roura on la seva col·laboració ha estat imprescindible per a poder publicar els articles presents en aquesta memòria.

A tots els participants inclosos per la seva col·laboració constant i desinteressada, sobretot, el personal del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Clínic i els alumnes de Farmàcia de la UB.

Als meus pares, Josep i Rosa, pel seu suport en tot moment. Sense la seva educació i el seu amor jo no seria res. Gràcies pels vostres consells, per animar-me, estimar-me i fer-me riure en els moments que més ho necessitava. Us estimo molt de tot cor i aquesta tesi està dedicada molt especialment a vosaltres perquè us ho mereixeu tot i més.

Al meu germà, Pere, als meus cunyats, sogres i família amb tot el meu amor i simpatia pel suport moral i ajuda durant tot aquest període.

A les meves amigues incondicionals: Meri, Núria i Francesca que han compartit amb mi moltes rialles, anècdotes, viatges i bones vibracions demostrant la seva amistat en tot moment.

I finalment, al Xevi, un somriure en una cara trista, un estel en un cel ennuvolat, un somni en un malson, en definitiva, l'amor de la meua vida. Gràcies carinyo per tot el teu suport moral i emocional en tot moment, fins i tot, per cuidar-me quan estic malalta, eixugar-me les llàgrimes de impotència i aguantar-me durant aquesta fase crítica de confecció de la tesi.

ÍNDEX

ABREVIACIONS	1
INTRODUCCIÓ	5
1. INTRODUCCIÓ GENERAL	7
2. FISIOPATOLOGIA DE L'ARTERIOSCLEROSI-HIPÒTESI INFLAMATÒRIA	9
2.1. Endoteli vascular i resposta inflamatòria de l'arteriosclerosi	9
2.2. Arteriosclerosi - Formació de la placa d'ateroma	9
2.3. Placa d'ateroma estable vers inestable	11
2.4. Tipus cel·lulars implicats en la patogènia de l'arteriosclerosi	12
2.4.1. Cèl·lules sanguínies circulants	12
2.4.2. Cèl·lules endotelials (EC)	13
2.4.3. Cèl·lules musculars llises (SMC)	14
2.5. Molècules inflamatòries implicades en la patogènia de l'arteriosclerosi	14
2.5.1. Proteïna C-reactiva (CRP)	14
2.5.2. Molècules d'adhesió cel·lulars i solubles	15
2.5.2.1. Selectines	16
2.5.2.2. Integrines	18
2.5.2.3. Superfamília de les Immunoglobulines	19
2.5.3. Citosines	21
2.5.4. Quimiosines	22
2.5.5. Sistema immunomodulador CD40/CD40L	23
2.6. Expressió de molècules inflamatòries regulada per NF- κ B	24
2.7. Disfunció endotelial - interaccions entre leucòcit i endoteli vascular	27
2.8. Factors de risc cardiovascular clàssics	29
2.8.1. Hipercolesterolèmia	30
2.8.2. Hipertensió arterial	31
2.8.3. Diabetis Mellitus	31
2.8.4. Obesitat	32
2.8.5. Tabaquisme	32
2.8.6. Hiperhomocisteïnèmia	33
2.9. Marcadors d'inflamació com a predictors d'arteriosclerosi	33
3. FACTORS EXÒGENS EN LA PREVENCIÓ D'ARTERIOSCLEROSI	37
3.1. Dieta	37
3.1.1. Alcohol	37
3.1.2. Polifenols	38
3.1.3. Altres	39
3.2. Exercici	39
4. CONSUM MODERAT D'ALCOHOL I PREVENCIÓ D'ARTERIOSCLEROSI	40
4.1. Alcohol - cardiopatia, malaltia cerebrovascular i vasculopatia perifèrica	42
4.2. Tipus de beguda alcohòlica i protecció front l'arteriosclerosi	43
4.3. Mecanismes implicats en reducció d'arteriosclerosi per consum d'alcohol	44

4.3.1. Efecte de l'alcohol sobre les lipoproteïnes.....	44
4.3.2. Efecte de l'alcohol sobre les plaquetes, sistema de coagulació i fibrinòlisis	47
4.3.2.1. Consum d'alcohol i activitat plaquetària.....	47
4.3.2.2. Consum d'alcohol i sistema de coagulació	48
4.3.2.3. Consum d'alcohol i fibrinòlisis	49
4.3.3. Efecte de l'alcohol sobre la funció endotelial	49
4.3.4. Efecte de l'alcohol sobre la resposta inflamatòria en la paret vascular	50
5. CONSUM DE POLIFENOLS PROCEDENTS DE LA DIETA I PREVENCIÓ	
D'ARTERIOSCLEROSI	54
5.1. Definició i classificació dels polifenols.....	54
5.2. Aliments rics en polifenols.....	56
5.2.1. Vi: origen i contingut polifenòlic.....	57
5.2.2. Cacao: origen i contingut polifenòlic	58
5.3. Polifenols i arteriosclerosi: efectes beneficiosos descrits	59
5.4. Mecanismes fisiopatològics dels polifenols en la prevenció de l'arteriosclerosi.....	60
5.4.1. Polifenols i estrès oxidatiu.....	60
5.4.2. Polifenols i funció endotelial	60
5.4.3. Polifenols, funció plaquetar i trombosis.....	61
5.4.4. Polifenols i resposta inflamatòria	61
HIPÒTESIS	63
OBJECTIUS	67
RESULTATS	71
TREBALL 1	73
TREBALL 2	83
TREBALL 3	93
DISCUSSIÓ CONJUNTA.....	111
CONCLUSIONS	119
BIBLIOGRAFIA.....	125
ANEXE DE PUBLICACIONS.....	147

ABREVIACIONES

BMI	Índex de massa corporal
BP	Pressió sanguínia
CAD	Malaltia de les artèries coronàries
CAM	Molècula d'adhesió cel·lular
CHD	Malaltia cardio-coronària
COX	Ciclooxigenasa
CRP	Proteïna C-reactiva
CVD	Malaltia cardiovascular
DNA	Àcid desoxiribonucleic
EC	Cèl·lula endotelial
EGF	Factor de creixement epidèrmic
eNOS	Òxid nítric sintasa endotelial
ET-1	Endotelina-1
HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
hsCRP	Proteïna C-reactiva ultrasensible
ICAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular-1
IFN- γ	Interferó gamma
Ig	Immunoglobulina
I κ B	Inhibidor de kappa beta
IKK	Quinasa de I κ B
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Oxid nítric sintasa induïble
kDa	Kilodaltons
LDL	Lipoproteïnes de baixa densitat
LDLox	Lipoproteïnes de baixa densitat oxidades
LFA-1	Antigen associat a funció leucocitària
Lp(a)	Lipoproteïna a
LPS	Lipopolisacàrid
MCP-1	Proteïna quimiotàctica de monòcits
MMP	Metal·loproteïnes de la matriu extracel·lular
NF- κ B	Factor nuclear kappa beta
NLS	Senyal de localització nuclear
NO	Òxid nítric
PA	Activador de plasminogen
PAI-1	Inhibidor de l'activador de plasminogen -1
PDGF	Factor de creixement derivat plaquetes

PECAM-1	Molècula d'adhesió de cèl·lula endotelial i plaqueta -1
PSGL-1	Glicoproteïna lligand de P-selectina -1
RHD	Domini d'homologia Rel
ROS	Espècie reactiva d'oxigen
SCR	Seqüències de repeticions consens
Sgp	Glicoproteïnes sulfatades
SLe ^x	Sialil Lewis x
SMC	Cèl·lula muscular llisa
TAD	Domini de transactivació
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VCAM-1	Molècula d'adhesió de cèl·lula vascular-1
VLA-4	Antigen d'activació tardana - 4
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

L'arteriosclerosi és una malaltia progressiva de les artèries caracteritzada per l'enduriment i engruiximent de la paret arterial al formar-se plaques d'ateroma i representa la major causa de morbi-mortalitat per malaltia cardiovascular de la població adulta en el món occidental (Hansson, 2005). A més, l'arteriosclerosi és una malaltia on els primers canvis apareixen en edat infantil però no presenta símptomes fins passades varies dècades. Per aquest motiu és de gran rellevància conèixer de forma exhaustiva i precisa la fisiopatologia d'aquesta malaltia per tal d'obtenir eines preventives que impossibilitin la seva formació en aquelles persones potencials a desenvolupar-la i, també, eines terapèutiques que millorin el seu pronòstic.

Els nous avenços adquirits sobre el coneixement de la fisiopatologia de l'arteriosclerosi durant la darrera dècada han ocasionat un gir radical en la seva definició (Ross, 1999; Lusis, 2000; Hansson, 2001). Inicialment, es considerava que l'arteriosclerosi era deguda a l'acumulació de lípids en la capa íntima de la paret arterial mitjançant un procés oxidatiu (hipòtesis oxidativa) però, més tard, es va comprovar que podia ser deguda a un procés inflamatori (hipòtesis inflamatòria). Arrel d'aquest descobriment, l'arteriosclerosi cal considerar-la com una malaltia inflamatòria crònica de baixa intensitat amb respostes cel·lulars i moleculars específiques sobre la paret arterial. L'esdeveniment clau que dona pas a l'inici de l'arteriosclerosi és la interacció entre els leucòcits sanguinis i l'endoteli vascular facilitada per l'augment de l'expressió de molècules d'adhesió i citosines, la qual està regulada pel factor nuclear kappa beta (NF- κ B). Aquestes cèl·lules són les que, posteriorment, es carreguen de lípids i acaben formant la placa arterioscleròtica, la lesió típica de l'arteriosclerosi.

En el desenvolupament de l'arteriosclerosi també intervenen factors ambientals com la dieta, l'exercici i el tabaquisme. En referència a la dieta, el consum d'aliments i begudes alcohòliques amb polifenols s'ha contemplat com un factor cardioprotector enfront l'aparició i progressió de l'arteriosclerosi. No obstant, cal remarcar que les begudes alcohòliques són beneficioses mentre el consum sigui moderat (fins a 40g alcohol/dia en homes i 20g d'alcohol/dia en dones). Nombrosos estudis epidemiològics han suggerit que els polifenols de la dieta s'associen a una menor morbi-mortalitat per cardiopatia isquèmica i una reducció de la incidència dels accidents vasculars cerebrals, no obstant, es desconeixen els mecanismes fisiopatològics responsables d'aquesta associació. Fins ara s'ha demostrat que aquests polifenols redueixen l'oxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i també tenen propietats

vasorelaxants. Però en canviar el concepte d'arteriosclerosi, apareix força interès en realitzar estudis prospectius controlats per a determinar els possibles efectes dels polifenols de la dieta sobre la resposta inflamatòria que esdevé en la paret arterial durant l'aterogènesi.

En conclusió, les malalties cardiovasculars són considerades una de les primeres causes de mortalitat en l'àmbit mundial, sent de vital rellevància clarificar els mecanismes fisiopatològics que intervenen per tal d'obtenir noves estratègies d'investigació enfocades a la prevenció d'aquestes malalties. Una de les múltiples línies d'investigació està centrada en l'estudi de components de la dieta que continguin polifenols amb una possible acció cardioprotectora que minvaria el desenvolupament de l'arteriosclerosi. La present Tesi Doctoral està enfocada en el possible efecte cardioprotector dels polifenols de la dieta com a prevenció primària de l'arteriosclerosi a través del mecanisme de modulació de la resposta inflamatòria. Concretament, es pretén conèixer els possibles efectes beneficiosos del vi negre, vi blanc, cava i cacau sobre els marcadors d'inflamació implicats en la fase inicial de la formació de la placa d'ateroma.

2. FISIOPATOLOGIA DE L'ARTERIOSCLEROSI-HIPÒTESI INFLAMATÒRIA

2.1. Endoteli vascular i resposta inflamatòria de l'arteriosclerosi

En condicions normals, l'endoteli és una barrera entre el focus d'inflamació o infecció i les cèl·lules immunes. Però quan s'exposa a estímuls proinflamatoris (factor de necrosis tumoral, TNF- α ; interleucina-1 beta, IL-1 β ; lipopolisacàrid, LPS), l'endoteli s'activa i inicia l'expressió de múltiples factors proinflamatoris addicionals on s'inclouen citosines, quimiosines i molècules d'adhesió que faciliten el pas dels leucòcits circulants a través de la barrera de cèl·lules endotelials (ECs) cap al focus d'inflamació (Pober, 2002; Alon i Feigelson, 2002). Per tant, la resposta inflamatòria és un mecanisme transitori de defensa en resposta al dany o lesió de la paret vascular amb l'objectiu primordial de reparar i mantenir tant l'estructura com la funcionalitat de l'endoteli vascular. Però, si aquesta reacció inflamatòria persisteix en el temps dona lloc a dany o disfunció tissular que acaba produint una patologia vascular com, per exemple, l'arteriosclerosi. Aquesta malaltia es caracteritza per la formació de plaques d'ateroma que en trencar-se són les responsables de l'aparició dels síndromes clínics vasculars com cardiopatia isquèmica, malaltia cerebrovascular o vasculopatia perifèrica (Hansson, 2001 i 2005). Per tant, la resposta inflamatòria sembla tenir un paper clau en l'inici i desenvolupament de l'arteriosclerosi. Aquesta hipòtesi inflamatòria de l'arteriosclerosi ve avalada per nombroses evidències experimentals, per exemple, animals d'experimentació amb carència de certes molècules d'adhesió (ICAM-1 o P-selectina) presentaven lesions arterioscleròtiques molt menys severes respecte els animals control (Hansson et al., 2001).

En la darrera dècada s'han obtingut dades molt fructíferes sobre el protagonisme de la resposta inflamatòria que té lloc en l'endoteli arterial durant el desenvolupament de l'arteriosclerosi. En conseqüència, per suprimir o disminuir la formació de la placa d'ateroma és fonamental el coneixement dels esdeveniments cel·lulars i moleculars que tenen lloc en el vas sanguini originats per la resposta inflamatòria.

2.2. Arteriosclerosi - Formació de la placa d'ateroma

L'arteriosclerosi es caracteritza per la formació de plaques d'ateroma. En aquest procés inflamatori de l'arteriosclerosi intervenen diferents tipus cel·lulars tant de la

paret arterial (EC i SMC), cèl·lules sanguínies circulants (monòcits, limfòcits T i plaquetes) així com també diverses molècules (molècules d'adhesió, citosines i factors de transcripció). L'arteriosclerosi esdevé en 4 etapes (Ross, 1999; Glass i Witztum, 2001; Libby, 2002; Faxon et al., 2004):

- Disfunció endotelial, esdeveniment clau que dona pas a l'inici de l'arteriosclerosi, i que s'acompanya del reclutament i transmigració del leucòcits circulants a l'espai subendotelial (capa íntima de l'endoteli vascular formada per una monocapa de EC) de la paret vascular mitjançant molècules d'adhesió, citosines i factors quimiotàctics (detallat en els **apartats 2.5 i 2.7**). El detonant d'aquest procés és l'acumulació de LDL oxidades (LDLox) originades a partir de LDL que han patit modificacions oxidatives en l'espai subendotelial.
- Estria de greix que es forma com a conseqüència de la captació de LDLox per part dels macròfags situats en la íntima del vas (procedents de la diferenciació dels monòcits) i donen lloc a les cèl·lules escumoses riques en gotes lipídiques. Així, doncs, l'estria de greix esdevindria una lesió primària i asimptomàtica que consisteix en l'acumulació subendotelial de macròfags engreixats de colesterol anomenats cèl·lules escumoses.
- Lesions avançades i complicacions. La lesió primària progressa cap a una lesió més complexa caracteritzada per la migració de SMC des de la capa mitja cap a l'íntima de l'espai subendotelial motivada per citosines i factors de creixement. Aquestes SMC proliferen i capten LDLox contribuint a la formació de noves cèl·lules escumoses i, a més, es secreten proteïnes de la matriu extracel·lular (MMP) que formen una capa fibrosa (lesió fibroproliferativa). Conseqüentment, s'expandeix l'íntima i s'estreny progressivament la llum del vas sanguini. Posteriorment, apareixeria una lesió necròtica caracteritzada per la formació d'un nucli necròtic a partir de l'apoptosis de cèl·lules escumoses (derivades tant de macròfags com de SMC) i de l'acumulació extracel·lular de colesterol. La persistència de tot aquest procés inflamatori i fibroproliferatiu motivaria la formació de la placa d'ateroma que pot romandre estable o inestable tal com es detalla en el següent apartat.
- Trencament de placa i trombosis. Si el procés inflamatori es manté i els factors de risc persisteixen, el nucli necròtic pot continuar creixent provocant la degradació de la matriu extracel·lular per les MMP secretades pels leucòcits activats. A més, les citosines proinflamatòries limiten la síntesi de col·lagen i fan disminuir el gruix

de la capa fibrosa provocant que la placa sigui susceptible al trencament. En trencar-se la placa, el factor tissular entra en contacte amb els components de la sang i s'activa la cascada de coagulació on la trombina activa l'agregació de plaquetes, les quals en interactuar amb les proteïnes del plasma permeten la polimerització del fibrinogen formant-se un trombus. Aquest trombus obstruïria el vas donant lloc a les manifestacions clíniques pròpies de l'arteriosclerosi com l'infart de miocardi.

2.3. Placa d'ateroma estable vers inestable

L'estabilitat o vulnerabilitat de la placa d'ateroma ve determinada per la mida i la composició d'aquesta placa (Libby i Aikawa, 2002; **Figura 1**):

- Placa d'ateroma estable: La càpsula fibrosa és gruixuda i el nucli conté poc colesterol donant lloc a una resposta inflamatòria menor. No sol presentar complicacions fins al cap de varies dècades.
- Placa d'ateroma vulnerable: La càpsula fibrosa és prima i el nucli és ric en colesterol tenint una resposta inflamatòria crònica. A més, la secreció de MMP per part dels macròfags i la neovascularització contribueixen a una major debilitació de la placa. Llavors, la inestabilitat de la placa facilita el trencament i l'alliberació del seu contingut cap a la llum del vas arterial on s'activa l'adhesió plaquetària formant-se un trombus (trombosis) que obstrueix el pas de flux sanguini pel vas arterial. La manca de flux sanguini desencadena els símptomes clínics vasculars com la isquèmia, però si aquesta manca de rec sanguini persisteix, es provoca la mort tissular de la zona afectada originant-se un infart de miocardi o cerebral depenent de si succeeix en l'artèria coronària o caròtida, respectivament.

En conclusió, les característiques cel·lulars específiques de la placa d'ateroma determinaran el risc de presentar-se un esdeveniment vascular en el territori irrigat per l'artèria en qüestió. Llavors, les plaques amb elevat contingut en cèl·lules inflamatòries, lípids i amb escassa paret fibrosa s'anomenarien plaques inestables perquè facilitarien la ruptura i, conseqüent, trombosis. En canvi, plaques amb baix contingut cel·lular i lipídic però amb una gran paret fibrosa serien plaques estables amb risc molt baix de trencament.

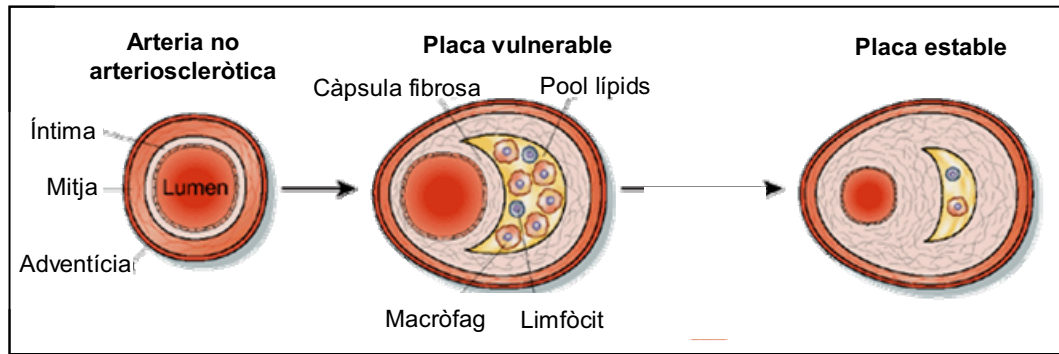


Figura 1. Estabilització o vulnerabilitat de la placa d'ateroma
(Adaptació de Libby i Aikawa, 2002).

2.4. Tipus cel·lulars implicats en la patogènia de l'arteriosclerosi

2.4.1. Cèl·lules sanguínies circulants

Una hiperactivació de monòcits, limfòcits T i plaquetes contribueix a la iniciació i progressió del procés arterioscleròtic. Els monòcits i els limfòcits T són les cèl·lules predominants en el lloc de formació de l'estria greixosa durant l'aterogènesi (Gimbrone et al., 1990). Els monòcits, leucòcits de mida més gran, maduren a macròfags en transvasar des de la sang cap al teixit subjacent. El macròfag és la principal font de mediadors de la inflamació en la placa d'ateroma perquè actua com a presentador d'antígens i productor de citosines, enzims proteolítics i factors de creixement (Glass i Witztum, 2001). També, té un paper primordial en la captació de LDLox mitjançant els receptors *scavenger*. Els limfòcits T conjuntament amb els monòcits intervenen en la resposta inflamatòria i, també, formen part en la mediació de la resposta immune en la placa d'ateroma. Aquests limfòcits T s'activarien en contactar amb l'antigen presentat per les cèl·lules presentadores d'antigen (macròfags i SMC) i, posteriorment, secretarien citosines que amplificarien la resposta inflamatòria.

Les plaquetes, cèl·lules sense nucli, circulen per la sang durant uns 7-10 dies i són necessàries per mantenir la hemostàsia. Quan es produeix un increment en l'activitat de les plaquetes, aquestes contribueixen a la malaltia arterioscleròtica (Libby, 2002; Faxon et al., 2004). La hiperactivitat de les plaquetes pot estar induïda per diferents factors de risc cardiovascular: fumar cigarretes, LDL elevades, diabetis i hiperhomocisteïnèmia. En condicions normals, les plaquetes no s'adhereixen a l'endoteli vascular perquè les EC alliberen substàncies com l'òxid nítric i prostaciclina,

les quals tenen sobre les plaquetes un efecte antiadhesiu i antiagregant, respectivament. No obstant, dany o disfunció de l'endoteli facilita la hiperactivació de les plaquetes amb la consegüent adherència i agregació d'aquestes a la paret arterial. A més, secreten factors de creixement com el derivat de plaquetes (PDGF) que causen la divisió i migració de les cèl·lules de la musculatura llisa cap al interior del vas causant l'engruiximent de la capa íntima i reducció de la llum del vas donant lloc a les característiques que defineixen el procés arterioscleròtic.

2.4.2. Cèl·lules endotelials (EC)

L'endoteli fa referència a una monocapa de EC que recobreixen els vasos sanguinis (arterials i venosos), cavitats cardíacaques i altres superfícies que estan en contacte directe amb la sang. EC s'orienten en el sentit del flux sanguini i proporcionen una superfície fina i llisa evitant una possible interferència amb el flux sanguini però no inhibeix la formació d'un trombus. La monocapa de EC és molt activa i està implicada en un gran nombre de processos biològics com l'aterogènesi i trombosis (Vita et al., 1996). L'endoteli té diverses funcions essencials i s'executen mitjançant mediadors químics. Una de les funcions més coneguda és el manteniment del to muscular dilatat per conservar la pressió arterial en valors normals i permetre la perfusió tissular. Aquesta funció vasodilatadora de l'endoteli s'exerceix mitjançant la síntesis i la secreció d'un factor de relaxació identificat com òxid nítric (NO). En condicions normals, artèries sanes on es produeix un creixement del flux sanguini, se'n generen forces tangencials sobre la paret vascular, llavors, apareix la intervenció per part de les EC estimulants la producció de NO per tal de conduir cap a una vasodilatació per compensar aquest augment del flux dins l'artèria. Aquest NO es difon dins les SMC i les estimula a relaxar-se, així s'aconsegueix incrementar el diàmetre arterial (Cooke et al., 1990). Per tant, el deteriorament de la vasodilatació a través de l'endoteli està lligat, en part, per la reducció de la disponibilitat de NO de les EC que provoca efectes proaterogènics. Així, el NO alliberat de les EC té diversos efectes antiaterogènics sumats a l'efecte vasodilatador com són la inhibició de: l'agregació i adhesió de plaquetes, unió dels monòcits a l'endoteli i proliferació-migració de les SMC. Llavors, una millora de la funció endotelial per increment dels nivells de NO alliberats tindria un efecte protector en la paret arterial enfront el desenvolupament de l'arteriosclerosi.

Cal remarcar que les EC regulen tot un seguit de funcions vitals per a la preservació de la paret sanguínia mitjançant la producció d'un ampli espectre de

substàncies bioactives. Entre elles, components que són produïts i alliberats com el NO, prostaciclins, quimiosines i factors implicats en coagulació-fibrinolisis o bé molècules d'adhesió que formen part de l'estructura a nivell de membrana de les quals es descriuen més endavant.

2.4.3. Cèl·lules musculars llises (SMC)

Les SMCs participen en la fase de formació de lesions avançades de l'arteriosclerosi sent clau per a la gènesi del component fibroproliferatiu de la placa d'ateroma (Ross, 1993). Aquestes cèl·lules es troben en la capa mitja del vas però en processos de disfunció endotelial, les SMCs migren progressivament mitjançant molècules quimiotàctiques (PDGF i trombina) cap a l'espai subendotelial on formaran l'estria fibrosa. També s'estimula la proliferació d'aquestes SMCs i la producció de matriu extracel·lular mitjançant citosines i factors de creixement (IL-1, TNF- α , PDGF...) generades per elles mateixes o bé per macròfags, EC, plaquetes i limfòcits T (Yokota i Hansson, 1995).

2.5. Molècules inflamatòries implicades en la patogènia de l'arteriosclerosi

2.5.1. Proteïna C-reactiva (CRP)

La CRP, sintetitzada en el fetge en resposta a la secreció de interleucina-6 (IL-6), és un reactant de fase aguda que promou la inflamació i, per tant, l'aterogènesi (Deveraj et al., 2003; de Ferranti i Rifai, 2007). S'ha detectat la presència CRP en plaques d'ateroma realitzant múltiples funcions com, per exemple, l'estimulació de l'expressió i secreció de molècules d'adhesió cel·lular que permet incrementar l'adhesió entre leucòcits i endoteli (**Figura 2**).

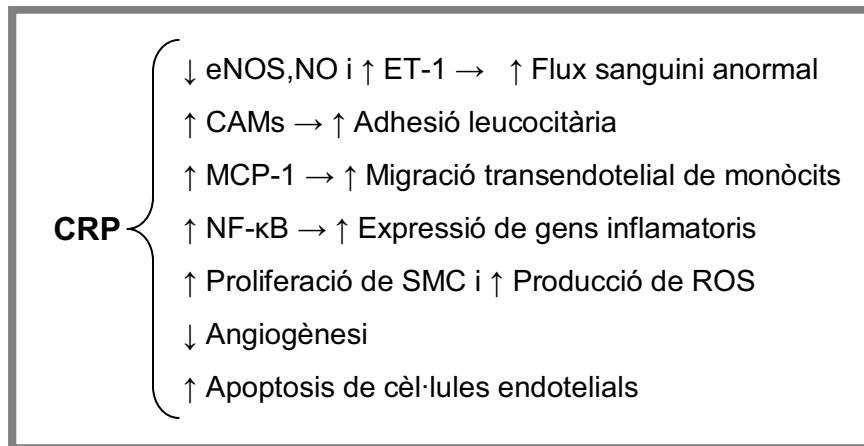


Figura 2. Funcions de CRP en la placa d'ateroma.

2.5.2. Molècules d'adhesió cel·lulars i solubles

Les molècules d'adhesió conjuntament amb les citosines són dos mecanismes pels quals les cèl·lules es comuniquen entre si per aconseguir una bona resposta immune en produir-se dany tissular i cal una funció coordinada entre elles perquè certes citosines indueixen i regulen l'expressió de les molècules d'adhesió.

Les molècules d'adhesió són receptors proteics de la superfície de la membrana cel·lular i es caracteritzen per tenir una estructura dividida en tres regions: extracel·lular, transmembranal i citoplasmàtica (**Figura 3**). Principalment, s'expressen en la superfície de leucòcits (monòcits i limfòcits T) i EC i poden realitzar interaccions adhesives entre cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular (Gimbrone et al., 1990; Dejana et al., 1994, Petruzzelli et al., 1999). Segons Krieglstein (2001) aquests receptors intervenen en diferents processos relacionats amb la malaltia vascular com són l'organogènesi, l'angiogènesi i el desenvolupament de la resposta immune e inflamatòria. Concretament, les molècules d'adhesió presents en l'endoteli i en leucòcits estan implicades en processos d'adhesió relacionats amb la primera fase del procés de formació de la placa d'ateroma. D'aquestes molècules, unes estan presents constitutivament però d'altres se sintetitzen de nou (algunes tenen síntesi constitutiva i altres induïda) en resposta a estímuls quimiotàctics i proinflamatoris. S'han descrit tres famílies de molècules d'adhesió que participen en les fases inicials (interacció leucòcit-endoteli, adhesió i extravasació leucocitària) del procés d'arteriosclerosi: selectines, integrines i superfamília d'immunoglobulines detallades a continuació (Jang et al., 1994; Crockett-Torabi, 1998; Petruzzelli et al., 1999; Alon i Feigelson, 2002; Pober, 2002).

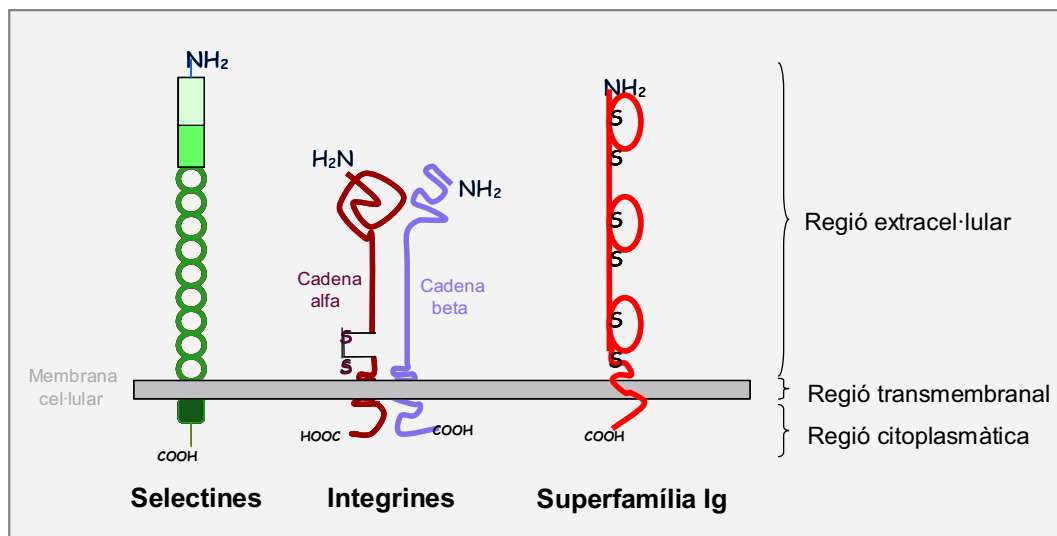


Figura 3. Estructura de les molècules d'adhesió.

Formes solubles d'aquestes molècules d'adhesió procedents de la superfície de l'endoteli activat s'han mesurat en plasma, tot i que els seus orígens no estan molt definits. La hipòtesi més factible seria que les molècules d'adhesió solubles procedeixen d'una escissió de la regió extracel·lular de la molècula d'adhesió de la superfície de la EC activada. Així, la regió extracel·lular de les molècules d'adhesió cel·lulars poden alliberar-se fàcilment al torrent sanguini un cop aquestes molècules han realitzat la seva funció (Gearing i Newman, 1993; Bevilacqua, et al., 1994).

En resum, l'expressió en la superfície cel·lular de molècules d'adhesió com a conseqüència d'estímuls fisiopatològics determina la interacció entre les cèl·lules sanguínies i l'endoteli vascular, aspecte fonamental per al desenvolupament de l'arteriosclerosi en totes les seves fases d'evolució.

2.5.2.1. Selectines

Les selectines són glicoproteïnes transmembranals, expressades en la superfície cel·lular, caracteritzades per tenir en la regió extracel·lular N-terminal: un domini lectina dependent de calci d'unió als lligands, un domini d'homologia al factor de creixement epidèrmic (EGF) i un domini amb tot un seguit de seqüències de repeticions consens (SCR) amb un nombre variable segons el tipus de selectina (**Figura 3**). A més, estan inserides a la membrana cel·lular mitjançant un domini transmembranal hidrofòbic que posseeix una petita cua citoplasmàtica. Els diferents membres de la família difereixen en el nombre de dominis SCR (Bevilacqua i Nelson., 1993; Jang et al., 1994). S'han

identificat tres membres diferents: L-selectina (la més petita), E-selectina i P-selectina (la més gran) s'expressen en tots els leucòcits, l'endoteli activat i en plaquetes/EC, respectivament com es pot observar en la **Taula 1** (Toborek i Kaiser, 1999). Al contrari que les L i P-selectines, la E-selectina no s'expressa constitutivament en les EC sinó que la seva síntesi està induïda per citosines (IL-1 α i TNF- α) i regulada pel factor transcripcional NF- κ B.

Les E i P-selectines mitjançant els dominis lectina s'uneixen principalment amb carbohidrats específics com l'àcid siàlic presents en les glicoproteïnes i glicolípid de la superfície dels leucòcits. A més, PSGL-1 (glicoproteïna lligand P-selectina 1) i L-selectina també són lligands de les E i P-selectines (Crockett-Torabi, 1998). Així, aquests carbohidrats com l'oligosacàrid Sialil Lewis x (SLe^x), PSGL-1 i L-selectina són els contrareceptors que s'uneixen al receptor E o P-selectina endotelial tenint lloc el procés de rodament de leucòcits per la superfície endotelial (Foxall et al., 1992). En canvi, L-selectina s'uneix a glicoproteïnes sulfatades (Sgp) endotelials (Lasky et al., 1992; Crockett-Torabi, 1998). Totes aquestes unions entre selectines i els contrareceptors corresponents són de baixa afinitat.

SELECTINES			
Nomenclatura	Expressió	Contrareceptor	Cèl·lula diana
L-selectina (CD62L)	Leucòcits	Sgp⁵⁰, Sgp⁹⁰, E i P-selectina	ECs activades, plaquetes i eosinòfils
E-selectina (CD62E)	ECs activades	SLe^x, PSGL-1, L-selectina i ESL-1	Neutròfils, monòcits i limfòcits
P-selectina (CD62P)	Plaquetes, ECs	SLe^x, PSGL-1 i L-selectina	Neutròfils i monòcits

Taula 1. Classificació i nomenclatura dels membres de la família de les selectines que intervenen en el procés d'adhesió transitòria entre leucòcit-endoteli.

En presència d'un focus d'inflamació o dany, les selectines intervenen en el primer pas per a l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli que consisteix en el reclutament i rodament dels leucòcits sobre la superfície endotelial (Patel et al., 2002). Els leucòcits circulants s'uneixen a les selectines expressades en la superfície de l'endoteli actiu i, tot i que, la unió és relativament baixa és suficient per disminuir el moviment i,

conseqüentment, facilitar el rodament dels leucòcits per la paret vascular. S'han realitzat estudis que demostren la presència de E i P-selectina en la superfície de les EC durant el desenvolupament de l'arteriosclerosi (Wood et al. 1993).

En resum, el paper principal de les selectines es facilitar la unió lleu i transitòria dels leucòcits a l'endoteli vascular donant pas als esdeveniments inicials per al desenvolupament de l'arteriosclerosi.

2.5.2.2. Integrines

Les integrines són una família de proteïnes transmembranals heterodimèriques composades per l'associació no covalent de les subunitats alfa (α) i beta (β) amb un rang de mida entre 120-170 kDa i 90-100 kDa, respectivament (Jang et al., 1994; **Figura 3**). A més, contenen llocs d'unió per cations divalents, com el magnesi i el calci, imprescindibles per la seva funció d'adhesió. La subunitat α involucrada en el reconeixement del lligand que continguin les seqüències RGD (arginina, glicina i aspartat) entre d'altres. Mentrestant, la subunitat β confereix l'especificitat de la integrina i en base a aquesta subunitat β es distingeixen tres subfamílies d'integrines: les $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$ (Springer, 1994). En destaquem els membres LFA-1 (antigen associat a funció leucocitària-1) i Mac-1 de la subfamília $\beta 2$ i VLA-4 (antigen d'activació tardana-4) de la subfamília $\beta 1$ perquè són les integrines de la superfície leucocitària implicades en l'adhesió ferma (**Taula 2**). No obstant, els membres de la $\beta 3$ no intervenen en el procés d'adhesió sinó de proliferació cel·lular. Totes les integrines tenen varies conformacions segons el grau d'activació cel·lular, és a dir, en estat inactiu estan presents en la superfície cel·lular amb una conformació de baixa avidesa pels seus lligands mentre que en estat actiu presenten una conformació d'elevada avidesa pels seus lligands (Hughes i Pfaff, 1998). La superfamília de les immunoglobulines són els contrareceptors endotelials de les integrines (**Taula 3**) (Crockett-Torabi, 1998).

Les integrines tenen la funció d'unir les cèl·lules amb els lligands d'altres cèl·lules com les EC i, també, amb les proteïnes de la matriu extracel·lular de la membrana basal. Aquestes integrines són fonamentals per a la segona (rodament) i tercera (adhesió ferma) fase de l'adherència dels leucòcits a l'endoteli vascular. Durant la fase de rodament, les quimiosines són el detonant de l'activació de les integrines leucocitàries (LFA-1, Mac-1 i VLA-4) perquè provoquen els canvis conformacionals que afavoreixen el pas d'unions transitòries a unions d'alta afinitat amb els lligands

endotelials. En conseqüència, finalitza la fase de rodament i s'inicia l'adhesió ferma entre aquests leucòcits activats i l'endoteli vascular a partir de la unió d'elevada avidesa entre les integrines leucocitàries i els contrareceptors endotelials (Alon i Feigelson, 2002).

INTEGRINES					
Subfamília	Heterodímer	Nomenclatura	Expressió	Iligand	Cèl·lula diana
beta 1	$\alpha_4\beta_1$	VLA-4 Cd49d/CD29	monòcits limfòcits, fibroblasts	VCAM-1	Monòcits, macròfags, ECs i epitelials
beta 2	$\alpha_L\beta_2$	LFA-1 o CD11a/CD18	Limfòcits Monòcits i granulòcits	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	ECs
	$\alpha_M\beta_2$	Mac-1 o CD11b/CD18	Macròfags, monòcits neutròfils,	ICAM-1,	ECs

Taula 2. Classificació i nomenclatura dels membres de la família de les integrines que intervenen en el procés d'adhesió ferma leucòcit-endoteli.

En resum, les integrines intervenen en les interaccions d'elevada avidesa amb els lligands endotelials derivant-se en una adhesió ferma entre leucòcit i endoteli. Per tant, les integrines són responsables de la consolidació i de l'estabilització de l'adhesió leucocitària a l'endoteli vascular sent el pas clau per produir la diapedesi i transmigració dels leucòcits a l'espai subendotelial i continuar, així, amb la progressió de la formació de la placa d'ateroma.

2.5.2.3. Superfamília de les Immunoglobulines

La superfamília d'immunoglobulines (Ig) anomenades així perquè els seus membres tenen característiques estructurals similars a les immunoglobulines. Tots els membres contenen com a mínim un domini Ig, el qual està format per dues cadenes β plegades i unides entre elles per un pont disulfur (**Figura 3**). El domini Ig va seguit

d'una regió transmembranal acompanyada d'una petita cua citoplasmàtica (Jang et al., 1994).

L'endoteli vascular expressa molècules d'adhesió de la superfamília de les Ig les quals actuen generalment com a contrareceptors de les integrines leucocitàries. Els diversos membres es distingeixen entre ells pel nombre de dominis Ig extracel·lulars (Lee i Benveniste, 1999; Petruzzelli et al., 1999). En la **Taula 3** es representa només ICAM-1 (molècula d'adhesió intercel·lular-1) i VCAM-1 (molècula d'adhesió de cèl·lula vascular-1) perquè al unir-se a les integrines es consideren els dos membres més importants en la cascada d'adhesió ferma dels leucòcits a l'endoteli (ICAM-2 e ICAM-3 són isoformes de ICAM-1). En canvi, PECAM-1 o molècula d'adhesió de EC i plaquetes, que s'uneix a sí mateix, està més relacionada amb el manteniment de la integritat de la barrera endotelial i l'extravasació de les cèl·lules sanguínies (Muller et al., 1993).

SUPERFAMÍLIA IMMUNOGLOBULINES			
Nomenclatura	Expressió	Lligand	Cèl·lula diana
ICAM-1 (CD54)	ECs, leucòcits i fibroblasts	LFA-1 Mac-1	Leucòcits
VCAM (CD106)	ECs, macròfags i mioblasts	VLA-4	Monòcits i limfòcits

Taula 3. Classificació i nomenclatura dels principals membres de la superfamília de les Ig que intervenen en el procés d'adhesió ferma leucòcit-endoteli.

En l'endoteli activat, VCAM-1 té una expressió induïda per citosines mentre que ICAM-1 s'expressa constitutivament (Lafrenie et al., 1993). ICAM-1 conté 5 dominis Ig i és un dels principals contrareceptors de les integrines $\beta 2$ leucocitàries: LFA-1 i Mac-1, tot i que, sembla ser que LFA-1 predomina en la unió amb ICAM-1 per sobre de Mac-1. Mentre que VCAM-1 amb 7 dominis Ig s'uneix al contrareceptor leucocitari VLA-4 (Jang et al., 1994).

En resum, la superfamília de les Ig conjuntament amb les integrines i selectines són les molècules d'adhesió que intervenen en l'adhesió i transmigració dels leucòcits

a l'endoteli vascular sent de vital rellevància en la patogènia de les malalties vasculars e inflamatòries com l'arteriosclerosi.

2.5.3. Citosines

Les citosines constitueixen una xarxa complexa de mediadors proteics petits (15-30 kDa) que posseeixen una vida mitja molt curta i actuen sobre les cèl·lules a concentracions molt baixes, de l'ordre de picograms, a través de la unió amb receptors d'elevada afinitat presents en la superfície cel·lular. En general, no es detecta una producció constitutiva significativa de citosines sinó que cal una activació cel·lular per a la síntesis de noves citosines a una concentració biològicament efectiva. Majoritàriament, estan produïdes per leucòcits i són secretades a l'espai extracel·lular, tot i que, algunes poden acumular-se dins la cèl·lula o inserides a la membrana o bé a la matriu extracel·lular. Les citosines representen el vocabulari del sistema de comunicació entre les cèl·lules implicades en la reacció inflamatòria on la paret vascular, el fetge, la medul·la òssia i el sistema nerviós central són alguns dels teixits diana (Olsson, 1993). Aquesta comunicació pot esdevenir a curta distància entre receptors de la pròpia cèl·lula productora (efecte autocrí) o a moderada distància actuant sobre cèl·lules veïnes (efecte paracrí) o bé actuen a llarga distància en altres òrgans o teixits a través de la circulació sanguínia o limfàtica (efecte endocrí). Una de les característiques funcionals és el pleiotropisme, és a dir, una mateixa citosina és capaç d'exercir diferents efectes biològics sobre múltiples tipus cel·lulars. Les citosines actuen mitjançant una xarxa funcional on l'efecte d'una citosina està estretament regulada, positivament o negativament, per una altra citosina i, per tant, poden actuar sinèrgicament o antagònicament entre elles. Així, les citosines interactuen amb certa complexitat i representen un sistema de comunicació sofisticat i versàtil sent essencial per l'efecte biològic en la resposta immune. No obstant, les citosines també intervenen en altres processos cel·lulars com la mitosi, diferenciació i migració.

Les citosines produïdes en la resposta immune innata s'alliberen immediatament després del contacte de les cèl·lules implicades en la resposta immune amb l'agent estrany, per tant, les citosines acompanyades de les molècules d'adhesió són els mediadors primaris de la resposta inflamatòria enfront el dany tissular (Gosain i Gamelli, 2005). Els monòcits i els macròfags activats són la principal font d'aquestes citosines, no obstant, també poden ser produïdes per limfòcits activats o per altres cèl·lules alienes al sistema immune com les EC. De totes elles cal destacar les

citosines amb propietats proinflamatòries relacionades amb la formació de la placa d'ateroma:

- IL-1 produïda fonamentalment per monòcits i macròfags però també per altres tipus cel·lulars com EC i dendrítiques. Existeixen dues formes IL-1 α i IL-1 β que comparteixen el mateix receptor i exerceixen efectes biològics similars tot i que la seva homologia només és d'un 25%. Part dels seus efectes proinflammatoris es deuen a que indueix l'alliberació d'histamina en els mastòcits generant vasodilatació i augment de la permeabilitat vascular en el focus d'inflamació. També promou la síntesi de proteïnes de fase aguda per part dels hepatòcits.
- IL-6 on els monòcits, macròfags, EC, limfòcits T entre d'altres són les cèl·lules productores. Conjuntament amb la IL-1 és la principal inductora de la síntesi de proteïnes de fase aguda, sobretot, del fibrinogen i CRP. A més, d'aquest efecte en la inflamació, s'ha observat que indueix la producció de Ig en promoure la diferenciació dels limfòcits B.
- TNF- α es sintetitzat en resposta als antígens bacterians majoritàriament per monòcits i macròfags. Principalment, les seves funcions són un potent mediador paracrí i endocrí de la inflamació i del sistema immune amb la inducció de l'expressió de molècules d'adhesió contribuint a la extravasació dels leucòcits. A més, regula el creixement i la diferenciació de una gran varietat de tipus cel·lulars.

L'expressió d'aquestes citosines està regulada per NF- κ B, a la vegada, aquestes citosines sintetitzades poden estimular l'activació d'aquest factor de transcripció, per tant, s'obté un feedback positiu (de Martin et al., 2000).

2.5.4. Quimiosines

Les quimiosines són un tipus de citosines amb propietats quimioatracients que indueixen a les cèl·lules com els leucòcits, mitjançant els receptors apropiats, a migrar en direcció al focus inflamatori. Totes les quimiosines amb una mida compresa entre 8-14kDa estan estructuralment relacionades i es caracteritzen per la presència de cisteïnes unides per pont disulfur. Els seus receptors són proteïnes amb 7 dominis transmembranals.

En referència a la funció inflamatòria, les quimiosines són produïdes per múltiples cèl·lules com monòcits, macròfags, limfòcits, neutròfils i EC en resposta a senyals de

perill com una infecció bacteriana, virus o dany tissular i la seva secreció pot estar regulada per citosines proinflamàtories (IL-1, TNF- α o IFN- γ). Aquest gradient de quimiosines té com a funció principal atraure les cèl·lules efectores sanguínies com els leucòcits (monòcits, limfòcits) cap al teixit afectat. És a dir, durant la interacció leucòcits-endoteli, hi ha un increment en la producció de quimiosines les quals detonen l'activació d'integrines iniciant-se el canvi de rodament lent amb unions transitòries cap a l'adhesió ferma d'alta afinitat entre leucòcits i l'endoteli (Laudanna et al., 2002) amb la consegüent extravasació de monòcits i limfòcits T dins la paret vascular i reclutament de nous leucòcits al focus d'inflamació. Així, les quimiosines es poden considerar uns potents mediadors de la migració i activació cel·lular tenint un paper clau en fases inicials de la resposta inflamatòria (Lukacs et al., 1995; Gerszten et al., 1999). Tanmateix, les quimiosines poden realitzar altres funcions com cooperar en l'activació cel·lular i en l'angiogènesi.

Entre totes elles destaquem el MCP-1 (CCL2) i IL-8 (CXCL8) presents en la placa d'ateroma (Terkeltaub et al., 1998). MCP-1 és un potent quimioatracent de monòcits mentre que IL-8 n'és de neutròfils. Aquestes quimiosines estan produïdes per les EC via NF- κ B (de Martin et al., 2000), no obstant, MCP-1 també es detecta en macròfags i SMC presents en la placa d'ateroma (Yla-Herttuala et al., 1991).

2.5.5. Sistema immunomodulador CD40/CD40L

El sistema immunomodulador CD40/CD40L està implicat en la fisiopatologia de diverses malalties inflamatòries cròniques com l'arteriosclerosi (Phipps 2000; Schönbeck i Libby, 2001; Lutgens i Daemen, 2002; Szmítko et al., 2003). El lligand CD40L (39 kDa, membre de la família TNF) i el seu receptor CD40 (50 kDa, proteïna de membrana de la família dels receptors de TNF) s'expressen conjuntament en ECs, SMCs, limfòcits T, macròfags i plaquetes implicats tots ells en el procés arterioscleròtic (Schönbeck i Libby, 2001). El CD40L actua en una forma soluble, la qual és plenament activa biològicament (sCD40L) (Graf et al., 1995). Estudis immunohistoquímics en humans revelen la presència de CD40L i CD40 en les diferents fases de l'arteriosclerosi, incloent la iniciació i progressió de la lesió arterioscleròtica així com també en les possibles complicacions trombòtiques posteriors (Breummer et al., 2001). Quan el sCD40L s'uneix al seu receptor CD40 situat en la superfície de les ECs o de SMCs s'indueix l'expressió de molècules d'adhesió com E-selectina, VCAM-1 i ICAM-1 promovent el reclutament leucocitari en la zona de lesió arterioscleròtica. Alhora,

CD40L indueix la secreció de citosines i quimiosines (IL-6, TNF- α i MCP-1) per part de les cèl·lules implicades en la formació de placa d'ateroma, tenint com a resultat un reclutament constant de leucòcits. Per tant, el sistema de senyalització proinflamatori CD40/CD40L desencadena l'activació de molècules d'adhesió cel·lular i secreció de citosines i quimiosines proinflamatòries promovent el reclutament leucocitari i la perpetuació de la resposta inflamatòria en la zona on s'inicia la lesió arterioscleròtica. A més, els macròfags i els limfòcits T també expressen CD40 i CD40L els quals activaran més ECs i SMCs permetent la progressió de la lesió en reforçar la reacció inflamatòria. Es pensa que les LDLox podrien ser els detonants de l'expressió de CD40/CD40L en la placa d'ateroma (Schönbeck et al., 2002).

En estudis previs realitzats en animals i en humans s'observa una interrupció de la senyalització de CD40/CD40L provocant una disminució significativa de la formació i la progressió de la lesió arterioscleròtica (Schönbeck et al., 2000; Lutgens et al., 2000). A més, estudis amb dones sanes demostren que concentracions elevades de CD40L es poden correlacionar amb un increment de risc vascular amb la qual cosa es podria considerar com un marcador d'arteriosclerosi (Schönbeck, et al., 2001).

2.6. Expressió de molècules inflamatòries regulada per NF- κ B

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) correspon a una família de factors de transcripció implicat en la transmissió de senyals del citoplasma al nucli de nombrosos tipus cel·lulars, el qual juga un paper essencial en l'expressió d'una àmplia varietat de gens implicats en la patogènesis de diverses malalties com l'arteriosclerosi i el càncer (Yamamoto i Gaynor, 2001). En mamífers, s'han descrit 5 membres que formen part de la família NF- κ B/Rel: Rel A (p65), Rel B, p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2) i c-Rel (Ghosh et al., 1998).

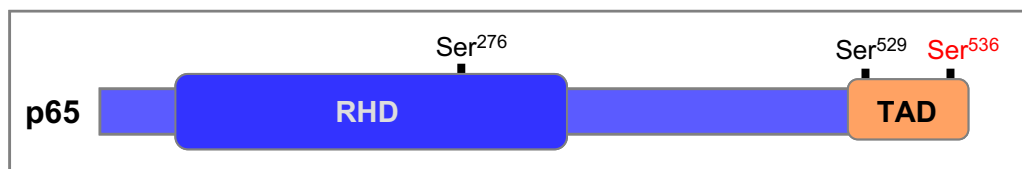


Figura 4. Estructura de la subunitat p65 del NF- κ B.

La família NF- κ B es caracteritza per tenir en la regió N-terminal un domini d'homologia Rel (RHD) conservat el qual conté el domini de dimerització, senyal de localització nuclear (NLS) i el lloc d'unió al DNA (àcid desoxiribonucleic). A més, p65,

RelB i c-Rel contenen el domini de transactivació (TAD) en la regió C-terminal (Li i Verma, 2002; **Figura 4**). El NF- κ B s'expressa en forma d'homodimers o heterodimers però en la gran majoria dels tipus cel·lulars s'expressa en forma d'heterodímer p65/p50.

En condicions basals de la cèl·lula, NF- κ B està retintut en el citoplasma en forma inactiva mitjançant la unió amb proteïnes inhibidores anomenades I κ B (Kutuk i Basaga, 2003; **Figura 5**). Aquesta família I κ B, principalment I κ B α , es caracteritza per la presència de moltes repeticions d'anquirina implicades en la interacció proteïna-proteïna (Li i Verma, 2002). En presència d'una àmplia varietat d'estímuls, l'inhibidor I κ B es fosforilat per les cinases IKK, ubiquitinitzat i degradat via proteasoma provocant la separació i activació del NF- κ B (Sakurai et al., 1999; Yamamoto i Gaynor, 2004). Aquesta activació de NF- κ B pot esdevenir-se mitjançant la fosforilació de la subunitat p65-NF- κ B (P-p65) en els residus de serina destacant, sobretot, la fosforilació de la serina 536 (**Figura 4**).

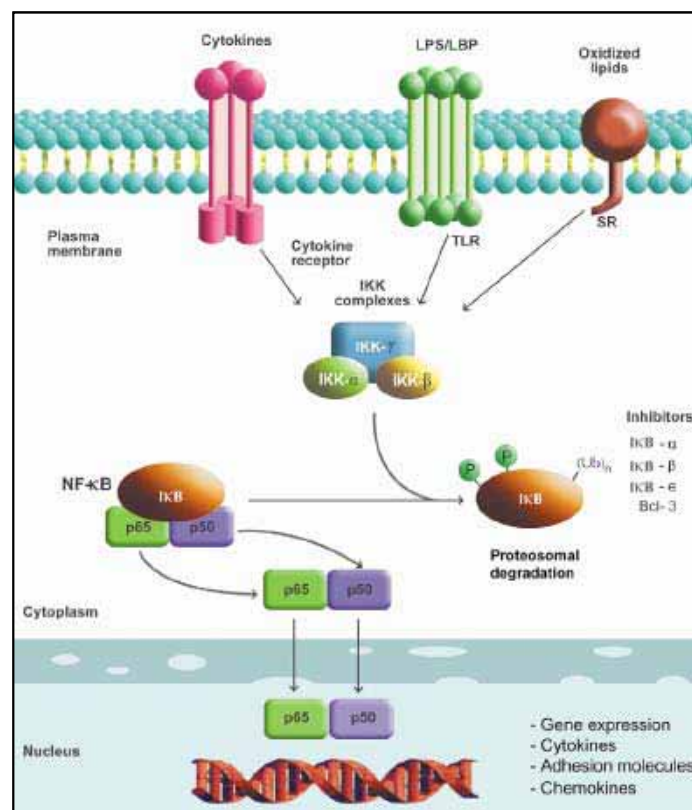


Figura 5. Via de senyalització del NF- κ B
(Adaptat de Kutuk i Basaga, 2003).

NF- κ B en separar-se del I κ B queda desemmascarat el NLS permetent la translocació del citoplasma al nucli, unió al DNA i l'activació de la transcripció gènica. Per tant, NF- κ B indueix l'expressió d'un gran nombre de gens entre els quals s'engloben les molècules d'adhesió, les citosines i les quimiosines implicats amb la resposta inflamatòria del procés arterioscleròtic (de Martin et al., 2000) (**Taula 4**).

Gens expressats	Exemples
Molècules d'adhesió	VCAM-1, ICAM-1, E-selectina
Citosines	TNF-α, IL-1, IL-6
Quimiosines	MCP-1, IL-8
Proteïnes procoagulants	TF, PAI-1
Enzims	Lipooxigenasa, COX-2, iNOS

Taula 4. Principals gens regulats per NF- κ B.

El NF- κ B activat està present en EC, monòcits/macròfags i SMC que intervenen en la lesió arterioscleròtica (Kutuk i Basaga, 2003; de Winther et al., 2005). En els vasos sans també es detecta el NF- κ B en les mateixes cèl·lules però està inactivat. Llavors, a diferència d'altres factors de transcripció, l'activació de NF- κ B no requereix d'una prèvia inducció de la seva expressió.

Algunes citosines (TNF- α , IL-1), LDLox, radiacions ultraviolades, infecció vírica o bacteriana (LPS) són els estímuls que indueixen l'activació del NF- κ B (Kutuk i Basaga, 2003), mentre que d'altres com els antioxidants (Schreck et al., 1992), glucocorticoides, estatines (Bustos et al., 1998) i begudes alcohòliques amb contingut polifenòlic (Blanco-Colio et al., 2000 i 2007) inhibeixen la seva activació. En l'estudi de Weber et al. (1994), els antioxidants inhibeixen l'adhesió monocitària en suprimir l'activació del NF- κ B que regula l'expressió de molècules d'adhesió endotelials en cèl·lules amb una exposició a reaccions d'oxidació (peròxid d'hidrogen, anió superòxid). Aquestes troballes suggereixen que els antioxidants podrien exercir un efecte antiinflamatori en modificar l'expressió de les molècules d'adhesió endotelials d'unió a monòcits per regulació negativa del NF- κ B. Per tant, l'activació del NF- κ B pot estar inhibida per l'efecte produït pels antioxidants i, també, per NO però difereixen entre ells en el mecanisme d'acció pel qual el NF- κ B és inactivat (Spiecker et al., 1998).

En l'actualitat, els factors de transcripció són una bona diana terapèutica ja que, normalment, s'expressen en diferents tipus cel·lulars i regulen un gran nombre de gens. Concretament, el NF- κ B genera molta expectació sent un factor important d'investigació

degut a que regula gens implicats en el control de la resposta inflamatòria que té lloc en el desenvolupament arterioscleròtic (de Winther et al., 2005). Per tant, l'obtenció de tractaments terapèutics enfront el NF-κB potenciarà un efecte anti-aterogènic. A més, de generar fàrmacs que tinguin com a diana el NF-κB, com podrien ser els inhibidors de l'activació de NF-κB, s'està estudiant la possibilitat de fer nutrigenòmica, és a dir, usar nutrients com a reguladors de l'expressió gènica. Un exemple podria ser l'ús de flavonoides com a reguladors de NF-κB evitant l'expressió de gens inflamatoris. Els polifenols procedents de la dieta (flavonoides) modulen processos de senyalització cel·lular com la inflamació mitjançant la regulació de NF-κB (Rahman et al., 2006).

2.7. Disfunció endotelial - interaccions entre leucòcit i endoteli vascular

L'endoteli vascular juga un paper clau en preservar l'estructura i funció normal del vas arterial. En condicions fisiològiques, l'endoteli vascular té un potencial antitrombòtic i no es produeixen infiltracions de leucòcits cap a l'interior de la paret vascular. Però aquest endoteli arterial canvia ràpidament en resposta a estímuls específics (infeccions per microorganismes, LDLox, tabaquisme, hipertensió, diabetis, hiperhomocisteïnèmia) els quals serien la causa de la disfunció endotelial (Ross, 1999). La disfunció endotelial, alteració de la fisiologia de la paret de l'endoteli vascular que produeix un desequilibri de la funcionalitat, està associada a diverses manifestacions clíniques de la patologia de l'arteriosclerosi com la insuficiència cardíaca, per tant, l'endoteli es un objectiu estratègic per al tractament de malalties cardiovasculars.

En l'arteriosclerosi, la disfunció de l'endoteli vascular lidera el reclutament de leucòcits amb un increment de l'adhesió leucocitària així com també una disminució de la producció de NO (Cybulsky i Gimbrone, 1991). La interacció entre els leucòcits i l'endoteli està regulada per l'expressió de molècules d'adhesió i producció de citosines proinflamatòries, els quals juguen un paper crític en el manteniment del procés inflamatori afavorint el desenvolupament del procés arterioscleròtic (veure **apartat 2.5**). Aquesta interacció entre leucòcit i endoteli, via receptors específics, podrien proporcionar senyals intracel·lulars que activarien la extravasació dels leucòcits des de la llum del vas cap al focus d'inflamació mitjançant unions específiques. Per tant, el procés arterioscleròtic s'inicia amb una disfunció endotelial on s'altera la funció i estructura de l'endoteli vascular, caracteritzada per la interacció leucòcit amb l'endoteli vascular promoguda per molècules d'adhesió. Aquesta fase inicial de la inflamació

cursa en silenci (asimptomàtica) perllongada en el temps. La interacció leucòcit-endoteli succeeix en varies fases (Price i Loscalzo, 1999; Alon i Feigelson, 2002; Laudanna et al., 2002; **Figura 6**):

- Reclutament i rodament lent. El reclutament leucocitari des del vas sanguini cap als teixits circumdants es el pas clau per a l'inici del procés inflamatori. El reclutament de leucòcits fa referència al procés en el qual els leucòcits s'adhereixen transitòriament a l'endoteli vascular mitjançant quimioatracients de la superfície endotelial. Aquestes unions transitòries, reversibles, dèbils i de baixa afinitat es desencadenen en interaccionar les selectines endotelials (principalment E i P-selectina) amb els contrareceptors leucocitaris. Aquesta adhesió transitòria és suficient per disminuir el moviment dels leucòcits i, conseqüentment, facilitar el rodament lent d'aquests leucòcits per sobre la superfície endotelial com a resultat d'una pèrdua relativa d'adherència dels leucòcits a l'endoteli (rodament per contacte de baixa afinitat). Aquest rodament lent sembla ser la causa del canvi conformacional que pateixen les integrines leucocitàries, les quals s'activen i provoquen un increment de l'afinitat d'aquestes integrines amb els lligands endotelials corresponents.
- Activació fa referència a l'increment de l'habilitat de les cèl·lules per interaccionar amb els lligands extracel·lulars d'altres cèl·lules mitjançant quimioatracients de la superfície endotelial. Els quimioatracients de la superfície endotelial, principalment MCP-1, generen l'activació progressiva dels leucòcits consistent en l'expressió d'integrines que facilita la seva adherència a les cèl·lules endotelials. Aquesta activació d'integrines per senyals de transducció induïts per quimiosines succeeix molt ràpid. Simultàniament, les cèl·lules endotelials comencen a expressar en la seva superfície molècules d'adhesió pertanyent a la superfamília de Ig permetent una unió més ferma amb els leucòcits i la seva activació pot estar induïda per diverses molècules proinflamatòries com citosines, LPS i fosfolípids oxidats.
- Adhesió ferma. L'augment de l'afinitat de les integrines leucocitàries per a els lligands endotelials (superfamília de Ig) desencadena una adhesió ferma entre leucòcit-endoteli, és a dir, consolidació i estabilització dels leucòcits a la superfície de l'endoteli després d'un curt període de rodament. Per tant, s'origina un augment de la adhesió leucocitària per activació d'integrines i senyalització de quimiosines.

- **Transmigració**, fase final que acompanya a l'adhesió ferma. Degut a la permeabilitat endotelial que esdevé en l'etapa inicial de l'arteriosclerosi, es produeix la transvasació dels leucòcits des de la llum del vas cap a capa intima de endoteli a través de l'espai format entre les unions interendotelials.

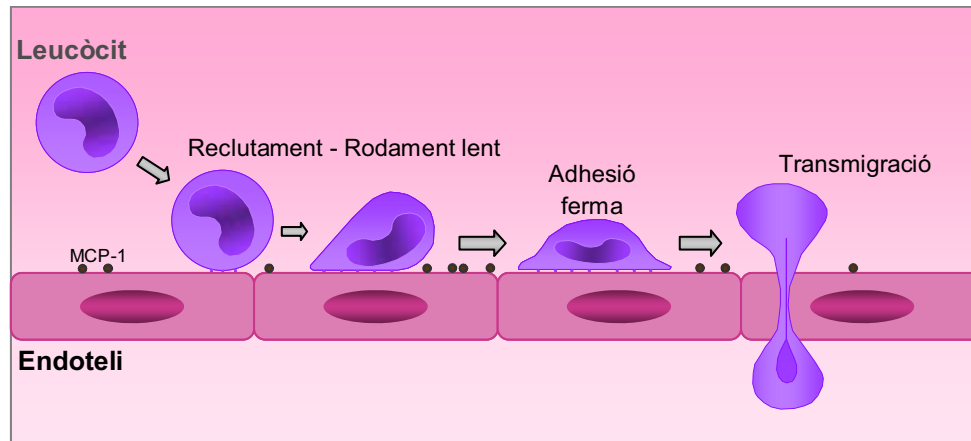


Figura 6. Fases de la interacció leucòcit-endoteli.

2.8. Factors de risc cardiovascular clàssics

La funció endotelial és el balanç entre els elements protectors vasculars i els factors de risc. Si la balança es decanta a favor dels factors de risc cardiovascular tradicionals es promou l'arteriosclerosi perquè aquests factors causen disfunció endotelial, dany cel·lular i ambient proinflamatori que es tradueix en (Altman, 2003; Bonnetti et al., 2003):

- Increment de l'expressió de molècules d'adhesió.
- Increment de leucòcits.
- Increment de marcadors d'inflamació.
- Disminució de NO.
- Increment d'endotelina.

La **Taula 5** mostra les diferents categories i propietats dels factors de risc cardiovascular clàssics més importants (Fruchart et al., 2004).

FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR CLÀSSICS		
Controlables	Hipercolesterolèmia	LDL > 160 mg/dL HDL < 40 mg/dL
	Hipertensió	BP ≥ 140/90 mmHg
	Diabetis Mellitus	*Gluc > 6.7 mmol/L
	Obesitat	BMI ≥ 30
	Tabaquisme	> 1 Cigarreta/dia
	Hiperhomocisteïnèmia	> 15 mmol/L
No controlables	Sexe	Homes > Dones
	Edat	Homes ≥ 45 anys Dones ≥ 55 anys
	Antecedents familiars	CHD prematura

Taula 5. Factors de risc cardiovascular clàssics.

*Gluc, nivells de glucosa en dejú.

2.8.1. Hipercolesterolèmia

Diversos estudis epidemiològics i prospectius posen de manifest que baixes concentracions plasmàtiques de HDL-colesterol estan relacionades amb un major risc de patir un esdeveniment coronari agut (Gordon i Rifkind, 1989). Estudis relacionats amb modificacions genètiques i desordres del metabolisme de les HDL realitzats en models animals i en pacients han demostrat una relació causal entre nivells baixos de HDL i desenvolupament de l'arteriosclerosi vascular. L'acció ateroprotectora de les HDL s'explica per l'habilitat que tenen aquestes lipoproteïnes d'eliminar el colesterol que circula per la paret arterial i transportar-lo cap al fetge per obtenir la secreció de sals biliars que són molt importants per processos digestius, sobretot, de greixos.

Cal remarcar les xifres obtingudes en diferents estudis al llarg de les darreres dècades on es posa de manifest que la hipercolesterolèmia pot induir a l'oxidació de les LDL en l'endoteli vascular donant lloc a disfunció endotelial, conseqüentment, la hipercolesterolèmia és considerada un factor important en la formació de la placa d'ateroma on les LDLox són un estímul aterogènic clau (Ross, 1993). Aquestes LDLox

alteren totes les etapes de la fase de reclutament leucocitari i un dels possibles mecanismes és per inducció de l'expressió de molècules d'adhesió com P-selectina, VCAM-1 i ICAM-1 (Lehr et al., 1991; McEver, 1992).

S'ha observat que individus joves poden presentar correlacions entre les concentracions sèriques de molècules d'adhesió endotelials i colesterol. Per reduir les xifres de colesterol sèric es fa un tractament amb estatines amb el qual també es reduirien les xifres de molècules d'adhesió. Però aquests possibles efectes antiinflamatoris de les estatines només està demostrat en alguns estudis (Rausch et al., 2000).

2.8.2. Hipertensió arterial

La hipertensió és un factor de risc important. El sistema de renina-angiotensina amb la conseqüent alteració de la pressió sanguínia contribueix a la patogènesis de l'arteriosclerosi. Concretament, l'angiotensina II activa la inflamació via regulació del NF- κ B en cèl·lules monocitàries que es reflexa en una major expressió de citosines (Kranzhofer et al., 1999). Per tant, un tractament amb inhibidors que tinguin com a diana d'acció l'enzim convertidor d'angiotensina, permetria interrompre la inflamació i disminuir el risc cardiovascular (Libby, 2002).

La hipertensió arterial també té altres accions proinflamatòries com l'augment de la formació de radicals lliures els quals redueixen la formació de NO endotelial produint-se un augment de l'adhesió leucocitària. Així, la hipertensió desencadena una alteració de l'expressió de ICAM-1 incrementant l'adhesió monocitària, això suggereix que cèl·lules endotelials exposades a hipertensió arterial crònica podria incrementar substancialment l'adhesió leucocitària (Komatsu et al., 1997).

2.8.3. Diabetis Mellitus

Diabetis Mellitus és un desordre metabòlic que pot derivar en malaltia vascular (Deedwania, 2003). La presència de diabetis tipus 2, variant més freqüent trobada en la fase de disfunció endotelial, és indicatiu d'un increment en la coagulabilitat plasmàtica (Mooradian, 2003). La hiperglucèmia promou l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli mitjançant la desregulació de l'expressió de molècules d'adhesió i aquest procés és dependent de l'activació del NF- κ B, conseqüentment, la hiperglucèmia

indueix una disfunció de l'endoteli vascular (Morigi et al., 1998). A més, s'ha vist que cèl·lules diabètiques presenten un increment en la producció de peroxidació lipídica donant lloc a estrès oxidatiu que lidera un increment en la migració transendotelial de monòcits, no obstant, aquest efecte podria bloquejar-se per la presència d'antioxidants (Rattan et al., 1997). D'altra banda, el grau de resistència a la insulina es correlaciona significativament amb les concentracions de E-selectina, ICAM-1 i VCAM-1 fet que incrementaria la predisposició a patir una malaltia coronària per activació de les molècules d'adhesió cel·lulars (Chen et al., 1999).

2.8.4. Obesitat

Nombrosos estudis han determinat una relació lineal entre obesitat i malaltia cardiovascular (Kim et al., 2000). L'obesitat, caracteritzada per un excés de teixit adipós, genera un estat proinflamatori que incrementa la predisposició de patir un síndrome coronari agut. Aquest estat proinflamatori es caracteritza per un augment en les concentracions sèriques de CRP indicant, en aquest cas, una elevada concentració de citosines inflamatòries secretades pel teixit adipós (Visser et al., 1999). Llavors, el control del pes és un aspecte important a tenir en compte degut a que s'ha observat que en dones obesas que han patit una pèrdua de pes s'associa a una reducció en els nivells sèrics de CRP (Tchernof et al., 2002). A més, un excés de teixit adipós provoca un increment en la concentració de l'inhibidor dels activadors de plasminogen (PAI-1) que es tradueix en un desequilibri de la balança a favor del sistema trombòtic en retraïment del sistema fibrinolític (Grundy, 2002).

2.8.5. Tabaquisme

Existeix una relació lineal entre fumar i risc de malaltia cardiovascular (CVD) independentment del número de cigarretes fumades al dia (Hasdai et al., 1997). Llavors, fumar tabac és un altre factor de risc de patir arteriosclerosi produint-se una declinació en la resposta vasomotora de l'endoteli (Pepine et al., 1998). Això provoca disfunció endotelial possiblement mitjançant diversos mecanismes:

- Increment de l'estrès oxidatiu per increment de l'oxidació de les LDL (Powell, 1998).

- Reducció en la producció de NO. Mazzone et al. (2001) van observar que en individus fumadors es produeix una reducció en els metabolits de NO i un increment significatiu en la concentració de sICAM-1 i sVCAM-1.
- Alteracions en les cèl·lules endotelials. Fumar cigarretes incrementa la adhesió dels leucòcits a l'endoteli perquè induïx l'expressió de les molècules d'adhesió en l'endoteli i afavoreix l'increment de la migració transendotelial a través de la fosforilació de PECAM-1 (Shen et al., 1996).

L'oxidasa xantina, produïda per l'acció de fumar cigarretes, podria contribuir de manera clau en aquesta disfunció endotelial (Guthikonda et al., 2003).

2.8.6. Hiperhomocisteïnèmia

L'homocisteïna s'obté a partir de la dimetilació de la metionina. Aquelles alteracions en el metabolisme de l'homocisteïna en els quals s'obtenen nivells elevats d'homocisteïna estan relacionats amb risc de patir malaltia vascular coronària, cerebral o perifèrica. Nivells elevats d'homocisteïna plasmàtica són indicatius de risc de patir arteriosclerosi.

En un article de revisió de Welch i Loscalzo (1998) es detalla que la hiperhomocisteïnèmia causa una disfunció endotelial seguida d'una activació de plaquetes i formació d'un trombus. L'homocisteïna podria exercir els seus efectes mitjançant dany oxidatiu a través del mecanisme de disminució de la biodisponibilitat del NO per potenciació de la seva inactivació (Loscalzo, 1996). A més, l'homocisteïna activa el factor de transcripció NF-κB en les SMC i, en conseqüència, contribueix a l'efecte proliferatiu en la paret vascular a través d'aquest mecanisme que implica estrès oxidatiu (Bellas et al., 1995).

2.9. Marcadors d'inflamació com a predictors d'arteriosclerosi

Tot i que es disposen d'eines terapèutiques preventives, CVD segueix liderant les causes de morbo-mortalitat. Però només amb factors de risc clàssics, se'n prediuen menys del 50% del total dels possibles esdeveniments cardiovasculars futurs. Cal la utilització d'altres factors de risc (emergents) per identificar l'arteriosclerosi subclínica i, per tant, predir amb més precisió esdeveniments cardiovasculars futurs. Per tant, la

determinació de risc global de patir CVD mitjançant la detecció combinada de factors de risc clàssics amb factors de risc no clàssics incrementaria les possibilitats de detectar individus amb risc cardiovascular i, en conseqüència, optimitzar i agilitar el diagnòstic i la prevenció de CVD com l'arteriosclerosi.

En els darrers anys han emergit nous candidats a ser marcadors de risc cardiovascular no clàssics, és a dir, individus amb concentracions elevades d'aquests biomarcadors tenen un major risc de patir un esdeveniment vascular com l'infart de miocardi (Ridker et al. 2001). La **Taula 6** mostra els possibles nous factors de risc cardiovascular que es considerarien com a biomarcadors predictors de malaltia arteriotrombòtica molt important per a detectar la presència d'arteriosclerosi subclínica (Lahoz i Mostaza, 2007):

Factors de risc cardiovascular no clàssics	
Marcadors Coagulació	Fibrinogen PAI-1 Trombina
Marcadors Inflamació	Molècules adhesió Citosines CRP CD40L MMPs
Altres	Lp (a)

Taula 6. Factors de risc cardiovascular no clàssics.

Clínicament, alguns d'aquests factors són encara una promesa però no un fet degut a que no compleixen totes les característiques de biomarcador de CVD (**Taula 7**). Per exemple, pel fibrinogen encara no existeix l'estandardització de l'assaig (de Ferranti i Rifai, 2007).

Característiques d'un marcador de risc CVD
<p>Versemblança biològica demostrada</p> <p>Predicció de CVD en poblacions per diversos mètodes (epidemiològics, prospectius i poblacionals)</p> <p>Actuació independentment d'altres factors de risc</p> <p>Increment de l'habilitat de predicció de malaltia mitjançant <i>Framingham Risk Score</i></p> <p>Presenta una estabilitat biològica al llarg del temps</p> <p>Amplia disponibilitat d'assaigs reproduïbles i estandarditzats</p> <p>Disminució per efecte d'intervencions reductores de risc</p>

Taula 7. Característiques imprescindibles d'un marcador de risc cardiovascular.

Degut al paper clau de la inflamació crònica en l'arteriosclerosi, nombrosos marcadors d'inflamació com CRP, molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina), citosines (IL-6, IL-18 i TNF- α), MMPs (MMP-9) i CD40L s'ha vist incrementat la seva concentració en processos arterioscleròtics, considerant-se com a possibles factors de risc emergents predictors de malaltia cardiovascular (Blake i Ridker, 2001; Altman et al., 2003; Lind, 2003; Szmitko et al., 2003). Concretament, aquesta Tesi Doctoral es centralitza en l'estudi dels biomarcadors d'inflamació, a excepció de MMPs, com a predictors d'arteriosclerosi:

- CRP és un marcador d'inflamació sistèmica amb una rellevància a nivell de predicció de futurs esdeveniments cardiovasculars (Ridker i Morrow, 2003). Teoria avalada per diversos estudis, per exemple, Ridker et al. analitzen concentracions de CRP per preveure risc cardiovascular en dones (2000). Actualment, hsCRP (nivells sèrics de CRP mitjançant un assaig d'elevada sensibilitat) n'és el marcador d'inflamació més usat en l'àmbit clínic en comparació amb el mètode tradicional degut a que compleix els requeriments per ser considerat un marcador de CVD (**Taula 7**). hsPCR es correlaciona amb un increment en la prevalença d'infart de miocardi, infart cerebral i malaltia vascular perifèrica. L'augment de risc cardiovascular associat a un increment de hsCRP n'és independent d'altres factors de risc.
- S'avalua tant la concentració de molècules d'adhesió cel·lulars (monocitàries i limfocitàries) com solubles (endotelials) com a marcadors d'evolució de l'arteriosclerosi i altres processos patològics associats (Frijns et al., 1997, Estruch et al., 2004). Segons Price i Loscalzo les molècules d'adhesió solubles

endotelials com sICAM-1 i sVCAM-1 (1999) poden determinar-se a partir de la concentració plasmàtica d'aquestes molècules en pacients amb arteriosclerosi. La mesura de molècules adhesió podria ser un marcador útil per a la detecció d'activació endotelial i leucocitària associada a la formació de la placa d'ateroma i, per tant, predicció de risc de futurs esdeveniments cardiovasculars com l'infart de miocardi.

- Diversos estudis de Ridker et al. (2000) han determinat que les citosines com IL-6 i TNF- α poden ser predictores d'esdeveniments cardiovasculars.
- Nivells elevats de CD40L estan associats amb esdeveniments cardiovasculars en humans. Durant un seguiment de 4 anys, nivells basals de sCD40L eren significativament majors en 130 dones que van desenvolupar esdeveniments cardiovasculars en comparació amb unes altres 130 dones que van permanèixer sanes sense malaltia cardiovascular (Schönbeck et al., 2001).

Basat en aquestes evidències anteriors, s'ha consolidat el concepte que els marcadors d'inflamació circulants tenen un paper com a factors de risc de patir manifestacions pròpies de l'arteriosclerosi, tot i que, resta per determinar de manera activa la seva contribució en el desenvolupament i progressió de la malaltia arterioscleròtica.

En resum, actualment existeix un nou front d'investigació enfocat a determinar nous biomarcadors per augmentar la capacitat de predir una CVD com ara l'arteriosclerosi. S'ha proposat mesurar tot un seguit de biomarcadors indicatius d'inflamació i coagulació entre d'altres, considerats com a factors de risc cardiovascular no clàssics en els quals una elevada presència es correlaciona amb un augment de risc de patir CVD. Tanmateix, aquest conjunt de biomarcadors implicats en els efectes fisiopatològics que tenen lloc en la malaltia cardiovascular són dianes potencials dels polifenols procedents de la dieta (Curin i Andriantsitohaina, 2005).

3. FACTORS EXÒGENS EN LA PREVENCIÓ D'ARTERIOSCLEROSI

3.1. Dieta

Fa dues dècades es van desenvolupar estudis on es manifestava que els països de la conca mediterrània europea (Espanya, Itàlia, França, Grècia i Portugal) tenien una menor percentatge d'infarts de miocardi i una menor taxa de mortalitat per càncer respecte la resta de població mundial (De Lorgeril et al., 2002). Arrel d'aquests estudis se'n va deduir que la dieta tenia una implicació fonamental en la incidència de malaltia cardiovascular i càncer. L'anomenada dieta mediterrània, basada en la ingesta d'oli d'oliva, fruites, verdures, pastes, arròs, llegums, peix, pa integral i consum moderat de vi, és un important factor a considerar en quan a prevenció primària i secundària de malalties cardiovasculars com l'arteriosclerosi. A continuació s'expliquen els diferents elements de la dieta mediterrània considerats com a cardiosaludables.

3.1.1. Alcohol

El concepte d'alcohol fa referència a begudes alcohòliques i se'n poden distingir dos tipus:

- Begudes fermentades on s'obté etanol a partir de la fermentació de sucres procedents de certes fruites o grans de cereals. A més, aquestes begudes contenen polifenols degut a que la matèria prima utilitzada per al procés de fermentació es d'origen vegetal. Mitjançant aquest procediment es pot obtenir com a màxim 15 graus d'etanol i s'inclouen el vi, la sidra i la cervesa.
- Begudes destil·lades on s'obtenen a partir de la destil·lació o maceració de begudes fermentades, amb això s'aconsegueix augmentar els nivells d'etanol que sol estar al voltant dels 40 graus però, en contrapartida, els nivells de polifenols són escassos o inexistents. La ginebra, el vodka i el whisky, també anomenats licors, en són exemples.

La **Taula 8** mostra el rang aproximat d'alcohol present en les begudes alcohòliques utilitzades per als estudis inclosos en la present Tesi Doctoral.

Beguda alcohòlica	Etanol (% v/v)
Vi Negre	9-15 ¹
Vi Blanc/Cava	10.8-12.8 ²
Ginebra	>37.5 ³

Taula 8. Contingut alcohòlic de certes begudes alcohòliques.

¹Consell Regulador del vi n° 1439/1999 (D.O.C.E. L179 del 14-07-1999).

²Decret del 14-11-1991 del BOE n° 189278:37587-93.

³Regulació de la Comunitat Europea n° 157/89.

Des de fa moltes dècades, els científics debaten els possibles beneficis o riscos de consumir begudes alcohòliques. Es creu que el consum moderat d'alcohol podria tenir una acció protectora enfront les malalties cardiovasculars com l'arteriosclerosi (veure **Apartat 4**). Però cal emfatitzar que l'alcohol s'ha de consumir només en dosis moderades (un màxim de 40g en homes i 20g en dones al dia) per obtenir-ne un efecte saludable a nivell cardiovascular perquè si s'augmenta la dosi (>70g/dia) l'efecte serà oposat amb conseqüències molt greus i perjudicials per al individu (Kozarevic et al., 1998). Cal considerar que el consum moderat de begudes alcohòliques poden reduir la incidència de mort per CAD, però resta per aclarir si aquest efecte reductor es degut al component alcohòlic o etanol *per se*, al component no alcohòlic, principalment polifenols o bé degut a una combinació dels dos components.

3.1.2. Polifenols

Els polifenols, constituents naturals dels vegetals, tenen una ampla distribució en aliments d'origen vegetal com les verdures i les fruites que formen part de la dieta humana, sobretot, la dieta tipus Mediterrània i en els darrers anys se'ls hi ha atorgat propietats antiinflamatòries, antiagregants i antitrombòtiques complementàries a les propietats antioxidants que tenen els polifenols per si mateixos (veure **Apartat 5**).

3.1.3. Altres

Les vitamines C i E, i els β -carotens procedents de fruites i verdures són, també, una font d'antioxidants a tenir present en la dieta (Kaliora et al., 2006). Els cítrics, tomàquets, patates i olis vegetals són font natural de vitamina C i E, respectivament. En canvi, els β -carotens es troben àmpliament distribuïts entre els vegetals: taronges, tomàquets, espinacs, etc. No obstant, la vitamina E (obtinguda per combinació de tocoferols i tocotrienols sintetitzats exclusivament per plantes) i els β -carotens han ésser transportats mitjançant partícules lipídiques degut a les seves característiques hidrofòbiques.

3.2. Exercici

Diversos estudis epidemiològics han demostrat una estreta relació inversament proporcional entre l'augment de l'activitat física i la reducció de patir una malaltia cardiovascular (Zanettini et al., 1997; Van den Burg, 1997). Estudis prospectius també confirmen que una activitat física diària es efectiva tant a nivell de prevenció primària com secundària d'esdeveniments cardiovasculars tant en homes com en dones (Blair i Barlow, 1995). Realitzar exercici regularment (45-60 minuts/dia) disminueix el pes corporal, la pressió sanguínia i la trombogènesi, i millora el perfil lipídic. Els possibles mecanismes biològics pels quals l'exercici regular es beneficiós són els següents (El-Sayed, 1996; Yarnel et al., 2000; Maiorana et al., 2003):

- Vasodilatació per alliberació de NO i prostaciclina que s'acompanya d'un augment del flux sanguini.
- Reducció del pes corporal està associada a disminucions dels nivells de PAI-1, que es troba en concentracions elevades en individus obesos o amb sobrepès.
- Disminució dels nivells sèrics de colesterol i augment de les HDL-colesterol.
- Disminució de nivells plasmàtics de fibrinogen potenciant la capacitat fibrinolítica i, en conseqüència, una reducció de la coagulació sanguínia.

En resum, realitzar exercici moderat combinat amb una dieta saludable es efectiu per prevenir i tractar malalties cardiovasculars i, per tant, reduir la mortalitat prematura entre els individus de la població.

4. CONSUM MODERAT D'ALCOHOL I PREVENCIÓ D'ARTERIOSCLEROSI

Múltiples estudis clínics i experimentals publicats en les últimes dècades fan referència a que el consum moderat d'alcohol en països desenvolupats s'associa amb un menor risc de morbi-mortalitat per malaltia cardiovascular (Stampfer et al., 1988; Gronbaek et al., 2000; Theobald et al. 2003; Mukamal et al., 2003; Ruf, 2003; Wellmann et al., 2004; Renaud et al., 2004). Cal esmentar el *Framingham Study* on es va detectar una relació inversa entre el consum d'alcohol i els símptomes de malaltia arterio-coronària o CAD (angina de pit, infart de miocardi, mort sobtada) després d'un seguiment de 22 anys en pacients amb manifestacions clíniques de CAD (Gordon i Kannel, 1983). Aquestes publicacions globals han permès, també, extrapolar si el possible efecte cardioprotector del consum moderat de begudes alcohòliques es beneficiós independentment del país d'origen, raça o sexe. Els resultats obtinguts suggereixen que la reducció de la morbi-mortalitat cardiovascular associada al consum moderat d'alcohol incideix tant en països diferents com en homes i dones. Per exemple, el *Nurses' Health Study* basat en dades de 87.562 dones entre 34-59 anys afirma que l'alcohol té un efecte cardioprotector no solament en homes sinó també en dones (Stampfer et al., 1988). Tanmateix, s'ha demostrat que l'alcohol té un efecte beneficiós en individus amb risc cardiovascular moderat tot i que aquest efecte semblaria més prominent en individus amb alt risc cardiovascular (Thun et al., 1997).

Consumir begudes alcohòliques pot ser beneficiós o perjudicial per a la salut depenent de la dosi ingerida. La corba de dosi-resposta del consum d'alcohol en relació amb la mortalitat global i risc de patir una CHD té forma de "J" o "U" (Kannel i Ellison, 1996; Andreasson, 1998), és a dir, el risc es major en individus abstemis o amb un consum elevat d'alcohol que no pas en individus amb un consum moderat d'alcohol. Però si el promig de consum d'alcohol per dia d'un individu és superior a 70g, llavors, el risc d'esdeveniments coronaris és molt superior respecte els abstemis (Rehm et al., 2003). A partir d'aquest moment, s'han portat a terme molts estudis prenent com a referència les corbes en forma de "J" o "U" per descriure amb detall la relació entre consum d'alcohol i mortalitat per malaltia CHD i quins són els possibles mecanismes que defineixen l'alcohol com a cardioprotector (Gaziano et al., 2000). Un exemple a destacar n'és el meta-anàlisi de 34 estudis prospectius en homes i en dones publicats per Di Castelnuovo et al. (2006), on es recalca el consum moderat d'alcohol permet una disminució de la mortalitat global però a mesura que s'incrementa la dosi d'alcohol també s'incrementa la mortalitat global. En aquest estudi s'observa que la dosi d'alcohol considerada cardiosaludable és diferent depenent del

sexe de l'individu a avaluar. És a dir, les dones (1 beguda/dia) han de consumir una dosi alcohol inferior als homes (2 begudes/dia) per poder tenir els efectes cardioprotectors de l'alcohol degut a que tenen una metabolització més lenta de l'alcohol a conseqüència d'una activitat baixa de l'alcohol deshidrogenasa (enzim metabolitzador de l'alcohol a l'estómac). Així, Di Castelnuovo i col·laboradors conclouen que el consum moderat d'alcohol és inversament proporcional a la mortalitat total tant en homes com en dones, tot i que, en dones la dosi d'alcohol considerada com a moderada ha de ser inferior a la dels homes.

Renaud i Lorgeril (1992) van introduir el terme de *Paradoxa Francesa* que es defineix com una baixa incidència de mortalitat en França tot i ser un país on el consum de greixos saturats és elevat. França en ser un país caracteritzat per consumir una dieta rica en greixos saturats és lògic obtenir una taxa de mortalitat per CAD elevada però, paradoxalment, l'estadística demostrava tot el contrari presentant una taxa de mortalitat per CAD molt inferior (fins a un 40% menys) respecte a l'obtinguda en altres països industrialitzats. Aquest fet s'ha atribuït a l'alt consum de vi negre pels francesos. Arrel de la *Paradoxa Francesa*, va sorgir la teoria que el consum moderat d'alcohol, concretament vi negre, podria tenir un efecte cardioprotector enfront l'arteriosclerosi i altres CAD.

Malgrat les evidències científiques del benefici del consum d'alcohol esmentades anteriorment, hi han estudis en els quals no s'observa aquest efecte beneficiós del consum d'alcohol. Aquest fet pot ser conseqüència de la intervenció de factors de confusió relacionats amb l'estil de vida que no s'haurien tingut en compte a l'hora de fer els estudis com són la dieta, l'activitat física i els factors de risc cardiovascular (hipertensió, tabaquisme, hipercolesterolèmia, obesitat, hiperhomocisteïnèmia diabetis). Per això és molt important obtenir dades procedents d'assaigs on els factors estan controlats per tal d'evitar que aquests factors de confusió interfereixin en els resultats emascarant l'efecte protector del consum d'alcohol.

El consum moderat d'alcohol sembla tenir un efecte protector sobre el sistema cardiovascular mitjançant la prevenció del desenvolupament de l'arteriosclerosi però també es podria atribuir a l'alcohol una protecció contra la mortalitat global per efecte sobre altres òrgans i sistemes. No obstant, la qüestió fonamental a resoldre és si el vi té propietats cardioprotectors enfront l'arteriosclerosi superiors respecte altres begudes alcohòliques com els licors i a quin/s component/s s'ha d'atribuir aquests beneficis del consum moderat d'alcohol.

4.1. Alcohol - cardiopatia, malaltia cerebrovascular i vasculopatia perifèrica

Durant els darrers anys, s'han publicat nombrosos estudis epidemiològics a nivell mundial que suggereixen que el consum moderat de begudes alcohòliques (vi, cervesa i licors) redueix la mortalitat global, sobretot, la morbi-mortalitat cardiovascular per cardiopatia isquèmica, accident cerebrovascular o vasculopatia perifèrica.

Individus amb un consum moderat d'alcohol presenten una relació inversa respecte la morbiditat cardiovascular. S'ha observat una reducció, fins a un màxim del 50%, de la mortalitat global i d'incidència d'infart de miocardi en individus moderats respecte els abstemis (Gordon i Kannel, 1983; Stampfer et al., 1988; Klatsky et al., 1999). Aquest consum moderat d'alcohol és important no solament per la prevenció primària sinó també secundària com demostra Muntwyler i col·laboradors (1998). A més, cal afegir l'aparició d'articles recents on es suggereix que el consum moderat de vi redueix el risc de complicacions cardiovasculars en individus que han sobreviscut a un infart de miocardi agut recent (De Lorgeril et al., 2002). No obstant, si el consum d'alcohol és elevat l'efecte resultant és certament tòxic i perjudicial per al sistema cardiovascular de l'individu degut a un increment del risc de patir infart de miocardi agut o embòlia cerebral (Kiechl et al., 1998; Hillbom et al., 1999).

El risc de patir una malaltia cerebrovascular minva fins a un 50% en individus amb un consum moderat d'alcohol en comparació amb els abstemis i, sobretot, amb els grans bevedors on el consum supera les 3 begudes per dia, per tant, existeix una relació en forma de "J" entre la incidència d'infart cerebral i consum d'alcohol (Wannamethee i Shaper, 1998). També s'ha demostrat que un consum moderat implica menor freqüència de lesions isquèmiques cerebrals subclíniques detectades mitjançant ressonància magnètica (Mukamal et al., 2001). En altres estudis s'observa una menor risc de malaltia cerebrovascular quan la beguda consumida amb moderació és vi però no es detecten canvis després de consumir cervesa o licors (Goldberg et al., 1999).

La vasculopatia perifèrica es la manifestació clínica de l'arteriosclerosi menys investigada en relació amb el consum d'alcohol. Tot que les dades obtingudes són poc concloents, en el *Edinburg Artery Study* es va determinar que un major consum d'alcohol podria associar-se a una vasculopatia perifèrica menys severa (Jepson et al., 1995). No obstant, la millora era més significativa després d'un consum de vi respecte el consum de cervesa o licors destil·lats.

4.2. Tipus de beguda alcohòlica i protecció front l'arteriosclerosi

En conèixer la relació entre el consum moderat d'alcohol i la reducció del risc de patir un esdeveniment cardiovascular, diversos autors han mostrat interès en determinar si aquesta relació es depenent o independent del tipus de beguda alcohòlica ingerida i, a més, quin és el component o components de les begudes alcohòliques que cal atribuir els efectes beneficiosos sobre el sistema cardiovascular. Estudis epidemiològics on s'associa l'infart de miocardi i el consum de diferents tipus de begudes alcohòliques han determinat que el consum begudes alcohòliques a dosis moderades redueix el risc relatiu de patir infart de miocardi en comparació amb els individus abstemis (Rimm et al., 1991). Sembla ser que totes les begudes alcohòliques tant vi, cervesa com licors tindrien un efecte cardioprotector per igual sense diferències significatives entre elles, no obstant, semblaria existir una certa tendència del vi negre a tenir un efecte més intens respecte les altres begudes alcohòliques. Arrel d'aquests estudis van sorgir els defensors de la teoria consistent en que l'efecte cardioprotector és independent del tipus de begudes alcohòliques que es consumeixi (vi, cervesa o licors) atribuint aquest efecte al component alcohòlic o etanol. Però en contraposició van sorgir els defensors de la teoria (avalada per la paradoxa francesa de Renaud i Lorgeril, 1992 esmentada anteriorment) que el vi negre és més cardioprotector que la resta de begudes alcohòliques atribuint aquest efecte beneficiós al component no alcohòlic, és a dir, els polifenols (Gronbaek et al., 2000; Theobald et al., 2003). Posteriorment, han sorgit nous estudis com, per exemple, el meta-anàlisi basat en 26 articles (on s'inclouen més de 200.000 persones) on es compara els efectes del vi i de la cervesa sobre el risc de CHD (Rimm et al., 1999). El risc relatiu de CHD en bevedors de vi respecte abstemis era 0.68 (95% CI: 0.59-0.77), mentre que la protecció associada a la cervesa era un 10% inferior al vi amb un risc relatiu de 0.78 (95% CI: 0.70-0.86). Arrel d'aquest meta-anàlisi, s'han publicat altres articles addicionals com el de Djousse et al. (2002) on es considera que només el consum de vi (s'exclouen la cervesa i els licors) està relacionat amb la reducció del risc relatiu de patir isquèmia. No obstant, estudis prospectius han comprovat que el consum de begudes destil·lades també poden exercir un efecte cardioprotector atribuït al propi etanol tal com defensen Rimm i col·laboradors.

En resum, el consum moderat d'alcohol s'associa a un descens de la morbi-mortalitat cardiovascular però hi ha una manca de consens unitari per part dels diversos investigadors en referència a si els beneficis cardioprotectors de les begudes

alcohòliques han d'ésser atribuïbles al propi etanol o al component no alcohòlic o bé als dos components en conjunt.

4.3. Mecanismes implicats en reducció d'arteriosclerosi per consum d'alcohol

En aquests moments, els estudis que han determinat l'efecte beneficiós del consum moderat d'alcohol a nivell cardiovascular, no han permès aclarir amb exactitud quins són els mecanismes moleculars i cel·lulars que intervenen en aquest efecte protector, tot i que, s'especulen diverses teories. Diversos estudis s'han centralitzat en que el consum moderat d'alcohol provoca canvis en el perfil lipídic, deguts a nivells elevats de HDL, relacionats amb una disminució d'accidents vasculars però el seu efecte no es suficient per demostrar-ne tot l'efecte beneficiós ja que només justificaria un 50% de l'efecte total (Langer et al., 1992). Per tant, han d'existir altre/s mecanisme/s complementari/s a l'efecte de les HDL. Variacions en el sistema plaquetari i d'hemostàsia relacionades amb una disminució de la trombosis arterial s'han proposat com altres possibles mecanismes d'actuació, els quals també tenen una incidència important però insuficient per explicar-ne la totalitat de la reducció de la malaltia cardiovascular (Rimm et al., 1999). Posteriorment, en definir-se l'arteriosclerosi com una malaltia on es destaca la importància del component inflamatori (hipòtesi inflamatòria), esmentat en apartats anteriors de la present tesi, ha donat peu a pensar en l'existència d'un altre mecanisme d'acció de l'alcohol relacionat amb una possible activitat antiinflamatòria sobre la paret vascular aconseguint retardar i/o evitar la formació de la placa d'ateroma que té lloc en les fases inicials de l'arteriosclerosi. Aquest possible mecanisme antiinflamatori de l'alcohol completaria la totalitat de l'efecte cardioprotector de l'alcohol enfront l'arteriosclerosi que restava per explicar. Resumint, el consum d'alcohol pot prevenir el desenvolupament de l'arteriosclerosi a través de la contribució col·lectiva de múltiples mecanismes els quals es descriuen a continuació (Goldberg et al., 1999).

4.3.1. Efecte de l'alcohol sobre les lipoproteïnes

S'ha demostrat que el consum moderat d'alcohol modifica el perfil de les lipoproteïnes, principalment les HDL, que es tradueix en un baix risc de patir arteriosclerosi e infart de miocardi (Hansen et al., 2005). Segons Rimm i

col·laboradors (1999), el consum moderat de 30g d'alcohol per dia incrementa els nivells de les lipoproteïnes HDL, essencialment les subclasses HDL₂ i HDL₃, que equival a una reducció del risc CHD en un 17% aproximadament. Aquest increment de les HDL per efecte del consum d'alcohol podria atribuir-se a 3 mecanismes (Rimm et al., 1999; Agarwal, 2002):

- L'alcohol indueix la síntesi hepàtica de la apolipoproteïna (apo) AI i AII, components precursors de les partícules de HDL, necessàries per a la maduració de les HDL. Per exemple, s'ha estimat que si un individu consumeix 30g/dia de alcohol pot mostrar de promig un increment de 8 mg/dL en la concentració plasmàtica de apo AI.
- L'alcohol indueix un increment de la secreció de lipoproteïnes riques en triglicèrids per part del fetge i, en conseqüència, s'incrementa la concentració de lipases que degraden els triglicèrids en partícules lipoproteiques (quilomicrons i lipoproteïnes de molt baixa densitat o VLDL). Tot aquest procés es tradueix en un increment del flux de colesterol cap a l'interior de les partícules de HDL.
- L'alcohol disminueix l'intercanvi de triglicèrids i esters de colesterol mitjançant proteïnes de transferència d'esters de colesterol i, així, s'aconsegueix reduir el catabolisme de les HDL.

Segons aquests resultats, es podria concloure que el consum moderat d'alcohol afavoreix un increment destacat dels nivells de HDL mitjançant la producció de constituents de les HDL, potenciació del flux de colesterol cap a l'interior de les HDL i la prevenció del seu catabolisme.

En relació a l'efecte del consum moderat d'alcohol respecte concentracions d'altres lípids com les LDL-c no està molt definit i existeix opinions contradictòries entre autors. Certs autors (Estruch, 2000) afirmen que el consum d'alcohol no modifica les concentracions plasmàtiques del LDL-c mentre que d'altres (Paassilta et al., 1998) confirmen petites reduccions en les concentracions plasmàtiques de LDL-c, sobretot, si el consum d'alcohol acompanya un àpat.

El coneixement adquirit a partir de dades obtingudes d'estudis observacionals han proporcionat força evidència que l'oxidació de les LDL juguen un paper important en la iniciació i progressió de la malaltia vascular arterioscleròtica (Griffin, 1999). Efectivament, l'efecte antioxidant assignat al consum d'alcohol s'exerceix alterant el procés d'oxidació de les LDL, d'aquesta manera impedir la formació de la placa d'ateroma (Serafini et al., 2000). Concretament, el vi (sobretot el negre) conté un gran

nombre d'antioxidants nutricionals degut al seu alt contingut en substàncies amb capacitat antioxidant com els polifenols a tenir en compte a l'hora de postular els efectes estabilitzadors sobre les LDL. En aquest sentit, l'efecte antioxidant dels polifenols del vi es considera un altre dels possibles efectes beneficiosos del consum d'alcohol front l'aterogènesi en mostrar una capacitat d'inhibició de l'oxidació de les LDL humanes presents en l'endoteli (Puddey et al., 1998). Puddey i Croft (1999) proposen un estudi on l'alcohol destil·lat envellit en fusta roure adquireix certes quantitats d'antioxidants que podrien ser diferents respecte als presents en el vi negre. Aquests resultats suggereixen que no deuen existir grans diferències entre la capacitat del vi i l'alcohol destil·lat en referència a la protecció i/o baix risc de patir malaltia coronària (Goldberg et al., 1999). Recentment, en un assaig aleatoritzat i creuat dirigit pel nostre grup d'investigació s'observa una reducció de l'índex d'oxidació de les LDL després del consum moderat de vi negre i ginebra, no obstant, la peroxidació de les lipoproteïnes només va disminuir després de consumir vi negre. Per tant, el major efecte del vi negre respecte la ginebra possiblement atribuïble a la major presència de polifenols en el vi negre (Estruch, 2000).

En referència a la Lp(a), estudis recents mostren que juga un paper important en l'arteriosclerosi i és un dels factors de risc de CHD. Nivells elevats de Lp(a) redueixen els nivells de plasminogen que es tradueix en inhibició de la fibrinòlisis (Testa i Marcovina, 1999). Un petit nombre d'estudis d'intervenció recents en humans, contribueixen a la idea que el consum d'alcohol redueix les concentracions plasmàtiques de Lp(a) (Kervinen et al., 1993). A més, Paasilta i col·laboradors (1998) han demostrat que homes de mitjana edat que beuen alcohol en societat presenten una reducció dels nivells Lp(a), per tant, recalquen la idea que Lp(a) és un factor important que explicaria la reducció de la mortalitat i la baixa incidència de CAD en bevedors socials. A més, un assaig clínic d'intervenció realitzat pel nostre grup d'investigació reafirma aquesta teoria perquè la Lp (a) va disminuir després del consum de vi negre amb alt contingut polifenòlic (Estruch, 2000).

Per últim, certs estudis han investigat l'efecte del consum d'alcohol sobre les característiques físico-químiques de les apolipoproteïnes (Apo) perquè si estan compostes per una major fracció lipídica i una menor fracció proteica són potencialment més aterogèniques. Un dels pocs estudis existents, realitzat pel nostre grup, determina que la fracció proteica de les HDL (Apo A) incrementa quan es consumeix alcohol amb alt contingut polifenòlic (vi negre), en canvi, la fracció proteica de les LDL (Apo B) disminueix en consumir alcohol amb baix contingut en polifenols (ginebra) incrementant-ne la fracció lipídica de les LDL (Estruch, 2000).

Aquestes dades suggereixen que el consum moderat de begudes alcohòliques tenen efectes positius sobre el perfil lipídic que indueixen a una millora de la salut cardiovascular. Els mecanismes pels quals actuen varien segons el tipus de beguda alcohòlica que s'analitzi i cal emfatitzar l'efecte del component no alcohòlic.

4.3.2. Efecte de l'alcohol sobre les plaquetes, sistema de coagulació i fibrinòlisis

El balanç normal d'hemorràgia i coagulació de l'endoteli vascular es manté mitjançant la interacció i regulació de components del sistema hemostàtic com les proteïnes fibrinolítiques, els factors de coagulació i les plaquetes circulants. Tanmateix, l'aparició d'esdeveniments cardiovasculars aguts, com a conseqüència de la formació d'un trombus que obstrueix el vas sanguini desencadenat per una fissura de la placa d'ateroma, poden tenir origen en el desequilibri del sistema hemostàtic amb alteracions en la coagulació sanguínia (tant plaquetes com proteïnes i factors de coagulació) i el sistema fibrinolític. Aquest raonament ha permès als investigadors un nou enfoc d'estudi dirigit a que el consum moderat d'alcohol pot interaccionar positivament amb diferents factors hemostàtics com l'agregabilitat plaquetar, concentració de fibrinogen i els factors fibrinolítics que minvarien el risc de patir esdeveniments cardiovasculars (Djousse et al., 2000; Mukamal et al., 2001; van de Wiel et al., 2001).

4.3.2.1. Consum d'alcohol i activitat plaquetària

Estudis *in vitro* demostren l'efecte inhibidor de l'alcohol sobre l'agregació plaquetària. No obstant, aquest efecte inhibidor també s'ha comprovat tant en plaquetes humanes (Cowan, 1980) com animals (Torres Duarte et al., 1995). Estudis epidemiològics relacionats amb l'agregació de plaquetes donen suport a aquestes dades (Imano et al., 2002). No obstant, pocs estudis a gran escala si han inclòs dones, a més, tampoc s'han realitzat estudis que aclareixin la relació entre el consum d'alcohol i activació plaquetària. Arrel d'aquests interrogants, es va realitzar un estudi, anomenat *Framingham Offspring Study*, amb l'objectiu de definir la relació concreta entre consum d'alcohol i activitat plaquetària (activació i agregació conjuntament) en una població adulta d'ambdós sexes (Mukamal et al., 2005). Per a l'estudi es mesura la P-selectina, un marcador d'activació plaquetar. La P-selectina en activar-se es

transloca en direcció a la superfície de la plaqueta amb la funció de permetre la interacció amb altres plaquetes produint-se l'agregació entre elles. El *Framingham Offspring Study* conclou que el consum d'alcohol és inversament proporcional tant a l'activació com l'agregació de plaquetes, particularment en homes. De totes maneres, cal obtenir més estudis per determinar si aquests resultats contribueixen amb la relació consum d'alcohol i esdeveniments cardiovasculars relacionats amb la balança trombosis-fibrinòlisis. Segons Rubin (1999), l'etanol inhibeix l'agregació plaquetària i la formació de tromboxà A₂ en humans, per tant, alcohol exerceix un efecte antitrombòtic tant *in vitro* com *in vivo*. Altres estudis demostren que l'alcohol, concretament el vi, té un efecte negatiu sobre l'agregació de les plaquetes sanguínies. Segons Ruf (2004), l'activitat antiplaquetària del vi negre s'explica per l'efecte sinèrgic entre l'etanol i els polifenols, aquests últims es detecten en elevades concentracions. A partir d'aquest estudi, en particular, neix la teoria de que el vi i, específicament els polifenols, inhibeixen l'agregació de les plaquetes podent explicar una part dels efectes protectors més intensos del vi enfront l'arteriosclerosi.

4.3.2.2. Consum d'alcohol i sistema de coagulació

En referència al sistema de coagulació existiria una relació entre consum moderat d'alcohol i disminució dels nivells plasmàtics de plasminogen (Hendriks i Van der Gaag, 1998). Aquest efecte del consum moderat d'alcohol podria ser atribuïble a la seva acció antiinflamatòria. Experiments tant *in vitro* com *in vivo* han demostrat que dosis baixes d'etanol redueixen els nivells de fibrinogen en un 20% (Wang et al., 1999). Estudis epidemiològics reafirmen la reducció dels nivells plasmàtics de fibrinogen relacionada amb un menor risc d'infart de miocardi en individus amb un consum moderat de begudes alcohòliques en comparació amb els abstemis i els grans bevedors, per tant, el consum d'alcohol i concentració de fibrinogen presentarien una relació en forma de J (Scarabin et al., 1998; Lacoste et al., 2001). A més, un estudi *in vitro* ha demostrat que el resveratrol, polifenol present en el vi, té la capacitat d'inhibir el factor tissular essencial per detonar la cascada de coagulació (Pendurthi et al., 1999). Per últim, es pensa que el consum moderat d'alcohol no solament incideix negativament sobre les proteïnes de coagulació sinó també sobre els factors de coagulació com els factors VII i VIII (Gorinstein et al., 1997).

4.3.2.3. Consum d'alcohol i fibrinòlisis

Estudis experimentals han suggerit que l'efecte beneficiós del consum moderat d'alcohol podria ser degut a la capacitat d'augmentar l'activitat fibrinolítica de les cèl·lules endotelials a través de canvis en els nivells dels diferents components del sistema fibrinolític com l'augment dels activadors de plasminogen (t-PA i u-PA) i la disminució de PAI-1 (Hendriks i Van der Gaag, 1998). Així, doncs, la potenciació del sistema fibrinòlisis redueix el risc de trombosis minvant la probabilitat de produir-se un infart de miocardi. Estudis *in vitro* (Booyse i Parks, 2001) proposen que tant l'etanol com els compostos no alcohòlics (catequina, resveratrol...) indueixen la secreció de t-PA, per tant, el consum moderat d'alcohol produeix canvis en el sistema de coagulació-fibrinòlisis decantant-se la balança cap al procés de fibrinòlisis. No obstant, altres treballs publicats no han detectat aquesta associació (Volpato et al., 2004).

4.3.3. Efecte de l'alcohol sobre la funció endotelial

Existeixen evidències que determinen l'efecte beneficiós de l'alcohol sobre la funció endotelial, concretament, el consum d'alcohol en individus sans a resultat en una millora del flux sanguini per vasodilatació, el qual es considera una mesura important de funció endotelial (Teragawa et al., 2002). Aquest efecte vasodilatador de l'endoteli s'obté mitjançant l'expressió de l'òxid nítric sintasa amb la consegüent alliberació de NO per part de les cèl·lules endotelials (Leikert et al., 2002). Un estudi amb 11 homes sans, es va mesurar la dilatació dependent de flux sanguini (un increment del flux sanguini provoca una dilatació de l'artèria gràcies a l'efecte vasodilatador del NO alliberat per les cèl·lules endotelials) abans i després del consum de vi negre (ric en polifenols), vodka (pobre en polifenols) o vi negre desalcoholitzat. Es va determinar una millora significativa de la dilatació després del consum de vi negre tant amb alcohol com sense. No obstant, després del consum de vodka es va obtenir una reducció de la dilatació (Hashimoto et al., 2001). Karatzi i col·laboradors (2004) van fer un estudi amb 15 homes que ingerien 250 mL de vi negre normal i desalcoholitzat, les dades obtingudes van demostrar que els individus en consumir vi negre desalcoholitzat presentaven un major flux sanguini per vasodilatació en comparació amb el vi negre normal. També s'ha demostrat que la ingesta de most permet una millora significativa del flux coronari en pacients afectats per una cardiopatia coronària (Stein et al., 1999). Així, part d'aquest efecte cardioprotector del

vi sobre l'endoteli vascular podria estar relacionat amb una acció independent de les substàncies no alcohòliques presents en el vi com són els flavonoides (polifenols) i el resveratrol. Un exemple a destacar és l'estudi *in vitro* realitzat per Andriambelsson et al. (1999) on s'ha comprovat que l'administració de quercitina i resveratrol, polifenols molt freqüents en el vi negre, en rates provoca una vasodilatació de l'aorta aïllada principalment pel mecanisme relacionat amb la secreció de NO.

Aquests estudis mostren que les begudes alcohòliques poden millorar la funció endotelial per efecte tant de l'etanol com dels compostos no alcohòlics (polifenols), presents en certes begudes com el vi negre.

4.3.4. Efecte de l'alcohol sobre la resposta inflamatòria en la paret vascular

En els darrers anys han sorgit noves evidències sobre la participació del procés inflamatori en la disfunció endotelial, clau per a la formació de la placa d'ateroma. Arrel d'aquesta hipòtesi inflamatòria de l'arteriosclerosi, diversos científics (inclòs el nostre grup d'investigació) s'han decantat per una nova línia d'investigació consistent en l'estudi de l'efecte del consum moderat d'alcohol sobre diversos paràmetres inflamatoris d'arteriosclerosi com la producció de citosines i quimiosines, expressió de molècules d'adhesió i NF- κ B (esmentats anteriorment) amb l'objectiu de poder determinar la incidència de l'alcohol en la resposta inflamatòria-immune relacionada amb processos arterioscleròtics (Blanco-Colio 2000 i 2007; Sacanella et al., 2002; Estruch et al., 2004), és a dir, aclarir el possible mecanisme antiinflamatori de l'alcohol. No obstant, un consum excessiu i crònic d'alcohol s'associa a un increment en la resposta proinflamatòria amb dany del sistema immune (Cook, 1998), per tant, alcohol té un efecte dual (antiinflamatori o proinflamatori) en funció de la dosi d'alcohol ingerida i del temps d'exposició.

L'article de Brown et al. (2006) agrupa diversos estudis que col·lectivament demostren un increment de la resposta inflamatòria induïda per citosines en consumir alcohol en excés, el qual també origina un estrès oxidatiu crònic que contribueix a la generació de més citosines proinflamatòries, per tant, hi ha una inducció constant de senyals inflamatòries que fan inefectives les estratègies del sistema immune enfront una infecció a conseqüència de l'abús de alcohol. Diversos estudis demostren que l'efecte immunosupressor de l'etanol seria sobre diversos tipus cel·lulars on s'inclouen els monòcits, els macròfags i els limfòcits T (Watson et al., 1988; Chen et al., 1993).

Disposem dades procedents d'estudis amb animals d'experimentació on dosis elevades d'etanol mostren una sobreexpressió tant de l'ICAM-1 de l'endoteli hepàtic com del seu lligand leucocitari LFA-1, és a dir, aquest increment d'expressió de molècules d'adhesió provoca un increment en l'adhesió leucòcit – endoteli facilitant la extravasació de leucòcits que desencadena l'inici de la resposta proinflamatòria que pot derivar en dany hepàtic (Bautista, 1997). Tanmateix, estudis amb humans determinen que l'ús excessiu i perllongat d'alcohol induïx una hepatitis alcohòlica, la qual està associada amb un increment en els nivells circulants de citosines proinflamatòries com el TNF- α (McClain et al., 1999) i una desregulació en l'expressió de molècules d'adhesió endotelials i leucocitàries (monòcits i limfòcits) com ICAM-1, VCAM-1, E-selectina i VLA-4 (Sacanella et al., 1999 vol. 23 i 34; Sacanella i Estruch, 2003). En definitiva, les darreres publicacions suggereixen que un consum crònic i excessiu d'alcohol activa senyals cel·lulars relacionades amb un increment en l'expressió de molècules d'adhesió i citosines que promouen la extravasació de leucòcits on s'exerceix un efecte proinflamatori, el qual afecta significativament a la resposta immune-inflamatòria de l'individu.

Un consum moderat d'alcohol podria afectar la producció de mediadors d'inflamació en humans d'aquesta manera permetria influenciar negativament en la formació de lesions arterioscleròtiques. Aquesta associació està avalada per resultats obtinguts en estudis epidemiològics on es compara el consum d'alcohol (tant en homes com en dones) amb nivells de proteïna CRP, un marcador d'inflamació sistèmic (Imhof et al, 2001). En la gràfica de la **Figura 7** s'observa una disminució dels nivells del marcador d'inflamació CRP, tant a nivell poblacional com desglossat en homes i dones, després del consum de dosis moderades d'alcohol en comparació amb els abstemis i els bevedors excessius. Per tant, se'n podria deduir que l'alcohol a dosis moderades tindria un efecte antiinflamatori sobre la CRP amb una relació en forma de "U" entre el consum diari d'alcohol i marcadors d'inflamació. Mandrekar i col·laboradors (2006) suggereixen que el consum moderat d'alcohol té un doble efecte antiinflamatori consistent en un augment de la IL-10 (citosina antiinflamatòria) i una reducció en la resposta inflamatòria dels monòcits induïda per la inhibició del NF- κ B. Aquests resultats antiinflamatoris eren els esperats degut a que estudis *in vitro* previs d'aquests autors (1999) ja s'hi observa una atenuació de la inducció de TNF- α i IL-1 en monòcits (citosines amb un paper clau per a la inflamació) després d'una exposició d'alcohol aguda. Llavors, el conjunt de dades resultants suggereixen que el consum moderat d'alcohol té un efecte antiinflamatori en el sistema cardiovascular (Imhof i Koenig, 2003).

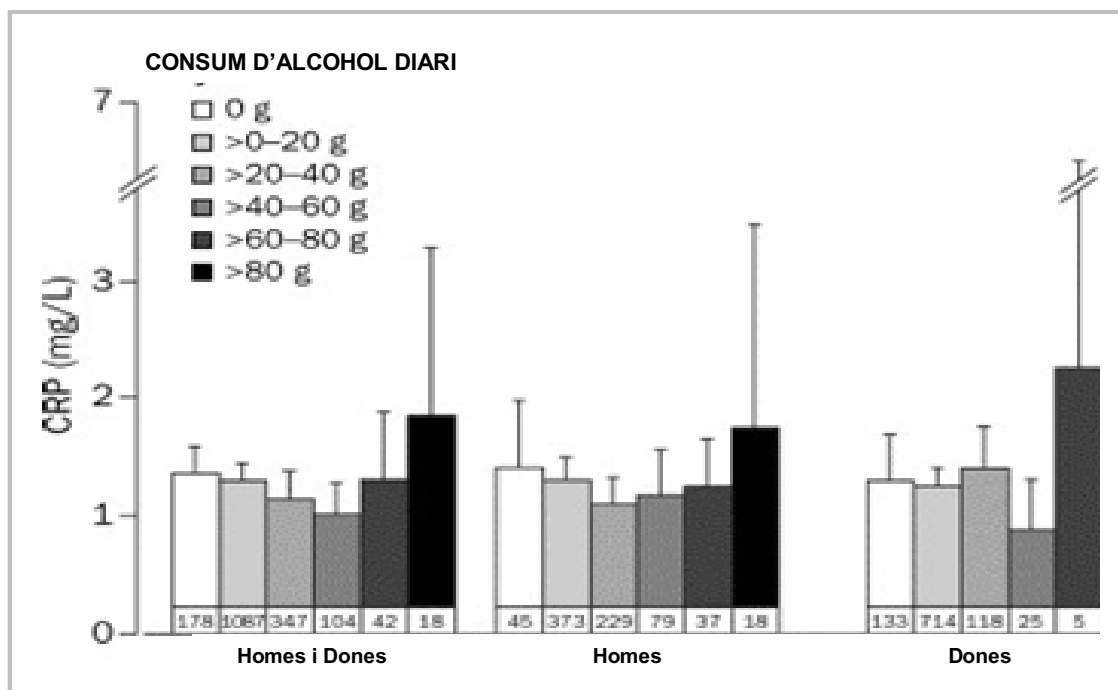


Figura 7. Nivells de CRP d'individus segons la dosi diària d'alcohol (adaptació de Imhof et al., 2001).

Diversos estudis han analitzat els efectes del component alcohòlic i no alcohòlic de les begudes alcohòliques sobre els marcadors d'inflamació relacionats amb l'arteriosclerosi. Aquests estudis evidencien que tant l'etanol com els compostos no alcohòlics, principalment polifenols, poden induir canvis en l'expressió de molècules d'adhesió i altres molècules relacionades en les cèl·lules vasculares així com també l'adhesió dels monòcits a l'endoteli vascular. Aquests canvis poden estar influenciats tant per la dosi i duració de l'exposició a l'alcohol com per el tipus de beguda alcohòlica ingerida. Estudis *in vitro* realitzats en cèl·lules endotelials humanes demostren que una exposició a dosis baixes d'etanol inhibeix l'expressió de la quimiosina MCP-1 relacionada amb processos inflamatoris (Cullen et al., 2005). Tanmateix, altres estudis *in vitro* han demostrat que alguns polifenols presents en el vi negre (resveratrol, catequina, quercitina...) redueixen l'expressió d'ICAM-1 i VCAM-1 per regulació negativa del NF- κ B i l'adhesió de monòcits a l'endoteli (Ferrero et al., 1998; Koga i Meydani, 2001). Així, doncs, en estudis *in vitro* no solament l'etanol sinó també els polifenols indueixen canvis en els paràmetres inflamatoris que intervenen en l'arteriosclerosi.

Actualment, encara no se'n té un coneixement nítid de l'efecte beneficiós del consum moderat d'alcohol sobre la resposta inflamatòria *in vivo* en humans. L'explicació més raonable seria que en aquests individus a més del consum d'alcohol coexisteixen altres factors de confusió com són la dieta, l'exercici i factors de risc

cardiovascular (hipertensió, dislipèmia...), els quals per si mateixos poden alterar l'expressió i la funcionalitat de paràmetres inflamatoris com les molècules d'adhesió. Per això, és necessari fer estudis d'intervenció en individus sans on tots aquests possibles factors de confusió que podrien interferir siguin controlats de manera que les dades que s'obtinguin corresponguin únicament a l'efecte produït pel consum d'alcohol per si mateix. Membres del nostre grup d'investigació han publicat certs estudis en individus sans on s'han controlat els factors de confusió i s'observa una disminució tant de l'expressió de paràmetres d'inflamació (molècules d'adhesió, citosines, quimiosines, fibrinogen i CRP) com de l'adhesió monòcit-endoteli després del consum moderat de vi negre respecte la ingesta de ginebra alcohòliques (Estruch et al., 2004; Badia et al., 2004). Aquests resultats estan en concordança amb els assaigs clínics de Blanco-Colio et al. (2000 i 2007) que mostren que individus sans amb un consum moderat de vi negre, una beguda alcohòlica amb alt contingut polifenòlic, inhibeix l'activació del factor de transcripció NF- κ B implicat en la regulació de l'expressió de gens (molècules adhesió, citosines i quimiosines) implicats en les respostes immune e inflamatòria mentre que un consum moderat de ginebra amb baix contingut polifenòlic no té efecte. Llavors, aquesta immunomodulació de la resposta inflamatòria de la paret vascular sembla ser més intensa quan la beguda alcohòlica consumida conté un alt contingut en polifenols (vi negre) respecte a una beguda amb baix contingut en polifenols (ginebra).

En resum, la resposta inflamatòria de la paret vascular que participa en el desenvolupament de l'arteriosclerosi pot estar modulada pel consum d'alcohol mitjançant alteracions en l'expressió de paràmetres inflamatoris, principalment, molècules d'adhesió, citosines, quimiosines i NF- κ B. Si el consum d'alcohol és moderat pot tenir un efecte antiinflamatori beneficiós amb una reducció la resposta inflamatòria en la paret vascular que atenuaria la formació de la placa d'ateroma però si el consum és excessiu, llavors, l'alcohol té un efecte proinflamatori perjudicial amb un increment de la resposta inflamatòria que podria derivar en una malaltia associada a l'alcoholisme crònic com l'hepatitis alcohòlica. Però cal emfatitzar la necessitat d'obtenir més evidències científiques mitjançant assaigs clínics d'intervenció per tal de determinar si l'efecte antiinflamatori de les begudes alcohòliques és degut al component alcohòlic o al component no alcohòlic o bé a l'efecte sinèrgic dels dos components.

5. CONSUM DE POLIFENOLS PROCEDENTS DE LA DIETA I PREVENCIÓ D'ARTERIOSCLEROSI

5.1. Definició i classificació dels polifenols

El terme fenol o polifenol fa referència als compostos que posseeixen un anell aromàtic benzènic substituït amb un o varis grups hidroxil (-OH) i una cadena lateral funcional (-R) presents en vegetals (**Figura 8**).

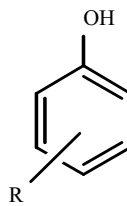


Figura 8. Estructura bàsica dels compostos fenòlics.

Existeix una àmplia varietat de polifenols però, principalment, els polifenols de la dieta es subdivideixen en dues famílies: flavonoides i no flavonoides (**Figura 9**) que diferiran en el nombre de grups hidroxil que posseeixi l'estructura química.

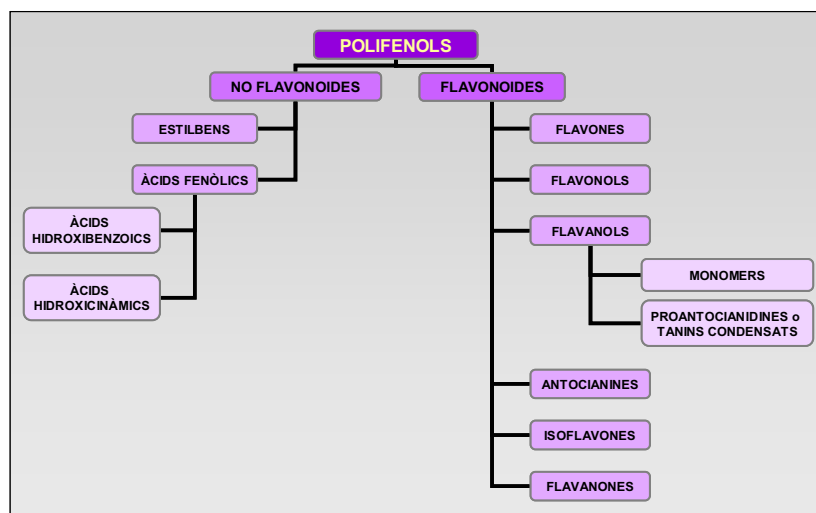


Figura 9. Diagrama general dels polifenols més freqüents en la dieta.

Els flavonoides correspon a la família de polifenols amb més abundància en aliments de la dieta, sobretot, aquells inclosos dins la dieta Mediterrània. Els flavonoides són pigments amb una gamma de colors que compren des del blanc fins al vermell incloent el morat i el blau. Principalment, els flavonoides és divideixen en 6 subgrups segons el grau d'oxidació de l'anell benzènic: flavones, flavonols, flavanols, antocianines, isoflavones i flavanones (Manach et al., 2004) (**Fig. 10**). Se'n destaca una major presència en begudes i fruites com el vi, te, cafè, suc de fruites i fruites vermelles (maduixa, cirera, mora...) i cacau. Dels diferents subgrups destaquen, sobretot, els flavanols o flavan-3-ols que es divideixen en monòmers, (-)-epicatequina i (+)-catequina, i en oligòmers que són combinacions d'aquests monòmers anomenats procianidines. Així, doncs, aquests flavanols tant monòmers com oligòmers que se'n deriven són un potencial benefici per a la salut. Un nombre de diferents aliments i begudes poden contribuir a les necessitats dietètiques humanes en quan a contingut en flavanols, inclosos la xocolata, el cacau, el té, el raïm, pomes, fruits secs i vi negre. A més, les antocianines o antocians són pigments responsables de la coloració morada típica del raïm negre.

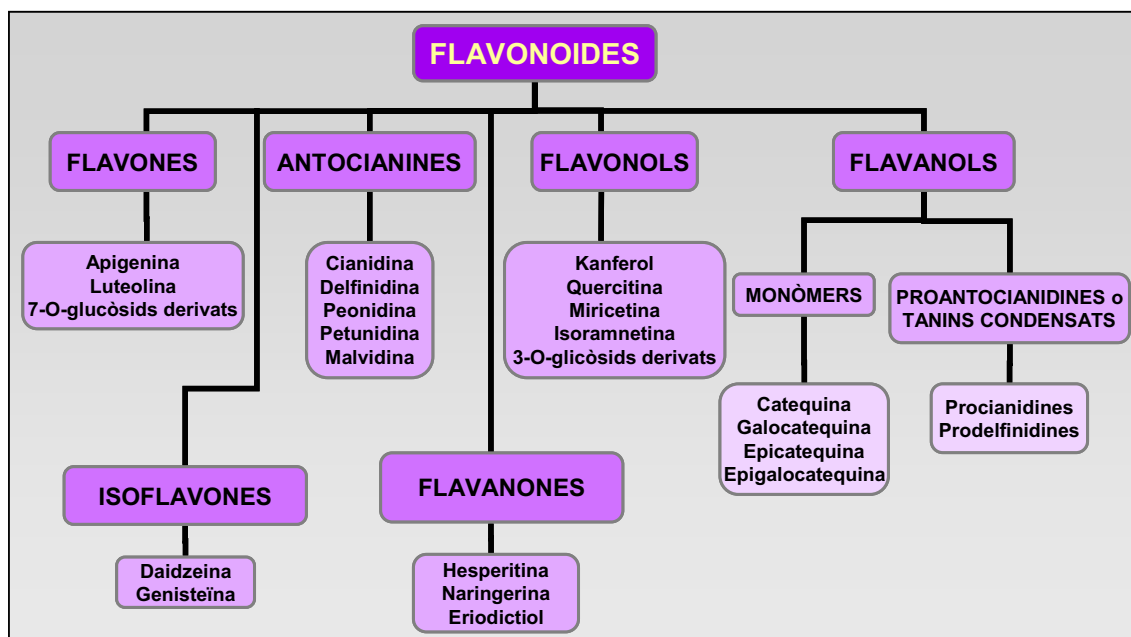


Figura 10. Diagrama dels flavonoides.

Els principals polifenols no flavonoides fan referència als àcids fenòlics i els estilbens (**Fig. 11**).

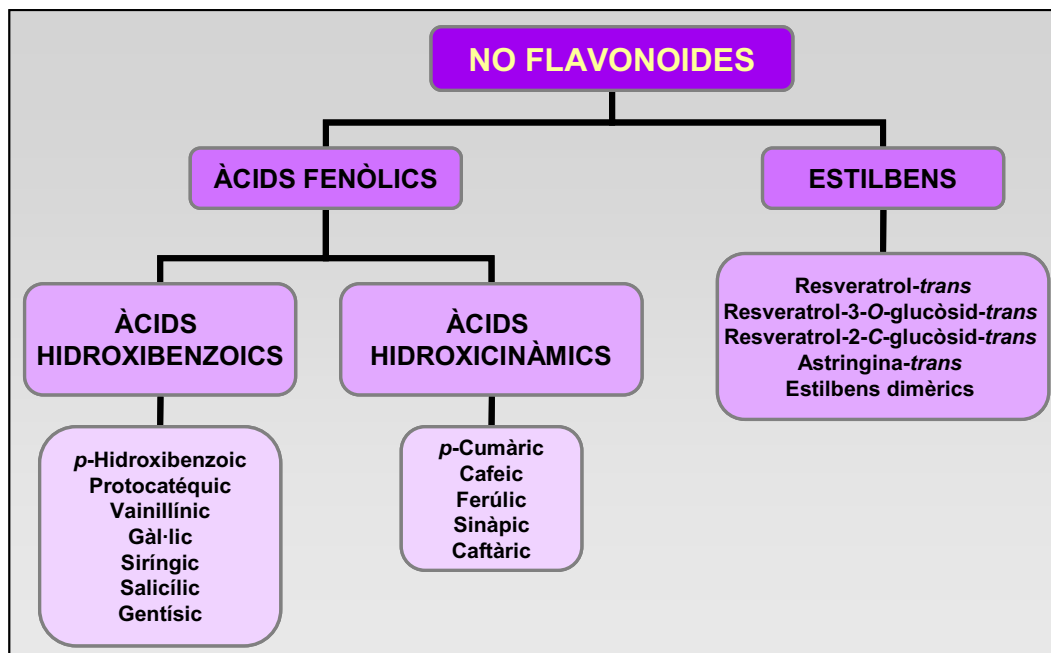


Figura 11. Diagrama dels no flavonoides.

5.2. Aliments rics en polifenols

Hi han molts productes alimentaris rics en polifenols on destaquen el vi, cacau, te, ceba, fruits secs, oli d'oliva. En aquesta tesi es farà èmfasi en els efectes dels polifenols derivats del consum de vi i solubles de cacau. La **Taula 9** mostra la concentració de polifenols totals de les begudes i solubles de cacau usats en la tesi.

Beguda o aliment	Polifenols totals
Vi negre	1945 ¹
Vi blanc	308 ¹
Vi escumós o cava	202 ¹
Ginebra	~ 0
Solubles de Cacau	11,5 ²

Taula 9. Contingut polifenòlic de les begudes alcohòliques i solubles de cacau usats en els diversos protocols. ¹Unitats expressades en mg àcid gàl·lic/L; ²Unitats expressades en mg catequina/g cacau.

5.2.1. Vi: origen i contingut polifenòlic

El vi és una beguda elaborada a partir de la fermentació alcohòlica del suc o most del raïm (*Vitis vinifera*). Modificacions en la fermentació deriven en variacions en la composició del vi, conseqüentment, s'obtenen diferents tipus de vi:

- Vi negre, s'elabora majoritàriament a partir de raïm negre. Com que la coloració ve donada per la pellofa, cal realitzar una fermentació prèvia del most conjuntament amb la pellofa abans de ser processat.
- Vi blanc, s'elabora tant amb raïm blanc com negre. A diferència de la fabricació del vi negre, el vi blanc no pateix una fermentació prèvia sinó que es processa directament separant la pellofa del most per evitar-ne la coloració.
- Vi blanc escumós on a Espanya es denomina cava procedent de vinyes del Penedès situades a Catalunya. El procediment d'elaboració és el mateix que el del vi blanc però amb una segona fermentació addicional en ampolla on s'allibera anhídrid carbònic o gas que caracteritza el cava.

En referència a la composició de polifenols, no existeix una única xifra que englobi a totes les varietats de vi degut a que la composició exacta de polifenols del vi està condicionada per múltiples factors: clima, varietat de raïm, temps de fermentació, etc (Singleton i Trousdale, 1983). El raïm del qual s'origina el vi conté, en essència, polifenols no flavonoides en la polpa i polifenols flavonoides en la pellofa i llavor. Per tant, depenent de si la pellofa i la llavor del raïm es fermenten o no, hi haurà presència o absència de polifenols tipus flavonoides tenint vi negre o vi blanc, respectivament.

En el vi blanc i cava els polifenols predominants són la família dels no flavonoides com el resveratrol i l'àcid caftàric. En canvi, el vi negre tot i tenir certs polifenols no flavonoides com el resveratrol i l'àcid gàl·lic es compon, bàsicament, de flavonoides amb flavonols (quercitines), flavanols (catequina, epicatequina i proantocianidines o tanins condensats) i d'antocianines que representen una font important de polifenols procedents de la fermentació de la pellofa i llavors del raïm (Ibern-Gomez et al., 2002). Per tant, el vi negre conté un nivell alt en polifenols respecte el vi blanc o cava que es considera un contingut polifenòlic intermig degut a la presència de polifenols tipus flavonoides en el vi negre (**Taula 10**). En quan a les begudes destil·lades com la ginebra el seu contingut seria al voltant de zero.

Beguda alcohòlica	Polifenols (mg àcid gàl·lic/L)
Vi Negre	1848-2315
Vi Blanc/Cava	143-350
Ginebra	~ 0

Taula 10. Contingut de compostos polifenòlics de certes begudes alcohòliques.

5.2.2. Cacao: origen i contingut polifenòlic

El cacao (*Theobroma cacao*) són les llavors grasses, seques i parcialment fermentades del cacauer, arbre tropical natiu del sud-est de Mèxic. Els solubles de cacao és la pols seca que s'obté molent els grans i extraient-ne, total o parcialment, el greix o mantega de cacao.

El cacao i tots els derivats representen una font dietètica enriquida en polifenols, essencialment flavonoides, fins i tot major que el te o el vi negre segons Lee et al. (2003). En els solubles de cacao, els flavonoides més abundants són els flavanols catequina, epicatequina i els polímers derivats d'aquests monòmers anomenats procianidines com la B2 (Wollgast and Anklam, 2000; Hammerstone et al., 1999). No obstant, els flavonols (quercitina i isoquercitina) i flavones tot i tenir una menor presència també tenen una aportació destacable per al benefici de la salut (Andrés-Lacueva et al., 2000; Lamuela-Raventós et al., 2001; Sánchez-Rabaneda et al., 2003). Però cal recalcar que el contingut exacte de flavonoides del cacao, al igual que passa amb el vi, és molt difícil d'establir perquè depèn de múltiples factors: geografia, clima, procés d'elaboració, etc (Manach et al., 2004).

Enquestes realitzades a Europa confirmen un increment en el consum de cacao on el 58% de la població el consumeix en forma de xocolata amb llet seguit d'un 43% que el consumeix en forma de xocolata negra (Callebaut, 2000). Espanya és un dels països amb major consum de cacao i es situa en primera posició en referència al consum popular de cacao soluble dissolt en llet. Això explica la gran repercussió que tenen per a la població espanyola l'estudi dels possibles beneficis cardioprotectors dels solubles del cacao.

5.3. Polifenols i arteriosclerosi: efectes beneficiosos descrits

En els darrers anys, s'ha generat un gran interès en l'estudi dels polifenols de la dieta degut a seves propietats antioxidants, antimutagèniques, anticarcinogèniques i antiinflamatòries exercint un possible efecte beneficiós en la prevenció de diverses patologies com CVD, malalties neurodegeneratives i càncer (Scalbert et al., 2005).

Cada vegada existeixen més evidències que, globalment, els polifenols exerceixen un efecte protector sobre el sistema cardiovascular i redueixen el risc de patir CVD com l'arteriosclerosi (Curin i Andriantsitohaina, 2005; Vita, 2005; Zern i Fernandez, 2005). Una àmplia gamma d'estudis epidemiològics avalen l'existència d'una correlació negativa entre el consum d'aliments rics en polifenols (com el te, el vi i el cacau) i la incidència de CVD (Renaud i de Lorgeril, 1992; Nakachi et al., 2000; Osakabe et al., 2000; Rein et al., 2000; Sazazuki et al., 2000; Sesso et al., 2003; Arts i Hollman, 2005).

Cal destacar els estudis relacionats amb el consum de polifenols presents en begudes alcohòliques com el vi negre on individus amb un consum moderat de vi negre tenen un risc cardiovascular inferior respecte els abstemis. Part d'aquest efecte cardioprotector és atribuïble a l'etanol per si mateix (veure **Apartat 4**) però, a més, el vi negre té un efecte beneficiós addicional atribuïble als polifenols que hi conté (Di Castelnuovo et al., 2002; Klatsky et al., 2003). Així, doncs, el consum d'aliments rics en polifenols podria tenir efectes relacionats amb una protecció efectiva sobre la salut, particularment en la prevenció de l'arteriosclerosi. En aquest sentit, en diferents estudis epidemiològics (evidències clíniques tant *in vitro* com en humans) s'ha vist una correlació estadísticament significativa entre el consum de flavonoides i reducció de mortalitat per cardiopatia isquèmica (Hertog et al., 1993, Knekt et al., 1996), però encara existeixen dubtes sobre les bases científiques responsables d'aquest benefici potencial per a la salut.

En resum, hi han moltes evidències epidemiològiques dels possibles beneficis dels polifenols procedents de la dieta per a la salut cardiovascular però cal realitzar estudis prospectius i controlats en humans, com els realitzats en la present Tesi Doctoral, per reafirmar les dades obtingudes en aquests estudis epidemiològics.

5.4. Mecanismes fisiopatològics dels polifenols en la prevenció de l'arteriosclerosi

En estudis recents s'ha fet èmfasi en la descripció dels mecanismes d'acció dels polifenols implicats en la prevenció de l'arteriosclerosi, els quals estan relacionats principalment amb un efecte antioxidant, millora de la funció endotelial, efecte antiplaquetari, efecte antitrombòtic i efecte antiinflamatori detallats a continuació.

5.4.1. Polifenols i estrès oxidatiu

Els polifenols són compostos fitoquímics que tenen propietats d'antioxidants naturals perquè bloquegen e inactiven radicals lliures, s'associen amb les LDL evitant la formació de LDLox i regulen el NO. Per tant, els polifenols eviten processos d'oxidació relacionats amb estrès oxidatiu i contribuir així en l'efecte protector enfront CVD. Nombrosos estudis avalen aquest efecte antioxidant dels polifenols, sobretot, en relació amb els flavonoides (Osakabe et al., 2000; Nijveldt et al., 2001; Higdon i Frei, 2003).

5.4.2. Polifenols i funció endotelial

Diversos estudis han demostrat que les begudes que contenen flavonoides com el te, derivats del raïm i cacau tenen un efecte beneficiós sobre la funció endotelial:

- Duffy i col·laboradors (2001) van observar que el consum a curt i llarg termini de te (ric en polifenols com les catequines i les quercitines) millorava la funció endotelial en pacients amb CAD.
- Chou et al (2001) van observar que el consum de suc de raïm s'associava, també, a una millora de la funció en pacients amb CHD.
- Hodgson et al (2002) van demostrar que el consum diari de te negre durant 5 setmanes millorava la dilatació arterial i, per tant, millorava la funció endotelial.
- Heiss et al (2003) van observar una millora de la funció endotelial per increment de la dilatació en pacients amb risc cardiovascular després del consum de cacau ric en flavanols.

- Augment en l'activitat del NO i ,conseqüentment l'endoteli, vascular es relaxa i la pressió sanguínia disminueix en consumir flavonoides del cacau (Taubert et al., 2003; Sies et al., 2005).

5.4.3. Polifenols, funció plaquetar i trombosis

Un altre efecte cardioprotector dels polifenols consistiria en reduir l'activitat plaquetar mitjançant la inhibició de l'agregació plaquetària. Diversos estudis demostren que els flavonoides presents en begudes (te i derivats del raïm) i cacau inhibeixen la funció plaquetar (Rein et al., 2000; Duffy et al., 2001; Freedman et al., 2001; Hodgson et al., 2001; Murphy et al., 2003). També existeixen estudis que demostren un efecte antitrombòtic dels polifenols del vi negre (de Gaetano et al., 2002).

5.4.4. Polifenols i resposta inflamatòria

Arrel de la importància del protagonisme del procés inflamatori en l'arteriosclerosi (Libby et al., 2002), han augmentat les evidències d'estudis referents al possible efecte antiinflamatori dels compostos polifenòlics. Principalment, destaquen els següents estudis:

- El resveratrol, un polifenol present en raïm i vi, inhibeix *in vitro* tant l'expressió de molècules d'adhesió com l'adhesió dels monòcits a l'endoteli (Carluccio et al., 2003).
- Disminució de marcadors d'inflamació (molècules d'adhesió, citosines i hsCRP) i de l'adhesió de monòcits humans a una línia endotelial estimulada amb TNF- α després del consum de vi negre ric en polifenols en homes sans (Estruch et al., 2004; Badia et al., 2004).
- S'ha establert els efectes dels compostos polifenòlics (vi negre, oli d'oliva...) sobre la inactivació del NF- κ B (Blanco-Colio et al., 2000 i 2007; Surh et al., 2001; Carluccio et al., 2003), per tant, aquesta sèrie d'estudis suggereixen que els efectes antiinflamatoris dels polifenols són conseqüència de la supressió de l'activació del modulador transcripcional NF- κ B, el qual de retruc disminueix la producció de molècules d'adhesió i citosines implicades en el procés inflamatori.

- Els polifenols procedents del raïm tenen efectes beneficiosos sobre la inflamació a nivell de citosines (TNF- α i IL-6) en dones pre- i post-menopàusiques (Zern et al., 2005).

Actualment, és molt important la identificació de biomarcadors d'inflamació relacionats amb l'arteriosclerosi i, consegüentment, ha crescut l'interès en estudiar una nova línia d'investigació relacionada amb la determinació del nivell d'afectació d'aquests biomarcadors d'inflamació en consumir aliments amb contingut polifenòlic. En la present Tesi Doctoral s'estudia el possible efecte inhibidor dels polifenols presents en vi negre, vi blanc, cava i cacau sobre els biomarcadors d'inflamació que participen en la formació de la placa d'ateroma. Per tant, investigar el possible efecte cardioprotector i preventiu dels polifenols de la dieta sobre la resposta inflamatòria de la paret vascular que evitaria o enlentiria l'aparició i progressió de l'arteriosclerosi.

HIPÒTESIS

HIPÒTESI GENERAL

Nombrosos estudis epidemiològics han suggerit que una dieta rica en polifenols es beneficiosa per a la salut en reduir la incidència de càncer, arteriosclerosi i malalties degeneratives. Aquest efecte saludable dels polifenols podria ser atribuïble a diversos mecanismes relacionats amb una propietat antioxidant, vasomotora i antiinflamatòria d'aquestes molècules.

Components de la dieta rics en polifenols com les begudes alcohòliques (vi i cava) o aliments (cacau) poden alterar la resposta inflamatòria com ara les molècules d'adhesió, citosines, etc., implicades en el desenvolupament de l'arteriosclerosi. En conseqüència, se'n derivarà un efecte antiinflamatori en la paret vascular interferint en les interaccions leucòcit-endoteli. Aquest efecte antiinflamatori esdevindrà més o menys intens depenent de la quantitat de polifenols consumits en la dieta.

HIPÒTESIS CONCRETES

1. El consum moderat de begudes alcohòliques (20g/dia) amb un contingut polifenòlic elevat (vi negre) o moderat (vi blanc) en dones fèrtils i sanes amb baix risc cardiovascular s'associarà amb una reducció en les molècules d'adhesió (limfocitàries, monocitàries i endotelials), citosines i altres marcadors d'inflamació que participen en la formació de la placa d'ateroma.
2. Les alteracions fenotípiques descrites s'associaran a defectes funcionals manifestant-se com una reducció en l'adhesió monòcit-endoteli després del consum moderat de beguda alcohòlica amb polifenols. Probablement, l'efecte serà més intens després de consumir la beguda alcohòlica amb major contingut polifenòlic, és a dir, el vi negre.
3. El consum moderat de begudes alcohòliques (30g/dia) amb contingut polifenòlic mig (cava) o sense (ginebra) en homes sans amb baix risc cardiovascular es correlacionarà amb una reducció en els marcadors d'inflamació com les molècules d'adhesió i les citosines que participen en la formació de la placa d'ateroma. El cava, probablement, exercirà un major efecte respecte a la ginebra degut a la presència de polifenols en el cava.

4. El consum agut de solubles de cacau (40g), un aliment ric en polifenols, en individus sans amb baix risc cardiovascular reduirà l'activació del factor de transcripció NF- κ B i, conseqüentment, els nivells de molècules d'adhesió solubles que participen en la formació de la placa d'ateroma. Probablement, podrà haver diferències entre els efectes quan els solubles de cacau es consumeixen diluïts en aigua o llet.

OBJECTIUS

OBJECTIUS GENERALS

L'arteriosclerosi és una malaltia inflamatòria de baixa intensitat, la present Tesi Doctoral té com a objectiu estudiar la capacitat dels compostos polifenòlics procedents de la dieta en la modulació dels mecanismes inflamatoris implicats en la formació de la placa d'ateroma. Amb aquesta finalitat, s'han seleccionat individus sans amb baix risc vascular per sotmetre'ls a una intervenció amb productes naturals que contenen polifenols (vi negre, vi blanc, cava o solubles de cacau) per veure el seu efecte en els biomarcadors inflamatoris predictius d'arteriosclerosi en els quals la dieta i exercici estan controlats.

OBJECTIUS CONCRETES

1. Analitzar l'efecte del consum moderat de 20g d'alcohol al dia durant un període de 4 setmanes en forma de vi negre o vi blanc sobre els marcadors d'inflamació que participen en la interacció leucòcits-endoteli en dones fèrtils, sanes i amb baix risc cardiovascular. En concret s'analitzarà:
 - L'expressió de molècules d'adhesió (LFA-1, VLA-4 i SLe^X) i CD40 en la superfície de limfòcits T circulants.
 - L'expressió de molècules d'adhesió (LFA-1, VLA-4, Mac-1 i SLe^X), MCP-1 i CD40 en la superfície de monòcits circulants.
 - La concentració de molècules d'adhesió endotelials solubles (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina), citosines proinflamatòries (IL-6) i altres paràmetres d'inflamació (hsCRP i CD40L).
 - Determinar la capacitat d'adhesió de monòcits humans, extrets abans i després del consum moderat de vi negre i blanc, sobre una monocapa de EC (Ea.hy926) en situació basal i sota estimulació amb TNF- α .

2. Analitzar l'efecte del consum moderat de 30g d'alcohol al dia durant un període de 4 setmanes en forma de cava o ginebra sobre els marcadors d'inflamació que participen en la interacció leucòcits-endoteli en homes sans i amb baix risc cardiovascular. En concret s'analitzarà:
 - L'expressió de molècules d'adhesió (LFA-1, VLA-4 i SLe^x) i CD40 en la superfície de limfòcits T circulants.
 - L'expressió de molècules d'adhesió (LFA-1, VLA-4, Mac-1 i SLe^x) i CD40 en la superfície de monòcits circulants.
 - La concentració de molècules d'adhesió endotelials solubles (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina), citosines (IL-6, TNF- α), quimiosines (MCP-1) i altres paràmetres d'inflamació (hsCRP i CD40L).

3. Analitzar l'efecte del consum agut de 40g de solubles de cacau diluïts en aigua o llet en individus amb baix risc cardiovascular sobre:
 - L'activació del factor de transcripció NF- κ B.
 - La concentració de molècules d'adhesió endotelials solubles: ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina regulades per NF- κ B.

RESULTATS

TREBALL 1

**Down-regulation of Adhesion Molecules and
Other Inflammatory Biomarkers after Moderate
Wine Consumption in Healthy Women. A
Randomized Trial**

Sacanella E, Vazquez-Agell M, Mena MP, Antúñez E, Fernández-Solá J, Nicolás JM, Lamuela-Raventós RM, Ros R and Estruch R.

Am J Clin Nutr 2007;86:1463-9.

Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial¹⁻³

Emilio Sacanella, Mònica Vázquez-Agell, Mari Pau Mena, Emilia Antúnez, Joaquim Fernández-Solá, José Maria Nicolás, Rosa M Lamuela-Raventós, Emilio Ros, and Ramón Estruch

ABSTRACT

Background: Moderate alcohol consumption is cardioprotective. The mechanism for this beneficial effect might be reduced inflammatory responses, as suggested by prospective studies and small clinical trials in men. No studies have evaluated the antiinflammatory effects of wine in women.

Objective: We investigated whether low-dose intake of white and red wines has differential effects on inflammatory markers in women.

Design: In a crossover study, we randomly assigned 35 healthy women to two 4-wk periods of 20 g ethanol/d as white or red wine, preceded by two 4-wk washout periods. Before and after interventions, we measured serum lipids, circulating inflammatory biomarkers, cellular adhesion molecules (CAMs), and adhesion of monocytes to stimulated endothelial cells.

Results: HDL cholesterol increased, and the serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein, intercellular adhesion molecule-1, CD40L, and interleukin-6 decreased after either wine ($P < 0.01$, all). Vascular CAM-1 and E-selectin decreased ($P < 0.01$) only after red wine. CAM expression by mononuclear cells was blunted after either wine, with a greater suppressant effect of red wine. Enhanced adhesion of monocytes to stimulated endothelial cells was reduced by 51% (95% CI: -57%, -45%) after white wine and by 89% (95% CI: -96%, -82%) after red wine ($P = 0.01$ for between-wine differences).

Conclusions: Moderate wine consumption is associated with beneficial effects on various inflammatory pathways related to endothelial activation in women. Probably because of its higher polyphenol content, red wine shows superior antiinflammatory effects than does white wine. Reducing low-grade inflammation and endothelial activation may be another potential mechanism by which alcoholic beverages exert their cardioprotective effect. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1463-9.

KEY WORDS Inflammatory biomarkers, endothelium, adhesion molecules, wine, polyphenols

INTRODUCTION

The protective effect of moderate alcohol consumption against ischemic heart disease (IHD) has been established in many epidemiologic studies (1-5). Because only one-half of this protective effect may be attributed to the increase in serum HDL

cholesterol observed in moderate alcohol drinkers (3), mechanisms other than lipid effects may be involved in the association between moderate alcohol consumption and reduced IHD rates (2, 6, 7). The atherosclerotic process underlying IHD is currently considered an inflammatory disease (8). Findings from large cohort studies suggest that moderate alcohol consumption is associated with a reduction in serum inflammatory biomarkers (7, 9-12). In addition, clinical trials in men have shown a reduction of both circulating markers of inflammation and monocyte adhesion to endothelial cells after daily intake of 30 g alcohol as red wine (13, 14). It is unknown, however, whether in women doses of alcohol lower than those considered safe in men taken as wine are sufficient to elicit antiinflammatory effects similar to those observed in men. Therefore, we performed a randomized crossover study in women to evaluate the effects of moderate consumption (20 g alcohol/d) of 2 alcoholic beverages with high (red wine) or low (white wine) polyphenol content, respectively, on inflammatory markers associated with endothelial dysfunction and on monocyte adhesion to endothelial cells.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

Thirty-six healthy female employees of our institution who reported an average daily ethanol intake ranging from 10 to 20 g during the past 5 y were recruited into a protocol approved by the institutional review board and gave informed consent. Eligibility criteria were age of 20-50 y; absence of family history of premature IHD; no tobacco smoking, hypertension, or diabetes mellitus; LDL cholesterol < 160 mg/dL; and HDL cholesterol > 35

¹ From the Department of Internal Medicine, Hospital Clinic (ES, EA, JF-S, JMN, RE), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) (MV and MPM), Department of Nutrition and Food Science, CeRTA, Pharmacy School (RML-R), Lipid Clinic (ER), Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

² Supported by grants from the Spanish Ministries of Education and Science (VINO1-006) and Health (PI020611, PI041837, G03/140, and CB06/03), and CIBER 06/03 Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III (ES, EA, JF-S, JMN, ER, and RE).

³ Address reprint requests to E Sacanella, Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: esacane@clinic.ub.es.

Received December 28, 2006.

Accepted for publication June 9, 2007.

TABLE 1
Characteristics of study group¹

	Value
Age (y)	38.0 ± 8.5
Body weight (kg)	63.3 ± 9.9
BMI (kg/m ²)	23.9 ± 3.8
Systolic blood pressure (mm Hg)	104.2 ± 12.0
Diastolic blood pressure (mm Hg)	71.2 ± 5.2
Glucose (mg/dL)	85.1 ± 7.1
Lipids (mg/dL)	
Total cholesterol	211.3 ± 37.7
HDL cholesterol	52.7 ± 10
LDL cholesterol	128.5 ± 32.9
Triacylglycerols	74.8 ± 43.9
Serum biomarkers	
hsCRP (mg/L)	1.88 ± 1.43
Interleukin-6 (pg/mL)	3.85 ± 3.06
VCAM-1 (ng/mL)	1146 ± 288
ICAM-1 (ng/mL)	405 ± 271
E-selectin (ng/mL)	241 ± 214
P-selectin (ng/mL)	386 ± 138
CD40L (ng/mL)	46.5 ± 20.3

¹ All values are $\bar{x} \pm SD$. $n = 35$. hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; VCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1; ICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1.

mg/dL. None of the women was taking oral contraceptives, medication of any sort, or vitamin supplements. The reported prior intake of alcohol was 7.8 ± 6.3 g/d during a period of 16 ± 12 y. Participants received free wine but no monetary compensation. The baseline characteristics of the participants are shown in **Table 1**.

Study design

The study was an open, randomized crossover trial. To equilibrate hormonal influences on adhesion molecules, all biological measurements were performed on the first day of the menstrual cycle. The study design included a 4-wk run-in period (coinciding with the menstrual cycle) during which all subjects abstained from alcohol and consumed a prescribed Mediterranean-type diet with average energy intake as 20% protein, 47% carbohydrate, and 33% fat (8% saturated fatty acids, 20% monounsaturated fatty acids, and 5% polyunsaturated fatty acids). After this period, participants were individually randomly assigned in a crossover design between 2 isocaloric diet sequences for 4-wk periods, containing either red wine or white wine. Between the first and second wine sequence, there was a 4-wk washout period with alcohol abstention. All subjects received daily doses of 20 g ethanol as red wine or white wine (1 glass of 100 mL at lunch and at dinner). Dietary habits and physical activity were monitored before and at the end of each intervention treatment, when body weight and blood pressure were measured and blood and urine samples were collected.

Wine polyphenol content

Red and white wines were obtained from Tempranillo and Xarello grapes, with an alcoholic strength of 13.5% and 13%, respectively. The selection of wines was based on the wine's polyphenol content, which was determined by HPLC as described (15). The total polyphenol, resveratrol, and anthocyanin contents of red wine were 1945 mg/L, 12.8 mg/L and 164.85

mg/L, respectively. White wine provided 308 mg/L polyphenols and 1.3 mg/L resveratrol, and anthocyanin was below detection limits.

Diet and exercise monitoring

The background diets were designed according to the subject's personal preferences. Consumption of dispensable foods rich in polyphenols or other potent antioxidants, such as onions, virgin olive oil, and green and black tea, was discouraged. Other foods with a high content in polyphenols, ascorbic acid, α -tocopherol, or β -carotene, such as cocoa, chocolate, orange and tomato juices, nuts, some fruit (oranges, lemons, strawberries, grapes, melon, apples, and apricots), some vegetables (spinach, turnips, carrots, parsley, peppers, garlic, and tomatoes), and soybean products were restricted. Natural foods rich in antioxidants, especially fruit and vegetables, were controlled so that individual diets had similar antioxidant content throughout the study.

Diet compliance was assessed from 3-d diet records administered by the same trained physician before and after each intervention (2 washout periods and 2 intervention treatments). These questionnaires were previously validated in our population (16). Foods were converted to nutrients by using the PROFESSIONAL DIET BALANCER software (Cardinal Health Systems Inc, Edina, MN). Physical activity was monitored with the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire, which has also been validated in Spain (17). At the end of the study, a clinician assessed any adverse effects from the interventions by administering a checklist of symptoms, including bloating, fullness, or indigestion; altered bowel habit; dizziness; and other symptoms possibly associated with wine intake.

Laboratory measurements

Fasting blood samples and a spot urine specimen were obtained at the end of each 4-wk period (run-in, first wine, washout, and second wine). Blood lipid measurements and immunophenotyping of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were performed immediately. Serum and EDTA-plasma samples were stored at -80°C for analysis of inflammatory and cell adhesion molecules at the end of the study. Cholesterol and triacylglycerols were measured with the use of enzymatic procedures. HDL cholesterol was quantified after precipitation with phosphotungstic acid and magnesium chloride. Analyses determined by subject in frozen samples of whole serum or plasma as appropriate were homocysteine by fluorescence polarization immunoassay; high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) by particle-enhanced immunonephelometry; and interleukin-6, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-selectin, P-selectin, and CD40L by standard enzyme-linked immunosorbent assay (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Intraassay and interassay CVs for hsCRP, interleukin-6, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, and CD40L ranged from 1.8% to 5.4% and 0.9% to 9.9%, respectively.

All analyses were done in duplicate. As a measure of intervention compliance, urinary resveratrol metabolites and anthocyanins were measured by HPLC before and after each intervention, as previously reported (18, 19).

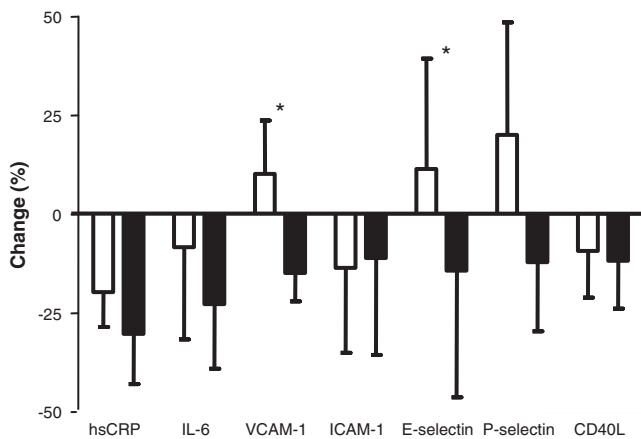


FIGURE 1. Changes from baseline in circulating adhesion and inflammatory molecules after intake of white wine (□) and red wine (■) in healthy women ($n = 35$). Error bars are 95% CIs. hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL-6, interleukin-6; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1. *Significant differences ($P < 0.007$) between effects of white wine and red wine by repeated-measures ANOVA.

PBMC immunophenotyping

PBMCs were obtained from whole blood by the Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) method (20). To measure PBMC expression of cell adhesion molecules (CAMs), a double direct immunofluorescence test was performed with commercial fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. Data analyses were performed with a FACScan Clinical Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) with the use of CELLQUEST software (version 7.5.3; Becton Dickinson, Aoust, Belgium). The following CAMs were measured: very late activation antigen-4 (VLA-4; anti-CD49d; Clone 44H6; Cytogmos, Barcelona, Spain), lymphocyte function-associated antigen-1 (anti-CD11a; Clone R7.1; Bender MedSystems), α M β 2 (Mac-1; anti-CD11b; Clone LM2/1; Bender MedSystems), and Sialyl-Lewis X (anti-CD15s, Clone CSLEX1; BD Biosciences, San Jose, CA).

We also measured the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (Pharming, San Diego, CA) and CD40 on the cell surface. Monocytes and T lymphocytes were identified with the use of anti-CD14 and anti-CD2 monoclonal antibodies (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), respectively.

Monocyte-endothelium adhesion assay

After obtaining a suspension of PBMCs with the Ficoll-Hypaque method, cells were labeled with microbeads (monoclonal antibodies bound to magnetic particles) and were submitted to a magnetic field, which resulted in the isolation of an enriched monocyte population ($>95\%$ CD14⁺ cells, as assessed by flow cytometry). Cell viability was determined by the Trypan blue dye exclusion test (Sigma-Aldrich, Irvine, CA). The endothelial cell line used was Ea.hy926, which is a fusion product between the human umbilical vein endothelial cell line and the epithelial cell line A549, and was processed as previously reported (14). Endothelial Ea.hy926 cell monolayers were grown to confluence in 96-well tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). The endothelium adhesion assay was performed under nonstimulated and stimulated conditions [human recombinant tumor necrosis

factor- α (TNF- α) 10 ng/mL]. We added 1.5×10^5 human monocytes/well (30 min at 37 °C) to allow the adhesion. After that, nonadherent cells were removed by aspiration, and the wells were washed. Adherent cells were fixed and stained with 0.2% crystal violet in 20% methanol in phosphate-buffered saline for 20 min and were washed repeatedly with distilled water. After solubilization with 1% sodium dodecyl sulfate, adhesion was measured in units of absorbance with a spectrophotometer at a wavelength of 600 nm (Multiskan RC ThermoLabsystems, Helsinki, Finland). The adhesion assay, for each subject and condition, was performed in quadruplicate.

Statistical analyses

For a crossover design, statistical power calculations indicated that to detect mean differences of 10 mean fluorescence intensity in VLA-4 in monocytes with a conservative SD of 10 mean fluorescence intensity (13), 32 subjects per group would need to complete the study (α risk = 0.05; power = 0.8). Although the VLA-4 adhesion molecule measurement was used to set sample size, changes in all endpoints were of equal interest in this study. Descriptive statistics with means and SDs were used for the baseline characteristics of the participants. Values with a skewed distribution (hsCRP, VCAM-1, ICAM-1, and interleukin-6) were transformed to their ln for analyses. Changes in clinical outcomes were assessed with repeated-measures analysis of variance with 3 factors: wine (red wine compared with white wine), time (before compared with after intervention), and wine sequence. Treatment (wine) and time were factors with repeated measures. No carryover effect between wine treatments (period sequence) was found for any variable. Therefore, final analyses were performed with repeated-measures analysis of variance for the 2 factors wine and time and their interactions. Within- and between-group differences are expressed as means and 95% CIs. All statistical tests were 2-tailed, and the significance level was 0.05. Analyses were performed with the use of SPSS, version 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTS

Patient characteristics and diets

Of the 36 participants randomly assigned to intervention, 35 completed all study periods. One woman withdrew before completing the 2 phases of the study. Her baseline characteristics were similar to those of the overall group. The women who finished the trial had a mean age of 38 y (range: 23–50 y). Seventeen participants consumed first red wine for 4 wk and after the washout period switched to white wine for the ensuing 4 wk, whereas 18 subjects followed the same interventions in reverse order.

According to participants' reports and recounts of empty bottles, compliance with intake of both red and white wines was 100%. As an objective measure of intervention compliance, resveratrol metabolites were measured in urine. As expected, urine concentration of total resveratrol metabolites (*cis*- and *trans*-resveratrol glucuronides) increased from 51.2 ± 30.3 to 262.7 ± 76.4 nmol/g (mean change: 211.0 nmol/g; 95% CI: 168.1, 253.9; $P = 0.001$) at the end of the white wine period compared with its correspondent washout period. In addition, a significant increase from 49.5 ± 35.0 to 604.0 ± 425.6 nmol/g (mean change: 554.5 nmol/g; 95% CI: 229.1, 879.9; $P = 0.005$) was also observed in

TABLE 2

Mean fluorescence intensity of adhesion molecule and chemokine expression on T lymphocytes and monocytes before and after each intervention¹

	Before intervention (n = 35)	After intervention (n = 35)	Differences ²	P for treatment ³	P for time ⁴	P for interaction ⁵
Lymphocytes						
LFA-1						
White wine	126.4 ± 35.6 ⁶	122.9 ± 31.2	-3.4 (-14.9, 8.1) ⁷	0.514	0.457	0.900
Red wine	131.2 ± 33.6	129.8 ± 37.5	-1.4 (-11.2, 8.4)			
VLA-4						
White wine	28.2 ± 5.7	26.8 ± 4.6	-1.3 (-3.1, 0.48)	0.958	0.040	0.726
Red wine	28.4 ± 4.0	26.8 ± 4.3	-1.6 (-3.2, -0.10)			
CD40						
White wine	21.2 ± 9.2	19.1 ± 6.5	-2.1 (-5.4, 1.2)	0.720	0.484	0.716
Red wine	20.8 ± 7.9	20.5 ± 8.6	-0.4 (-3.8, 3.0)			
Syalil-Lewis						
White wine	16.8 ± 7.2	15.1 ± 5.2	-1.8 (-4.0, 0.46)	0.900	0.010	0.369
Red wine	17.7 ± 7.9	14.0 ± 4.9	-3.7 (-6.4, -1.0)			
Monocytes						
LFA-1						
White wine	131.6 ± 29.1	127.1 ± 33.6	-4.4 (-15.5, 6.6)	0.345	0.001	0.002
Red wine	139.9 ± 36.4	112.4 ± 28.0	-27.5 (-39.3, -15.7)			
Mac-1						
White wine	69.9 ± 22.6	60.6 ± 18.2	-9.3 (-16.7, -1.8)	0.116	0.002	0.998
Red wine	66.0 ± 20.1	55.7 ± 18.3	-10.3 (-18.3, -2.3)			
VLA-4						
White wine	42.0 ± 16.2	35.5 ± 12.1	-6.6 (-12.6, -0.46)	0.059	0.004	0.814
Red wine	37.4 ± 16.7	31.3 ± 6.30	-6.1 (-11.7, -0.38)			
CD40						
White wine	43.4 ± 21.1	35.2 ± 17.7	-8.2 (-17.1, 0.62)	0.211	0.017	0.409
Red wine	42.4 ± 20.7	30.6 ± 15.4	-11.8 (-20.9, -2.8)			
Syalil-Lewis						
White wine	59.6 ± 23.3	53.6 ± 24.2	-6.0 (-17.9, 5.9)	0.007	0.007	0.020
Red wine	61.1 ± 28.3	40.7 ± 15.8	-20.6 (-31.0, -10.3)			
MCP-1						
White wine	99.8 ± 51.3	81.9 ± 45.6	-17.9 (-39.8, 4.0)	0.831	0.020	0.701
Red wine	99.6 ± 49.7	76.7 ± 48.1	-22.9 (-44.1, -1.6)			

¹ LFA-1, lymphocyte function-associated antigen 1; VLA-4, very late activation antigen 4; Mac-1, αMβ2; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1.

There were no significant differences between the 2 groups before the intervention.

² Before and after intervention.³ Comparison between white and red wines (repeated-measures ANOVA).⁴ Comparison between before and after intervention (ANOVA).⁵ Comparison between measures obtained before and after intervention with white and red wines (ANOVA).⁶ $\bar{x} \pm SD$ (all such values).⁷ \bar{x} ; 95% CI in parentheses (all such values).

these metabolites after the red wine period in comparison to its correspondent washout period. The differences between the changes observed in urinary resveratrol concentrations after intakes of white and red wines significantly favored red wine ($P = 0.005$). In addition, urinary anthocyanin concentrations were measured, as a measure of red wine intake, which increased a mean of 0.077 ng malvidin glycoside/mg creatinine (95% CI: 0.015, 0.140 ng malvidin glycoside/mg creatinine) during red wine intake ($P = 0.02$), whereas it remained practically unchanged after white wine intake, with a mean change of 0.0002 ng malvidin glycoside/mg creatinine (95% CI: -0.0003, 0.0008 ng malvidin glycoside/mg creatinine).

The energy, nutrient, and antioxidant vitamin contents of the self-reported diets were close to that of the planned diets. No consumption of discouraged polyphenol-rich foods was reported. Nutrient intake was similar in all study phases (data not shown). Participants reported no adverse effects during the wine consumption periods. The average daily energy expended in

physical activity was similar throughout the study. No weight or blood pressure changes were observed (data not shown).

Changes in lipids, homocysteine, and soluble inflammatory markers

In comparison with baseline, red wine and white wine intakes produced a significant increase in serum HDL cholesterol with a mean change of 6.7 mg/dL (95% CI: 0.5, 12.8 mg/dL) and 2.8 mg/dL (95% CI: 0.2, 5.3 mg/dL), respectively ($P = 0.034$; both). However, no significant differences were observed between the effects of both interventions on mean serum HDL cholesterol (3.9 mg/dL; 95% CI: 2.2, 10.0 mg/dL; $P = 0.202$). No changes were observed in other lipid values. However, homocysteine serum concentration showed an imperceptible mean increase of 0.008 $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: -0.50, 0.52 $\mu\text{mol/L}$; $P = 0.97$) after the white wine intake and a not significant decrease of 0.22 $\mu\text{mol/L}$ (95% CI: -0.85, 0.41 $\mu\text{mol/L}$; $P = 0.47$) after the red wine period.



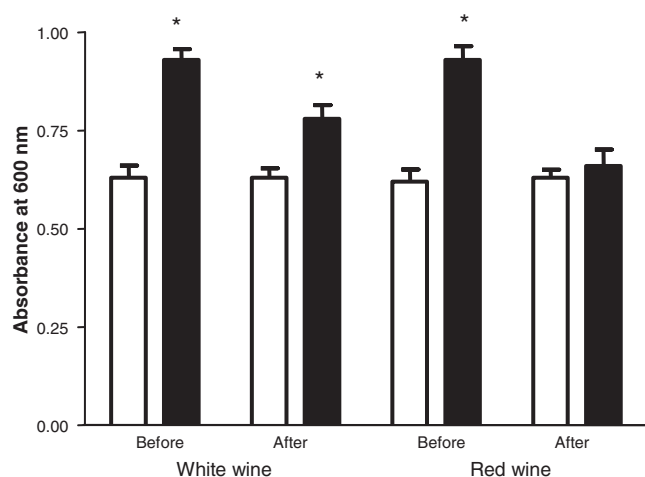


FIGURE 2. Changes in monocyte adhesion to unstimulated (□) and tumor necrosis factor- α (TNF- α)-stimulated (■) endothelial cells (Ea.hy926 line) before and after white wine and red wine in healthy women ($n = 35$). Noticeably, unlike the situation with white wine, adhesion of monocytes to stimulated endothelial cells was similar to that observed in unstimulated conditions after red wine (ie, monocytes were little activated only after red wine). Error bars are 95% CIs. *Significant differences ($P < 0.001$) between unstimulated and TNF- α -stimulated endothelial cells by paired Student's t test.

Changes in circulating concentrations of inflammatory markers are shown in **Figure 1**. hsCRP, interleukin-6, ICAM-1, and CD40L decreased significantly ($P < 0.05$) from 12% to 29% after the white wine intake, whereas hsCRP, interleukin-6, VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin, and CD40L were significantly ($P < 0.05$) reduced from 17% to 39% after the red wine intake. Significant differences were observed in the effects of the 2 interventions on VCAM-1 and E-selectin, with mean changes after the red wine above those observed after the white wine of -25% (95% CI: -42% , -10% ; $P = 0.007$) and -39% (95% CI: -72% , -8% ; $P = 0.005$), respectively.

Adhesion molecule expression by PBMCs

The changes in PBMC expression of CAMs and related proteins are shown in **Table 2**. After the red and white wines, the mean expression of VLA-4 and Syalil-Lewis on lymphocyte surface membranes decreased by 10% and 18% ($P < 0.05$, both) and 5% and 6% (NS), respectively. On monocyte membranes, the mean expression of Mac-1, VLA-4, monocyte chemoattractant protein-1, and CD40 decreased between 13% and 28% after

both interventions ($P < 0.02$, all). Lymphocyte function-associated antigen-1 and Syalil-Lewis expression, however, decreased only after the red wine intake (20% and 33%, respectively; $P < 0.001$, both).

Monocyte adhesion to endothelial cells

As expected, after the run-in and washout periods monocyte adhesion to the TNF- α -stimulated endothelial cells increased similarly by 46% (95% CI: 38%, 55%; $P < 0.001$) and 48% (95% CI: 39%, 51%; $P < 0.001$), respectively. The results were different after wine intake. Thus, with consumption of white wine, monocyte adhesion to TNF- α -stimulated endothelial cells increased only by 24% (95% CI: 17%, 28%; $P < 0.001$), whereas no significant changes occurred with red wine (5%; 95% CI: -4% , 13%); $P = 0.17$) (**Figure 2**). Compared with data obtained at baseline, white and red wine intakes decreased monocyte adhesion to TNF- α -stimulated endothelial cells by 51% (95% CI: -57% , -45% ; $P < 0.001$) and 89% (95% CI: -96% , -82% ; $P < 0.001$), respectively. Regarding effects of wine intake on monocyte adhesion to stimulated endothelial cells, a significantly ($P = 0.010$) greater decrease was observed after the red wine than after the white wine (**Table 3**).

DISCUSSION

In this clinical trial performed in 35 healthy women, consumption of 20 g alcohol/d as red wine or white wine was associated with increased HDL cholesterol and decreases in serum inflammatory biomarkers, CAM expression on monocyte surface membranes, and monocyte adhesion to endothelial cells. Red wine was usually more potent than white wine to elicit such changes.

Many epidemiologic studies have related moderate alcohol consumption to reduced rates of cardiovascular morbidity and mortality (1, 3, 5). Part of these beneficial effects are attributed to alcohol-associated increases in both HDL cholesterol and fibrinolytic activity, as well as decreased platelet aggregation (2, 3), although other mechanisms may be involved (2). Thus, the results of prospective studies and clinical trials show that, compared with abstainers or heavy drinkers, moderate drinkers have lower serum concentrations of inflammatory markers, such as hsCRP and interleukin-6 (7, 9, 10, 12, 21). In small clinical trials, wine (13, 14) and beer (21) reduced circulating and cellular inflammatory molecules related to early stages of atheroma plaque formation. Suppression of the postprandial activation of transcription factor nuclear factor- κ B in circulating mononuclear cells by a single red wine drink was suggested to play a key

TABLE 3

Changes in monocyte adhesion to nonstimulated and tumor necrosis factor- α -stimulated endothelial cells (line Ea.hy926) associated with consumption of white wine and red wine in healthy women ($n = 35$)

	Before intervention ($n = 35$)	After intervention ($n = 35$)	Differences ¹	P for Treatment ²	P for Time ³	P for Interaction ⁴
White wine	0.31 (0.27, 0.34) ⁵	0.15 (0.12, 0.19)	-0.16 (-0.21 , -0.10)	0.005	<0.001	0.010
Red wine	0.29 (0.25, 0.34)	0.03 (-0.01 , 0.06)	-0.26 (-0.31 , -0.21)			

¹ Before and after intervention.

² Comparison between white and red wines (2-tailed paired Student's t test).

³ Comparison between before and after intervention (ANOVA).

⁴ Comparison between measures obtained before and after intervention with white and red wines (ANOVA).

⁵ \bar{x} ; 95% CI in parentheses (all such values).



role in this antiinflammatory effect (22). These beneficial effects on arterial wall inflammation-related processes add biological plausibility to the epidemiologic evidences supporting a cardioprotective effect of alcoholic beverages (23).

It is unclear, however, whether the beneficial effects of moderate alcohol consumption depend on sex, dose, or type of alcoholic beverage. Women appear to be more susceptible than men to alcoholic liver injury (24), brain disorders (25), and cardiomyopathy (26). Accordingly, a threshold of moderate ethanol consumption lower than that stipulated for men has been defined for women (27). In the present study, we observed that 2 daily glasses of 100 mL wine during 4 wk reduced cellular and serum inflammatory biomarkers in women, in addition to decreasing monocyte adhesion to endothelial cells, the postulated first step in the atherosclerotic process (8). With respect to the alcohol dose that may be safe in women, we found that the lower dose (20 g/d) taken by women was associated with beneficial effects on atherosclerotic markers similar to those observed in men consuming higher doses (30 g/d). In fact, an updated meta-analysis of 34 prospective studies has shown that up to 2 drinks/d (20 g/d) are inversely associated with total mortality in women (28).

Whether the beneficial effects of alcohol depend on the type of alcoholic beverage consumed has been a matter of debate. Although prospective studies found no differences among different alcoholic beverages in protection against IHD (1) or reduction in circulating inflammatory markers (7), small clinical trials showed that polyphenol-rich red wine had higher antiinflammatory effects than did gin, which is devoid of polyphenols (13, 14). Red wine and white wine have equivalent ethanol content but dissimilar quantities of polyphenols. In our study red wine was associated with a greater reduction in inflammatory biomarkers, CAM monocyte expression, and monocyte adhesion to endothelial cells than was white wine, suggesting that the polyphenols in even small amounts of red wine are responsible in part for these beneficial effects.

However, although both wines decreased serum ICAM-1 concentrations, only red wine diminished serum concentrations of VCAM-1 and E-selectin. In fact, these adhesion molecules differ in their origin and regulation of expression. Although regulated by inflammatory cytokines, ICAM-1 is constitutively expressed by endothelial cells, whereas VCAM-1 and E-selectin are only expressed on activated endothelium. In addition, serum ICAM-1 may be synthesized by leukocytes and endothelial cells, whereas serum VCAM-1 and E-selectin are mainly synthesized by endothelium (29, 30). These differences may explain, at least in part, why the effects of red wine were different from those of white wine on serum inflammatory biomarkers.

Limitations

One limitation is the inherent difficulty in ensuring compliance with dietary instructions, wine intake, and overall lifestyle in free-living persons. This is particularly important in a study such as ours, because diet and exercise may modify the concentrations of inflammatory markers (31, 32). Nonetheless, adherence to the recommended diets and wine intake was good, as judged by self-reports and objective measurements, and physical activity remained constant throughout the study. However, real-life conditions may be considered a study's strength. Finally, we studied healthy women; thus, it is not possible to determine whether these salutary effects of moderate wine consumption against arterial wall inflammation are also applicable to women

at high cardiovascular risk, such as those who are postmenopausal.

From our data we cannot tell which alcoholic or nonalcoholic component of wine may be responsible for the antiinflammatory effects. In this sense, previous *in vitro* studies have shown that different red wine polyphenols induce down-regulation of ICAM-1 and VCAM-1, reduce adhesion of U937 monocytic cells to stimulated endothelium (33–35), prevent platelet-leukocyte interactions (36, 37), and inhibit the expression of matrix metalloproteinase-2, which is involved in atherosclerotic plaque growth and instability (38). In recent studies comparing the effects of red wine and gin (13, 14), we showed that both beverages (ie, ethanol itself) were associated with reduction of plasma fibrinogen, hsCRP, and interleukin-1 α , but polyphenol-rich red wine had the additional effect of decreasing monocyte CAM expression. Thus, both ethanol and nonalcoholic compounds appear to contribute to the antiinflammatory effects of alcoholic beverages.

Conclusions

The mechanisms underlying the cardioprotective effect of moderate alcohol consumption are probably multifactorial (6). Our results indicate that the beneficial effects of moderate wine consumption on the vascular system may be mediated, at least in part, by a reduction in circulating inflammatory molecules, adhesion molecule expression by peripheral monocytes, and monocyte adhesion to endothelium. These salutary effects are observed in women after consumption of lower doses of alcohol as wine than those showing similar benefit in men. In probable relation with its higher polyphenol content, red wine intake is associated with superior antiinflammatory effects than is white wine in women. The results provide additional information on the beneficial role of alcoholic beverages in the prevention of low-grade inflammation and endothelial dysfunction in the arterial wall in women.

We thank Fundación de Investigación sobre Vino y Nutrición (FIVIN) for their help in the selection of the red and white wines used in the study.

The author's responsibilities were as follows—ES, MV-A, EA, JF-S, JMN, and RE: conception and design; ES, MV-A, MPM, EA, JF-S, JMN, RL-R, ER, and RE: analysis and interpretation of the data; ES, MV-A, ER, and RE: drafting of the article; ES, MV-A, MPM, EA, JF-S, JMN, RL-R, ER, and RE: critical revision and final approval. None of the authors had a personal or financial conflict of interest.

REFERENCES

1. Gronbaek M, Becker U, Johansen D, et al. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Ann Intern Med* 2000;133:411–9.
2. Estruch R. Wine and cardiovascular disease. *Food Res Int* 2000;33:219–26.
3. Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL, et al. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993;329:1829–34.
4. Mukamal KJ, Jensen MK, Gronbaek M, et al. Drinking frequency, mediating biomarkers, and risk of myocardial infarction in women and men. *Circulation* 2005;112:1406–13.
5. Tolstrup J, Jensen MK, Tjonneland A, Overvad K, Mukamal KJ, Gronbaek M. Prospective study of alcohol drinking patterns and coronary heart disease in women and men. *BMJ* 2006;332:1244–8.
6. Lucas DL, Brown RA, Wassef M, Giles TD. Alcohol and the cardiovascular system research challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1916–24.
7. Imhof A, Woodward M, Doering A, et al. Overall alcohol intake, beer,

- wine, and systemic markers of inflammation in Western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *Eur Heart J* 2004;25:2092–100.
8. Hanson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95.
 9. Sacanella E, Badia E, Nicolas JM, et al. Differential effects of moderate or heavy alcohol consumption on circulating adhesion molecule levels. *Thromb Haemost* 2002;88:52–5.
 10. Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001;357:763–7.
 11. Pai JK, Hankinson SE, Thadhani R, Rifai N, Pischon T, Rimm EB. Moderate alcohol consumption and lower levels of inflammatory markers in US men and women. *Atherosclerosis* 2006;186:113–20.
 12. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 2003;107:443–7.
 13. Estruch R, Sacanella E, Badia E, et al. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis* 2004;175:117–23.
 14. Badia E, Sacanella E, Fernandez-Sola J, et al. Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cell after moderate alcohol consumption. *Am J Clin Nutr* 2004;80:225–30.
 15. Ibern-Gomez M, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM, Waterhouse AL. Rapid HPLC analysis of phenolic compounds in red wines. *Am J Enol Vitic* 2002;53:218–21.
 16. Schröder H, Covas MI, Marrugat J, et al. Use of a three-day estimated food record, a 72-hour recall and food frequency questionnaire for dietary assessment in a Mediterranean Spanish population. *Clin Nutr* 2001;20:429–7.
 17. Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish Men. MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol* 1994;139:1197–209.
 18. Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 2005;8:111–20.
 19. Zamora-Ros R, Urpi-Sala M, Lamuela-Raventós RM, et al. Diagnostic performance of urinary resveratrol metabolites as a biomarker of moderate wine consumption. *Clin Chem* 2006;52:1373–80.
 20. Sacanella E, Estruch R, Gaya A, et al. Upregulated expression of VLA proteins and CD29 in peripheral blood lymphocytes of chronic alcoholics without ethanol-related diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:371–5.
 21. Sierksma A, van der Gaag MS, Klufft C, Hendriks HF. Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:1130–6.
 22. Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, et al. Red wine intake prevents nuclear factor-kappa B activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 2000;102:1020–6.
 23. Lorgeril M, Salen P. Is alcohol anti-inflammatory in the context of coronary heart disease? *Heart* 2004;90:355–7.
 24. Morgan MY, Sherlock S. Sex-related differences among 100 patients with alcoholic liver disease. *BMJ* 1977;1:939–41.
 25. Mann K, Ackermann K, Croissant B, Mundle G, Nakovics H, Diehl A. Neuroimaging of gender differences in alcohol dependence: are women more vulnerable? *Alcoholism Clin Exp Res* 2005;29:896–901.
 26. Fernandez-Sola J, Estruch R, Nicolas JM, et al. Comparison of alcoholic cardiomyopathy in women versus men. *Am J Cardiol* 1997;80:481–5.
 27. Gunzerath L, Faden V, Zakhari S, Warren K. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Report on moderate drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:829–47.
 28. Di Castelnuovo A, Costanzo S, Bagnardi V, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Alcohol dosing and total mortality in men and women. *Arch Intern Med* 2006;166:2437–45.
 29. Coll-Vinent B, Vilardell C, Font C, et al. Circulating soluble adhesion molecules in patients with giant cell arteritis. Correlation between soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) concentrations and disease activity. *Ann Rheum Dis* 1999;58:189–92.
 30. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules, part II: blood vessels and blood cells. *N Engl J Med* 1996;335:43–5.
 31. Katja B, Tiina L, Veikko S, Pekka J. Associations of leisure time physical activity, self-rated physical fitness, and estimated aerobic fitness with serum C-reactive protein among 3803 adults. *Atherosclerosis* 2006;185:381–7.
 32. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Fung TT, et al. Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1029–35.
 33. Ferrero ME, Bertelli AE, Bertelli A. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1208–14.
 34. Koga T, Meydani M. Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001;73:941–8.
 35. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:622–9.
 36. Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, et al. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol* 1998;123:1691–9.
 37. Appeldoorn CM, Bonnefoy A, Lutters BHC, et al. Gallic acid antagonizes P-selectin-mediated platelet-leukocyte interactions. Implications for the French paradox. *Circulation* 2005;111:106–12.
 38. Oak MH, El Bedoui J, Anglard P, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type-1 matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004;110:1861–7.

RESULTATS CONCRETS:

1. 35 dones fèrtils i sanes sense factors de risc cardiovascular van completar l'estudi sense presentar efectes adversos durant els períodes d'intervenció amb vi i, a més, no es van detectar canvis en la dieta i en l'exercici durant les 4 fases de l'estudi.
2. El compliment de la intervenció va ser adequat i es va comprovar tant subjectivament (entrevista personal i recompte d'ampolles retornades) com objectivament (determinació de polifenols en orina després de cada intervenció).
3. El consum de vi blanc i vi negre provoca un increment significatiu dels nivells sèrics de colesterol-HDL amb una mitja de canvi de 2.8 mg/dL i 6.7 mg/dL, respectivament ($P=0.034$).
4. En limfòcits T, l'expressió de VLA-4 (10%) i SLe^x (18%) va disminuir significativament després del consum de vi negre ($P<0.05$).
5. En monòcits, l'expressió de Mac-1, VLA-4, MCP-1 i CD40 va disminuir entre un 13-28% en ambdues intervencions amb vi (negre i blanc) ($P<0.02$). Tanmateix, l'expressió de LFA-1 (20%) i SLe^x (33%) va disminuir només després de consumir vi negre ($P<0.001$).
6. Les concentracions de hsPCR, IL-6, ICAM-1 i CD40L van disminuir significativament entre un 12-29% després d'ambdues intervencions amb vi ($P<0.05$) però només VCAM-1, E i P-selectina van disminuir entre un 17-23% després de consumir vi negre ($P<0.05$).
7. Es va observar diferències significatives en els efectes de les 2 intervencions en VCAM-1 (-25%, $P=0.007$) i E-selectina (-39%, $P=0.005$) a favor del vi negre.
8. En comparació amb les dades obtingudes en el basal, l'adhesió monocitària després d'estimular les EC amb TNF- α es va reduir després del consum tant de vi blanc (51%, $P<0.001$) com vi negre (89%, $P<0.001$), no obstant, aquesta reducció va ser significativa únicament en vi negre ($P=0.01$).

TREBALL 2

Inflammatory Markers of Atherosclerosis Are Decreased after Moderate Consumption of Cava (Sparkling Wine) in Men with Low Cardiovascular Risk

Vazquez-Agell M, Sacanella E, Tobias E, Monagas M, Antúnez E, Zamora-Ros R, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Fernández-Solá J, Nicolás JM and Estruch R.

J Nutr. 2007;137:2279-2284.

Inflammatory Markers of Atherosclerosis Are Decreased after Moderate Consumption of Cava (Sparkling Wine) in Men with Low Cardiovascular Risk^{1,2}

Mónica Vázquez-Agell,^{3,4} Emilio Sacanella,^{3-5*} Ester Tobias,³ María Monagas,^{3,4} Emilia Antúnez,³⁻⁵ Raúl Zamora-Ros,⁶ Cristina Andrés-Lacueva,⁶ Rosa M^a Lamuela-Raventós,⁶ Joaquim Fernández-Solá,³⁻⁵ José M^a Nicolás,³⁻⁵ and Ramon Estruch³⁻⁵

³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona 08036, Spain; ⁴CIBER 06/03: Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid 28029, Spain; ⁵Department of Internal Medicine, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona 08036, Spain; and ⁶Department of Nutrition and Food Science-XaRTA, Pharmacy School, University of Barcelona, Barcelona 08007, Spain

Abstract

Atherosclerosis is considered a low-grade inflammatory disease. Polyphenol-rich alcoholic beverages (red wine) have shown a more pronounced antiinflammatory effect than polyphenol-free alcoholic beverages (gin). However, no studies to our knowledge have evaluated the antiinflammatory effects of alcoholic beverages with medium-level polyphenol content such as cava (sparkling wine). We enrolled 20 healthy men (aged 34 ± 9 y) in a randomized crossover study to receive 30 g ethanol/d as cava or gin for 28 d. Before both interventions, subjects abstained from alcohol for 2 wk. Inflammatory biomarkers of atherosclerosis and expression of adhesion molecules on peripheral leukocytes were measured before and after each intervention. Likewise, dietary intake and exercise were also evaluated. Expression of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), very late activation antigen-4 (VLA-4), Sialyl-Lewis^x (SLe^x), and CD40 on monocytes decreased after cava intake (all $P < 0.05$), whereas only SLe^x was reduced after gin intake ($P = 0.036$). Circulating markers of atherosclerosis including vascular cell adhesion molecule-1, E-selectin, and P-selectin decreased after both interventions (all $P < 0.05$). High-sensitivity C-reactive protein, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and CD40L were diminished only after cava intake (all $P < 0.05$). The effects of cava on circulating CD40L, ICAM-1, and MCP-1, and monocyte surface expression of CD40, LFA-1, and VLA-4 were greater than those of gin (all $P < 0.05$). In conclusion, both cava and gin showed antiinflammatory properties; however, cava had a greater protective effect, probably due its polyphenol content. *J. Nutr.* 137: 2279–2284, 2007.

Introduction

Many epidemiological studies involving subjects of different gender, race, and age have shown that moderate alcohol consumption is associated with a reduced risk of cardiovascular disease (1–4). Because part of the atheroprotective effects associated with moderate alcohol intake has been attributed to changes in serum lipoproteins, coagulation, and platelet aggregation, other alternative mechanisms have been proposed (5–7).

Up to the 1980s, atherosclerosis was considered to be the result of lipid accumulation in the arterial wall. Nonetheless, better knowledge of the atheroma plaque formation has led to

the conclusion that atherosclerosis is, indeed, a chronic low-grade inflammatory disease of the arterial wall (8). Large epidemiologic studies have reported a significant association between moderate alcohol consumption and lower levels of inflammatory biomarkers related to atherosclerosis (9–14), suggesting that antiinflammatory effects of alcoholic beverages may play a role in their protective effect against cardiovascular disease (15). Because this effect was independent of the type of alcoholic beverage (liquor, beer, and wine), some researches attributed this action to ethanol itself (16). However, other epidemiologic studies have found significant differences in the effects of wine and other alcoholic beverages on global mortality, cardiovascular mortality, and incidence of cancer, in favor of wine (17,18). The heterogeneity in the results obtained in these epidemiologic studies may be due to the fact that it is very difficult to adequately monitor diet and physical activity in such studies. Because almost all alcoholic beverages (some spirits, beer, and wine) contain ethanol and nonalcoholic compounds (mainly polyphenols), it seems

¹ Supported by the Spanish Ministries of Education and Science and Health (PI020611, PI041837, PI051519, G03/140, CB06/03, ALI/AGL 2006-14228-C03-02/01, and 2005-0559).

² Author disclosures: M. Vázquez-Agell, E. Sacanella, E. Tobias, M. Monagas, E. Antúnez, R. Zamora-Ros, C. Andrés-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, J. Fernández-Solá, J. M. Nicolás and R. Estruch, no conflicts of interest.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: esacane@clinic.ub.es.

difficult to differentiate the effects of both compounds in epidemiologic studies.

Other types of evidence may be obtained regarding the biologic plausibility of this hypothesis. Clinical trials measuring the effects of moderate alcoholic beverage intake in surrogate markers of atherosclerosis in humans may be used to explain the mechanisms by which alcoholic beverages could exert their positive effects. In this sense, previous studies have concluded that polyphenol-rich alcoholic beverages, such as red wine, exert a higher antiinflammatory effect than ethanol itself (19). However, up to now, no clinical trials to our knowledge have analyzed the effects of medium-level polyphenol-content beverages, such as cava (sparkling wine) compared with those observed after the administration of a polyphenol-free alcoholic beverage, such as gin. We embarked, therefore, upon a prospective, randomized crossover clinical trial to evaluate the effects of moderate intake of cava vs. gin on adhesion molecules, chemokines, and other inflammatory biomarkers related to the early stages of atherosclerosis.

Participants and Methods

Participants and study design. We selected 30 healthy men, between 25 and 50 y, who were working in the Department of Internal Medicine of our institution and reported a daily ethanol intake ranging from 10 to 30 g over the last 5 y. Five declined participation, 3 did not meet lipid criteria, and 2 suffered from hypertension. Thus, we finally included 20 volunteers who gave informed consent to a protocol approved by the Institutional Review Board of the Hospital Clinic. None reported any of the following exclusion criteria: diabetes mellitus, tobacco smoking, hypertension, LDL cholesterol levels > 4.14 mmol/L, HDL cholesterol levels < 1.04 mmol/L, coronary heart disease (CHD),⁷ family history of premature CHD, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease, HIV infection, alcoholic liver disease, malnutrition, or neoplastic or acute infection disease. In addition, no subjects were receiving any medication or taking any vitamin supplements. Participants received free cava and gin but no monetary compensation.

The study was an open, prospective, randomized, crossover, and single-blinded clinical trial in which subjects received 30 g ethanol/d as cava (0.3 L/d) or gin (0.1 L/d) for 28 d in a random order. Before both interventions, the subjects abstained from alcohol for 2 wk (washout periods 1 and 2). We followed the dietary intake and physical activity of the participants throughout the study. Before and after each intervention period, we withdrew blood samples after overnight fasting and coded them with random numbers to perform biochemical tests and immunological studies. Finally, at the end of each intervention, a clinician assessed any adverse effects from the interventions by administering a checklist of symptoms, including bloating, fullness or indigestion, altered bowel habit, dizziness, and other symptoms possibly associated with alcoholic beverage intake.

Alcoholic beverages. We used a monovarietal cava made from white grapes of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay (12% alcoholic strength) and gin (40% alcoholic strength) in this study. We selected these beverages on the basis of their polyphenolic content (medium level for the cava and negligible for the gin). Total phenolic compounds were determined by the Folin-Ciocalteu reagent (20). In addition, individualized phenolic compounds were determined by HPLC as previously described (21) (Table 1).

Diet and exercise monitoring. The participants in the study followed an isocaloric Mediterranean-type diet, which was designed according to

⁷ Abbreviations used: CHD, coronary heart disease; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; SLe^x, Sialyl-Lewis^x; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; VLA-4, very late activation antigen-4.

TABLE 1 Total phenolic and individual phenolic compound concentrations of Chardonnay cava

Phenolics by HPLC-DAD	Gallic acid
	mg/L
Total phenolic content (Folin-Ciocalteu)	202
Hydroxybenzoic acids	
Gallic acid	5.00
Protocatechuic acid	0.05
Hydroxycinnamic acids	
trans-Caftaric acid	13.59
2-S-glutathionylcaftaric acid	9.25
trans-Caffeic acid	1.60
trans-p-Coumaric acid	0.63
trans-Ferulic acid	0.37
Stilbenes	
trans-Resveratrol	0.14
cis-Resveratrol	0.13
trans-Piceid	ND ¹
cis-Piceid	0.92
Phenolic alcohols	
Tyrosol	11.14
Flavanols	
(+)-Catechin	0.40
(−)-Epicatechin	0.20
Quercetin-3-glucuronide	0.33

¹ ND, not detected.

their personal preferences. Participants were not allowed to consume onions, virgin olive oil, and green and black tea, which are rich in polyphenols and antioxidants. Other foods with high polyphenol content, ascorbic acid, α -tocopherol, and/or β -carotene, such as cocoa, chocolate, orange and tomato juices, nuts, some fruits (oranges, lemons, strawberries, grapes, melon, apples, and apricots), some vegetables (spinach, turnips, carrots, parsley, peppers, garlic, and tomatoes), and soybean products were restricted, providing a similar antioxidant content for all the participants throughout the study. Before and after each intervention, we used a 3-d food recall questionnaire, validated in our population (22), to assess the dietary intake and converted this information into nutritional data using the Professional Diet Balancer software (Cardinal Health Systems). We monitored physical activity with the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire (23).

Laboratory analysis. At the end of each 4-wk period (run-in, intervention 1, wash-out, and intervention 2), we obtained blood samples from fasting and a spot urine specimen. Immunophenotyping of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were performed. Serum and EDTA-plasma samples were stored at -80°C for analysis of inflammatory molecules at the end of the study. Analyses determined in frozen samples of plasma as was homocysteine by fluorescence polarization immunoassay (Siemens Medical Solutions Diagnostics) or whole serum as appropriate were: high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) by particle-enhanced immunonephelometry; soluble adhesion molecules [intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-selectin, and P-selectin], monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and CD40L by standard ELISA (Bender MedSystems). We used high sensitivity immunoassays for IL-6 and TNF α to detect low serum concentrations of these molecules (80 pg/L and 310 pg/L, respectively). Intra- and inter-assay variation coefficients for hsCRP, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, CD40L, MCP-1, TNF α , and IL-6 ranged from 1.8 to 5.4% and from 0.9 to 9.9%, respectively.

We performed all analyses in duplicate. As a measure of intervention compliance, we measured urinary resveratrol metabolites by HPLC-MS/MS before and after each intervention, as previously reported (24).

PBMC immunophenotyping. PBMC were isolated from whole blood by density gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia) (25). We analyzed the expression of adhesion molecules on PBMC surface via double direct immunofluorescence using commercial monoclonal antibodies. Cell counting and fluorescence analysis were performed in a FACScan Clinical Cytometer (Becton-Dickinson) using the CellQuest software. The adhesion molecules studied were: very late activation antigen-4 (VLA-4) (Cytogmos), lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) (Bender MedSystems), Mac-1 (Bender MedSystems), and Sialyl-Lewis^x (SLe^x) (Beckman Coulter). CD40 (Caltag Laboratories), another related molecule, was also measured. We identified monocytes and T-lymphocytes separately using anti-CD14 and anti-CD2 (Caltag Laboratories) monoclonal antibodies, respectively.

Statistical analysis. We performed statistical analysis using the SPSS Statistical Analysis system 11.0. Values in the text are expressed as means \pm SD, unless otherwise indicated. Values with a skewed distribution (hsCRP, VCAM-1, ICAM-1, and IL-6) were transformed to their natural logarithm for analyses. We compared changes in outcome variables in response to each intervention treatment with the 2-tailed paired *t* test. To exclude the presence of a carryover effect for the 2 interventions, we compared the outcome variables observed before the cava and gin treatments and did not observe differences in any of the variables analyzed (see above). Within- and between-group differences are expressed as mean percent difference (95% CI). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Baseline characteristics, intervention compliance, diet, exercise monitoring, and side effects. Of 30 eligible subjects, we excluded 10 from the study for the reasons explained above. Thus, we included the remaining 20 healthy men (34 ± 9 y, range 25–50 y) in the study and randomly assigned them to 1 of the 2 interventions (cava or gin). All subjects completed both phases of the study. Prior to participating in the study, they reported a daily ethanol intake of 16.8 ± 12.6 g during a period of 17 ± 10 y. We evaluated the compliance of intervention by analyzing participants' reports and recounts of empty bottles returned. In addition, as an objective measure of intervention compliance, we determined resveratrol metabolites in urine. The urine concentration of total resveratrol metabolites

increased by 72.4 nmol/g (95% CI = 48.5–96.2 nmol/g; $P = 0.005$) after the cava intervention compared with the corresponding wash-out period, whereas we did not find any significant changes after the gin intervention. Based on these data, all participants were compliant. Self-reported diets were close to the planned diets and none of the subjects consumed a significant quantity of polyphenol-rich foods during the study, so the nutritional intake including total energy, carbohydrates, fat, protein, and vitamins was similar before and after each intervention period in all the subjects. Only 1 participant reported a 1-d violation (onion) 17 d before assessment. In addition, we did not find any significant differences in physical activity throughout the study (Table 2). None of the participants reported any side effects during the both phases of the study.

Expression of cell adhesion molecules on leukocyte cell surface. Expression of cell adhesion molecules on leukocyte cell surface before and after each intervention is reported in Table 3. Adhesion molecule expression did not differ before cava and gin intervention. Changes in T-lymphocyte surface molecules were minimal. We detected a reduction in LFA-1 expression after cava intake by 16% ($P = 0.001$) and an upregulation of LFA-1 expression after gin intake by 19% ($P = 0.034$); however, the rest of molecules did not differ on T-lymphocytes. Changes were more prominent on monocyte surface. After cava intake, there were reductions of 11–21% in LFA-1 ($P = 0.048$), VLA-4 ($P = 0.015$), SLe^x ($P = 0.01$), and CD40 ($P = 0.033$) expression. On the other hand, after the gin intake period, only SLe^x declined ($P = 0.036$). The following molecules were significantly down-regulated more by cava than by gin: LFA-1 in T-lymphocytes ($P = 0.001$) and monocytes ($P = 0.021$), VLA-4 in monocytes ($P = 0.008$), and CD40 in monocytes ($P = 0.029$).

Changes in homocysteine and circulating inflammatory markers. Plasma homocysteine concentrations were similar before and after cava (10.9 ± 2.7 μ mol/L to 11.5 ± 3.6 μ mol/L) or gin (10.5 ± 2.6 μ mol/L to 11.2 ± 2.9 μ mol/L) intervention periods. Serum adhesion molecule concentrations did not differ before both the interventions. Some circulating adhesion

TABLE 2 Dietary intake, body weight, and exercise energy output in men before and after cava and gin interventions¹

	Cava			Gin		
	Before	After	Difference % (95% CI) ²	Before	After	Difference % (95% CI)
Dietary intake						
Energy ³ , kcal/d	2246 \pm 683	2236 \pm 468	−3 (−13 to 7)	2506 \pm 673	2255 \pm 668	−8 (−18 to 2)
Cholesterol, mg/d	374 \pm 104	396 \pm 115	13 (−7 to 33)	431 \pm 123	395 \pm 150	−4 (−21 to 12)
SFA, mg/d	32.2 \pm 11.8	30.8 \pm 10.1	−0.1 (−14 to 14)	37.2 \pm 14.7	33.2 \pm 12.0	−4 (−20 to 10)
Monounsaturated fatty acids, mg/d	47.5 \pm 16.8	48.3 \pm 14.3	8 (−7 to 23)	55.6 \pm 16.6	48.9 \pm 13.3	−6 (−23 to 11)
PUFA, mg/d	13.8 \pm 6.0	15.8 \pm 5.9	29 (−5 to 64)	17.2 \pm 6.4	15.8 \pm 6.0	−1 (−20 to 18)
Vitamin A, mg/d	400 \pm 200	463 \pm 201	32 (−1 to 65)	455 \pm 241	445 \pm 228	−18 (−54 to 10)
Vitamin E, mg/d	10.2 \pm 4.1	12.0 \pm 5.3	26 (−1 to 53)	12.0 \pm 4.5	11.1 \pm 5.5	−1 (−26 to 24)
Vitamin C, mg/d	130 \pm 69.4	131 \pm 53.3	1 (−31 to 33)	135 \pm 81.6	134 \pm 82.7	−1 (−61 to 59)
Polyphenols, mg/d	227 \pm 59	225 \pm 72	−15 (−56 to 26)	240 \pm 85	231 \pm 88	−18 (−46 to 10)
Exercise						
Energy output, kcal/d	231 \pm 133	227 \pm 155	−1 (−21 to 19)	289 \pm 238	214 \pm 160	−12 (−46 to 23)
Body weight, kg	78.0 \pm 12.3	78.5 \pm 12.4	−0.6 (−1.2 to 0.1)	78.2 \pm 10.1	78.1 \pm 10.1	−0.02 (−0.6 to 0.6)

¹ Values are means \pm SD, $n = 20$.

² 95% CI of mean differences (%) after the intervention, $n = 20$.

³ 1 kcal = 4.184 kJ.

TABLE 3 Expression of inflammatory molecules on leukocyte cell surfaces of men before and after cava and gin interventions¹

	Cava			Gin		
	Before	After	Difference	Before	After	Difference
T-Lymphocytes	AU ²		% (95% CI) ³	AU ²		% (95% CI) ³
LFA-1	139.2 ± 25.1	115.8 ± 23.9**	-16 (-24 to -8)***	122.6 ± 29.4	139.3 ± 26.7*	19 (3 to 34)
VLA-4	28.2 ± 5.0	26.9 ± 6.8	-2 (-16 to 11)	25.9 ± 5.3	27.6 ± 2.3	11 (-2 to 24)
SLe ^x	12.2 ± 4.4	13.1 ± 4.1	17 (-5 to 39)	12.5 ± 4.6	13.9 ± 7.5	21 (-16 to 57)
CD40	16.9 ± 3.2	18.9 ± 4.3	16 (-0.6 to 32)	17.4 ± 5.6	16.4 ± 5.2	-0.6 (-19 to 18)
Monocytes						
LFA-1	138.2 ± 16.8	121.1 ± 24.1*	-11 (-21 to -2)***	121.7 ± 24.9	130.9 ± 29.1	12 (-4 to 28)
Mac-1	63.1 ± 21.2	58.6 ± 14.2	-2 (-17 to 21)	58.7 ± 12.6	55.1 ± 17.2	-4 (-17 to 9)
VLA-4	39.7 ± 9.8	31.7 ± 5.9*	-17 (-26 to -7)***	34.6 ± 10.5	36.7 ± 10.8	12 (-6 to 30)
SLe ^x	63.0 ± 24.4	44.1 ± 14.7**	-21 (-37 to -5)	50.6 ± 14.3	37.9 ± 10.5*	-20 (-32 to -8)
CD40	43.8 ± 17.1	32.1 ± 8.8*	-19 (-33 to -4)***	34.4 ± 11.6	36.2 ± 16.7	18 (-18 to 53)

¹ Values are means ± SD. Asterisks indicate different from baseline: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ***Different between cava and gin intervention period, *P* < 0.05.

² Arbitrary units.

³ 95% CI of mean differences (%) after the intervention, *n* = 20.

molecules and other inflammatory biomarkers changed after each intervention (Fig. 1). After the cava period, concentrations of CD40L (*P* = 0.015), VCAM-1 (*P* = 0.001), hsCRP (*P* = 0.049), IL-6 (*P* = 0.008), P-selectin (*P* = 0.01), E-selectin (*P* = 0.02), ICAM-1 (*P* = 0.013), and MCP-1 (*P* = 0.01) diminished from 11 to 27%. After gin consumption, we observed reductions of 13–18% in serum E-selectin (*P* = 0.012), P-selectin (*P* = 0.028), and VCAM-1 (*P* = 0.034) concentrations and 21% higher MCP-1 levels (*P* = 0.026). The effect of cava was greater than that of gin for CD40L (*P* = 0.030), ICAM-1 (*P* = 0.015), and MCP-1 (*P* = 0.001).

Discussion

In this 3-mo feeding intervention trial, consumption of 30 g ethanol/d as cava was associated with a downregulation of the

expression of LFA-1, VLA-4, SLe^x, and CD40 in monocytes and of LFA-1 in T-lymphocytes. In addition, serum concentrations of hsCRP, VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin, IL-6, MCP-1, and CD40L also decreased after cava intake. Gin intake also exerted an antiinflammatory effect, because serum concentrations of VCAM-1, E-selectin, and P-selectin decreased and, also, SLe^x was downregulated in monocyte surface. However, the effects of cava on inflammatory biomarkers of atherosclerosis were significantly greater than those of gin.

The epidemiological association between moderate alcohol consumption and lower prevalence of atherosclerosis may have several pitfalls, because even in prospective cohort studies it is difficult to assess the type and amount of ethanol intake exactly and to control the effects of the diet consumed and physical activity performed on the variables studied (26). In fact, some investigators have suggested that the lower risk of CHD in

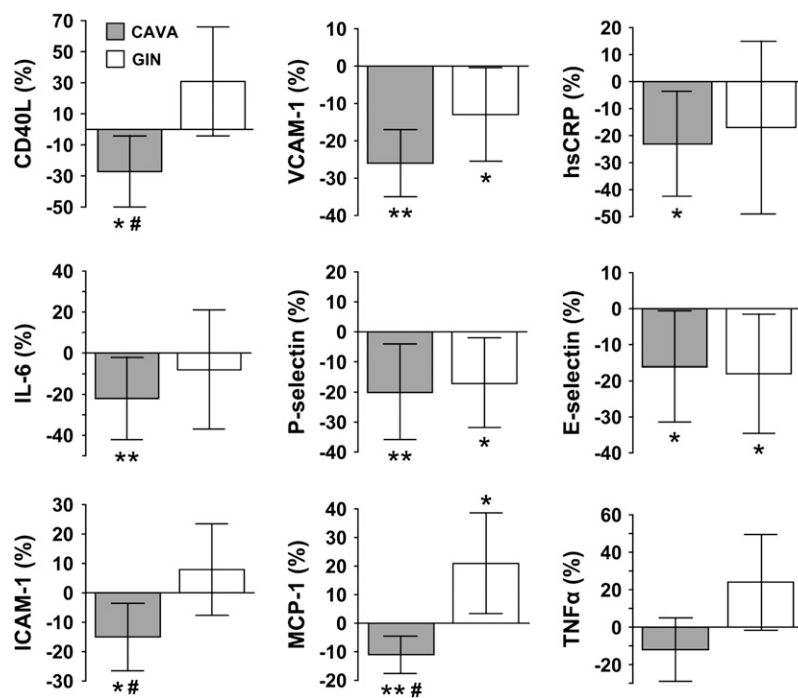


FIGURE 1 Percent changes from baseline in circulating adhesion molecules and other inflammatory biomarkers in healthy men after cava and gin consumption. Values are means and 95% CI, *n* = 20. Asterisks indicate different from baseline: **P* < 0.05; ***P* < 0.01. #Different from gin, *P* < 0.05.

moderate drinkers may be also related to their characteristic lifestyle or the consumption of a healthier diet (27). It should be taken into account that fruits and vegetables contain large amounts of polyphenolic compounds, such as flavonoids, and some studies have suggested that flavonoid intake may explain the low mortality rates from CHD reported in Western countries (28,29). On the other hand, physical activity increases HDL cholesterol serum concentrations (30) and may reduce cardiovascular mortality by itself. Thus, the issue of nutrition and exercise may be solved in only well-designed clinical trials in which the intervention could be monitored by biochemical analysis. To avoid this problem, in this trial, we monitored nutritional intake and exercise performed throughout the study by means of validated scales, but we did not detect any differences in these variables between the periods of the study. We also assessed protocol compliance by personnel interviews, counting empty bottles, and measuring concentrations of resveratrol metabolites in urine after each intervention (24). After analyzing all these data, we concluded that protocol compliance was nearly 100% in all the subjects. Therefore, the changes observed in inflammatory variables analyzed in the study should be attributed to the consumption of cava or gin.

The mechanisms by which moderate alcohol consumption may prevent atherosclerosis are not completely known. Beyond changes in lipid profile, coagulation, and fibrinolytic system observed in alcohol drinkers, the involvement of other alternative mechanisms may completely explain the protective effect of alcoholic beverages (7,13,31). Thus, the possible antiinflammatory effects of alcoholic beverages in the arterial wall have become a matter of research (15).

Epidemiological studies suggest that moderate alcohol intake is associated with reduced levels of circulating inflammatory predictive markers of atherosclerosis (9,14,32). In this sense, a reduction in C-reactive protein, α_1 -globulins, α_2 -globulins, IL-6, sTNF-R1, sTNF-R2, and fibrinogen have been observed in moderate drinkers compared with nondrinking subjects. Likewise, moderate amounts of red wine inhibit the expression of MCP-1 and neointimal hyperplasia after a balloon injury in cholesterol-fed rabbits (33), whereas *in vitro* studies show that ethanol inhibits MCP-1 expression in IL-1 β -activated human endothelial cells (34). Previous clinical trials performed by our group revealed that moderate consumption of red wine exerted greater antiinflammatory effects than ethanol itself (gin). In addition, red wine prevented nuclear factor- κ B activation in PBMC, a process that activates genes involved in immune and inflammatory responses (35,36). These antiinflammatory effects have been attributed to the high polyphenol content of red wines. The results of this study also confirm that moderate consumption of cava, a medium-level polyphenol content beverage, is able to reduce the expression of adhesion molecules that participate in the passage of monocytes and T-lymphocytes into the arterial wall.

The interaction of T-lymphocytes and monocytes with endothelium through adhesion molecules is the first event in atheroma plaque formation. This process may involve several steps such as rolling, tethering, firm adhesion, and transmigration of circulating mononuclear cells in which different adhesion molecules participate (8). Selectins and SLe^x exert their function during the rolling phase, whereas integrins, ICAM-1, and VCAM act during firm adhesion and transmigration (37). Our results suggest that moderate consumption of cava and gin may have an effect in the initial phases of the atherosclerosis process. Until now, no studies to our knowledge have reported the antiinflammatory effect of cava consumption in human beings.

These effects may contribute, with others previously reported (such as reduction of LDL oxidation *in vitro* or decrease of aortic fatty streak formation in hamsters) (38,39), to the overall beneficial effect of wine against atherosclerosis.

In summary, our study suggests that alcoholic beverages with medium-level polyphenol content such as cava induce greater reductions of inflammatory markers of atherosclerosis (adhesion molecules, cytokines, and CD40/CD40L system) compared with alcoholic beverages with negligible levels of polyphenols, such as gin. Therefore, these data suggest that some of the atheroprotective effect of alcoholic beverages could be partially mediated by their antiinflammatory activity in the vascular wall.

Literature Cited

- Doll R, Peto R, Hall E, Wheatley K, Gray R. Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 1994;309:911-8.
- Muntwyler J, Hennekens C, Buring J, Gaziano J. Mortality and light to moderate alcohol consumption after myocardial infarction. *Lancet*. 1998;352:1882-5.
- Rotondo S, Iacoviello L, de Gaetano G. Light to moderate alcohol consumption and the risk of stroke among American male physicians. *Ital Heart J Suppl*. 2000;1:569-70.
- Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB, De Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation*. 2002;105:2836-44.
- Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL, Goldhaber SZ, Rosner B, VanDenburgh M, Willett W, Hennekens CH. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1993;329:1829-34.
- Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation *in vivo*. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:258-65.
- Estruch R. Wine and cardiovascular disease. *Food Res Int*. 2000;33:219-26.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
- Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet*. 2001;357:763-7.
- Sacanella E, Badia E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Antunez E, Urbano-Marquez A, Estruch R. Differential effects of moderate or heavy alcohol consumption on circulating adhesion molecule levels. *Thromb Haemost*. 2002;88:52-5.
- Sierksma A, van der Gaag MS, Kluf C, Hendriks HF. Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels: a randomized, diet-controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:1130-6.
- Van der Gaag M, Ubbink J, Sillanaukee P, Nikkari S, Hendriks H. Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *Lancet*. 2000;355:1522.
- Imhof A, Woodward M, Doering A, Helbecque N, Loewel H, Amouyel P, Lowe GD, Koenig W. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in Western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *Eur Heart J*. 2004;25:2092-100.
- Pai JK, Hankinson SE, Thadhani R, Rifai N, Pischon T, Rimm EB. Moderate alcohol consumption and lower levels of inflammatory markers in US men and women. *Atherosclerosis*. 2006;186:113-20.
- Stewart SH. Alcohol and inflammation: a possible mechanism for protection against ischemic heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2002;12:148-51.
- Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, Colditz GA, Ascherio A, Rosner B, Stampfer MJ. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet*. 1991;338:464-8.
- Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G, Sorensen TI. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Ann Intern Med*. 2000;133:411-9.

18. Theobald H, Johansson SE, Engfeldt P. Influence of different types of alcoholic beverages on self-reported health status. *Alcohol Alcohol*. 2003;38:583–8.
19. Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antúnez E, Nicolás JM, Fernández-Solá J, Rotilio D, De Gaetano G, Rubin E, et al. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*. 2004;175:117–23.
20. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144–58.
21. Ibern-Gómez M, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Buxaderas S, Singleton VL, de la Torre-Boronat MC. Browning of cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *Am J Enol Vitic*. 2000;51:29–36.
22. Schröder H, Covas MI, Marrugat J, Vila J, Pena A, Alcantara M, Masia R. Use of a 3-days estimated food record, a 72-hours recall and food frequency questionnaire for dietary assessment in a Mediterranean Spanish population. *Clin Nutr*. 2001;20:429–37.
23. Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol R. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. *Am J Epidemiol*. 1994;139:1197–209.
24. Zamora-Ros R, Urpí-Sardà M, Lamuela-Raventós RM, Estruch R, Vázquez-Agell M, Serrano-Martínez M, Jaeger W, Andres-Lacueva C. Diagnostic performance of urinary resveratrol metabolites as a biomarker of moderate wine consumption. *Clin Chem*. 2006;52:1373–80.
25. Sacanella E, Estruch R, Gaya A, Ferrer K, Fernandez-Sola J, Alonso JR, Nicolas JM, Urbano-Marquez A. Upregulated expression of VLA proteins and CD29 in peripheral blood lymphocytes of chronic alcoholics without ethanol-related diseases. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23:371–5.
26. Borodulin K, Laatikainen T, Salomaa V, Jousilahti P. Associations of leisure time physical activity, self-rated physical fitness, and estimated aerobic fitness with serum C-reactive protein among 3803 adults. *Atherosclerosis*. 2006;185:381–7.
27. Ruidavets JB, Bataille V, Dallongeville J, Simon C, Bingham A, Amouyel P, Arveiler D, Ducimetiere P, Ferrieres J. Alcohol intake and diet in France, the prominent role of lifestyle. *Eur Heart J*. 2004;25:1153–62.
28. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993;342:1007–11.
29. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996;312:478–81.
30. Arquer A, Elosua R, Covas MI, Molina L, Marrugat J. Amount and intensity of physical activity, fitness, and serum lipids in pre-menopausal women. *Int J Sports Med*. 2006;27:911–8.
31. Lucas DL, Brown RA, Wassef M, Giles TD. Alcohol and the cardiovascular system research challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1916–24.
32. Avellone G, Di Garbo V, Campisi D, De Simone R, Raneli G, Scaglione R, Licata G. Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60:41–7.
33. Feng AN, Chen YT, Ding YZ, Lin SJ. Red wine inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression and modestly reduce neointimal hyperplasia after balloon injury in cholesterol-fed rabbits. *Circulation*. 1999;100:2254–9.
34. Cullen JP, Sayeed S, Jin Y, Theodorakis NG, Sitzmann JV, Cahill PA, Redmond EM. Ethanol inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression in interleukin-1{beta}-activated human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1669–75.
35. Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C, Ortego M, Fernandez-Presa MA, Cancelas P, Gomez-Gerique J, Millan J, et al. Red wine intake prevents nuclear factor-kappa B activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation*. 2000;102:1020–6.
36. Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Alvarez-Sala LA, Castilla M, Bustamante A, Lamuela-Raventós RM, Gómez-Gerique J, Fernández-Cruz A, et al. Ethanol beverages containing polyphenols decrease nuclear factor kappa-B activation in mononuclear cells and circulating MCP-1 concentrations in healthy volunteers during a fat-enriched diet. *Atherosclerosis*. 2007;192:335–41.
37. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol*. 1999;94:295–314.
38. Satué-Gracia MT, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Frankel EN. Spanish sparkling wines (cavas) as inhibitors of in vitro human low-density lipoproteins oxidation. *J Agric Food Chem*. 1999;47:2198–202.
39. Auger C, Rouanet JM, Vanderlinde R, Bornet A, Décordé K, Lequeux N, Cristol JP, Teissedre PL. Polyphenols-enriched Chardonnay white wine and white sparkling wine Pinot Noir red wine identically prevent early atherosclerosis in hamsters. *J Agric Food Chem*. 2005;53:9823–9.

RESULTATS CONCRETS:

1. 20 homes sans sense factors de risc cardiovascular van completar l'estudi sense presentar efectes adversos relacionats amb les intervencions realitzades i tampoc es van detectar canvis en la dieta i en l'exercici durant les 4 fases de l'estudi.
2. El compliment de la intervenció va ser adequat i es va comprovar tant subjectivament (entrevista personal i recompte d'ampolles retornades) com objectivament (determinació de polifenols en orina després de cada intervenció).
3. En limfòcits T, únicament es redueix l'expressió de LFA-1 en un 16% ($P=0.001$) en consumir cava i s'augmenta en un 19% en consumir ginebra ($P=0.034$).
4. En monòcits, l'expressió de LFA-1 (11%), VLA-4 (17%) i CD40 (19%) decreix significativament ($P<0.05$) i també decreix SLe^X (21%, $P=0.01$) després del consum de cava. Però en consumir ginebra, únicament SLe^X (20%) disminueix significativament ($P=0.036$).
5. Per a LFA-1 limfocitària ($P=0.001$) i monocitària ($P=0.021$), VLA-4 monocitària ($P=0.008$) i CD40 ($P=0.029$) monocitària les diferències entre ambdues intervencions van ser significatives a favor del cava.
6. Els nivells circulants de marcadors inflamatoris van disminuir significativament entre un 11 i 27% per a VCAM-1, IL-6, P-selectina i MCP-1 ($P<0.01$) i, també, per a hsCRP, CD40L, E-Selectina i ICAM-1 ($P<0.05$) després de consumir cava.
7. Després de la ingesta de ginebra només es va observar una reducció significativa ($P<0.05$) en les concentracions de VCAM-1 (13%), E i P-Selectina (18%). Contràriament, MCP-1 va augmentar un 21% ($P=0.026$).
8. Per a CD40L ($P=0.03$), ICAM-1 ($P=0.015$) i MCP-1 ($P=0.001$) les diferències van ser significatives a favor del cava, per tant, l'efecte del cava va ser major que l'efecte produït per la ginebra per aquests 3 marcadors d'inflamació.

TREBALL 3

Reduced NF- κ B Activation in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Healthy Subjects After Cocoa Consumption

Vazquez-Agell M, Sacanella E, Tobias E, Roura E, Andrés-Lacueva C and Estruch R.

Pendent d'acceptació, 2008.

Reduced NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects after cocoa consumption

Mónica Vázquez-Agell ^(1,2) PhD, Emilio Sacanella ^(1,2),MD, PhD, Vicenta Llorente ^(2,3) PhD, Ester Tobias ⁽¹⁾ PhD, Elena Roura ⁽⁴⁾ PhD, Cristina Andres-Lacueva ⁽⁴⁾ PhD, Lina Badimon ^(2,3) PhD and Ramon Estruch ^(1,2) MD, PhD.

¹*Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain*

²*CIBER 06/03: Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.*

³*Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de Santa Creu i de Sant Pau, Barcelona, Spain.*

⁴*Department of Nutrition and Food Science-CeRTA, Pharmacy School, University of Barcelona, Barcelona, Spain.*

Address for correspondence and reprints: Dr. R. Estruch, Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain.

Tel. +34-93-2279365; FAX: +34-93-2279365; E-mail: restruch@clinic.ub.es

Short running head: Reduced NF- κ B after cocoa consumption.

Word count of manuscript: 3406

Subject Codes: [101], [134], [138], [142].

1 **ABSTRACT**

2 **Background**

3 Several epidemiological studies have demonstrated the beneficial effects of certain
4 foods containing flavonoids in reducing total and cardiovascular mortality, due, at least
5 in part, to its anti-inflammatory effects. However, the exact mechanism by which
6 flavonoid-rich foods, such as cocoa, protects against atherosclerosis is not fully known.

7 **Objective**

8 Because monocytes/macrophages and nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) are
9 implicated in the pathogenesis of atherosclerotic lesions, we examine the effect of cocoa
10 powder consumption on the activation of NF- κ B system.

11 **Methods**

12 Seventeen volunteers without cardiovascular risk factor received at random 3
13 interventions: 40 g of cocoa powder diluted in 250 ml of milk (CM), 40 g of cocoa
14 powder diluted in 250 ml of water (CW), and 250 ml of milk (M). NF- κ B activation
15 (Western blot) and soluble adhesion molecules (ELISA) were analyzed before and 6
16 hours after each intervention.

17 **Results**

18 M consumption elicited a significantly ($P=0.009$) increase of NF- κ B activation,
19 whereas, after CM intervention NF- κ B activation was blunted and after CW
20 intervention a significant decrease of NF- κ B activation was observed ($P=0.049$). A
21 decrease in plasma sICAM-1 levels was also observed after 6h cocoa consumption,
22 which only achieved significance after CW intervention ($P=0.024$).

23 **Conclusions**

24 These results provide a new potential mechanism to explain the beneficial effect of
25 cocoa consumption in the reduction of cardiovascular mortality.

26

27 **Keywords:** NF- κ B, adhesion molecules, inflammation, cocoa powder, polyphenols.

1 INTRODUCTION

2 Flavonoids are phytochemical constituents of certain foods and beverages such as
3 cocoa, wine and tea. Flavonoids intake, in particular a class called flavanols, is
4 associated with lower cardiovascular morbidity and mortality¹ and also with a decreased
5 incidence of certain types of cancer² probably due to their antioxidant³ and anti-
6 inflammatory properties.⁴ However, the exact mechanisms by means of flavonoid-rich
7 intake, such as cocoa, protects against atherosclerosis is not fully understood.

8 Up to now, several non-inflammatory mechanisms has been reported in healthy subjects
9 eating a flavanol-rich diet such as vasodilatation,³ reduction of plasma cholesterol
10 concentrations⁵ and insulin resistance⁶ and also a reduction of blood pressure in mild
11 hypertensive subjects.⁷ Studies analyzing the anti-inflammatory role of cocoa intake are
12 scarce. In fact, only *in vitro* studies has suggested that cocoa flavanols can modify
13 intracellular transduction pathways and therefore modulate synthesis of inflammatory
14 cytokines such as interleukine-1 β .^{8,9}

15 Inflammation of the arterial wall is the leading process during atherosclerosis
16 development in which adhesion molecules, cytokines and related molecules are
17 involved.¹⁰ Most of them are regulated by the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) which is
18 expressed in inactive form in the cytoplasm of the cells.¹¹ After stimulation, NF- κ B
19 release its inhibitory protein (I κ B) and is translocated to the nucleus where induce gene
20 expression of the inflammatory cytokines and adhesion molecules involved in atheroma
21 plaque formation.¹²

22 Hypothetically, NF- κ B could be a target to inhibit the inflammatory reaction in the
23 vascular wall and in this way reduce atherogenesis.¹³ The effect of some polyphenols-
24 rich food such as olive oil^{14,15} and red wine^{16,17} in NF- κ B activation has been reported.
25 However, no studies have evaluated the effect of other polyphenol-enriched food such
26 as cocoa on NF- κ B activation in humans. Therefore, we designed a trial in which NF-
27 κ B activation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and soluble adhesion
28 molecules: intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell
29 adhesion molecule-1 (VCAM-1) regulated by NF- κ B were analyzed in subjects with
30 low cardiovascular risk after acute cocoa consumption.

1 MATERIALS AND METHODS

2 Study subjects and design

3 We included 18 volunteers (9 men and 9 women aged 19-49 years) into a protocol and
4 none reported any of the following exclusion criteria: diabetes mellitus, tobacco
5 smoking, hypertension, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) levels >160 mg/dL,
6 high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) levels < 35 mg/dL, coronary heart disease
7 (CHD), family history of premature CHD, cerebrovascular disease, peripheral vascular
8 disease, human immunodeficiency virus infection, alcoholic liver disease, malnutrition,
9 neoplastic or acute infection disease. In addition, none of them received any medication
10 or taken vitamin supplements. Volunteers fasted overnight for at least 12 hours before
11 beginning the assessment period. Before their inclusion in the trial, all participants gave
12 written informed consent for the different procedures and none received any economic
13 compensation. The Institutional Review Board of the Hospital Clinic approved the
14 study protocol.

15 This study was an open, prospective, randomized, cross-over and single-blinded clinical
16 trial. All subjects received the three interventions in a random order to all the subjects: i)
17 40g of cocoa powder diluted in 250mL of whole milk (CM), ii) 40g of cocoa powder
18 diluted in 250mL of water (CW), iii) 250mL of whole milk (M) as a control.

19 The three interventions were performed of 3 consecutive weeks at 8:00 am after
20 overnight fasting in order those 7 days, there was a wash-out period of seven days
21 between each intervention. Volunteers were instructed to abstain from vitamin
22 supplements, drugs, alcoholic beverages and any polyphenol rich containing foods for at
23 least 48 h before and during the test day. A list with the allowed and forbidden foods
24 and two menus were given to all participants to help them to strictly follow the
25 polyphenol free diet the days before the study. Furthermore, they remained during the
26 entire period of study in the experimental clinical ward, ensuring that volunteers only
27 consumed the diet proscribed in this study.

28 Cocoa powder composition

29 The cocoa powder phenolic content is composed, essentially, by flavanols (**Table 1**),
30 whereas, milk phenolic content was under the detection limits.

31 The three types of beverages were isocaloric between them, using sugar to equal the
32 caloric content in order to avoid differences in their absorption. The CM and CW
33 macronutrient composition (g/250mL) were respectively: carbohydrates 30.75, 58.4, fat
34 10.91, 2.16, protein 13.54, 5.64 and energy (Kcal/250mL). Everyday of the intervention

1 period, the different drinks were prepared by using a standardized protocol. At the end
2 of this study, a clinician assessed any adverse effects from the interventions by
3 administering a checklist of symptoms with included oral symptoms; bloating, fullness
4 or indigestion; altered bowel habit; and any other diet-related complaint.

5 **Laboratory measurements**

6 Two blood samples of all volunteers drawn just before (0h or baseline), 2 and 6h after
7 each intervention, which were coded with random numbers and processed immediately
8 to perform lipid profile, and immunological assays of PBMC. For blood lipid analysis,
9 cholesterol and triglycerides were measured using enzymatic procedures and HDL-c
10 was quantified after precipitation with phosphotungstic acid and magnesium chloride.

11 As a measure of cocoa polyphenols bioavailability, quantification of (-)-Epicatechin
12 (Ec) in plasma was determined by LC/MS/MS analysis as previously reported.¹⁸

13 **Protein extracts isolation to PBMC**

14 Blood samples were assayed at the same day of blood sampling but serum samples were
15 frozen at -80°C until needed. PBMC were isolated from blood samples by density
16 gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sw).¹⁹ Then, total
17 protein extracts were isolated to PBMC by TripureTM Isolation Reagent (Roche
18 Molecular Biochemicals) as indicated by the manufacturer. The quantification of total
19 protein concentrations in PBMC samples was carried out using the Bicinchoninic acid
20 protein assay (Pierce, Rockland, IL), which were used for Western-blot study.

21 **Phospho-p65 Western-blot**

22 An equal amount of proteins (20 μg) were loaded and separated in 10% SDS-PAGE gels
23 and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Invitrogen, CA, USA). The blots
24 were blocked with 5% non-fat dry milk overnight at 4°C and then probed with a
25 monoclonal antibody against p65 phosphorylated (P-p65) serine 536 (Cell Signaling
26 Technology Inc, Beverly, MA). To verify equal protein loading, the blots were reprobed
27 with a monoclonal antibody against actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).
28 The antibodies concentrations were used as indicated by the manufacturer. Levels of
29 expression for a specific protein were visualized by treating the blots with a
30 quimioluminescent detection kit (Pierce, Rockland, IL) that enhanced the signal. The
31 intensity of signals was quantified by ImageGauge Software. Protein expression of NF-
32 κB was assessed by P-p65/actin ratio (P-p65 amount was normalized by actin content)
33 in arbitrary units.

1 **Enzyme-linked immunoabsorbent assay**

2 Plasma levels of soluble endothelial adhesion molecules: sICAM-1, sVCAM-1 and sE-
3 selectin were measured in duplicate by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)
4 using commercial immunoassays for the quantitative detection of soluble human
5 molecules (Bender MedSystems, Vienna, Au). Intra- and inter-assay variation
6 coefficients for sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin ranged from 3.1% to 5.4% and
7 5.2% to 7.6%, respectively.

8 **Statistical analysis**

9 Means and SEMs were used to describe continuous variables. For analysis of laboratory
10 variables, the average of two baseline measurements was used as the baseline value and
11 the average of the two measurements taken at 2 or 6 hours was used as the final
12 variable. The two-tailed paired *t*-test was used to compare changes in outcome variables
13 in response to each intervention period. To exclude the presence of a carryover effect
14 for the two interventions, comparison of the outcome variables observed before the 3
15 intervention periods was performed. Within- and between group differences are
16 expressed as means and 95% confidence intervals (CI). All statistical tests were 2-tailed
17 and the significance level was set at $P < 0.05$. Analyses were performed using SPSS
18 version 12.0 (Inc, Chicago, IL).

1 **RESULTS**

2 **Participant's characteristics**

3 All participants (mean age 26 ± 7 years) completed all study periods and none reported
4 any adverse effect related to the interventions administered. Baseline lipid
5 characteristics of participants were normal (202 ± 3 mg/mL cholesterol, 53 ± 9 mg/mL
6 HDL-c, 127 ± 2 mg/mL LDL-c and 54 ± 7 mg/mL glucose). Nutrient intake was similar
7 in all study phases. There were no weight or lipid profile changes (data not shown).

8 **Plasma cocoa polyphenols levels**

9 Before the consumption of the test meals, (-)-Ec plasma concentration was undetectable
10 in all the subjects. 2 hours after the intake of the two cocoa beverages, (-)-Ec-
11 glucuronide was the only (-)-Ec metabolite detected into the bloodstream, showing the
12 mean \pm SD plasma concentration of $330.44 \text{ nmol.l}^{-1} \pm 156.1$ and $273.7 \text{ nmol.l}^{-1} \pm 138.4$ for
13 CW and CM, respectively. Not observed difference between these interventions
14 ($P=0.076$). As expected, (-)-Ec was no detected before and after M intake.

15 **NF- κ B activation and adhesion molecules levels**

16 Blood samples were taken before (0h) and 6h after beverage intervention and measured
17 P-p65 levels (NF- κ B active form) by Western-blot (**Figure 1**). In comparison to
18 baseline, M consumption elicited a significantly ($P=0.009$) increase of NF- κ B
19 activation, whereas, after CM intervention NF- κ B activation was blunted and after CW
20 intervention a significant decrease of NF- κ B activation was observed ($P=0.049$). The
21 effects of interventions over NF- κ B activation after 6 hours were significantly greater in
22 favor of cocoa compared to milk intervention ($P<0.05$). Finally, a decrease in plasma
23 sICAM-1 levels was observed after 6h cocoa consumption which was significantly
24 after CW intervention ($P=0.024$) (**Figure 1**). No changes in sVCAM-1 and E-selectin
25 analyzed were found.

1 DISCUSSION

2 In this clinical trial, consumption of 40g of cocoa powder mixed with water or milk was
3 associated with decreased phosphorylation of the p65, the transcriptional active subunit
4 of NF- κ B, and decreases in sICAM-1 but after M consumption occur the opposite
5 effect.

6 NF- κ B, a modulator of genes involved in inflammation, may play a crucial role in
7 atherosclerosis. Activated NF- κ B has been identified in human atherosclerotic plaques,
8 but not in vessels from healthy subjects.²⁰ Nowadays, NF- κ B is considered a major
9 therapeutic target to prevent atherosclerosis²¹ and the research fields have been directed
10 to anti-inflammatory effects of polyphenols-containing foods that exerted a NF- κ B
11 inhibition associated with suppression of inflammatory mediators.^{15-17,22} Several clinical
12 studies have shown improved endothelial function after cocoa intake.²³ In vitro studies,
13 epicatechin, catechin and procyanidins isolated from cocoa inhibit NF- κ B activation,
14 that it was attributed to their antioxidant capacity.²⁴

15 The results of the current study suggest that inhibitory effect on NF- κ B activation and
16 sICAM-1 is due to polyphenols (flavanols) presents in cocoa powder, this product have
17 demonstrated anti-inflammatory properties in laboratory study.

18 Up to now, discrepant findings have been observed about milk may counteract with the
19 beneficial effects of cocoa when it is added.^{25,26} Little is known whether addition of
20 milk and which milk component influence these beneficial cocoa effects. Schroeter et
21 al.²⁷ have not observed a reduction on flavonoids bioavailability when cocoa was
22 consumed with milk. However, in our study, the anti-inflammatory effect of cocoa
23 powder was higher in presence of water than in presence of milk. Colio et al.^{16,17}
24 observed that an acute intake of fat enriched diet caused NF- κ B activation in humans
25 and this activation could be prevented by consumption of ethanol beverage containing
26 polyphenols. Therefore, the minor effect observed in CM intervention could be due by
27 negative effect of milk fats, activators of NF- κ B. However, exist a tendency that cocoa
28 are more bioavailable in presence of water, change in cocoa polyphenols bioavailability
29 were excluded between CM and CW, since no differences were observed in the (-)-Ec
30 metabolites of glucoronide between cocoa intervention, Then, the inflammatory effect
31 of fats presents in milk by NF- κ B activation could be, in part, counteracted by cocoa
32 polyphenols activity.

33 The main of this study is that the result may not be applicable to subjects with high
34 cardiovascular risk. Further studies are required including high-risk patients.

1 In conclusion, polyphenols-rich cocoa consumption could confer cardioprotective effect
2 mediated by inhibition with the NF- κ B-dependent transcription pathway supporting the
3 idea that cocoa consumption may contribute to prevent chronic inflammatory disease as
4 atherosclerosis but this effect is less evident in presence of milk.

1 **ACKNOWLEDGEMENTS**

2 Conception and design: M. Vázquez-Agell, E. Sacanella, C.Andres-Lacueva and R.
3 Estruch.

4 Data collection: M. Vázquez-Agell, E. Roura, V. Llorente.

5 Analysis and interpretation of the data: M. Vázquez-Agell, E. Sacanella, V. Llorente, L.
6 Badimon, C. Andres-Lacueva and R. Estruch.

7 Drafting of the article: M. Vázquez-Agell E. Sacanella, L. Badimon and R. Estruch

8 Critical revision and final approval: M. Vázquez-Agell, E. Sacanella, V. Llorente, E.
9 Roura, E. Tobías, C. Andres-Lacueva, L. Badimon and R. Estruch.

10

11 **SOURCES OF FUNDING**

12 The authors would like to thank all volunteers involved in the study. Without their
13 collaboration, this project would not have been possible. This research was supported
14 partially by *Centro para el Desarrollo Industrial*, CDTI (P-02-0277), *Comisión*
15 *Interministerial de Ciencia y Tecnología*, CICYT (AGL2004-08378-C02-01/02) and
16 CONSOLIDER CSD 2007-063 national grants. We are also grateful to Lactalis Group
17 and Nutrexp S.A to give us the milk and cocoa powder, respectively.

18 **DISCLOSURES**

19 None.

REFERENCES

1. Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996;312:478-81.
2. Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem*. 2005;16:449-66.
3. Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxid-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens*. 2003;21:2281-6.
4. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS*. 2006;103:1024-9.
5. Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, Osakabe N, Kanegae M, Kondo K. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr*. 2007;137:1436-41.
6. Grassi D, Lippi C, Necazione S, Desideri G, Ferri C. Short term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:611-4.
7. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schömig E. Effects of low habitual cocoa intake on Blood pressure and bioactive nitric oxid. *JAMA*. 2007;298:49-60.
8. Wheeler DS, Catravas JD, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong HR. Epigallocatechin-3-gallate, a Green Tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 β -dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J Nutr*. 2004;134:1039-44.
9. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharma*. 2006;72:1439-52.
10. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
11. Miyamoto S, Verma IM. Rel/NF- κ B/I- κ B: story. *Adv Cancer Res* 1995;66:255-92.
12. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6853-66.
13. Yoon JH, Back SJ. Molecular target of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J*. 2005;46:585-596.

14. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanto A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:622–9.
15. Bellido C, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Perez-Martinez P, Muriana FJ, Martin-Ventura JL, Marin C, Gomez P, Fuentes F, Egido J, Perez-Jimenez F. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor κ B in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1487-91.
16. Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Cancelas P, Gomez-Gerique J, Millan J, Egido J. Red wine intake prevents nuclear factor- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation.* 2000;102:1020-6.
17. Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Alvarez-Sala LA, Castilla M, Bustamante A, Lamuela-Raventós RM, Gómez-Gerique J, Fernández-Cruz A, Millán J, Egido J. Ethanol beverages containing polyphenols decrease nuclear factor kappa-B activation in mononuclear cells and circulating MCP-1 concentrations in healthy volunteers during a fat-enriched diet. *Atherosclerosis.* 2007;192:335-41.
18. Roura E, Andrés-Lacueva C, Estruch E, Mata Bilbao ML, Izquierdo-Pulido M, Waterhouse AL, Lamuela-Raventós RM. Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoids in healthy human. *Ann Nutr Metab.* 2007;51:493-8.
19. Sacanella E, Estruch R, Gaya A, Ferrer K, Fernandez-Sola J, Alonso JR, Nicolas JM, Urbano-Marquez A. Upregulated expression of VLA proteins and CD29 in peripheral blood lymphocytes of chronic alcoholics without ethanol-related diseases. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23:371-5.
20. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 1996;97:1715-22.
21. Kutuk O, Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF- κ B as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 2003;12:549-57.
22. Karlsen A, Retterstol L, Laake P, Paur I, Kjolsrud-Bohn S, Sanduvik L, Blomhoff R. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappa B activation in monocytes and

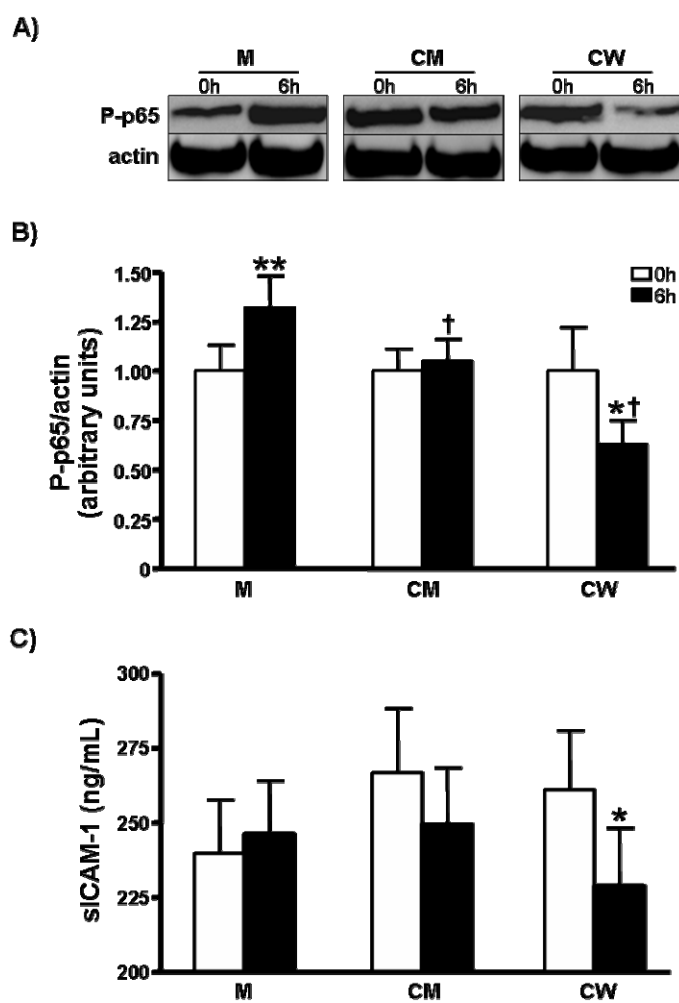
- reduce plasma concentrations of pro-inflammatory molecules in healthy adults. *J Nutr.* 2007;137:1951-4.
23. Hermann f, Spieker L, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Lüscher TF, Riesen W, Noll G, Corti R. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart.* 2006;92:119-120.
 24. Mackenzie GG, Carrasquedo F, Delfino MJ, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF- κ B activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.* 2003;18:167-9.
 25. Leenen R, Roodenburg AJ, Tijburg LB, Wiseman SA. A single dose of tea with or without milk increase plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54:87-92.
 26. Lorenz M, Jochmann N, von Krosigk A, Martus P, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *Eur Heart J.* 2007;28:219-23.
 27. Schroeter H, Holt RR, Orozco TJ, Schmitz HH, Keen CL. Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature.* 2003;426:787-8.

1 **FIGURE LEGEND**

2 **Figure 1.** NF- κ B activation determined by p65 phosphorylated (P-p65) protein
3 expression and sICAM-1 concentrations in volunteers at 0h and 6h after milk (M),
4 cocoa-milk (CM) or cocoa-water (CW) intake (n=17). A) Representative example of
5 Western-blot of P-p65 protein expression. Actin was used to verify equal protein
6 loading. B) Densitometer quantification of P-p65 activity. Values are mean \pm SEM
7 presented in arbitrary units as a ratio of P-p65/actin. C) Plasma sICAM-1 levels
8 expressed as mean \pm SEM.
9 ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; * $P < 0.05$ compared to before intervention;
10 ** $P < 0.01$ compared to before intervention; $^{\dagger} P < 0.05$ compared to after M
11 intervention./versus 6h of M intake.

Table 1. Cocoa powder composition per 100g.

100 g Cocoa powder	
Carbohydrates	47 g
Fiber	16 g
Protein	14.1 g
Fat	5.4 g
Phenols:	160.2 mg
Flavanols: (-)-Epicatechin	70.5 mg
Procyanidin B ₂	63.7 mg
(+)-Catechin	21 mg
Flavonols	5 mg

Figure 1

RESULTATS CONCRETS:

1. 18 individus (9 homes i 9 dones) sans sense factors de risc cardiovascular van completar l'estudi sense presentar efectes adversos relacionats amb les intervencions realitzades.
2. El consum de llet sola provoca un augment significatiu ($P=0.009$) de l'activació del NF- κ B en comparació amb el basal. Contràriament, després del consum de solubles de cacau amb llet no hi ha activació de NF- κ B o, inclòs, disminueix significativament ($P=0.049$) després del consum de solubles de cacau amb aigua.
3. Els efectes de les dues intervencions amb solubles de cacau sobre l'activació de NF- κ B passades sis hores són significativament majors en comparació amb la intervenció de llet ($P<0.05$).
4. Passades sis hores de les intervencions amb solubles de cacau (cacau-llet i cacau-aigua), s'observa una disminució dels nivells solubles d'ICAM-1, la qual és significativa després del consum de solubles de cacau amb aigua ($P=0.024$).
5. No s'observen canvis en les concentracions de VCAM-1 i E-selectina analitzades.

DISCUSSIÓ CONJUNTA

Existeix una relació inversa entre el consum de determinats aliments i la incidència de morbi-mortalitat cardiovascular avalada per varis estudis epidemiològics. Concretament, els polifenols són els elements de la dieta implicats en la prevenció de diverses patologies com la malaltia cardiovascular per aquest motiu, actualment, existeix un gran interès en el seu estudi. Existeixen diversos components de la dieta que contenen polifenols com ara les begudes alcohòliques i el cacau.

Diferents estudis epidemiològics demostren un efecte cardioprotector del consum moderat d'alcohol enfront l'arteriosclerosi (Estruch et al., 2000; Gronbaek et al., 2000; Mukamal et al., 2005). La majoria d'estudis experimentals o d'intervenció s'han centrat en avaluar l'efecte del consum moderat d'alcohol sobre el perfil lipídic, funció plaquetar, sistema de coagulació i fibrinòlisis. No obstant, en definir-se l'arteriosclerosi com una malaltia inflamatòria crònica de baixa intensitat de la paret arterial, estudis de cohort han suggerit que el consum moderat d'alcohol també pot reduir els marcadors d'inflamació predictors d'arteriosclerosi (Imhof et al., 2001). Per tant, l'alcohol actuaria a través d'un altre mecanisme d'acció en el qual es modifica la resposta inflamatòria i, conseqüentment, retardar i/o evitar el desenvolupament de la placa d'ateroma.

Per altre banda, tot i que el consum moderat d'alcohol és inversament proporcional a la morbi-mortalitat cardiovascular, existeix controvèrsia respecte si els efectes cardioprotectors de les begudes alcohòliques són atribuïbles al component alcohòlic (Rimm et al., 1999) o al component no alcohòlic (Theobald et al., 2003) o bé als dos components en conjunt (Badia et al., 2004; Estruch et al., 2004).

Per tal d'evitar factors de confusió en la interpretació de les dades es van incloure en els tres treballs una població de persones adultes sanes, homes i dones, amb baix risc cardiovascular definida com absència dels següents factors de risc cardiovascular clàssics: diabetis mellitus, tabaquisme, hipertensió, alteracions en el perfil lipídic, cardiopatia isquèmica o antecedents de cardiopatia isquèmica precoç.

El primer i segon treball d'aquesta Tesi Doctoral s'han realitzat amb la finalitat d'obtenir una major evidència científica mitjançant estudis d'intervenció que ajudés a entendre la relació entre el consum moderat d'alcohol i marcadors d'inflamació, com ara molècules d'adhesió i citosines, predictors d'arteriosclerosi. Tanmateix, aclarir si els beneficis del consum moderat d'alcohol depenen del sexe, dosi i/o tipus de beguda alcohòlica. Això es va fer mitjançant assaigs clínics on la dieta i exercici van estar controlats i els participants van ser sotmesos a una intervenció consistent en el consum de beguda alcohòlica amb alt, baix o nul contingut en polifenols però amb la mateixa dosi diària d'alcohol (30g/dia en homes i 20g/dia en dones) durant 4 setmanes

precedida per un període d'abstinència alcohòlica absoluta. El grau d'adherència de la intervenció mesurat per paràmetres subjectius (entrevista personal i recompte del retorn d'ampolles buides) i objectius (determinació de marcadors polifenòlics en orina després de cada intervenció) va ser plenament satisfactori. A més, no es van detectar diferències ni en la dieta (respecte a la ingesta calòrica, greixos saturats e insaturats i antioxidants) ni en el grau d'activitat física realitzades durant totes les fases d'estudi. Per tant, les possibles variacions observades en els paràmetres inflamatoris analitzats serien atribuïbles al tipus d'intervenció realitzada (consum moderat de vi negre vers vi blanc o cava vers ginebra).

En el **primer treball** d'aquesta Tesi Doctoral es pretén investigar si els efectes antiinflamatoris del consum moderat d'alcohol observat en homes (Badia et al., 2004; Estruch et al., 2004) també són aplicables a les dones amb baix risc cardiovascular. En aquest treball es posa de manifest que un consum de 20g d'alcohol/dia en forma de vi negre o vi blanc s'associa amb un increment en el colesterol HDL i una disminució dels marcadors d'inflamació circulants (hsPCR, IL-6, ICAM-1 i CD40L), de l'expressió de molècules d'adhesió monocitàries (Mac-1, VLA-4, MCP-1 i CD40) i de l'adhesió monòcit-endoteli en 35 dones fèrtils i sanes. El vi negre posseeix un efecte més potent respecte el vi blanc per produir aquests canvis per als marcadors: VCAM-1, E-selectina, P-selectina, LFA-1 i SLe^x. Aquests resultats aporten, en concordança, bases fisiopatològiques de les dades epidemiològiques procedents d'un meta-anàlisi on confirma que el consum de 20g d'alcohol/dia està inversament associat a la mortalitat total en dones (Di Castelnuovo et al., 2006).

En aquest cas, la dosi d'alcohol aplicada en l'estudi és de 20g d'alcohol/dia clarament inferior a l'estudi amb homes degut a la major susceptibilitat de les dones a l'alcohol consumit ja que és coneguda la major sensibilitat de les dones a l'alcohol i aquesta és la dosi màxima recomanada com a saludable pel *U.S. Department of Agriculture* (2000). Respecte a la dosi d'alcohol saludable per a la dona, s'ha trobat que una dosi de 20g d'alcohol/dia s'associa a efectes beneficiosos sobre els marcadors d'inflamació predictors d'arteriosclerosi similars als observats en homes que consumeixen dosis més elevades (30g d'alcohol/dia).

Tant el vi blanc com el negre tenen un contingut d'etanol equivalent però difereixen en el contingut polifenòlic. Concretament, el vi blanc i vi negre usats en aquest estudi tenen un contingut polifenòlic total de 308mg/L i 1945mg/L, respectivament. En aquest estudi s'observa que el consum de vi negre provoca una major reducció dels marcadors d'inflamació (VCAM-1, E-selectina, P-selectina, LFA-1 i SLe^x) i l'adhesió monòcit-endoteli que el vi blanc. Aquestes dades suggereixen que la major quantitat

de polifenols del vi negre, en part, són els responsables d'aquests efectes beneficiosos.

Cal explicar que aquest treball té certes limitacions. En primer lloc, existeix una certa dificultat per assegurar el compliment de les instruccions dietètiques, consum de vi i l'estil de vida global, no obstant, les mesures objectives realitzades han estat constants durant tot l'estudi amb una fiabilitat pràcticament del 100%. En segon lloc, les alteracions analítiques obtingudes en els paràmetres inflamatoris predictors d'arteriosclerosi són de difícil interpretació clínica degut a que són dones que per sí mateixes estan sanes que no presenten aquesta malaltia, no obstant, aquest estudi ens permet descobrir nous aspectes de la fisiopatologia de l'arteriosclerosi important per poder determinar noves dianes d'acció i, així, combatre-la. En tercer lloc, els efectes cardioprotectors del consum moderat d'alcohol en dones fèrtils i amb un baix risc cardiovascular global no són directament extrapolables en dones amb elevat risc cardiovascular ni en dones post-menopàusiques.

En resum, els resultats d'aquest primer treball permeten concloure que els efectes del consum moderat de vi sobre el sistema vascular poden estar mediatos, en part, per la reducció de les molècules d'inflamació circulants, l'expressió de molècules d'adhesió cel·lulars i l'adhesió monòcit a l'endoteli. Aquests efectes saludables observats sobre el consum moderat d'alcohol en forma de vi en dones mostren un benefici similar al obtingut en estudis realitzats en homes. Sembla ser que tant la fracció alcohòlica (etanol) com la fracció no alcohòlica (polifenols) contribueixen conjuntament en els efectes antiinflamatoris del consum moderat de begudes alcohòliques. En dones, el consum moderat de vi negre té un efecte antiinflamatori superior al vi blanc possiblement degut al major contingut en polifenols del vi negre. Aquestes dades proporcionen una informació addicional sobre el paper beneficiós de les begudes alcohòliques en la prevenció de l'arteriosclerosi en dones.

Avaluat que el consum moderat de begudes alcohòliques amb elevat contingut en polifenols exerceix un efecte antiinflamatori que pot contribuir en retardar el desenvolupament de l'arteriosclerosi es va voler analitzar si les begudes alcohòliques amb menor contingut en polifenols, com el cava, també són immunomoduladores.

En el **segon treball** d'aquesta Tesi Doctoral es pretén avaluar els efectes del consum moderat d'una beguda amb un nivell mig en polifenols (cava) vers un nivell nul (ginebra) en homes sans amb baix risc cardiovascular. El disseny d'estudi va ser similar a l'anterior, és a dir, el període d'intervenció consta de 4 setmanes intercalat amb un període de rentat (abstinència alcohòlica absoluta). En aquest treball es posa

de manifest que el consum de 30g d'alcohol/dia s'associa amb una reducció de marcadors inflamatoris solubles (VCAM-1, E i P-selectina) i l'expressió de molècules d'adhesió cel·lulars (SLe^x). No obstant, els efectes del cava sobre els biomarcadors d'arteriosclerosi són significativament majors que els produïts per la ginebra.

El cava i la ginebra es diferencien tant en el grau d'alcohol com en el contingut polifenòlic, és a dir, la ginebra és una beguda alcohòlica (40% etanol) sense polifenols mentre que el cava és una beguda alcohòlica (12% etanol) amb un contingut mig en polifenols (202 mg/L). Com que s'ha administrat la mateixa quantitat d'etanol en cada intervenció, els majors efectes que es podrien detectar en el cava en comparació amb la ginebra serien deguts a l'efecte dels polifenols que hi conté.

Prèviament, dades d'estudis clínics procedents del nostre grup d'investigació revelen que el consum moderat de begudes alcohòliques amb alt contingut polifenòlic (vi negre) exerceixen un efecte antiinflamatori superior a les begudes alcohòliques amb baix contingut polifenòlic (ginebra) (Badia et al., 2004; Estruch et al., 2004). Llavors, els efectes antiinflamatoris s'haurien d'atribuir a l'alt contingut polifenòlic del vi negre. Els resultats obtinguts en aquest estudi confirmen que el consum moderat de cava, una beguda amb un contingut mig en polifenols, al igual que el vi negre és capaç de reduir la resposta inflamatòria que té lloc en la paret arterial durant l'inici del procés arterioscleròtic.

Cal esmentar que aquest treball també té les mateixes limitacions al igual que succeeix amb el primer treball en quan a compliment (difícil interpretació clínica dels resultats i dades no directament extrapolables a individus amb un factor de risc cardiovascular elevat).

En resum, aquest treball suggereix que el consum moderat de begudes alcohòliques amb un contingut polifenòlic mig, com ara el cava, indueix una major reducció dels marcadors inflamatoris d'arteriosclerosi en comparació amb les begudes alcohòliques amb un contingut polifenòlic inapreciable com la ginebra. Per tant, les dades suggereixen que part de l'efecte protector de les begudes alcohòliques podria estar, parcialment, mediat per la seva activitat antiinflamatòria en la paret vascular.

Després d'avaluar l'efecte antiinflamatori que exerceix el consum de begudes alcohòliques amb contingut en polifenols, es volia analitzar si un aliment ric en polifenols, com els solubles de cacau, també és immunomodulador. Per tant, determinar si els polifenols tenen un efecte antiinflamatori enfront l'arteriosclerosi independentment de la beguda o aliment en el quals estiguin presents.

Paral·lelament, en la present Tesi Doctoral s'ha portat a terme un **tercer treball** per determinar si un aliment ric en polifenols, com ara els solubles de cacau, té un efecte negatiu en l'activació del factor de transcripció NF- κ B, implicat en la patogènesi de l'arteriosclerosi perquè regula l'expressió de molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina), en individus sans amb baix risc cardiovascular.

El factor de transcripció NF- κ B, modulador de múltiples gens implicats en el procés d'inflamació, juga un paper essencial en la fisiopatologia de l'arteriosclerosi. Arrel d'aquest descobriment, el NF- κ B és objecte d'estudi considerat, actualment, com la diana terapèutica primordial per prevenir el desenvolupament de l'arteriosclerosi. Una de les branques d'estudi està direccionada en els possibles efectes inhibidors dels polifenols de la dieta sobre l'activació del NF- κ B i concentracions de mediadors inflamatoris. En humans, tot i que existeixen dades referents a l'efecte antiinflamatori dels polifenols del vi i oli d'oliva sobre l'activació del NF- κ B (Blanco-Colio et al., 2000 i 2007; Bellido et al., 2004), no s'han avaluat estudis sobre l'efecte antiinflamatori dels polifenols del cacau sobre l'activació del NF- κ B.

No obstant, existeix una gran controvèrsia quan la matriu de dilució és la llet on certs autors opinen que la llet és innòcua però d'altres opinen tot el contrari (Leenen et al., 2000; Lorenz et al., 2007). Científicament, hi han pocs estudis sobre la influència de la llet sobre els efectes beneficiosos del cacau. Per aquest motiu s'ha realitzat un estudi agut sobre els efectes dels solubles de cacau utilitzant com a matriu l'aigua i la llet amb l'objectiu d'investigar si la llet interfereix negativament o no sobre els possibles efectes beneficiosos del consum de polifenols del cacau. Els resultats obtinguts en aquest estudi suggereixen que l'efecte inhibidor sobre l'activació del NF- κ B ($P < 0.05$) i sICAM-1 ($P = 0.024$) seria degut als polifenols continguts en els solubles de cacau, sobretot, flavanols. Per tant, es podria atribuir al cacau propietats antiinflamatòries. Tanmateix, s'ha determinat un menor efecte en el cacau diluït amb llet respecte amb el cacau diluït en aigua el qual podria ser degut a l'efecte negatiu dels lípids continguts en la llet sencera perquè els lípids són una font d'activació del NF- κ B.

Com a mesura de biodisponibilitat dels polifenols del cacau administrats durant la intervenció es va determinar la presència de marcadors polifenòlics en plasma. A més, la dieta realitzada pels voluntaris va estar monitoritzada en tot moment, per tant, possibles variacions observades no poden ser resultat de la dieta.

La principal limitació seria que aquest estudi avalua l'efecte agut del cacau i caldria, també, realitzar un altre estudi per saber si l'efecte crònic es manté o no. A més, els resultats no podrien ser aplicables a individus amb elevat risc cardiovascular,

per tant, caldria realitzar més estudis on els individus inclosos fossin pacients amb un elevat risc cardiovascular.

En resum, aquest tercer treball suggereix que el consum de solubles de cacau, aliment ric en contingut polifenòlic, podria conferir un efecte cardioprotector en interferir en la via de transcripció de gens inflamatoris depenent de NF- κ B. Però aquest efecte seria menys intens quan la matriu usada és la llet. Per tant, el consum de solubles de cacau podria contribuir en la prevenció de malalties inflamatòries cròniques com ara l'arteriosclerosi.

Tots els treballs presentats, en conjunt, en aquesta memòria aporten diverses evidències que suggereixen que els polifenols procedents de la dieta, com ara el consum moderat de begudes alcohòliques i solubles de cacau, tenen un efecte inhibidor sobre els marcadors d'inflamació predictors d'arteriosclerosi. Per tant, els polifenols de la dieta tindrien un efecte protector enfront el desenvolupament de l'arteriosclerosi mitjançant la modulació de la resposta inflamatòria que esdevé en la paret vascular durant el procés de formació de la placa d'ateroma. A més, segons el contingut polifenòlic de la beguda alcohòlica administrada, l'efecte cardioprotector serà més o menys intens.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS GENERALS

1. El consum moderat de begudes alcohòliques en homes i dones sanes amb baix risc cardiovascular s'associa amb una reducció de molècules d'adhesió i altres marcadors d'inflamació relacionats amb les fases inicials de l'arteriosclerosi.
2. El consum moderat de begudes alcohòliques en dones fèrtils s'associa amb una reducció de l'adhesió entre monòcit i endoteli que és una de les primeres etapes en la formació de la placa d'ateroma.
3. Els efectes immunomoduladors de les begudes alcohòliques són més importants en aquelles que tenen un contingut més elevat en polifenols.
4. El consum agut de solubles de cacau també s'associa amb una reducció en els mecanismes inflamatoris implicats en la formació de la placa d'ateroma.
5. L'efecte anti-arterioscleròtic del consum moderat de begudes alcohòliques i solubles de cacau sembla ser degut, en part, al seu efecte en la modulació de la resposta inflamatòria a la paret arterial.

CONCLUSIONS CONCRETES PER TREBALLS

1. Les dones amb baix risc cardiovascular que consumeixin alcohol a dosis moderades (20g/dia) en forma de vi negre o vi blanc presenten una reducció significativa de l'expressió de molècules d'adhesió (limfocitàries i monocitàries) i CD40 que participen en la formació de la placa d'ateroma (**Treball 1**).
2. Les dones amb baix risc cardiovascular que consumeixin alcohol a dosis moderades (20g/dia) en forma de vi negre o vi blanc presenten una reducció significativa de la concentració de marcadors inflamatoris circulants que participen en la formació de la placa d'ateroma (CRP, molècules d'adhesió endotelials, citosines, quimiosines i CD40L) (**Treball 1**).
3. Les dones amb baix risc cardiovascular que consumeixin alcohol a dosis moderades (20g/dia) en forma de vi negre o vi blanc presenten una reducció de l'adhesió dels monòcits a l'endoteli estimulat amb TNF- α , la qual és significativa després de consumir vi negre (**Treball 1**).

4. L'efecte antiinflamatori és més intens després del consum de vi negre respecte el consum de vi blanc el qual podria atribuir-se al seu elevat contingut en polifenols (**Treball 1**).
5. En comparació amb la ginebra, homes amb baix risc cardiovascular que consumeixin cava a dosis moderades (30g/dia) presenten una major reducció significativa de l'expressió de molècules d'adhesió (limfocitàries i monocitàries) i CD40 (**Treball 2**).
6. En comparació amb la ginebra, homes amb baix risc cardiovascular que consumeixin cava a dosis moderades (30g/dia) presenten una major reducció significativa de la concentració de marcadors inflamatoris d'arteriosclerosi circulants (CRP, molècules d'adhesió endotelials, citosines, quimiosines i CD40L) (**Treball 2**).
7. Les diferències entre els efectes del cava i la ginebra podrien ser atribuïbles a la presència de polifenols en el cava (**Treball 2**).
8. Es posa de manifest que l'acció protectora del cava es deguda tant al component alcohol·lic (etanol) com al component no alcohol·lic (polifenols) (**Treball 2**).
9. Individus amb baix risc cardiovascular amb un consum agut de 40g de solubles de cacau diluïts en aigua o llet presenten una reducció significativa de l'activació del NF- κ B, no obstant, l'efecte és més intens en presència d'aigua (**Treball 3**).
10. Individus amb baix risc cardiovascular amb un consum agut de 40g de solubles de cacau diluïts en aigua o en llet presenten una reducció de la concentració de la molècula d'adhesió endotelial soluble ICAM-1, la qual és significativa quan la matriu és l'aigua (**Treball 3**).
11. El menor efecte dels solubles de cacau diluïts en llet respecte en aigua podria ser atribuïble a la presència de lípids en la llet que actuarien com a inductors de l'activació del NF- κ B, per tant, els efectes saludables dels solubles de cacau contrarestarien els efectes negatius de la llet (**Treball 3**).

CONCLUSIÓ FINAL I RECOMANACIÓ

Aquesta Tesi Doctoral aporta evidència científica sobre els mecanismes cel·lulars i moleculars a través dels quals el consum moderat de begudes alcohòliques i d'altres aliments amb polifenols poden exercir un efecte protector contra l'arteriosclerosi en retardar o evitar la formació de la placa d'ateroma. Les dades donen credibilitat als resultats dels estudis epidemiològics previs i, a més, afegixen informació sobre els mecanismes específics mitjançant els quals els polifenols exerceixen efectes beneficiosos per a la salut.

Tot i que, en la present Tesi Doctoral s'han demostrat aquests efectes beneficiosos del consum moderat d'alcohol, hem de recordar que aquest és tòxic quan es pren en quantitats elevades i que pot induir dependència en un percentatge no despreciable d'individus. Per tant, considerem que **NO** es pot **aconsellar beure alcohol** a les persones que siguin abstemis pel risc de que alguna d'elles caigui en la situació de dependència o consumeixin alcohol en excés. No obstant això, els bevedors moderats d'alcohol se'ls ha d'aconsellar que continuïn aquest hàbit però sense superar la dosis considerada saludable (fins a 30-40g d'alcohol/dia en homes i 10-20g d'alcohol/dia en dones), sempre i quan no hi hagin contraindicacions mèdiques.

BIBLIOGRAFIA

A

- Agarwal DP. Cardioprotective effects of light-moderate consumption of alcohol: a review of putative mechanisms. *Alcohol* 2002;37:409-15.
- Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol* 2002;14:93-104.
- Altman R. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. *Thromb J* 2003;1:1-11.
- Andreasson S. Alcohol and J-shaped curves. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22: S359-64.
- Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Jáuregui O, Casals I, Izquierdo-Pulido M, Permanyer J. An LC method for the analysis of cocoa phenolics. *LC:GC Europe* 2000;902-4.
- Andriambelason E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanisms of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:248-54.
- Arts ICW, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81: S317-25.

B

- Badia E, Sacanella R, Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Antunez E, Rotilio D, de Gaetano G, Rubin E, Urbano-Marquez A, Estruch R. Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells alter moderate alcohol consumption. *Am J Clin Nutr* 2004;80:225-30.
- Bautista AP. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology* 1997;25:335-42.
- Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995;96:2521-7.
- Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993;91:379-87.
- Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Ann Rev Med* 1994;45:361-78.
- Blair S, Barlow C. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA* 1995;273:1093-9.
- Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circulation Res* 2001;89:763-71.

- Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Cancelas P, Gomez-Gerique J, Millan J, Egido J. Red wine intake prevents nuclear factor- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 2000;102:1020-6.
- Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Alvarez-Sala LA, Castilla M, Bustamante A, Lamuela-Raventós RM, Gómez-Gerique J, Fernández-Cruz A, Millán J, Ejido J. Ethanol beverages containing polyphenols decrease nuclear factor kappa-B activation in mononuclear cells and circulating MCP-1 concentrations in healthy volunteers during a fat-enriched diet. *Atherosclerosis* 2007;192:335-41.
- Booyse FM, Parks DA. Moderate wine and alcohol consumption: Beneficial effects on cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 2001;86:517-28.
- Bonnetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction. A marker of atherosclerotic risk. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:168-75.
- Brown LAS, Cook RT, Jerrells TR, Kolls JK, Nagy LE, Szabo G, Wands JR, Kovacs EJ. Acute and chronic alcohol abuse modulates immunity. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:1624-31.
- Bruemmer D, Riggers U, Holzmeister J, Grill M, Lippek F, Settmacher U, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Graf K. Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions. *Am J Cardiol* 2001;87:21-7.
- Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:2057-64.

C

- Callebaut B. Results of European consumer survey by Barry Callebaut predict fast-growing demand for healthy chocolate: 1 in 3 Europeans want chocolate with health benefits (2000).
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:622–9.

- Chen GJ, Huang DS, Watzl B, Watson RR. Ethanol modulation of tumor necrosis factor and γ interferon production by murine splenocytes and macrophages. *Life Sci* 1993;52:1319-26.
- Chen NG, Holmes M, Reaven GM. Relationship between insulin resistance, soluble adhesion molecules and mononuclear cell binding in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3485-9.
- Chou EJ, Keevil JG, Aeschlimann S, Wiebe DA, Folts JD, Stein JH. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2001;88:553-5.
- Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1927-42.
- Cooke JP, Stamler J, Andon N, Davies PF, McKinley G, Loscalzo J. Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol. *Am J Physiol* 1990;259:H804-12.
- Cowan DH. Effect of alcoholism on hemostasis. *Semin Hematol* 1980;17:137-47.
- Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *Leukoc Biol* 1998;63:1-14.
- Cullen JP, Sayeed S, Jin Y, Theodorakis NG, Sitzmann JV, Cahill PA, Redmond EM. Ethanol inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression in interleukin-1 β -activated human endothelial cells. *Am J Physiology Heart Circ Physiology* 2005;289:H1669-75.
- Curin Y, Andriantsitohaina R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep* 2005;57:S97-107.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-91.

D

- De Ferranti SD, Rifai N. C-reactive protein: a nontraditional serum marker of cardiovascular risk. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:14-21.
- De Gaetano G, De Curtis A, Di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L, Rotondo S. Antithrombotic effect of polyphenols in experimental models: a mechanism of reduced vascular risk by moderate wine consumption. *Ann NY Acad Sci* 2002;957:174-88.
- De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Boucher F, Paillard F, De Leiris J. Wine drinking and risks of cardiovascular complications after recent acute myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:1465-9.

- De Lorgeril M, Salen P, Paillard F, Laporte F, Boucher F, De Leiris J. Mediterranean diet and the French paradox: two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 2002;3:503-15.
- De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF- κ B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:e83-8.
- De Winther MPJ, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:904-14.
- Deedwania PC. Diabetes and vascular disease: Common links in the emerging epidemic of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2003;91:68-71.
- Dejana E, Breviario F, Caveda L. Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12:S25-8.
- Deveraj S, Yan Xu D, Jialai I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells. Implications for the metabolic syndrome and atherotrombosis. *Circulation* 2003;107:398-404.
- Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB, de Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* 2002;105:2836-44.
- Di Castelnuovo A, Constanzo S, Bagnardi V, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Alcohol dosing and total mortality in men and women. *Arch Intern Med* 2006;166:2437-45.
- Djousse L, Ellison RC, Beiser A, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA. Alcohol consumption and risk of ischemic stroke: The Framingham Study. *Stroke* 2002;33:907-12.
- Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:151-6.
- Duffy SJ, Vita JA, Holbrook M, Swerdloff PL, Keaney JF Jr. Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1084-9.

E

- El-Sayed MS. Effects of exercise on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. *Sports Med* 1996;22:282-98.
- Estruch R. Wine and cardiovascular disease. *Food Res Intern* 2000;33:219-26.

- Estruch R, Sacanella R, Badia E, Antunez E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Rotilio D, de Gaetano G, Rubin E, Urbano-Marquez A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis* 2004;175:117-23.

F

- Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J. Atherosclerotic vascular disease conference: writing group III: pathophysiology. *Circulation* 2004;109:2617-25.
- Ferrero ME, Bertelli AA, Fulgenzi A, Pellegatta F, Corsi MM et al. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1208-14.
- Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis X oligosaccharide. *J Cell Biol* 1992;117:895-902.
- Freedman JE, Parker C III, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrazi MD, Folts JD. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001;103:2792-8.
- Frijns CMJ, Kapelle LJ, Van Gijn J. Soluble adhesion molecule reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 1997;28:2214-8.
- Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ESG, Kastelein JJP, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004;109: III15-19.

G

- Gaziano JM, Gaziano TA, Glynn RJ, Sesso HD, Ajani UA, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE. Light-to-moderate alcohol consumption and mortality in the Physicians' Health Study enrollment cohort. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:96-105.
- Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology Today* 1993;14:506-12.
- Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm

- adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999;398:718-23.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-60.
 - Gimbrone MAJ, Bevilacqua MP, Cybulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1990;598:77-85.
 - Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001;104:503-16.
 - Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem* 1999;47:3978-85.
 - Goldberg DM, Soleas GJ, Levesque M. Moderate alcohol consumption: the gentle face of Janus. *Clin Biochem* 1999;32:505-18.
 - Gordon T, Kannel WB. Drinking habits and cardiovascular disease: The Framingham Study. *Am Heart J* 1983;105:667-73.
 - Gordon DJ, Rifkind BM. High density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989;321:1311-6.
 - Gorinstein S, Zemser M, Lichman I, Berebi A, Kleipfish A, Libmena I, Trakhtenberg S, Caspi A. Moderate beer consumption and the blood coagulation in patients with coronary artery disease. *Inter Med* 1997;241:47-51.
 - Gosain A, Gamelli RL. A primer in cytokines. *J Burn Care Rehabil* 2005;26:7-12.
 - Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 1995;25:1749-54.
 - Griffin BA. Lipoprotein atherogenicity, an overview of current mechanisms. *Proc Nutr Society* 1999;58:163-9.
 - Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G, Sorensen TI. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Ann Intern Med* 2000;133:411-9.
 - Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:2696-8.
 - Guilleman MW, Cook NR, Evans DA, Rosner B, Hennekens CH. Relationship of alcohol intake with blood pressure in young adults. *Hypertension* 1995;25:1106-10.

- Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG. Xhantine oxidasa inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* 2003;107:416-21.

H

- Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1999;47:490-6.
- Hansen AS, Marckmann P, Dragsted LO, Finne-Nielsen IL, Nielsen SE, Gronbaek M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2005;3:449-55.
- Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2001;21:1876-90.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
- Hasdai D, Garratt KN, Grill DE, Lerman A, Holmes Dr Jr. Effect of smoking status on the long-term outcome after successful percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997;336:755-61.
- Hashimoto M, Kim M, Eto M, Lijima K, Ako J, Yoshizumi M, Akishita M, Kondo K, Ikatura H, Hosoda K, Toba K, Ouchi Y. Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *Am J Cardiol* 2001;88:1457-60.
- Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* 2003;290:1030-1.
- Hendriks HF, Van der Gaag MS. Alcohol, coagulation and fibrinolysis. *Novartis Found Symp* 1998;216:111-20.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC. Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease:the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
- Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43:89-143.
- Hillbom M, Numminen H, Juvela S. Recent heavy drinking of alcohol and embolic stroke. *Stroke* 1999;30:2307-12.
- Hodgson JM, Puddey IB, Mori TA, Burke V, Baker RI, Beilin LJ. Effects of regular ingestion of black tea on haemostasis and cell adhesion molecules in humans. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:881-6.

- Hodgson JM, Puddey IB, Burke V, Watts GF, Beilin LJ. Regular ingestion of black tea improves brachial artery vasodilator function. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:195-201.
- Hughes PE, Pfaff M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* 1998;8:359-64.

I

- Ibern-Gomez M, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM, Waterhouse AL. Rapid HPLC analysis of phenolic compounds in red wines. *Am J Enol Vitic* 2002;53:218-21.
- Imano H, Iso H, Sato S, Kitamura A, Okamura T, Tanigawa T, Ohira T, Kudo M, Naito Y, Lida M, Shimamoto T. Determinants of platelet aggregation in 50-70-year-old men from three Japanese communities. *Atherosclerosis* 2002;165:327-34.
- Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001;3357:763-7.
- Imhof A, Koenig W. Alcohol inflammation and coronary heart disease. *Addict Biol* 2003;8:271-7.

J

- Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-601.
- Jepson RG, Fowkes FG, Donnan PT, Houseley E. Alcohol intake as a risk factor for peripheral arterial disease in the general population in the Edinburgh Artery Study. *Eur J Epidemiol* 1995;11:9-14.

K

- Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006;187:1-17.
- Kannel WB, Ellison RC. Alcohol and coronary heart disease: the evidence for a protective effect. *Clin Chim Acta* 1996;246:59-76.
- Karatzi K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, Boskou G, Chiou A, Sitara M, Feliou G, Kontoyiannis D, Zampelas A, Mavrikakis M. Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2004;15:485-90.

- Kervinen K, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Lp(a) levels increase after ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:926.
- Kiechl S, Willeit J, Rungger G, Egger G, Oberhollenzer F, Bonora E. Alcohol consumption and atherosclerosis: what is the relation? Prospective results from the Bruneck Study. *Stroke* 1998;29:900-7.
- Kim KS, Owen WL, Williams D, Adams-Campbell LL. A comparison between BMI and conicity index on predicting coronary heart disease: the Framingham Heart Study. *Ann Epidemiol* 2000;10:424-31.
- Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Risk of cardiovascular mortality in alcohol drinkers, ex-drinkers and non-drinkers. *Am J Cardiol* 1999;66:1237-42.
- Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA, Kipp H. Wine, liquor, beer and mortality. *Am J Epidemiol* 2003;158:585-95.
- Knekt P, Jarviven R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 1996;312:478-81.
- Koga T, Meydani M. Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001;73:941-8.
- Komatsu S, Panes J, Russel JM, Anderson DC, Muzykantov VR, Miyasaka M, Granger DN. Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997;29:683-9.
- Kozarevic D, Vojvodic N, Gordon T, Kaelber CT, McGee D, Zukel WJ. Drinking habits and death. The Yugoslavia cardiovascular disease study. *Int J Epidemiol* 1998;12:145-50.
- Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler w. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappab in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:826-8.
- Kriegstein CF. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14:44S-54S.
- Kutuk O, Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF-κB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Molec Med* 2003;9:549-57.

L

- Lacoste L, Hung J, Lam JY. Acute and antithrombotic effects of alcohol in humans. *Am J Cardiol* 2001;87:82-5.
- Lafrenie RM, Buchanan MR, Orr FW. Adhesion molecules and their role in cancer metastasis. *Cell Biophys* 1993;23:3-89.

- Lahoz C, Mostaza JM. Atherosclerosis as a systemic disease. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:184-95.
- Lamuela-Raventós RM, Andrés-Lacueva C, Permanyer J, Izquierdo-Pulido M. More antioxidants in cocoa. *J Nutr* 2001;131:834-5.
- Langer RD, Criqui MH, Reed DM. Lipoproteins and blood pressure as biological pathways for effect of moderate alcohol consumption on coronary heart disease. *Circulation* 1992;85:910-5.
- Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Grillett N, Watson SR, Rosen SD. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992;69:927-38.
- Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002;186:37-46.
- Lee SJ, Benveniste EN. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999;98:77-88.
- Lee WK, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem* 2003;51:7292-5.
- Leenen R, Roodenburg AJ, Tijburg LB, Wiseman SA. A single dose of tea with or without milk increase plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:87-92.
- Lehr HA, Hubner C, Nolte D, Finckh B, Beisiegel U, Kohlschutter A, Messmer K. Oxidatively modified human low-density lipoprotein stimulates leukocyte adherence to the microvascular endothelium in vivo. *Res Exp Med* 1991;191:85-90.
- Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002;106:1614-7.
- Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725-35.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
- Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 2002;8:1257-62.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
- Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;169:203-14.

- Lorenz M, Jochmann N, von Krosigk A, Martus P, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *Eur Heart J* 2007;28:87-92.
- Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996;98:5-7.
- Lukacs NW, Strieter RM, Elnor V, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel SL. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 1995;86:2767-73.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
- Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7464-9.
- Lutgens E, Daemen M. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:27-32.

M

- Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med* 2003;33:1013-35.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.
- Mandrekar P, Catalano D, Szabo G. Inhibition of LPS-mediated NF- κ B activation by ethanol in human monocytes. *Int Immunol* 1999;11:1781-90.
- Mandrekar P, Catalano D, White B, Szabo G. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:135-9.
- Mazzone A, Cusa C, Mazzucchelli I, Vezzoli M, Ottini E, Ghios S, Tossini G, Pacifi R, Zuccaro P. Cigarette smoking and hypertension influence nitric oxide release and plasma levels of adhesion molecules. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:822-6.
- McClain C, Barve S, Deaciue L, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999;19:205-19.
- McEver RP. Leucocyte-endothelial interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:840-9.
- Mooradian AD. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2003;163:33-40.

- Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, Remuzzi A, Zoja C, Remuzzi G. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:1905-15.
- Mukamal KJ, Longstreth WT Jr, Mittleman MA, Crum RM, Siscovick DS. Alcohol consumption and subclinical findings on magnetic resonance imaging of the brain in older adults: the cardiovascular health study. *Stroke* 2001;32:1939-46.
- Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, Camargo CA, Stampfer MJ, Willet WC, Rimm EB. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 2003;348:109-18.
- Mukamal KJ, Massaro JM, Ault KA, Mittleman MA, Sutherland PA, Lipinska I, Levy D, D'Agostino RB, Toftler GH. Alcohol consumption and platelet activation and aggregation among women and men: the Framingham Offspring Study. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;20:1906-12.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:449-60.
- Muntwyler KJ, Hennekens CH, Buring JE, Gaziano JM. Mortality and light to moderate alcohol consumption after myocardial infarction. *Lancet* 1998;352:1882-5.
- Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1466-73.
- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1436-42.

N

- Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors* 2000;13:49-54.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74:418-25.

O

- Olsson L. The cytokine network. *J Intern Med* 1993;233:103-5.

- Osakabe N, Natsume M, Adachi T, Yamagishi M, Hirano R, Takizawa T, Itakura H, Kondo K. Effects of cocoa liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. *J Atheroscler Thromb* 2000;7:164-8.

P

- Paasilta M, Kervinen K, Rantala AO, Savolainen MJ, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi YA. Social alcohol consumption and low Lp(a) lipoprotein concentration in middle aged Finnish men: population based study. *BMJ* 1998;316:594-5.
- Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002;14:73-81.
- Pendurthi UR, Williams JT, Rao VM. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine inhibits tissue factor expression in vascular cells: a possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:419-26.
- Pepine CJ, Schlaifer JD, Mancini GB, Pitt B, O'Neill BJ, Haber HE. Influence of smoking status on progression of endothelial dysfunction. TREND Investigators. Trial on reversing endothelial dysfunction. *Clin Cardiol* 1998;21:331-4.
- Petruzzelli L, Takami M, Humes DH. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 1999;106:467-75.
- Phipps RP. Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6930-2.
- Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 2002;4:S109-16.
- Powell JT. Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall. *Vasc Med* 1998;3:21-8.
- Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999;107:85-97.
- Puddey IB, Croft KD, Abu-Amsha Caccetta R, Beilin LJ. Alcohol, free radicals and antioxidants. *Novartis Foundation Symposium* 1998;216:51-67.
- Puddey IB, Croft KD. Alcohol, stroke and coronary heart disease. Are there anti-oxidants and pro-oxidants in alcoholic beverages that might influence the development of atherosclerotic cardiovascular disease?. *Neuroepidemiology* 1999;18:292-302.

R

- Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharma* 2006;72:1439-52.
- Rattan V, Shen Y, Sultana C, Kumar D, Kaira VK. Diabetic RBC-induced oxidant stress leads to transendothelial migration of monocyte-like KL-60 cells. *Am J Physiol* 1997;273:E369-75.
- Rausch U, Osende JI, Fuster V. Statins and cardiovascular disease: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins. *Atherosclerosis* 2000;153:181-9.
- Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr* 2000;130:2120S-6S.
- Rehm J, Gmel G, Sempos CT, Trevisan M. Alcohol-related morbidity and mortality. *Alcohol Res Health* 2003;27:39-51.
- Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-6.
- Renaud S, Lanzmann-Petithory D, Gueguen R, Conard P. Alcohol and mortality from all causes. *Biol Res* 2004;37:183-7.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New Engl J Med* 2000;342:836-43.
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-72.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2149-53.
- Ridker PM, Buring JE, Rifai N. P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001;103:491-5.
- Ridker PM, Morrow DA. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *Cardiol Clin* 2003;21:315-25.
- Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, Colditz GA, Ascherio A, Rosner B, Stampfer MJ. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet* 1991;338:464-8.
- Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipid and haemostatic factors. *BMJ* 1999;319:1523-8.

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- Ross R. Atherosclerosis and inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999;340:115-26.
- Rubin R. Effect of ethanol on platelet function. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1114-8.
- Ruf JC. Overview of epidemiological studies of wine, health and mortality. *Drugs Exp Clin Res* 2003;29:173-9.
- Ruf JC. Alcohol, wine and platelet function. *Biol Res* 2004;37:209-15.

S

- Sacanella E, Estruch R, Gayà A, Ferrer K, Fernandez-Sola J, Alonso JR, Nicolas JM, Urbano-Marquez A. Up-regulated expression of VLA-4 proteins and CD29 in peripheral blood lymphocytes of chronic alcoholic without ethanol-related diseases. *Alcohol Exp Clin Res* 1999;23:371-5.
- Sacanella E, Estruch R, Badia E, Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Urbano-Marquez A. Chronic alcohol consumption increases serum levels of circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules E-selectin and ICAM-1. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:678-84.
- Sacanella E, Badia E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Antunez E, Urbano-Marquez A, Estruch R. Differential effects of moderate or heavy alcohol consumption on circulating adhesion molecule levels. *Thromb Haemost* 2002;88:52-5.
- Sacanella E, Estruch R. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. *Addict Biol* 2003;8:371-8.
- Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. I- κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* 1999;274:30353-6.
- Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Casals I, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventós RM. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometry study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Mass Spectrom* 2003;38:35-42.
- Sasazuki S, Kodama H, Yoshimasu K, Liu Y, Washio M, Tanaka K, Tokunaga S, Kono S, Arai H, Doi Y, Kawano T, Nakagaki O, Takada K, Koyanagi S, Hiyamuta K, Nii T, Shirai K, Ideishi M, Arakawa K, Mohri M, Takeshita A. Relation between green tea consumption and the severity of coronary

- atherosclerosis among Japanese men and women. *Ann Epidemiol* 2000;10:401-8.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45:287-306.
 - Scarabin PY, Aillaud MF, Amouyel P, Evans A, Luc G, Ferrieres J, Arveiler D, Juhan-Vague I. Associations of fibrinogen, factor VII and PAI-1 with baseline findings among 10.500 male participants in a prospective study of myocardial infarction – the PRIME Study. *Thromb Haemost* 1998;80:749-56.
 - Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7458-63.
 - Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001;89:1092-103.
 - Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001;104:2266-8.
 - Schönbeck U, Gerdes N, Varo N, Reynolds RS, Horton DB, Bavendiek U, Robbie L, Genz P, Kinlay S, Libby P. Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 2002;106:2888-93.
 - Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Bauerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J Exp Med* 1992;175:1181-94.
 - Serafini M, Laranjinha JA, Almeida LM, Maiani G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidants capacity in humans. *J Nutr Biochem* 2000;11:585-90.
 - Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1400-8.
 - Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kaira VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* 1996;270:H1624-33.
 - Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr* 2005;81: S304-12.
 - Singleton VL, Trousdale E. White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *Am J Enol Vitic* 1983;34:27-34.
 - Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hubner F, Liao JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leuk Biol* 1998;63:732-9.

- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. The multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
- Stampfer MI, Colditz GA, Willet WC, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. *NEJM* 1988;319:267-73.
- Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:1050-5.
- Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of Inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 2003;108:1917-23.
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemoprotective activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 2001;480-1:243-68.

T

- Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *JAMA* 2003;290:1029-30.
- Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenstrual women. *Circulation* 2002; 105:564-9.
- Teragawa H, Fukuda Y, Matsuda K, Higashi Y, Yamagata T, Matsuura H, Chayama K. Effect of alcohol consumption on endothelial function in men with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002;165:145-52.
- Terkeltaub R, Boisvert WA, Curtiss LK. Chemokines and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:397-405.
- Testa R, Marcovina SM. The rate of plasmin formation after in vitro clotting is inversely related to lipoprotein(a) plasma levels. *Inter J Clin Lab Res* 1999;29: 128-32.
- Theobald H, Johansson SE, Engfeldt P. Influence of different type of alcoholic beverages on self-reported health status. *Alcohol Alcohol* 2003;38:583-8.
- Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW Jr, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly US adults. *N Engl J Med* 1997;337:1705-14.

- Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999;94:295-314.
- Torres Duarte A, Dong QS, Young J, Abi-Younes S, Myers AK. Inhibition of platelet aggregation in whole blood by alcohol. *Thromb Res* 1995;78:107-15.

U

- U.S. Department of Health and Human services and U.S. Department of Agriculture (2000). *Nutrition and your health: Dietary guidelines for Americans*. 5th ed. USDA, Washington, DC.

V

- Van de Wiel A, Van Golde PM, Kraaijenhagen RJ, Van dem Borne PA, Bouma BN, Hart HC. Acute inhibitory effect of alcohol on fibrinolysis. *Eur J Clin Invest* 2001;31:164-70.
- Van den Burg PJ, Hospers JE, van Vliet M, Mosterd WL, Bouma BN, Huisveld IA. Effect on endurance training and seasonal fluctuation on coagulation and fibrinolysis in young sedentary men *J Appl Physiol* 1997;82:613-20.
- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adult. *JAMA* 1999;282:2131-5.
- Vita JA, Keaney JF, Loscalzo J. Endothelial dysfunction in vascular disease, in: Loscalzo J, Creager MA, Dzau VJ (Eds.). *Vascular Medicine: A textbook of vascular biology and diseases*. Little Brown (Boston) 1996;9:245-6.
- Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* 2005;81: S292-7.
- Volpato S, Pahor M, Ferrucci L, Simonsick EM, Guralnik JM, Kritchevsky SB, Fellin R, Harris TB. Relationship of alcohol intake with inflammatory markers and plasminogen activator inhibitor-1 in well-functioning older adults: the Health, Aging and Composition study. *Circulation* 2004;109:607-12.

W

- Wang Z, Barker TH, Fuller GM. Alcohol at moderate levels decreases fibrinogen expression *in vivo* and *in vitro*. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;12:1927-32.
- Wannamethee SG, Shaper AG. Alcohol, coronary heart disease and stroke: an examination of the J-shaped curve. *Neuroepidemiology* 1998;17:288-95.

- Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL. Antioxidants in chocolate. *Lancet* 1996;348:834.
- Watson RR, Prabhala RH, Abril E, Smith TL. Changes in lymphocyte subsets and macrophage functions from high, short-term dietary ethanol in C57/BL6 mice. *Life Sci* 1988;43:865-9.
- Weber C, Erl W, Pietsch A, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW, Weber PC. Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1665-73.
- Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *NEJM* 1998;338:1042-50.
- Wellmann J, Heidrich J, Berger K, Döring A, Heuschmann FU, Keil U. Changes in alcohol intake and risk of coronary heart disease and all cause mortality in the MONICA/KORA-Augsburg cohort 1987-97. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004;11:49-55.
- Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int* 2000;33:423-47.
- Wood KM, Cadogan MD, Ramshaw AL, Parums DV. The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopathology* 1993;22:437-44.

Y

- Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107:135-42.
- Yamamoto Y, Gaynor RB. I kappa B kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004;29:72-9.
- Yarnell JW, Sweetnam PM, Rumley A, Lowe GD. Lifestyle and haemostatic risk factors for ischemic heart disease: the Caerphilly Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:271-9.
- Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5252-6.
- Yokota T, Hansson GK. Immunological mechanisms in atherosclerosis. *J Int Med* 1995;238:479-89.

Z

- Zanettini R, Bettega D, Agostoni O, Ballestra B, del Rosso G, di Michele R, Mannucci PM. Exercise training in mild hypertension: effects on blood pressure, left ventricular mass and coagulation factor VII and fibrinogen. *Cardiology* 1997;88:468-73.
- Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr* 2005;135:2291-4.
- Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, Shachter NS, Fernandez ML. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr* 2005;135:1911-7.

ANEXE DE PUBLICACIONES

Diagnostic Performance of Urinary Resveratrol Metabolites as a Biomarker of Moderate Wine Consumption

RAUL ZAMORA-ROS,¹ MIREIA URPI-SARDÀ,¹ ROSA M. LAMUELA-RAVENTÓS,¹
RAMÓN ESTRUCH,² MÓNICA VÁZQUEZ-AGELL,² MANUEL SERRANO-MARTÍNEZ,³
WALTER JAEGER,⁴ and CRISTINA ANDRES-LACUEVA^{1*}

Background: Nutritional biomarkers may be better measures of dietary exposure than self-reported dietary data. We evaluated resveratrol metabolites, potential biomarkers of wine consumption, in humans after moderate consumption of sparkling, white, or red wines.

Methods: We performed 2 randomized, crossover trials and a cohort study. In the first study, 10 healthy men consumed 30 g of ethanol/day as sparkling wine or gin for 28 days. In the second trial, 10 healthy women consumed 20 g of ethanol/day as white or red wine for 28 days. We also evaluated 52 participants in a study on the effects of a Mediterranean diet on primary prevention of cardiovascular disease (the PREDIMED Study). We used liquid chromatography–tandem mass spectrometry to analyze urinary total resveratrol metabolites (TRMs) and predictive values and ROC curve analyses to assess the diagnostic accuracy.

Results: We observed significant increases in TRMs [72.4 (95% confidence interval, 48.5–96.2; $P = 0.005$), 211.5 (166.6–256.3; $P = 0.005$), and 560.5 nmol/g creatinine (244.9–876.1; $P = 0.005$)] after consumption of sparkling, white, or red wine, respectively, but no changes after the washout or gin periods. In the cohort

study, the reported daily dose of wine consumption correlated directly with TRMs ($r = 0.654$; $P < 0.001$). Using a cutoff of 90 nmol/g, we were able to use TRMs to differentiate wine consumers from abstainers with a sensitivity of 72% (60%–84%); and a specificity of 94% (87%–100%).

Conclusions: Resveratrol metabolites in urine may be useful biomarkers of wine intake in epidemiologic and intervention studies.

© 2006 American Association for Clinical Chemistry

Epidemiologic studies have shown a negative correlation between moderate wine consumption and cardiovascular disease (1). In addition to ethanol, wine contains several minor compounds, such as polyphenols, that contribute to the differences observed between wine and distillates (2, 3). To date, no studies have been performed to determine biomarkers of wine consumption. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) and piceid (resveratrol-3-O- β -glucoside) are phenolic compounds present mainly in grapes and wine (4), and these compounds may have a role in the prevention of cancer, cardiovascular disease (1), and neurodegenerative diseases (5). In addition, they may be useful as biomarkers of wine consumption.

Biomarkers for epidemiologic and clinical assays have 3 distinct advantages over dietary data obtained by food frequency questionnaires (FFQs)⁵ (6, 7). One advantage is that biochemical markers of the intake of some nutrients are more precise than dietary assessment. Another advantage is that dietary data obtained by FFQ are often inadequate because of insufficient reporting of food com-

¹ Nutrition and Food Science Department-CeRTA, Pharmacy School, and
² Department of Internal Medicine, Hospital Clínic, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

³ Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, University of Navarra, Pamplona, Spain.

⁴ Department of Clinical Pharmacy and Diagnostics, University of Vienna, Vienna, Austria.

* Address correspondence to this author at: Nutrition and Food Sciences Department-CeRTA, Pharmacy School, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain. Fax 34-93-403-59-31; e-mail candres@ub.edu.

Received December 23, 2005; accepted April 11, 2006.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2005.065870

⁵ Nonstandard abbreviations: FFQ, food frequency questionnaire; LC-MS/MS, liquid chromatography–mass spectrometry; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence interval; and TRMs, total resveratrol metabolites.

position. The third advantage is that biomarker analysis provides a more proximal measure of specific nutrient intake than do FFQ data because it is an integrated measure of the bioavailability and metabolism of the component.

Recent advances in analytical techniques have improved the effectiveness and expanded the possibilities of biomarker analyses. Tandem mass spectrometry increases the sensitivity and selectivity of measurement of the metabolites of some nutrients (8, 9). Resveratrol metabolites could be the best nutritional biomarkers for wine consumption because *trans*-resveratrol-3-*O*-glucuronide has been reported to be the main resveratrol metabolite in human blood (10), urine (11), LDL (12), and target organs (13). Other phenolic metabolites previously used as biomarkers of food consumption include 4'-*O*-methylgallic acid (the main gallic acid metabolite) for tea (14), isoferulic acid for coffee (14), and isoflavonoids for soy (15).

The aim of this study was to determine the concentrations of resveratrol metabolites in blood and urine in 2 different studies after 4 weeks of wine consumption and to evaluate their usefulness as potential biomarkers of wine intake in intervention studies. In addition, we analyzed baseline data from a cohort included in a large intervention study to assess the diagnostic performance of this biomarker in real-life conditions.

Material and Methods

STUDY PARTICIPANTS

Clinical trials. The 2 intervention studies were open, prospective, randomized, crossover, single-blinded clinical trials.

The sparkling wine study (January to June 2005) included 10 healthy men [mean (SD) age, 28.2 (7.3) years; body mass index, 25.2 (1.3) kg/m²], and the wine study (September to December 2004) included 10 healthy women [mean (SD) age, 38.1 (9.2) years; body mass index, 24.1 (4.0) kg/m²]. All participants in both studies were healthy, and none reported any prior relevant disease.

COHORT STUDY

The PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea) Study is a large, parallel group, multicenter, controlled, randomized 4-year clinical trial aimed at assessing the effects of the Mediterranean diet on the primary prevention of cardiovascular disease (<http://www.predimed.org>). In the present study, we analyzed the baseline data of 52 consecutively admitted trial participants (30 men and 22 women admitted April to July 2005). Exclusion and inclusion criteria have been described previously by Estruch et al. (16). Twenty-nine participants (55.8%) reported a mean (SD) daily intake of 118.3 (112.3) mL of wine. Seven (13.5%) reported intermittent drinking, mostly during weekends, consuming a mean of 98.0 (28.7) mL of wine per week, and 16 participants (30.7%) did not drink. All but 2 (93%) of the daily drinkers reported to preferentially consume red wine, although 24% also re-

ported drinking lower amounts of white wine and sparkling wine. The Institutional Review Board of the Hospital Clinic of Barcelona approved the 3 study protocols, and written informed consent was obtained from each participant.

STUDY DESIGN

Clinical trials. Both studies were carried out over a 16-week period. During the first 4 weeks, the participants did not drink any alcoholic beverages (first washout period). During the next 4 weeks, they underwent the first intervention, after which they underwent a second 4-week washout period. During the final 4 weeks, the participants underwent the second intervention.

In the sparkling wine study, the interventions consisted of the intake of 30 g of ethanol/day as sparkling wine (300 mL/day) or as gin (100 mL/day) in a random order during dinner. In the wine study, the volunteers consumed 20 g of ethanol/day as red wine (200 mL/day) or white wine (200 mL/day), also in a random order during dinner.

In both studies, diet was monitored before and after each intervention period by use of a 3-day food-and-drink recall questionnaire, which had been validated previously in our country (17). We converted the reported consumption into nutritional data with the Professional Diet Balancer software (Cardinal Health Systems, Inc.). The clinical investigators and laboratory technicians did not know the sequence of the intervention.

Reports from the participants and the number of empty bottles returned showed adherence. We did not observe significant differences between nutrient intake, anthropometric variables, and energy expended in physical activity before and after the evaluated interventions.

Urine and serum samples were collected the morning after the interventions and washout periods after overnight fasting and were coded with random numbers and stored at -80 °C until analyses, which were performed with no knowledge of the clinical data.

Cohort study. At baseline, participants completed a 137-item validated FFQ (18) and the validated Spanish version (19) of the Minnesota Leisure Time Physical questionnaire. Data collected included information on drinking habits, such as amount, frequency, and type of alcohol intake. We took samples of fasting blood and morning urine from all participants. Energy and nutrient intakes were calculated from Spanish food composition tables (20). Urine samples were coded and stored at -80 °C until analyses. The clinical investigators and laboratory technicians were blinded to clinical data.

Reported daily consumption of the key food items and nutrients, as well as estimated energy expenditure from physical activity, were similar in the participants who drank wine daily, those who drank intermittently, and those who did not drink any kind of wine.

MEASUREMENT OF TOTAL RESVERATROL IN BEVERAGES BY HPLC WITH A DIODE ARRAY DETECTOR

We concentrated 5 mL of sparkling wine, white wine, or gin, under reduced pressure and protected against exposure to ultraviolet light, to a final volume of 2 mL. Wines were injected directly into the HPLC according to the previously described method (21). Results are reported as milligrams of total resveratrol consumed per day.

QUANTIFICATION OF RESVERATROL METABOLITES FROM HUMAN SAMPLES

We used liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as described elsewhere (12) to analyze resveratrol metabolites extracted from urine and serum samples by solid-phase extraction. Briefly, urine samples (5 mL) were loaded on Oasis HLB cartridges (60 mg; Waters) that had been equilibrated. The cartridges were washed, and resveratrol metabolites were eluted with acidified methanol solution and ethyl acetate. The organic extract was evaporated under N_2 . The samples were redissolved with 100 μ L of the mobile phase used for the LC initial conditions with taxifolin as internal standard and then analyzed in the LC-MS/MS system.

We identified and quantified resveratrol metabolites in urine and serum with an LC system (Perkin-Elmer s200) coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (API 3000; Perkin-Elmer Sciex) as described elsewhere (12). The intra- and interassay CVs for *trans*-resveratrol were 2.4% and 4.8%, respectively, and the analyses were performed in duplicate. All results for urinary resveratrol metabolites were corrected for urinary creatinine and are reported as nanomoles per gram of creatinine in the morning urine (11, 12). Urinary creatinine was assayed with the standard Jaffe (alkaline picrate) kinetic method (22). Serum (500 μ L) was treated with 20 μ L of *ortho*-phosphoric acid, vortex-mixed for 1 min, and processed by the same procedure.

STATISTICAL ANALYSIS

We used the standard statistical methods of the SPSS Statistical Analysis System, Ver. 11.5 (SPSS). Descriptive statistics with the mean (SD) were used for the baseline characteristics of the participants. Because the data were skewed (Kolmogorov and Levene tests), we used the Wilcoxon test for related samples to compare changes in outcome variables in response to each intervention period in both clinical trials. To exclude the presence of a carryover effect, we compared the observed outcome variables before both intervention periods. To compare groups in the cohort study, we used the 2-tailed *t*-test and ANOVA when indicated. We used Pearson correlations to examine associations between wine consumption and urinary excretion of resveratrol metabolites. To assess the accuracy of urinary resveratrol metabolite measurement for differentiating between wine consumers and nonconsumers, we calculated the sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative predictive values (NPV), the likeli-

hood ratio, and the ROC curve for the 2 randomized, crossover trials and the cohort study. With ROC curve analysis, we calculated a cutoff point that provided optimized sensitivity and specificity for the identification of wine consumers. Within- and between-group differences are expressed as means and 95% confidence intervals (CIs). All statistical tests were 2-tailed, and the significance level was 0.05.

Results

RESVERATROL CONCENTRATIONS IN BEVERAGES

The amount of total resveratrol consumed per day in the clinical trials was 0.357, 0.398, and 2.56 mg for sparkling, white, and red wine, respectively. The content of resveratrol in gin was below the detection limits.

CLINICAL TRIALS

Sparkling wine study. After 28 days of dietary supplementation with 300 mL/day of sparkling wine, *cis*- and *trans*-resveratrol-3-*O*-glucuronides were found in the urine of all participants, whereas only very low concentrations of these metabolites were detected in the urine after the washout periods and the gin period. The mean concentrations of resveratrol metabolites in urine before and after each intervention are shown in Fig. 1. The amount of total resveratrol metabolites (TRMs) identified in this study increased by 72.4 nmol/g (95% CI, 48.5–96.2 nmol/g; $P = 0.005$) after sparkling wine consumption, whereas the concentration of these metabolites did not vary significantly after the gin period (Fig. 1). The order of interventions did not affect the results. No positive results were obtained when urine was checked for resveratrol aglycone, piceid, and sulfoconjugates. Serum concentrations of resveratrol and its metabolites were below the limits of detection in all participants evaluated.

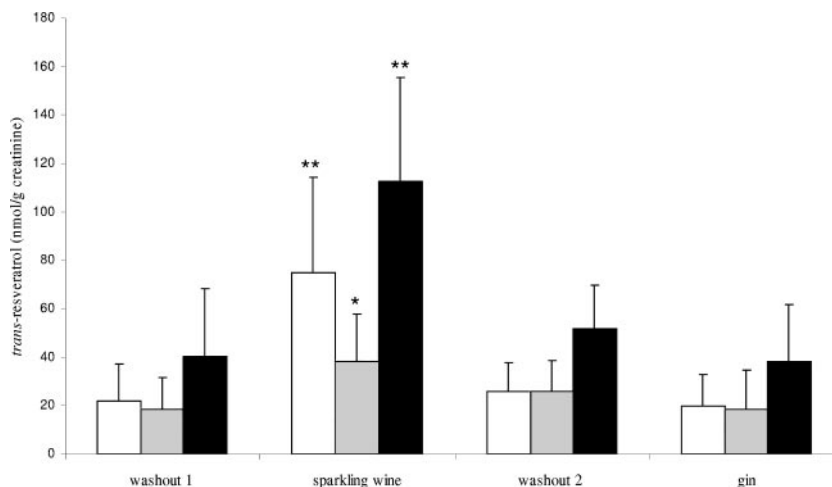
White and red wine study. After 28 days of dietary supplementation with white or red wine (200 mL/day), *trans*- and *cis*-resveratrol-3-*O*-glucuronide were found in the urine of all participants, whereas only very low concentrations of these metabolites were detected in urine after the washout periods (Fig. 2). According to the TRM results, both metabolites increased by 211.5 nmol/g (95% CI, 166.6–256.3 nmol/g; $P = 0.005$) after white wine consumption and by 560.5 nmol/g (244.9–876.1 nmol/g; $P = 0.005$) after red wine intake. The differences between the changes observed after white and red wine intake significantly favored red wine [349.6 nmol/g (86.8–612.3 nmol/g); $P = 0.005$]. For all participants, no free resveratrol, piceid, or sulfoconjugates were detected in the urine, and resveratrol and its metabolites were below the limits of detection in serum.

BOTH CLINICAL TRIALS

We used ROC curves to assess the effectiveness of urinary resveratrol metabolite measurement as a biomarker for wine intake. The optimal cutoff point was 90 nmol/g,

Fig. 1. Concentrations of urinary resveratrol glucuronides after washout period 1, sparkling wine intervention, washout period 2, and gin intervention.

Results are expressed as nmol of *trans*-resveratrol/g creatinine. Values are the means (SD; error bars) of duplicate measurement of samples from 10 volunteers. □, *trans*-resveratrol-3-glucuronide; ▒, *cis*-resveratrol-3-glucuronide; ■, total resveratrol glucuronides. Significant differences: *, $P < 0.05$; **, $P = 0.005$ for difference from results obtained during the previous washout period (Wilcoxon test).



which allowed differentiation of the washout and gin periods from the wine periods (Fig. 3): area under the curve = 0.985 (95% CI, 0.928–0.999); sensitivity = 93% (88%–99%); specificity = 98% (94%–100%); likelihood ratio = 46.7 (35.8–57.6); PPV = 95.6% (91.1%–100%); NPV = 85.3% (77.5%–93.1%).

COHORT STUDY

Participants who reported wine consumption had significantly higher urinary concentrations of *trans*- and *cis*-resveratrol-3-*O*-glucuronide than those who did not consume wine (Fig. 4). The mean (SD) urinary TRM concentration was 282.7 (305.2) nmol/g for participants who reported moderate daily wine consumption, a value that differed significantly from that measured in those who did not consume wine [mean difference, 242.2 nmol/g (95% CI, 125.0–359.3 nmol/g); $P = 0.001$] and those who consumed wine intermittently [171.4 nmol/g (44.5–298.2 nmol/g); $P = 0.01$; Fig. 3]. Mean (SD) urinary TRM concentrations were 111.3 (69.1) nmol/g for participants who reported intermittent wine consumption, a

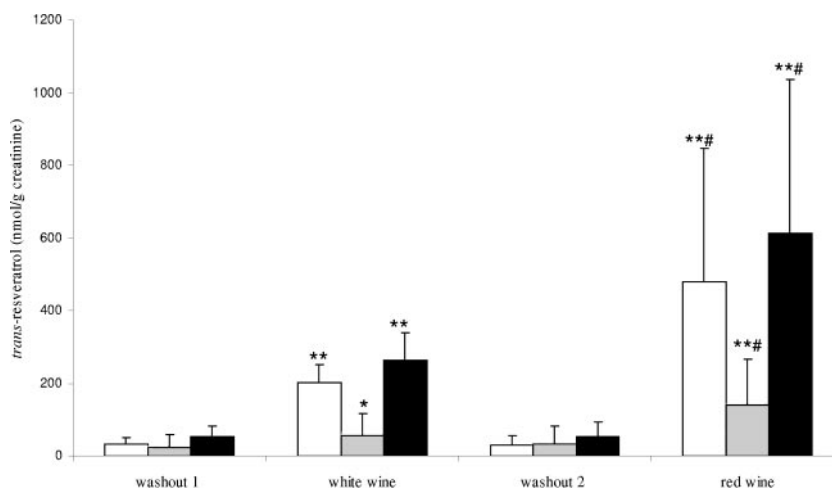
value that differed from the concentration observed in abstainers [70.8 nmol/g (6.4–135.2 nmol/g); $P = 0.035$]. The reported daily wine consumption correlated directly with urinary concentrations of resveratrol glucuronides ($r = 0.654$; $P < 0.001$).

The cutoff of 90 nmol/g enabled differentiation of moderate wine drinkers from those who did not drink wine with an area under the ROC curve (Fig. 5) of 0.863 (95% CI, 0.739–0.942), a sensitivity of 72% (60%–84%), a specificity of 94% (87%–100%), a PPV of 96.4% (91.3%–100%), an NPV of 59.1% (45.7%–72.5%), and a likelihood ratio of 11.6 (2.9–20.3). The percentage of false negatives was higher in those who consumed wine intermittently than in those who consumed it daily (43% and 24%, respectively); consequently, the sensitivity was higher in those who consumed moderate amounts of wine daily (76%) than in those who consumed wine intermittently (57%).

In all participants, no free resveratrol, piceid, or sulfoconjugates were detected in the urine, and resveratrol and its metabolites were below the limit of detection in the serum.

Fig. 2. Concentrations of urinary resveratrol glucuronides after washout period 1, white wine intervention, washout period 2, and red wine intervention.

Results are expressed as nmol of *trans*-resveratrol/g creatinine. Values are the means (SD; error bars) from duplicate measurements of samples from 10 volunteers. □, *trans*-resveratrol-3-glucuronide; ▒, *cis*-resveratrol-3-glucuronide; ■, total resveratrol glucuronides. Significant differences: *, $P < 0.05$; **, $P = 0.005$ for differences from results obtained during the previous washout period (Wilcoxon test); #, $P = 0.005$ for difference from values after white wine intake (Wilcoxon test).



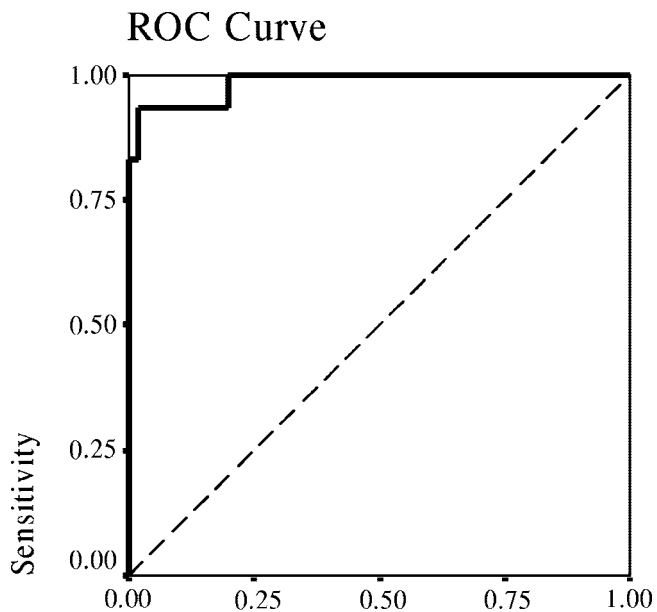


Fig. 3. ROC curve of urinary TRM concentrations for wine consumption periods vs washout and gin consumption periods in the clinical studies.

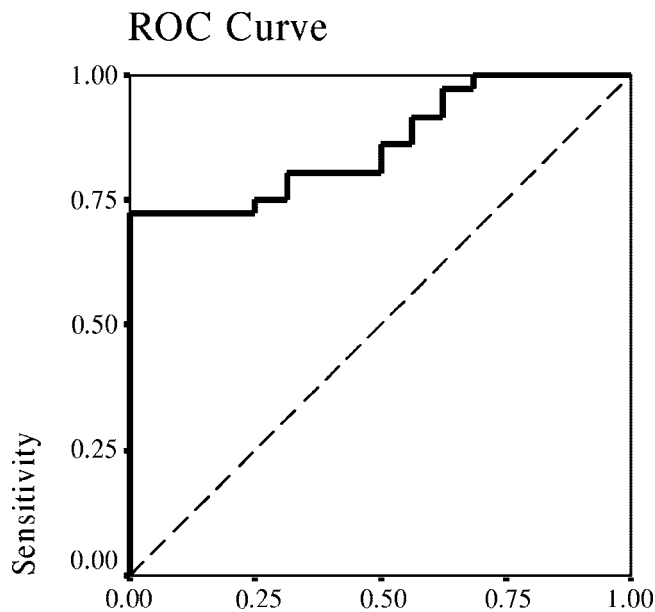


Fig. 5. ROC curve of urinary TRM for discrimination of wine consumers from non-wine consumers in the PREDIMED Study.

Discussion

An ideal biomarker should be specific, have an adequate half-life, and provide good correlation between the measured value and exposure (7). The results of the current study indicate that resveratrol metabolites fulfill the criteria to be considered as a biomarker of wine intake.

The 2 intervention clinical trials, which included men and women, allowed assessment of a urinary concentration of resveratrol metabolites of 90 nmol/g as a cutoff to differentiate wine drinkers from non-wine drinkers: this cutoff had a sensitivity and specificity >90% and a PPV >95%. The usefulness of this biomarker was then tested in a cohort of 52 consecutively admitted participants in a large-scale feeding clinical trial, the PREDIMED Study. In real-life conditions, this biomarker had a sensitivity of 73%, a specificity of 93%, and a PPV of 96%. However, the NPV was 60% because of a high percentage of false negatives among intermittent drinkers. Thus, urinary

concentrations of resveratrol metabolites are particularly useful as biomarkers of wine intake for moderate and regular drinkers, just as other phenolic compounds have been shown to be useful biomarkers for the intake of fruits, vegetables, tea, or coffee (14,23). We selected resveratrol as a marker of wine intake because it is a characteristic polyphenol of grape and wine products. Although a few other foods contain resveratrol (24–27), the quantities in those foods are much lower than those observed in grape and wine products (4, 21, 28).

Resveratrol metabolites were detected in morning urine after moderate and regular wine intake. Resveratrol metabolism has been investigated extensively in preclinical studies using animals (11, 29, 30), but few studies have been performed in humans (10, 12, 30–33). In the current trials, resveratrol intake ranged from 0.0040 mg/kg (0.35 mg of total resveratrol) for those who drank sparkling wine to 0.041 mg/kg (2.56 mg of total resveratrol) for those who consumed red wine; these values are

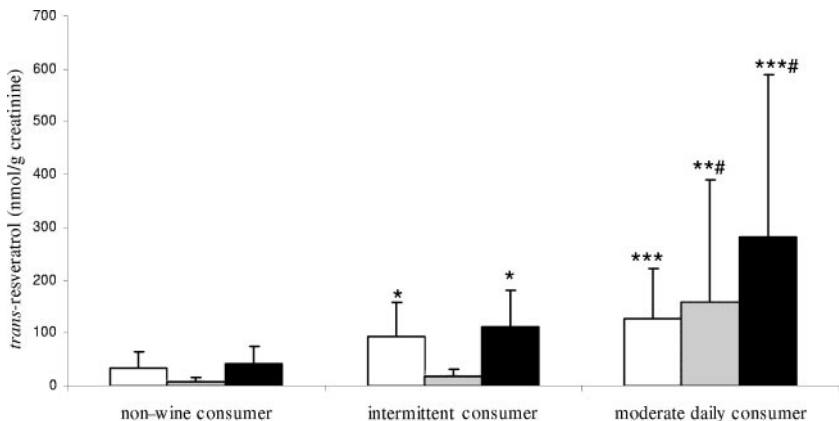


Fig. 4. Concentrations of urinary resveratrol glucuronides among non-wine consumers, intermittent consumers, and moderate daily consumers.

Results are expressed as nmol of *trans*-resveratrol/g creatinine. Values are the means (SD; error bars) from 52 participants. □, *trans*-resveratrol-3-glucuronide; ▒, *cis*-resveratrol-3-glucuronide; ■, sum of the resveratrol glucuronides. Significant differences: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ for difference from results obtained for samples from non-wine consumers (unpaired *t*-test). #, $P < 0.01$ for difference from values for intermittent wine consumers (unpaired *t*-test).

similar those reported in the literature (10, 30). These amounts cover the usual range of resveratrol intake from wine products (34, 35). To achieve high amounts of resveratrol, supplements must be taken (36). In the current trials, we were able to identify resveratrol metabolites in urine ~10 h after moderate intake of sparkling wine. Meng et al. (30) did not detect any resveratrol metabolites in the urine of volunteers after a comparable single dose of resveratrol, but the authors were able to quantify resveratrol metabolites in urine samples after a higher single dose (0.014 mg/kg). Because the accumulation of a metabolite increases after several days of ingestion (6, 37), our results suggest that urine analysis may be useful for determining regular wine intake. The metabolically active compounds could enter the urine when their concentrations in plasma increase and exceed the relevant renal threshold (38). Taking into account the bioactivity of wine phenols and comparing a single dose vs regular and moderate intake, Fisher and Hollenberg (39) observed an increased vascular response indicated by endothelial nitric oxide release over time. Furthermore, inclusion of resveratrol intake in a complex meal could increase or decrease the bioavailability of polyphenols (40).

We also observed interindividual variability in our intervention studies (Figs. 1 and 2). Similar results have been described previously for resveratrol in LDL particles (12), anthocyanins (41), isoflavones (42), and olive oil phenols such as tyrosol and hydroxytyrosol (43). Despite this variability among individuals, however, we observed a highly significant correlation between wine intake and urinary concentrations of the metabolites. Higher concentrations of resveratrol metabolites were found after higher resveratrol intake (when red wine was consumed). Likewise, a lower concentration of resveratrol metabolites was found after lower resveratrol intake (sparkling or white wine). After the washout periods as well as after gin intervention, very low concentrations of resveratrol glucuronide were detected in urine, possibly from previous intake of food with very low resveratrol content or interference from compounds with a similar structure, such as estrogens. Similar results have been observed after washout periods in studies investigating quercetin (44) and other polyphenols (45), as well as for hydroxytyrosol, a metabolite of dopamine, in an study of olive oil (46). Mean (SD) TRM concentrations did not differ significantly in response to various periods of no wine intake in our studies [43.4 (23.5), 51.5 (36.1), and 40.5 (33.6) nmol/g for sparkling, white, and red wine, respectively] as part of the larger PREDIMED Study.

Urinary resveratrol glucuronide is the main metabolite of resveratrol in humans (~97%) (30–32) and rodents (>90%) (29, 30), except in the study by Walle et al. (40%) (33). In studies of low resveratrol intake, only the glucuronide form was detected (30). In the current studies, 2 monoglucuronides, *trans*- and *cis*-resveratrol-3-*O*-glucuronide, were identified after moderate wine consumption, findings similar to those of previous studies (11, 47).

Resveratrol sulfates were not detected in morning urine after wine intake. However, further investigation is needed in this regard. The sulfate form has been reported in human urine after administration of high resveratrol doses (33). In other studies, the free form of resveratrol was not detected in human urine after moderate wine consumption but was found after high doses were consumed (31, 32).

In the present study, resveratrol metabolites were also measured in serum. In these samples, however, no resveratrol metabolites were detected an average of 10 h after the consumption of wine. In previous studies, resveratrol has been detected in plasma after a minimum resveratrol intake of 0.357 mg/kg in a single dose (31, 32). Furthermore, the half-life of resveratrol in human plasma is 2 h, with the highest concentrations being recorded at 30 min (31, 32). Thus, plasma concentrations of resveratrol are not a useful marker for regular intake because plasma concentrations increase only after very recent intake.

In summary, we identified resveratrol metabolites in human urine after moderate wine intake, suggesting that these metabolites can be used as a biomarker of moderate wine intake in regular drinkers. This biomarker can also be used to exclude moderate wine drinking in abstainers but may be less effective in intermittent drinkers. Therefore, resveratrol metabolites may be used as a measure of compliance in interventional studies as well as an objective measure of wine consumption in epidemiologic studies.

This study was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (Red de Grupo G03/140) from the Ministry of Health, and partially by Grants AGL2004-08378-C02-01/02/ALI and AGL 2005-0559/ALI from the Ministry of Education and Science (MEC) of the Spanish government. R.Z.R. was supported by the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació, and M.U.S. by an FPI fellowship from MEC. We are indebted to Drs. Isidre Casals and Olga Jauregui from the Scientific and Technical Services (University of Barcelona, Barcelona, Spain), and to Dr Maite Ibern for project management. We also thank Dr. Antonio Cherubini for reading the manuscript and providing helpful comments.

References

1. Szmitko PE, Verma S. Cardiology patient pages: red wine and your heart. *Circulation* 2005;111:e10–1.
2. Badia E, Sacanella E, Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Antunez E, Rotilio D, et al. Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption. *Am J Clin Nutr* 2004;80:225–30.
3. Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antunez E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, et al. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial; effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis* 2004;175:117–23.

4. Lamuela-Raventós R, Romero-Pérez A, Waterhouse A, de la Torre-Boronat M. Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceic isomers in Spanish red *vitis vinifera* wines. *J Agric Food Chem* 1995;43:281–3.
5. Dore S. Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neurosignals* 2005;14:61–70.
6. Potischman N. Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *J Nutr* 2003;133(Suppl 3):875S–80S.
7. Marshall JR. Methodologic and statistical considerations regarding use of biomarkers of nutritional exposure in epidemiology. *J Nutr* 2003;133(Suppl 3):881S–7S.
8. Liu DQ, Xia YQ, Bakhtiar R. Use of a liquid chromatography/ion trap mass spectrometry/triple quadrupole mass spectrometry system for metabolite identification. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16:1330–6.
9. Day AJ, Williamson G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br J Nutr* 2001;86(Suppl 1):S105–10.
10. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, et al. Bioavailability of *trans*-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:495–504.
11. Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, Lee YS, et al. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res* 2002;19:1907–14.
12. Urpi-Sarda M, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Jaeger W, Miksits M, Covas M, et al. Uptake of diet resveratrol into the human low density lipoprotein: identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2005;77:3149–55.
13. Vitrac X, Desmouliere A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, et al. Distribution of [¹⁴C]-*trans*-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci* 2003;72:2219–33.
14. Hodgson JM, Chan SY, Puddey IB, Devine A, Wattanapenpaiboon N, Wahlqvist ML, et al. Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea- and coffee-derived polyphenol exposure in human subjects. *Br J Nutr* 2004;91:301–6.
15. Seow A, Shi CY, Franke AA, Hankin JH, Lee HP, Yu MC. Isoflavonoid levels in spot urine are associated with frequency of dietary soy intake in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:135–40.
16. Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;in press.
17. Schroder H, Covas MI, Marrugat J, Vila J, Pena A, Alcantara M, et al. Use of a three-day estimated food record, a 72-hour recall, and a food-frequency questionnaire for dietary assessment in a Mediterranean Spanish population. *Clin Nutr* 2001;20:429–37.
18. Martín-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernández-Rodríguez JC, Salvini S, et al. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol* 1993;22:512–9.
19. Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E, Arquer A, et al. Validation of the Minnesota leisure-time physical-activity questionnaire in Spanish men. *Am J Epidemiol* 1994;139:1197–209.
20. Mataix J. Tabla de composición de Alimentos Españoles, 4th ed. Granada, Spain: University of Granada, 2003:560pp.
21. Andres-Lacueva C, Ibern-Gomez M, Lamuela-Raventos RM, Buxaderas S, de la Torre-Boronat M. Cinnamates and resveratrol content for sparkling wine characterization. *Am J Enol Vitic* 2002;53:147–50.
22. Jaffé M. Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z Physiol Chem* 1886;10:391–400.
23. Krogholm KS, Haraldsdottir J, Knuthsen P, Rasmussen SE. Urinary total flavonoid excretion but not 4-pyridoxic acid or potassium can be used as a biomarker for the intake of fruits and vegetables. *J Nutr* 2004;134:445–51.
24. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* 2002;50:3337–40.
25. Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *J Agric Food Chem* 2004;52:4713–9.
26. Romero-Perez AI, Ibern-Gomez M, Lamuela-Raventos RM, Torre-Boronat MC. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *J Agric Food Chem* 1999;47:1533–6.
27. Sobolev VS, Cole RJ. *trans*-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J Agric Food Chem* 1999;47:1435–9.
28. Romero Perez AI, Lamuela Raventos RM, Waterhouse AL, de LaTorre Boronat MC. Levels of *cis*- and *trans*-resveratrol and their glucosides in white and rose *Vitis vinifera* wines from Spain. *J Agric Food Chem* 1996;44:2124–8.
29. Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Bano MC, Obrador E, et al. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med* 2002;33:387–98.
30. Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric Food Chem* 2004;52:935–42.
31. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 2003;36:79–87.
32. Soleas GJ, Yan J, Goldberg DM. Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;757:161–72.
33. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1377–82.
34. Mattivi F, Reniero F, Korhammer S. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J Agric Food Chem* 1995;43:1820–3.
35. Soleas GJ, Goldberg DM, Diamandis EP, Karumanchiri A, Yan J, Ng E. A derivatized gas-chromatographic mass-spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. *Am J Enol Vitic* 1995;46:346–52.
36. Gescher AJ, Steward WP. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:953–7.
37. de Boer V, Dihal AA, van der WH, Arts IC, Wolfram S, Alink GM, et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr* 2005;135:1718–25.
38. Gibney MJ, Walsh M, Brennan L, Roche HM, German B, van OB. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *Am J Clin Nutr* 2005;82:497–503.
39. Fisher ND, Hollenberg NK. Flavonols for cardiovascular health: the science behind the sweetness. *J Hypertens* 2005;23:1453–9.
40. Lamuela-Raventos RM, Romero-Perez AI, Andres-Lacueva C, Tornero A. Review: health effects of cocoa flavonoids. *Food Sci Technol Int* 2005;11:159–76.
41. Wu X, Cao G, Prior RL. Absorption and metabolism of anthocya-

- nins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr* 2002;132:1865–71.
42. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47.
43. Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E, et al. Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000;10:111–20.
44. Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res* 2004;38:771–85.
45. Ito H, Gonthier MP, Manach C, Morand C, Mennen L, Remesy C, et al. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *Br J Nutr* 2005;94:500–9.
46. Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuno J, Weinbrenner T, et al. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem* 2003;49:945–52.
47. Aumont V, Krisa S, Battaglia E, Netter P, Richard T, Merillon JM, et al. Regioselective and stereospecific glucuronidation of *trans*- and *cis*-resveratrol in human. *Arch Biochem Biophys* 2001;393:281–9.

Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors

A Randomized Trial

Ramon Estruch, MD, PhD; Miguel Angel Martínez-González, MD, PhD; Dolores Corella, PhD; Jordi Salas-Salvadó, MD, PhD; Valentina Ruiz-Gutiérrez, PhD; María Isabel Covas, PhD; Miguel Fiol, MD, PhD; Enrique Gómez-Gracia, MD, PhD; Mari Carmen López-Sabater, PhD; Ernest Vinyoles, MD, PhD; Fernando Arós, MD, PhD; Manuel Conde, MD, PhD; Carlos Lahoz, MD, PhD; José Lapetra, MD, PhD; Guillermo Sáez, MD, PhD; and Emilio Ros, MD, PhD, for the PREDIMED Study Investigators*

Background: The Mediterranean diet has been shown to have beneficial effects on cardiovascular risk factors.

Objective: To compare the short-term effects of 2 Mediterranean diets versus those of a low-fat diet on intermediate markers of cardiovascular risk.

Design: Substudy of a multicenter, randomized, primary prevention trial of cardiovascular disease (Prevención con Dieta Mediterránea [PREDIMED] Study).

Setting: Primary care centers affiliated with 10 teaching hospitals.

Participants: 772 asymptomatic persons 55 to 80 years of age at high cardiovascular risk who were recruited from October 2003 to March 2004.

Interventions: Participants were assigned to a low-fat diet ($n = 257$) or to 1 of 2 Mediterranean diets. Those allocated to Mediterranean diets received nutritional education and either free virgin olive oil, 1 liter per week ($n = 257$), or free nuts, 30 g/d ($n = 258$). The authors evaluated outcome changes at 3 months.

Measurements: Body weight, blood pressure, lipid profile, glucose levels, and inflammatory molecules.

Results: The completion rate was 99.6%. Compared with the low-fat diet, the 2 Mediterranean diets produced beneficial changes

in most outcomes. Compared with the low-fat diet, the mean changes in the Mediterranean diet with olive oil group and the Mediterranean diet with nuts group were -0.39 mmol/L (95% CI, -0.70 to -0.07 mmol/L) and -0.30 mmol/L (CI, -0.58 to -0.01 mmol/L), respectively, for plasma glucose levels; -5.9 mm Hg (CI, -8.7 to -3.1 mm Hg) and -7.1 mm Hg (CI, -10.0 to -4.1 mm Hg), respectively, for systolic blood pressure; and -0.38 (CI, -0.55 to -0.22) and -0.26 (CI, -0.42 to -0.10), respectively, for the cholesterol–high-density lipoprotein cholesterol ratio. The Mediterranean diet with olive oil reduced C-reactive protein levels by 0.54 mg/L (CI, 1.04 to 0.03 mg/L) compared with the low-fat diet.

Limitations: This short-term study did not focus on clinical outcomes. Nutritional education about low-fat diet was less intense than education about Mediterranean diets.

Conclusion: Compared with a low-fat diet, Mediterranean diets supplemented with olive oil or nuts have beneficial effects on cardiovascular risk factors.

Ann Intern Med. 2006;145:1-11.

www.annals.org

For author affiliations, see end of text.

International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN): 35739639.

*For a list of additional PREDIMED Study Investigators, see the Appendix, available at www.annals.org.

Cardiovascular disease is the main cause of death in industrialized countries, but incidence rates have marked geographic differences. The low incidence of coronary heart disease (CHD) in Mediterranean countries has been partly ascribed to dietary habits (1–3). Recent findings from large European cohort studies (4–6) suggest that a high degree of adherence to the Mediterranean diet is associated with a reduction in mortality. In small clinical studies, the Mediterranean diet or some of its components have reduced blood pressure (7) and have improved lipid profiles (8, 9) and endothelial function (10). Moreover, a recent cross-sectional study (11) and a 2-year feeding trial (12) have shown that adherence to the Mediterranean diet is associated with reduced markers of vascular inflammation. These beneficial effects on surrogate markers of cardiovascular risk add biological plausibility to the epidemiologic evidence that supports a protective effect of the Mediterranean diet.

Olive oil, a rich source of monounsaturated fatty acids, is a main component of the Mediterranean diet. Virgin olive oil retains all the lipophilic components of the fruit, α -tocopherol, and phenolic compounds with strong antioxidant and anti-inflammatory properties (13, 14). Tree

nuts, which are also typical in the Mediterranean diet, have a favorable fatty acid profile and are a rich source of nutrients and other bioactive compounds that may beneficially influence the risk for CHD, such as fiber, phytosterols, folic acid, and antioxidants (15). Frequent nut intake has been associated with decreased CHD rates in prospective studies (15). Walnuts differ from all other nuts through their high content of polyunsaturated fatty acids, particularly α -linolenic acid, a plant n-3 fatty acid (16), which may confer additional antiatherogenic properties (17). Therefore, we designed a large-scale feeding trial in high-

See also:

Print

Editors' Notes 2
Summary for Patients I-11

Web-Only

Appendix
Appendix Tables
Conversion of figures and tables into slides

Context

Some experts attribute a low incidence of heart disease in Mediterranean countries to dietary habits.

Contribution

In this multicenter, 3-group trial, investigators randomly assigned 772 adults at high risk for cardiovascular disease to a low-fat diet or to a Mediterranean diet supplemented with either virgin olive oil (1 L per week) or nuts (30 g per day). After 3 months, the Mediterranean diet groups had lower mean plasma glucose level, systolic blood pressure, and total cholesterol–high-density lipoprotein cholesterol ratio than the low-fat diet group.

Cautions

The Mediterranean diet groups received more nutritional education than the low-fat diet group.

Implications

Mediterranean diets supplemented with olive oil or nuts may improve cardiovascular risk factors.

—The Editors

risk participants to assess the effects of 2 Mediterranean diets, one supplemented with virgin olive oil and the other supplemented with mixed nuts, compared with a low-fat diet on cardiovascular outcomes. We report the results of a 3-month intervention on intermediate markers of cardiovascular risk in the first 772 participants who were recruited into the trial.

METHODS**Study Design**

The Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) Study is a large, parallel-group, multicenter, randomized, controlled, 4-year clinical trial that aims to assess the effects of the Mediterranean diet on the primary prevention of cardiovascular disease (www.predimed.org). An estimated 9000 high-risk participants (>5000 participants are already recruited) will be assigned to 3 interventions: Mediterranean diet with virgin olive oil, Mediterranean diet with mixed nuts, or low-fat diet. The main outcome is an aggregate of cardiovascular events (cardiovascular death, nonfatal myocardial infarction, or nonfatal stroke). The anticipated completion date of the trial is December 2010.

We designed our present study to assess the 3-month effects of the dietary interventions on surrogate markers of cardiovascular risk in participants entering the study during the first 6 months of recruitment. The institutional review boards of the 10 participating centers approved the study protocol.

Participants and Recruitment

From October 2003 to March 2004, we selected 930 potential participants in primary care centers affiliated with

10 teaching hospitals across Spain. Eligible participants were community-dwelling men, 55 to 80 years of age, and women, 60 to 80 years of age, who fulfilled at least 1 of 2 criteria: type 2 diabetes or 3 or more CHD risk factors (current smoking, hypertension [blood pressure >140/90 mm Hg or treatment with antihypertensive drugs], low-density lipoprotein [LDL] cholesterol level ≥ 4.14 mmol/L [≥ 160 mg/dL] [or treatment with hypolipidemic drugs], high-density lipoprotein [HDL] cholesterol level ≤ 1.04 mmol/L [≤ 40 mg/dL], body mass index [BMI] ≥ 25 kg/m², or a family history of premature CHD). Exclusion criteria were history of cardiovascular disease, any severe chronic illness, drug or alcohol addiction, history of allergy or intolerance to olive oil or nuts, or low predicted likelihood of changing dietary habits according to the stages-of-change model (18).

The primary care physicians based participants' eligibility on review of clinical records and a screening visit. They obtained a list of candidates from computer-based records of patients who attended each participating center and reviewed their clinical records to exclude those who did not meet eligibility criteria. They then invited suitable candidates by telephone to attend a screening visit. The visit included an interview with administration of a 26-item questionnaire to inquire about medical conditions and risk factors related to eligibility. Of the eligible candidates who met entry requirements, 95% agreed to participate and provided informed consent.

Randomization and Intervention

After the screening visit, each center randomly assigned eligible participants to 1 of 3 diet groups by using a computer-generated random-number sequence. The coordinating center constructed the randomization table, and participants were randomly assigned into blocks of 50 participants balanced by center, sex, and age group (<70 years and ≥ 70 years). We concealed allocation into the intervention groups by using closed envelopes with correlative numbers by prespecified subgroups of sex and age.

The baseline examination included the administration of a 14-item questionnaire, an extension of a previously validated questionnaire (19), that assessed the degree of adherence to the traditional Mediterranean diet. We assigned values of 0 or 1 to each item (**Appendix Table 1**, available at www.annals.org). We also administered a 137-item validated food frequency questionnaire (20); the validated Spanish version (21) of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire; and a 47-item questionnaire about education, lifestyle, history of illnesses, and medication use. We performed anthropometric and blood pressure measurements and obtained samples of fasting blood and spot urine. We repeated all examinations at 3 months.

The same dietitian delivered the interventions to the 3 randomized groups in each center. On the basis of the assessment of individual Mediterranean diet scores, the di-

etitian gave personalized dietary advice during a 30-minute session to each participant, with recommendations on the desired frequency of intake of specific foods. We advised participants who were allocated to the low-fat diet to reduce intake of all types of fat, and we gave them a leaflet with written recommendations according to the American Heart Association guidelines (22). For total fat intake, these recommendations were opposite to those given to participants in the 2 Mediterranean diet groups, who received instructions intended to increase the 14-item Mediterranean diet score, including increased consumption of vegetable fats and oils. We did not suggest any energy restriction.

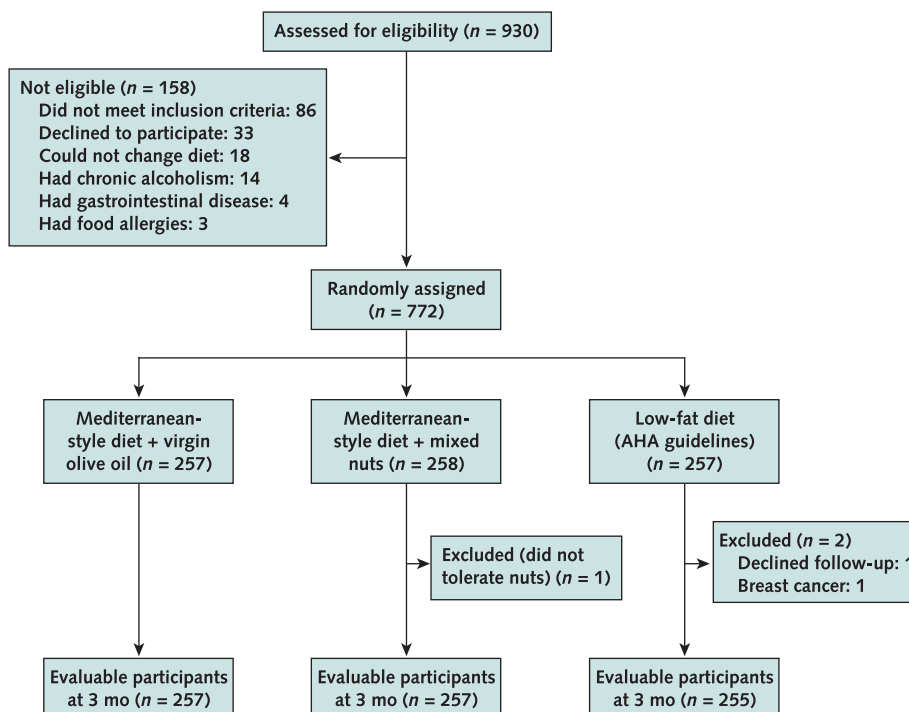
While the participants who were allocated to the low-fat diet did not receive further intervention, those assigned the 2 Mediterranean diet groups had access to more intense intervention in 2 ways. First, they were given a free provision of typical Mediterranean fatty foods (olive oil or nuts). Depending on group assignment, participants were given either free virgin olive oil (15 L [1 L/wk] for 3 months) or free sachets of walnuts, hazelnuts, and almonds (1350 g of walnuts [15 g/d], 675 g of hazelnuts [7.5 g/d], and 675 g of almonds [7.5 g/d] for 3 months). To improve adherence and account for family needs, participants in the corresponding Mediterranean diet groups were given excess olive oil or additional 1000-g packets of nuts. We analyzed the nutrient composition of the olive oil and nuts used in

the study by standard methods in a reference laboratory (Appendix Table 2, available at www.annals.org). Second, 1 week after inclusion, the dietitian delivered a 1-hour group session with up to 20 participants, with separate sessions for each Mediterranean diet group. Each group session consisted of informative talks and provision of written materials with elaborate descriptions of typical Mediterranean foods and seasonal shopping lists, meal plans, and cooking recipes. Throughout the study, all participants had free and continuous access to their center dietitian for advice and consultation.

Measurements

Trained personnel measured weight and height by using calibrated scales and a wall-mounted stadiometer, respectively; waist circumference midway between the lowest rib and the iliac crest by using an anthropometric tape; and blood pressure in triplicate with a validated semiautomatic oscillometer (Omron HEM-705CP, Hoofddorp, the Netherlands). We calculated energy and nutrient intake from Spanish food composition tables (23). At the 3-month visit and when consulted by participants, dietitians assessed any adverse effects from the interventions by administering a checklist of symptoms and gave advice on how to remedy them. The checklist included mouth symptoms; bloating, fullness, or indigestion; altered bowel habit; and any other diet-related symptom.

Figure 1. Study flow diagram.



AHA = American Heart Association.

Table 1. Baseline Characteristics*

Characteristic	Mediterranean Diet with Virgin Olive Oil (n = 257)	Mediterranean Diet with Mixed Nuts (n = 258)	Recommended Low-Fat Diet (n = 257)
Mean (SD) age, y	68.6 (6.9)	68.5 (6.2)	69.5 (6.1)
Men, n (%)	102 (40)	128 (50)	109 (42)
Family history of CHD, n (%)	63 (24)	55 (21)	60 (23)
Current smokers, n (%)	37 (14)	50 (19)	40 (15)
Mean (SD) BMI, kg/m ² †	29.7 (4.1)	29.4 (4.1)	30.2 (4.3)
Overweight or obese (BMI ≥25 kg/m ²), n (%)	232 (90)	233 (90)	231 (90)
Type 2 diabetes mellitus, n (%)	143 (56)	129 (50)	149 (58)
Hypertension, n (%)	199 (77)	193 (75)	213 (83)
Dyslipidemia, n (%)	165 (64)	171 (66)	179 (70)
Medications, n (%)			
ACE inhibitors	108 (42)	118 (46)	114 (44)
Diuretics	93 (36)	85 (33)	93 (36)
Other antihypertensive agents	60 (23)	43 (16)	57 (22)
Statins	104 (41)	115 (45)	107 (42)
Other lipid-lowering agents	18 (7)	19 (7)	14 (5)
Insulin	16 (6)	24 (9)	21 (8)
Oral hypoglycemic drugs	89 (35)	93 (36)	100 (39)
Aspirin or other antiplatelet drugs	44 (17)	49 (19)	45 (18)
Occupation, n (%)			
Unskilled	59 (23)	59 (23)	61 (24)
Skilled, manual	99 (39)	99 (38)	90 (35)
Skilled, nonmanual	59 (23)	54 (21)	59 (23)
Directive and professional	40 (15)	46 (18)	47 (18)
Education level, n (%)			
Primary school	189 (74)	180 (70)	185 (72)
First-degree high school	39 (15)	44 (17)	43 (17)
High school or university	28 (11)	34 (13)	29 (11)

* ACE = angiotensin-converting enzyme; BMI = body mass index; CHD = coronary heart disease.

† Calculated as weight in kg divided by height in m².

Samples of serum, EDTA plasma, and urine were coded, were shipped to central laboratories, and were stored at -80°C until assay. The clinical investigators and laboratory technicians were blinded to the interventions. Analytes determined for each participant in frozen samples of whole serum or plasma as appropriate were blood glucose level by the glucose-oxidase method; serum insulin level by radioimmunoassay; cholesterol and triglyceride levels by enzymatic procedures; HDL cholesterol level after precipitation with phosphotungstic acid and magnesium chloride; apolipoproteins A1 and B levels by using turbidimetry; soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and interleukin-6 levels by standard enzyme-linked immunosorbent assays; and high-sensitivity C-reactive protein (CRP) level by particle-enhanced immunonephelometry. We performed all analyses in duplicate. Intra- and interassay variation coefficients for insulin, CRP, ICAM-1, VCAM-1, and interleukin-6 ranged from 1.8% to 5.4% and from 0.9% to 9.9%, respectively.

In participants without diabetes, we calculated insulin resistance by using the homeostasis model assessment method (24): insulin resistance = fasting insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$) \times fasting glucose (mmol/L)/22.5. In a random sample of 273 participants (35%), we measured urinary tyrosol and hydroxytyrosol levels by gas chromatography-mass spectrometry as markers of adherence to virgin olive oil

intake (25) and the α -linolenic acid plasma content by gas chromatography as a measure of adherence to nut (walnut) intake (8).

Statistical Analyses

For a parallel design, statistical power calculations indicated that 227 participants per group would be needed to detect mean differences of 0.13 mmol/L (SD, 0.49) (5 mg/dL [SD, 19]) in LDL cholesterol level (8) ($\alpha = 0.05$; power = 0.8). Although we used LDL cholesterol level to set sample size, we were equally interested in changes in all end points in our exploratory and nonconfirmatory study. We based the analysis on the intention-to-treat principle. We used descriptive statistics with means and SDs for the baseline characteristics of the participants. For analysis of laboratory variables, we used the average of 2 baseline measures as the baseline value and the average of the 2 measures taken after the 3-month intervention as the final variable. We transformed values with a skewed distribution (CRP, VCAM-1, ICAM-1, and interleukin-6) to their natural logarithm for analyses. We examined 3-month changes in clinical, dietary, and laboratory variables, including center, as a stratification factor in the multivariable model. We controlled potential confounding by age, sex, and baseline body weight, entering these variables also into the multivariable model. We excluded participants whose energy intake, as derived from the food frequency ques-

tionnaires, was outside prespecified ranges (500 kcal/d to 3500 kcal/d for women and 800 kcal/d to 4000 kcal/d for men) (26) from the calculations of food, energy, and nutrient intake. In addition, we excluded participants with plasma CRP levels greater than 10 mg/L at any measurement, indicating an inflammatory process, from statistical analyses of inflammatory biomarkers. Within- and between-group differences are expressed as means and 95% CIs. All statistical tests were 2-tailed, and the significance level was 0.05. We performed analyses by using SPSS, version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Role of the Funding Sources

This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Health (Red G03/140). Fundación Patrimonio Comunal Olivarero and Hojiblanca SA, the California Walnut Commission, Borges SA, and Morella Nuts SA generously donated the olive oil, walnuts, almonds, and hazelnuts, respectively, used in the study. The funding sources had no role in the design, collection, analysis, or interpretation of the data or in the decision to submit the manuscript for publication.

RESULTS

We excluded 158 of 930 eligible participants before randomization for various reasons (Figure 1). Table 1 shows the baseline characteristics of the 772 participants who entered the study. Of these participants, 697 were Europeans of Spanish descent and 75 were Hispanic immigrants from Central and South America. Although the trial is an ongoing, large multicenter trial with large block

sizes, the groups were balanced in ethnic origin, demographic characteristics, adiposity, and risk factors. Three participants withdrew before study completion; their baseline characteristics were similar to those of the overall group.

Adverse Effects

Thirty-four (13%) participants in the Mediterranean diet with nuts group had difficulty chewing whole nuts or reported that small fragments of nuts were lodged between their teeth. This problem was solved satisfactorily by the advice to consume the nuts crushed and mixed with low-fat yogurt, except for 1 participant who withdrew from the study. Participants who were allocated to the Mediterranean diet with olive oil group or to the low-fat diet group reported no adverse effects.

Food, Energy, and Nutrient Intake

We excluded the following participants from food, energy, and nutrient calculations because they reported unrealistic energy intakes: 21 in the Mediterranean diet plus olive oil group, 19 in the Mediterranean diet plus nuts group, and 8 in the low-fat diet group (26). The main dietary changes were the large increases in consumption of virgin olive oil and nuts in the corresponding Mediterranean diet groups that were provided with these foods. Reciprocal decreases in the consumption of common olive oil indicated that participants replaced this oil by the virgin variety supplied. Both olive oil and nut intake decreased nonsignificantly in the low-fat group. Participants in the 3 groups increased the intake of vegetables, legumes, fruit, and fish and decreased the intake of meat, sweets, and dairy

Table 2. Changes in the Consumption of Key Food Items and 14-Point Mediterranean Diet Score*

Food Consumed	Mean Changes from Baseline at 3 mo (95% CI), g/d			Mediterranean Diet with Olive Oil vs. Low-Fat Diet		Mediterranean Diet with Nuts vs. Low-Fat Diet	
	Mediterranean Diet with Virgin Olive Oil (n = 257)	Mediterranean Diet with Mixed Nuts (n = 257)	Low-Fat Diet (n = 256)	Mean (95% CI) Between-Group Difference, g/d†	P Value	Mean (95% CI) Between-Group Difference, g/d†	P Value
Virgin olive oil	32 (27 to 37)	1.2 (0.1 to 2.5)	-0.1 (-3.0 to 2.8)	33 (27 to 39)	<0.001	0.8 (-3.4 to 4.9)	0.72
Refined-mixed olive oil	-25 (-30 to -21)	-0.6 (-5.5 to 4.3)	-1.6 (-5.8 to 1.6)	-24 (-28 to -21)	<0.001	1.4 (-5.9 to 3.0)	0.52
Total nuts	1.7 (0.5 to 2.9)	40 (33 to 47)	-0.7 (-3.3 to 1.9)	0.8 (-5.5 to 7.2)	0.80	38 (32 to 45)	<0.001
Vegetables	13 (-6.2 to 39)	18.0 (-1.4 to 36.0)	8.1 (-13.0 to 29.0)	5.2 (-28.0 to 39.0)	0.76	11 (-24 to 45)	0.54
Legumes	8.5 (3.5 to 13.0)	10 (5.8 to 14)	3.5 (0.2 to 6.8)	4.6 (-1.4 to 10.0)	0.137	3.3 (-2.8 to 9.4)	0.29
Fruits	5.5 (-34.0 to 44.0)	15 (-11 to 41)	25 (1 to 50)	-12 (-56 to 32)	0.58	-10 (22 to -42)	0.53
Fish or seafood	1.8 (-6.0 to 9.7)	2.4 (-7.8 to 13.0)	11.0 (-4.5 to 28.0)	-12.0 (-29.0 to 3.5)	0.124	-7.4 (-24.0 to 10.0)	0.39
Meat or meat products	-23 (-34 to -12)	-29 (-45 to -13)	-7.8 (-16.0 to 1.0)	-17.0 (-31.0 to -3.1)	0.017	-17.0 (-31.0 to -2.3)	0.023
Pastries, cakes, or sweets	-2.1 (-3.7 to -0.5)	-3.0 (-4.6 to -1.4)	-1.8 (-3.6 to 0.2)	-2.5 (-2.7 to 2.2)	0.84	-1.5 (-4.0 to 1.0)	0.23
Dairy products	-17.0 (-38.0 to 4.1)	-45 (-70 to -19)	-22.0 (-50.0 to 4.6)	4.6 (-32.0 to 40.0)	0.31	-16 (-58 to 25)	0.45
Alcohol	-0.5 (-1.9 to 0.9)	-1.3 (-2.7 to 0.1)	0.1 (-1.6 to 1.8)	-0.7 (-2.9 to 1.5)	0.53	-1.5 (-3.7 to 0.8)	0.20
14-unit Mediterranean diet score	2.2 (1.9 to 2.4)	2.8 (2.6 to 3.1)	-0.1 (-0.3 to 0.2)	2.3 (2.0 to 2.7)	<0.001	2.7 (2.4 to 3.1)	<0.001

* Of participants in the Mediterranean diet with olive oil, Mediterranean diet with nuts, and low-fat diet groups, 21, 20, and 8 participants, respectively, were excluded from calculations of food intake because reported energy was outside of prespecified ranges.

† Adjusted for center, age, sex, and baseline body weight.

products (Table 2). The Mediterranean diet score increased in the 2 Mediterranean diet groups and remained unchanged in the low-fat group. The results did not change when we included the participants whose energy consumption was out of range in the calculations.

Estimated energy expenditure from physical activity was similar in the 3 groups at baseline and after 3 months (data not shown). We observed a reduction from baseline in reported energy intake in the groups allocated to the Mediterranean diet plus olive oil and low-fat diets (Table 3). The 3 groups decreased saturated fatty acid intake from baseline; the 2 Mediterranean diet groups reduced cholesterol intake; and the Mediterranean diet with nuts group decreased the intake of total carbohydrate and increased the intake of fiber, total fat, monounsaturated fatty acids, and polyunsaturated fatty acids.

Biochemical measurements in plasma and urine samples from a random group of 273 (35%) participants in the study showed good adherence to supplemental foods in the Mediterranean diet groups. Compared with the low-fat diet group, participants assigned to the Mediterranean diet with olive oil group showed an increase from baseline in urinary tyrosol levels of 19 ng/mL (95% CI, 5 to 35 ng/mL) and in hydroxytyrosol levels of 84 ng/mL (CI, 34 to 135 ng/mL); those allocated to the Mediterranean diet with nuts group showed an increase in plasma α -linolenic acid level of 0.15 mol% (CI, 0.09 to 0.21 mol%).

Cardiovascular Risk Factors

Table 4 shows the changes in cardiovascular risk factors. Body weight and adiposity measures were slightly reduced in the 3 groups, with no between-group differences and statistically significant within-group changes only for BMI in the low-fat group. Compared with participants assigned to the low-fat diet group, those in the 2 Mediterranean diet groups had decreased systolic and diastolic

blood pressure, blood glucose levels, and cholesterol–HDL cholesterol ratio and increased HDL cholesterol levels. Fasting insulin levels and homeostasis model assessment scores were also lower in participants without diabetes in the 2 Mediterranean diet groups. Total cholesterol and triglyceride levels decreased only in the Mediterranean diet with nuts group.

Inflammatory Markers

We excluded from calculations 8 participants in the Mediterranean diet plus olive oil group, 2 participants in the Mediterranean diet plus nuts group, and 4 participants in the low-fat diet group who had plasma CRP levels greater than 10 mg/L in at least 1 measurement. Figure 2 shows the changes from baseline values in CRP, interleukin-6, ICAM-1, and VCAM-1 concentrations in the 3 groups. The CRP concentration decreased only in participants who were allocated to the Mediterranean diet plus olive oil group. Compared with participants in the low-fat diet group, adjusted between-group changes in CRP levels were -0.54 mg/L (CI, -1.04 to -0.03 mg/L) for those in the Mediterranean diet with olive oil group and 0.33 mg/L (CI, -0.19 to 0.84 mg/L) for those in the Mediterranean diet with nuts group. Circulating interleukin-6, ICAM-1, and VCAM-1 concentrations decreased in both Mediterranean diet groups and increased in the low-fat diet group. Compared with the low-fat diet group, the between-group changes in interleukin-6 level were -1.6 ng/L (CI, -2.5 to -0.6 ng/L) for the Mediterranean diet with olive oil group and -1.3 ng/L (CI, -2.3 to -0.4 ng/L) for the Mediterranean diet with nuts group. The between-group changes in ICAM-1 level were -104 ng/mL (CI, -135 to -72 ng/mL) and -97 ng/mL (CI, -128 to -65 ng/mL), respectively; the between-group changes in VCAM-1 level were -178 ng/mL (CI, -277 to -79 ng/mL) and -167 ng/mL (CI, -267 to -68 ng/mL), respectively. Be-

Table 3. Changes in Energy and Nutrient Intake*

Nutrients	Mean Changes from Baseline at 3 mo (95% CI)			Mediterranean Diet with Olive Oil vs. Low-Fat Diet		Mediterranean Diet with Nuts vs. Low-Fat Diet	
	Mediterranean Diet with Virgin Olive Oil (n = 257)	Mediterranean Diet with Mixed Nuts (n = 257)	Low-Fat Diet (n = 256)	Mean (95% CI) Between-Group Difference†	P Value	Mean (95% CI) Between-Group Difference†	P Value
Energy, kcal	-180 (-271 to -89)	-34 (-140 to 67)	-197 (-300 to -95)	4.5 (-139.0 to 148.0)	0.95	161 (12 to 310)	0.034
Energy from total protein, %	0.36 (-0.06 to 0.78)	-0.28 (-0.69 to 0.11)	0.83 (0.38 to 1.27)	-0.47 (-1.07 to 0.13)	0.122	-1.00 (-1.60 to -0.38)	0.002
Energy from total carbohydrate, %	0.33 (-0.59 to 1.26)	-2.9 (-4.0 to -1.9)	-0.36 (-1.50 to 0.80)	0.22 (-1.30 to 1.70)	0.84	-3.6 (-5.2 to -2.1)	<0.001
Fiber, g/d	0.98 (-0.74 to 2.70)	3.8 (1.8 to 5.7)	0.60 (-0.94 to 2.20)	0.49 (-1.90 to 2.90)	0.69	2.00 (-0.54 to 4.50)	0.124
Energy from total fat, %	-0.75 (-1.60 to 0.08)	3.4 (2.4 to 4.5)	-1.40 (-2.50 to -0.21)	0.45 (-1.00 to 1.90)	0.55	5.0 (3.5 to 6.5)	<0.001
SFA, %	-0.77 (-1.00 to -0.49)	-1.00 (-1.40 to -0.72)	-0.74 (-1.20 to -0.31)	-0.09 (-0.55 to 0.36)	0.69	0.07 (-0.40 to 0.54)	0.78
MUFA, %	0.15 (-0.39 to 0.70)	1.38 (0.81 to 2.00)	-0.52 (-1.20 to 0.22)	0.58 (-0.30 to 1.45)	0.198	1.9 (1.0 to 2.8)	<0.001
PUFA, %	-0.11 (-0.38 to 0.17)	3.0 (2.5 to 3.6)	0.14 (-0.46 to 0.17)	0.03 (-0.53 to 0.58)	0.93	3.0 (2.4 to 3.5)	<0.001
Linoleic acid, g/d	-2.1 (-2.8 to -1.1)	7.6 (5.8 to 9.3)	-0.68 (-1.80 to 0.44)	-0.27 (-0.85 to 0.31)	0.76	1.4 (1.1 to 1.7)	<0.001
α -linolenic acid, g/d	0.06 (-0.17 to 0.04)	1.20 (0.92 to 1.40)	-0.10 (-0.27 to 0.08)	0.03 (-0.32 to 0.25)	0.82	1.20 (0.86 to 1.50)	<0.001
Marine n-3 fatty acids, g/d	0.02 (-0.05 to 0.08)	0.11 (0.01 to 0.21)	0.13 (-0.02 to 0.28)	0.11 (-0.26 to 0.04)	0.143	-0.04 (-0.20 to 0.12)	0.60
Energy from olive oil, %	2.05 (1.20 to 2.90)	0.46 (-0.41 to 1.30)	0.06 (-1.00 to 1.20)	1.9 (0.55 to 3.20)	0.006	0.17 (-1.20 to 1.50)	0.81
Energy from nuts, %	0.40 (0.01 to 0.79)	10.2 (8.7 to 12.0)	-0.07 (-0.57 to 0.42)	0.03 (-1.30 to 1.40)	0.97	9.1 (7.7 to 10.0)	<0.001
Cholesterol, mg/d	-53 (-75 to -31)	-54 (-74 to -34)	-13 (-47 to 21)	-38 (-152 to 76)	0.27	-42 (-165 to 80)	0.152

* Forty-nine participants were excluded from calculations of energy and nutrient intake because reported energy was unrealistic (see Table 2). MUFA = monounsaturated fatty acid; PUFA = polyunsaturated fatty acid; SFA = saturated fatty acid.
† Adjusted for center, age, sex, and baseline body weight.

Table 4. Changes in Adiposity, Blood Pressure, and Cardiovascular Risk Factors*

Variable	Mean Changes from Baseline at 3 mo (95% CI)			Mediterranean Diet with Olive Oil vs. Low-Fat Diet		Mediterranean Diet with Nuts vs. Low-Fat Diet	
	Mediterranean Diet with Virgin Olive Oil (n = 257)	Mediterranean Diet with Mixed Nuts (n = 257)	Low-Fat Diet (n = 256)	Mean (95% CI) Between-Group Difference†	P Value	Mean (95% CI) Between-Group Difference†	P Value
Weight, kg	-0.19 (-0.46 to 0.07)	-0.26 (-0.59 to 0.08)	-0.24 (-0.48 to 0.01)	0.01 (-0.39 to 0.42)	0.96	0.01 (-0.40 to 0.43)	0.95
BMI, kg/m ²	-0.12 (-0.24 to 0.06)	-0.09 (-0.24 to 0.05)	-0.21 (-0.38 to -0.05)	0.09 (-0.12 to 0.29)	0.40	0.15 (-0.06 to 0.35)	0.165
Waist, cm	-0.82 (-1.80 to 0.14)	-0.29 (-0.95 to 0.37)	-0.37 (-1.20 to 0.44)	-0.52 (-1.60 to 0.61)	0.37	0.12 (-1.00 to 1.30)	0.84
Systolic BP, mm Hg	-4.8 (-6.7 to -2.7)	-6.5 (-8.7 to -4.3)	0.64 (-1.30 to 2.30)	-5.9 (-8.7 to -3.1)	<0.001	-7.1 (-10.0 to -4.1)	<0.001
Diastolic BP, mm Hg	-2.5 (-3.5 to -1.5)	-3.6 (-4.7 to -2.5)	-0.85 (-1.79 to 0.09)	-1.60 (-3.00 to -0.01)	0.048	-2.6 (-4.2 to 1.0)	0.001
Fasting glucose level					0.017		0.039
mmol/L	-0.21 (-0.41 to -0.01)	-0.14 (-0.31 to 0.03)	0.19 (-0.06 to 0.04)	-0.39 (-0.72 to -0.07)		-0.30 (-0.58 to -0.01)	
mg/dL	-3.8 (-7.4 to -0.2)	-2.5 (-5.5 to 0.5)	3.5 (-1.0 to 8.0)	-7.0 (-13.0 to -1.3)		-5.4 (-10.5 to -0.2)	
Fasting insulin level, pmol/L‡	-9.7 (-15.3 to -3.8)	-9.7 (-15.9 to -3.5)	6.5 (-3.8 to 16.7)	-16.7 (-27.1 to -0.4)	0.001	-20.4 (-31.9 to -9.7)	<0.001
HOMA index‡	-0.53 (-0.83 to -0.23)	-0.54 (-0.82 to -0.26)	0.32 (-0.15 to 0.79)	-0.91 (-1.40 to -0.46)	<0.001	-1.1 (-1.6 to -0.55)	<0.001
Total cholesterol level					0.26		0.040
mmol/L	-0.10 (-0.21 to 0.01)	-0.13 (-0.22 to -0.04)	0.02 (-0.10 to 0.14)	-0.09 (-0.25 to 0.07)		-0.16 (-0.31 to -0.01)	
mg/dL	-3.90 (-8.10 to 0.35)	-5.0 (-8.6 to -1.4)	0.74 (-3.80 to 5.30)	-3.5 (-9.5 to 2.6)		-6.20 (-12.00 to -0.28)	
LDL cholesterol level					0.177		0.119
mmol/L	-0.15 (-0.25 to -0.05)	-0.10 (-0.19 to -0.01)	-0.15 (-0.12 to 0.09)	-0.10 (-0.25 to 0.04)		-0.09 (-0.23 to 0.05)	
mg/dL	-5.8 (-9.8 to -1.8)	-3.80 (-7.30 to -0.39)	-0.56 (-4.60 to 3.50)	-3.9 (-9.5 to 1.7)		-3.4 (-8.9 to 2.1)	
HDL cholesterol level					<0.001		0.006
mmol/L	0.62 (0.08 to 0.04)	0.020 (0.002 to 0.050)	-0.01 (-0.03 to 0.01)	0.08 (0.04 to 0.10)		0.04 (0.01 to 0.07)	
mg/dL	2.4 (3.1 to 1.6)	0.94 (0.10 to 1.80)	-0.37 (-1.20 to 0.40)	2.9 (1.7 to 4.0)		1.60 (0.45 to 2.70)	
Triglyceride level					0.21		0.022
mmol/L	-0.03 (-0.13 to 0.07)	-0.09 (-0.16 to -0.01)	0.03 (-0.05 to 0.10)	-0.08 (-0.20 to 0.04)		-0.15 (-0.26 to -0.02)	
mg/dL	-3.0 (-11.8 to 5.9)	-7.6 (-14.0 to -1.1)	2.4 (-4.4 to 9.2)	-7.1 (-18.0 to 3.9)		-13.0 (-23.0 to -1.9)	
Cholesterol:HDL cholesterol ratio	-0.32 (-0.45 to -0.18)	-0.17 (-0.27 to -0.02)	0.06 (-0.05 to 0.16)	-0.38 (-0.55 to -0.22)	<0.001	-0.26 (-0.42 to -0.10)	0.002

* BMI = body mass index; BP = blood pressure; HDL = high-density lipoprotein; HOMA = homeostasis model assessment (a measure of insulin resistance); LDL = low-density lipoprotein.

† Adjusted for center, age, sex, and baseline body weight.

‡ Determined only for 305 participants without diabetes (95 in the Mediterranean diet with olive oil group, 110 in the Mediterranean diet with nuts group, and 100 in the low-fat diet group).

tween-diet differences in CRP levels were magnified, but statistical significance was unchanged when we included participants with CRP levels greater than 10 mg/L in the calculations. This did not affect the results of the other inflammatory molecules.

Subgroup Analyses

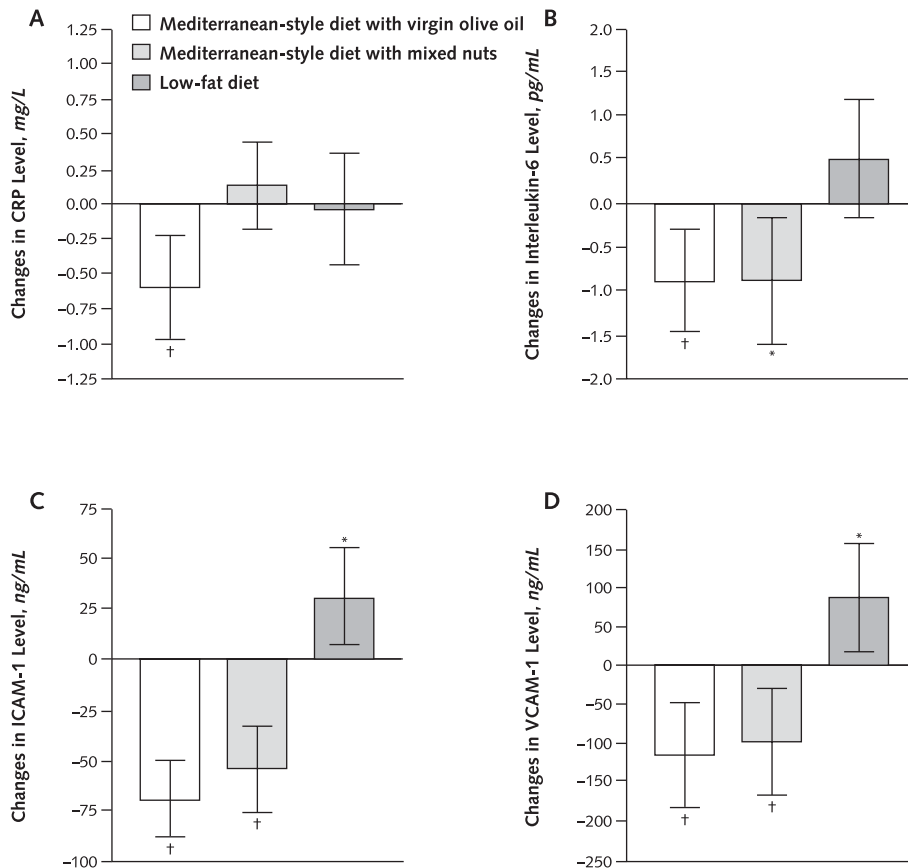
We observed no differences in outcomes for any study group in subgroups defined by center, ethnic origin, sex, age, baseline weight, or physical activity. However, participants with hypertension showed statistically significantly higher reductions from baseline in systolic blood pressure when given each of the 2 Mediterranean diets, with mean changes of -6.2 mm Hg (CI, -8.4 to -4.0 mm Hg) for olive oil and -7.4 mm Hg (CI, -9.9 to -5.0 mm Hg) for nuts. Participants with hypertension in the low-fat diet group showed a mean change in systolic blood pressure of 1.2 mm Hg (CI, -1.0 to 3.4 mm Hg). Participants with normal blood pressure in the low-fat diet, Mediterranean diet with olive oil, and Mediterranean diet with nuts groups showed mean changes in systolic blood pressure of -1.8 mm Hg (CI, -6.7 to 3.0 mm Hg), 0.5 mm Hg (CI, -1.4 to 2.5 mm Hg), and -2.2 mm Hg (CI, -4.5 to 0.1 mm Hg), respectively. Changes in diastolic blood pressure according to blood pressure status followed a similar pattern (data not shown).

DISCUSSION

If the Mediterranean diet was useful in primary cardiovascular prevention, one would expect that persons who adhere to the diet show a reduction in risk factors for atherosclerosis. In our study, high-risk participants who improved their baseline Mediterranean diet after nutritional education and supplementation with virgin olive oil or mixed nuts showed lower blood pressure, improved lipid profiles, decreased insulin resistance, and reduced concentrations of inflammatory molecules compared with those allocated to a low-fat diet.

The Mediterranean diet is high-fat because large amounts of monounsaturated fatty acid-rich olive oil are used in Mediterranean cultures (27, 28). Scientific evidence has documented the beneficial effect of diets with a relatively high monounsaturated fatty acid content on cardiovascular risk factors, obesity, and diabetes (1, 28-31) (Appendix Table 3, available at www.annals.org). However, when nutritional advice is given to people with increased adiposity, clinicians are still reluctant to recommend high-fat, high-monounsaturated fatty acid diets as an alternative to the traditional (and less palatable) low-fat diets because of the belief that fat provides excess energy, thus promoting obesity. Because many participants in our study were obese or had diabetes, our results are reassuring

Figure 2. Changes from baseline in plasma concentrations of the inflammatory biomarkers in the 3 intervention groups.



A. Mean changes from baseline of C-reactive protein (*CRP*). B. Mean changes from baseline of interleukin-6. C. Mean changes from baseline of intercellular adhesion molecule-1 (*ICAM-1*). D. Mean changes from baseline of vascular cell adhesion molecule-1 (*VCAM-1*). The low-fat diet followed the guidelines of the American Heart Association. Error bars are 95% CIs. * $P < 0.018$ for difference from baseline by 2-tailed t -test. † $P < 0.003$ for difference from baseline by 2-tailed t -test.

in the lack of weight gain when supplementing ad libitum diets with sizable amounts of unsaturated fats, such as those contained in olive oil or nuts. Our results also add to the increasing evidence that diets enriched with nuts do not induce weight gain (32–34).

Healthy diet and lifestyle are critical for preventing and treating hypertension (35). In our study, both Mediterranean diets were associated with statistically significant reductions in blood pressure in participants with hypertension who were already receiving antihypertensive medication. Observational studies (36, 37) and small feeding trials (38, 39) have suggested that increased olive oil consumption helps lower blood pressure (40). Recently, the OmniHeart study (41) also reported that diets rich in monounsaturated fatty acids from various sources exerted an antihypertensive effect. No effects on blood pressure have been reported for diets enriched with nuts in small trials (15). However, walnuts seem to have favorable effects on vasomotor activity (42). Furthermore, the intake of α -linolenic acid, the plant n-3 fatty acid that is abundant in

walnuts, was inversely related to blood pressure in a large cross-sectional study (43). Participants following the Mediterranean diet with nuts increased α -linolenic acid intake by an average of 1 g/d; thus, walnut consumption may have helped lower blood pressure. Another explanation for the blood pressure reduction observed with the 2 Mediterranean diet groups is the change in the overall food pattern, which was similar to that advocated in the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) trial (44), with the exception of the high content of olive oil. Salt intake was not restricted in our study. The blood pressure-lowering effect of the Mediterranean diets was similar to that of the unrestricted-sodium DASH diets (44) and was less than that of the low-sodium DASH diet (45). The effect was greater, however, than that obtained by partial substitution of carbohydrates with monounsaturated fatty acids in the OmniHeart study (41).

The 2 Mediterranean diets were associated with lower fasting glucose levels in all participants and lower fasting insulin levels and insulin resistance in those without diabe-

tes, thus extending previous observations of the favorable effects of Mediterranean diets on insulin sensitivity in patients with the metabolic syndrome (12). Insulin resistance and diabetes are linked to excess energy intake, particularly in the form of saturated fatty acids and simple sugars, and to increased adiposity (46). Low-fat, high-carbohydrate diets have traditionally been advised for patients with diabetes. However, such diets may worsen metabolic control, an untoward effect that is not observed with high-fat diets based on monounsaturated fatty acid-rich oils or nuts (31). Frequent nut consumption has been inversely associated with diabetes risk (47). In addition, decreased intake of meat and dairy products and increased fiber intake, as observed in the 2 Mediterranean diet groups, have been shown to reduce the incidence of diabetes in conjunction with lifestyle interventions (48, 49). Our results further support a beneficial effect of healthy diets on insulin resistance.

Replacing carbohydrate with dietary fat lowers triglyceride levels and increases HDL cholesterol levels, while substituting monounsaturated fatty acids for saturated fatty acids lowers LDL cholesterol levels (50, 51). Total fat intake was high both at baseline and after 3 months, and we observed a similar reduction in saturated fatty acid intake of approximately 1% of energy in the 3 groups. However, the lipid profile did not change in the low-fat diet group, while HDL cholesterol levels increased in the 2 Mediterranean diet groups, especially when olive oil was supplemented. While diets enriched with various nuts have an established hypocholesterolemic effect (8, 15, 42), why substituting virgin olive oil for refined olive oil has such beneficial lipid effects is unknown. Minor olive oil constituents contained in virgin olive oils (13, 14) might explain these effects and merit further study. Since low-fat diets usually lower both LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations (52–54), a fat-rich Mediterranean diet may be a better nutritional option for high-risk individuals.

Nut consumption in small trials has not resulted in lower serum triglyceride levels (15). The triglyceride-lowering effect observed in participants in the Mediterranean diet with nuts group might be related to the increased intake of α -linolenic acid from walnuts, since α -linolenic acid consumption was inversely related to triglyceride concentrations in a cross-sectional study (55).

Atherosclerosis is widely viewed as an inflammatory disease (56). Epidemiologic, clinical, and experimental studies have shown that the Mediterranean diet (10–12) or the frequent consumption of several main components of this dietary pattern, such as olive oil (14, 57), nuts (34, 42), or red wine (57, 58), is associated with a lower inflammatory status and improved endothelial function. Similar findings have been reported recently for other healthy dietary patterns (59). We observed reduced concentrations of cell adhesion molecules in participants assigned to the 2 Mediterranean diet groups, supporting the anti-inflammatory effects of this dietary pattern.

Our study has some limitations. Ensuring adherence to dietary instructions is difficult in a feeding trial. However, adherence to recommended dietary patterns and supplemental foods was good, as judged by self-report and objective measurements. On the other hand, our design has the strength of reproducing real-life conditions with home-prepared foods, reflecting usual practice. A second limitation is that nutritional education about low-fat diet was less intense than education about Mediterranean diets. In fact, fat intake was only marginally reduced in the group assigned to the low-fat diet. This was partly because of the study design but also because participants belonged to a Mediterranean culture, where people prefer using olive oil. Because the low-fat diet was not the usual diet, participants in this group also changed food habits in a healthy way. Therefore, the differences in outcomes observed between the Mediterranean diet groups and the low-fat diet group might be attributed to the supplemental foods provided. The duration of follow-up of only 3 months cannot be considered a major limitation because effects of dietary interventions on risk factors do not need a long induction period (44, 45, 53) and seem to persist as long as adherence is maintained (12, 48, 49).

In conclusion, our results suggest that the healthy effects of the Mediterranean diet observed in epidemiologic studies are exerted partly through plausible mechanisms: improved lipid profiles and reductions in blood pressure, insulin resistance, and systemic markers of inflammation. Our study duration was far too short to deal with clinical outcomes. Longer follow-up of the whole PREDIMED trial will eventually provide stronger evidence. In the meantime, an increasing body of knowledge supports the Mediterranean diet as a useful tool in managing individuals who are at high risk for CHD.

From Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS), Municipal Institut for Medical Research (IMIM), University of Barcelona, and Catalan Institute of Health, Barcelona, Spain; University of Navarra—Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain; University of Valencia, Valencia, Spain; University Rovira i Virgili, Reus (Tarragona), Spain; Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, and San Pablo Health Center, Sevilla, Spain; Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain; University of Malaga, Malaga, Spain; Hospital Txangorritxu, Vitoria, Spain; and Hospital Carlos III, Madrid, Spain.

Acknowledgments: The authors thank the Fundación Patrimonio Comunal Olivarero and Hojiblanca SA, California Walnut Commission, Borges SA, and Morella Nuts SA for donating the olive oil, walnuts, almonds, and hazelnuts, respectively, used in the study. They also thank the participants for their enthusiastic collaboration, the PREDIMED personnel for excellent assistance with all aspects of the trial, and Emili Corbella for providing expert assistance with statistical analyses.

Grant Support: By the Spanish Ministry of Health (Fondo de Investigación Sanitaria, Red G03/140).

Potential Financial Conflicts of Interest: *Consultancies:* E. Ros (Cal-

fornia Walnut Commission); *Honoraria*: E. Ros (California Walnut Commission); *Grants received*: E. Ros (California Walnut Commission); *Grants pending*: E. Ros (California Walnut Commission).

Requests for Single Reprints: Ramon Estruch, MD, PhD, Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; e-mail, restruch@clinic.ub.es.

Current author addresses and author contributions are available at www.annals.org.

References

1. Keys A, ed. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*. 1970; 41(Suppl 1):1-211.
2. Menotti A, Keys A, Kromhout D, Nissinen A, Blackburn H, Fidanza F, et al. Twenty-five-year mortality from coronary heart disease and its prediction in five cohorts of middle-aged men in Finland, The Netherlands, and Italy. *Prev Med*. 1990;19:270-8. [PMID: 2377589]
3. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353:1547-57. [PMID: 10334252]
4. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*. 2003; 348:2599-608. [PMID: 12826634]
5. Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA*. 2004;292:1433-9. [PMID: 15383513]
6. Knoops KT, Groot de LC, Fidanza F, Alberti-Fidanza A, Kromhout D, van Staveren WA. Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *Eur J Clin Nutr*. 2006. [PMID: 16418742]
7. Perona JS, Cañizares J, Montero E, Sánchez-Domínguez JM, Catalá A, Ruiz-Gutiérrez V. Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects. *Clin Nutr*. 2004;23:1113-21. [PMID: 15380903]
8. Zambón D, Sabaté J, Muñoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, et al. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial. *Ann Intern Med*. 2000;132:538-46. [PMID: 10744590]
9. Bemelmans WJ, Broer J, Feskens EJ, Smit AJ, Muskiet FA, Lefrandt JD, et al. Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the Mediterranean Alpha-linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) study. *Am J Clin Nutr*. 2002;75:221-7. [PMID: 11815311]
10. Fuentes F, López-Miranda J, Sánchez E, Sánchez F, Paez J, Paz-Rojas E, et al. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Ann Intern Med*. 2001;134:1115-9. [PMID: 11412051]
11. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44: 152-8. [PMID: 15234425]
12. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, et al. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA*. 2004;292:1440-6. [PMID: 15383514]
13. Visioli F, Galli C. Antiatherogenic components of olive oil. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3:64-7. [PMID: 11123850]
14. Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, et al. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*. 2005;437:45-6. [PMID: 16136122]
15. Kris-Etherton PM, Zhao G, Binkoski AE, Coval SM, Etherton TD. The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutr Rev*. 2001;59:103-11. [PMID: 11368503]
16. Exler J, Weihrauch JL. Provisional Table on the Content of Omega-3 Fatty Acids and Other Fat Components in Selected Foods. Washington, DC: U.S.

- Department of Agriculture; 1986. Publication HNIS/PT-103.
17. Harris WS. Alpha-linolenic acid: a gift from the land? [Editorial] *Circulation*. 2005;111:2872-4. [PMID: 15939831]
18. Nigg CR, Burbank PM, Padula C, Dufresne R, Rossi JS, Velicer WF, et al. Stages of change across ten health risk behaviors for older adults. *Gerontologist*. 1999;39:473-82. [PMID: 10495586]
19. 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. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58:1550-2. [PMID: 15162136]
20. Martín-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, et al. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol*. 1993;22:512-9. [PMID: 8359969]
21. Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol*. 1994;139:1197-209. [PMID: 8209878]
22. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*. 2000;102:2284-99. [PMID: 11056107]
23. Mataix J. Tablas de composición de alimentos [Food composition tables]. 4th ed. Granada, Spain: Univ of Granada; 2003.
24. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9. [PMID: 3899825]
25. Miró-Casas E, Covas MI, Fitó M, Farré-Albadalejo M, Marrugat J, de la Torre R. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57:186-90. [PMID: 12548315]
26. Issues in analysis and presentation of dietary data. In: Willett WC. *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford Univ Pr; 1998:321-45.
27. Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:1402S-1406S. [PMID: 7754995]
28. Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A. The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern? *Eur J Epidemiol*. 2004;19:9-13. [PMID: 15012018]
29. Katan MB, Grundy SM, Willett WC. Should a low-fat, high-carbohydrate diet be recommended for everyone? Beyond low-fat diets. *N Engl J Med*. 1997; 337:563-6; discussion 566-7. [PMID: 9262504]
30. Kris-Etherton PM. AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. American Heart Association. Nutrition Committee. *Circulation*. 1999;100:1253-8. [PMID: 10484550]
31. Ros E. Dietary cis-monounsaturated fatty acids and metabolic control in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:617S-625S. [PMID: 12936956]
32. Sabaté J. Nut consumption and body weight. *Am J Clin Nutr*. 2003;78: 647S-650S. [PMID: 12936960]
33. García-Lorda P, Megias Rangil I, Salas-Salvadó J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57 Suppl 1:S8-11. [PMID: 12947444]
34. Jiang R, Jacobs DR Jr, Mayer-Davis E, Szklo M, Herrington D, Jenny NS, et al. Nut and seed consumption and inflammatory markers in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am J Epidemiol*. 2006;163:222-31. [PMID: 16357111]
35. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289:2560-72. [PMID: 12748199]
36. Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:1012-8. [PMID: 15447913]
37. Alonso A, Martínez-González MA. Olive oil consumption and reduced incidence of hypertension: the SUN study. *Lipids*. 2004;39:1233-8. [PMID: 15736920]
38. Strazzullo P, Ferro-Luzzi A, Siani A, Scaccini C, Sette S, Catasta G, et al. Changing the Mediterranean diet: effects on blood pressure. *J Hypertens*. 1986; 4:407-12. [PMID: 3534087]
39. Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L, Guida L, Dello Russo A, Marotta

- T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med.* 2000;160:837-42. [PMID: 10737284]
40. **Alonso A, Ruiz-Gutierrez V, Martínez-González MA.** Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutr.* 2006;9:251-7. [PMID: 16571180]
41. **Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER 3rd, et al.** Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. *JAMA.* 2005;294:2455-64. [PMID: 16287956]
42. **Ros E, Núñez I, Pérez-Heras A, Serra M, Gilibert R, Casals E, et al.** A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation.* 2004;109:1609-14. [PMID: 15037535]
43. **Djoussé L, Arnett DK, Pankow JS, Hopkins PN, Province MA, Ellison RC.** Dietary linolenic acid is associated with a lower prevalence of hypertension in the NHLBI Family Heart Study. *Hypertension.* 2005;45:368-73. [PMID: 15655119]
44. **Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, et al.** A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1997;336:1117-24. [PMID: 9099655]
45. **Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, et al.** Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 2001;344:3-10. [PMID: 11136953]
46. **Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A, et al.** Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care.* 2002;25:148-98. [PMID: 11772915]
47. **Jiang R, Manson JE, Stampfer MJ, Liu S, Willett WC, Hu FB.** Nut and peanut butter consumption and risk of type 2 diabetes in women. *JAMA.* 2002;288:2554-60. [PMID: 12444862]
48. **Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al.** Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med.* 2001;344:1343-50. [PMID: 11333990]
49. **Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al.** Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346:393-403. [PMID: 11832527]
50. **Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB.** Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1146-55. [PMID: 12716665]
51. **Clarke R, Frost C, Collins R, Appleby P, Peto R.** Dietary lipids and blood cholesterol: quantitative meta-analysis of metabolic ward studies. *BMJ.* 1997;314:112-7. [PMID: 9006469]
52. **Yu-Poth S, Zhao G, Etherton T, Naglak M, Jonnalagadda S, Kris-Etherton PM.** Effects of the National Cholesterol Education Program's Step I and Step II dietary intervention programs on cardiovascular disease risk factors: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:632-46. [PMID: 10197564]
53. **Obarzanek E, Sacks FM, Vollmer WM, Bray GA, Miller ER 3rd, Lin PH, et al.** Effects on blood lipids of a blood pressure-lowering diet: the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Trial. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:80-9. [PMID: 11451721]
54. **Gardner CD, Coulston A, Chatterjee L, Rigby A, Spiller G, Farquhar JW.** The effect of a plant-based diet on plasma lipids in hypercholesterolemic adults: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2005;142:725-33. [PMID: 15867404]
55. **Djoussé L, Hunt SC, Arnett DK, Province MA, Eckfeldt JH, Ellison RC.** Dietary linolenic acid is inversely associated with plasma triacylglycerol: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:1098-102. [PMID: 14668270]
56. **Hansson GK.** Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-95. [PMID: 15843671]
57. **Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, et al.** Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:622-9. [PMID: 12615669]
58. **Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antúnez E, Nicolás JM, Fernández-Solá J, et al.** Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis.* 2004;175:117-23. [PMID: 15186955]
59. **Lopez-Garcia E, Schulze MB, Fung TT, Meigs JB, Rifai N, Manson JE, et al.** Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1029-35. [PMID: 15447916]

Current Author Addresses: Dr. Estruch: Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

Dr. Martínez-González: Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine—Clínica Universitaria de Navarra, University of Navarra, Irunlarrea 1, 31080 Pamplona, Navarra, Spain.

Dr. Corella: Department of Preventive Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Avda. Blasco Ibáñez 15, 46010 Valencia, Spain.

Dr. Salas-Salvadó: Human Nutrition Department, School of Medicine, University Rovira i Virgili, San Llorenç 21, 43201 Reus (Tarragona), Spain.

Dr. Ruiz-Gutiérrez: Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain.

Dr. Covas: Cardiovascular Epidemiology Unit, Municipal Institut for Medical Research (IMIM), Barcelona, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain.

Dr. Fiol: Department of Cardiology, Hospital Universitario Son Dureta, Andrea Doria 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain.

Dr. Gómez-Gracia: Department of Epidemiology, School of Medicine, University of Malaga, Capus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain.

Dr. López-Sabater: Department of Nutrition and Bromatology, School of Pharmacy, Avda. Joan XXIII s/n, Barcelona, Spain.

Dr. Vinyoles: Primary Care Division, Catalan Institute of Health, Gran Via 587, 08007 Barcelona, Spain.

Dr. Arós: Department of Cardiology, Hospital Txangorritxu, José Achoategui s/n, 01009 Vitoria, Alava, Spain.

Dr. Conde: Department of Epidemiology and Public Health, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain.

Dr. Lahoz: Arteriosclerosis Unit, Hospital Carlos III, Sinesio Delgado 10, 28029 Madrid, Spain.

Dr. Lapetra: San Pablo Health Center, Damasco s/n, 41007 Sevilla, Spain.

Dr. Sáez: Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Valencia, Avda. Blasco Ibáñez 15, 46010 Valencia, Spain.

Dr. Ros: Lipid Clinic, Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

Author Contributions: Conception and design: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, M.I. Covas, M. Fiol, E. Gómez-Gracia, M. Conde, C. Lahoz, J. Lapetra, G. Sáez, E. Ros.

Analysis and interpretation of the data: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, M.I. Covas, E. Gómez-Gracia, M.C. López-Sabater, J. Lapetra, G. Sáez, E. Ros.

Drafting of the article: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, M.I. Covas, F. Arós, C. Lahoz, G. Sáez, E. Ros.

Critical revision of the article for important intellectual content: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, M.I. Covas, M. Fiol, E. Gómez-Gracia, M.C. López-Sabater, M. Conde, J. Lapetra, G. Sáez, E. Ros.

Final approval of the article: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, M.I. Covas, M. Fiol, E. Gómez-Gracia, E. Vinyoles, M. Conde, J. Lapetra, G. Sáez, E. Ros.

Provision of study materials or patients: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, M.I. Covas, M. Fiol, E. Gómez-Gracia, E. Vinyoles, M. Conde, C. Lahoz, J. Lapetra, G. Sáez, E. Ros.

Statistical expertise: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, M.I. Covas, G. Sáez, E. Ros.

Obtaining of funding: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, M.I. Covas, M. Fiol, E. Gómez-Gracia, M. Conde, J. Lapetra, G. Sáez, E. Ros.

Administrative, technical, or logistic support: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, V. Ruiz-Gutiérrez, M.I. Covas, E. Gómez-Gracia, E. Vinyoles, F. Arós, M. Conde, J. Lapetra, G. Sáez, E. Ros.

Collection and assembly of data: R. Estruch, M.Á. Martínez-González, D. Corella, J. Salas-Salvadó, M.I. Covas, E. Gómez-Gracia, F. Arós, J. Lapetra, G. Sáez, E. Ros.

60. Michalsen A, Lehmann N, Pithan C, Knoblauch NT, Moebs S, Kannerberg F, et al. Mediterranean diet has no effect on markers of inflammation and metabolic risk factors in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Nutr.* 2006;60:478-85. [PMID: 16306923]

61. Stachowska E, Wesolowska T, Olszewska M, Safranow K, Millo B, Domański L, et al. Elements of Mediterranean diet improve oxidative status in blood of kidney graft recipients. *Br J Nutr.* 2005;93:345-52. [PMID: 15877874]

62. Vincent-Baudry S, Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, et al. The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:964-71. [PMID: 16280426]

63. Bravo-Herrera MD, López-Miranda J, Marín C, Gómez P, Gómez MJ, Moreno JA, et al. Tissue factor expression is decreased in monocytes obtained from blood during Mediterranean or high carbohydrate diets. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2004;14:128-32. [PMID: 15330271]

64. Rodríguez-Villar C, Pérez-Heras A, Mercadé I, Casals E, Ros E. Comparison of a high-carbohydrate and a high-monounsaturated fat, olive oil-rich diet on the susceptibility of LDL to oxidative modification in subjects with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2004;21:142-9. [PMID: 14984449]

65. Søndergaard E, Møller JE, Egstrup K. Effect of dietary intervention and lipid-lowering treatment on brachial vasoreactivity in patients with ischemic heart disease and hypercholesterolemia. *Am Heart J.* 2003;145:E19. [PMID: 12766751]

66. Toobert DJ, Glasgow RE, Strycker LA, Barrera M Jr, Radcliffe JL, Wander RC, et al. Biologic and quality-of-life outcomes from the Mediterranean Lifestyle Program: a randomized clinical trial. *Diabetes Care.* 2003;26:2288-93. [PMID: 12882850]

67. Singh N, Graves J, Taylor PD, MacAllister RJ, Singer DR. Effects of a 'healthy' diet and of acute and long-term vitamin C on vascular function in healthy older subjects. *Cardiovasc Res.* 2002;56:118-25. [PMID: 12237172]

68. Mezzano D, Leighton F, Martínez C, Marshall G, Cuevas A, Castillo O, et al. Complementary effects of Mediterranean diet and moderate red wine intake on haemostatic cardiovascular risk factors. *Eur J Clin Nutr.* 2001;55:444-51. [PMID: 11423921]

69. Pérez-Jiménez F, López-Miranda J, Pinillos MD, Gómez P, Paz-Rojas E, Montilla P, et al. A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons. *Diabetologia.* 2001;44:2038-43. [PMID: 11719836]

70. Ferro-Luzzi A, Strazzullo P, Scaccini C, Siani A, Sette S, Mariani MA, et al. Changing the Mediterranean diet: effects on blood lipids. *Am J Clin Nutr.* 1984;40:1027-37. [PMID: 6496382]

APPENDIX: OTHER PREDIMED INVESTIGATORS

Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer, Barcelona, Spain: Mercè Serra, RD; Ana Pérez-Heras, RD; Emilio Sacanella, MD, PhD; Daniel Zambón, MD, PhD; Mónica Vázquez-Agell, PhD.

University of Navarra, Primary Care Division, Pamplona, Spain: Manuel Serrano, MD, PhD; Pilar Buil, MD, PhD.

University of Valencia, Valencia, Spain: Olga Portolés, PhD; José Vicente Sorlí, MD.

University Rovira i Virgili, Reus (Tarragona), Spain: Josep Basora, MD, PhD; Rosa Solà, MD, PhD; Mónica Bulló, PhD.

Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla, Spain: Javier S. Perona, PhD

Municipal Institute for Medical Research, Barcelona, Spain:

Montserrat Fitó, PhD; Jaime Marrugat, MD, PhD; Roberto Elosúa, MD, PhD.

University of Málaga, Málaga, Spain: Juan José Sánchez-Luque, MD, PhD; Virginia Velasco-García, MD.

University of Barcelona, Barcelona, Spain: Rosa Lamuela-Raventós, MD, PhD.

University Institute for Health Sciences Investigation, Palma de Mallorca, Spain: Fernando Rigo, MD; Guillem Frontera, MD.

Primary Care Division, Catalan Institute of Health, Barcelona, Spain: Carmen Cabezas, MD.

Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain: Jesús San Vicente, MD; Jaime Algorta, MD, PhD

Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain: Adoración Nieto, MD, PhD.

Hospital Carlos III, Madrid, Spain: José M. Mostaza, MD, PhD.

San Pablo Health Center, Sevilla, Spain: Pablo Iglesias, MD; José Manuel Santos, MD.

Appendix Table 1. Quantitative Score of Adherence to the Mediterranean Diet

Foods and Frequency of Consumption	Criteria for 1 Point*
1. Do you use olive oil as main culinary fat?	Yes
2. How much olive oil do you consume in a given day (including oil used for frying, salads, out-of-house meals, etc.)?	≥4 tbsps
3. How many vegetable servings do you consume per day? (1 serving = 200 g [consider side dishes as half a serving])	≥2 (≥1 portion raw or as salad)
4. How many fruit units (including natural fruit juices) do you consume per day?	≥3
5. How many servings of red meat, hamburger, or meat products (ham, sausage, etc.) do you consume per day? (1 serving = 100–150 g)	<1
6. How many servings of butter, margarine, or cream do you consume per day? (1 serving = 12 g)	<1
7. How many sweet or carbonated beverages do you drink per day?	<1
8. How much wine do you drink per week?	≥3 glasses
9. How many servings of legumes do you consume per week? (1 serving = 150 g)	≥3
10. How many servings of fish or shellfish do you consume per week? (1 serving = 100–150 g of fish or 4–5 units or 200 g of shellfish)	≥3
11. How many times per week do you consume commercial sweets or pastries (not homemade), such as cakes, cookies, biscuits, or custard?	<3
12. How many servings of nuts (including peanuts) do you consume per week? (1 serving = 30 g)	≥1
13. Do you preferentially consume chicken, turkey, or rabbit meat instead of veal, pork, hamburger, or sausage?	Yes
14. How many times per week do you consume vegetables, pasta, rice, or other dishes seasoned with <i>sofrito</i> (sauce made with tomato and onion, leek, or garlic and simmered with olive oil)?	≥2

* 0 points if these criteria are not met.

Appendix Table 2. Fatty Acid, Tocopherol, and Sterol Composition of Virgin Olive Oil and Nuts Used in the Trial*

Constituents	Olive Oil	Walnuts	Almonds	Hazelnuts
Total fat, %	100	62.9 (0.3)	50.2 (0.2)	53.2 (0.3)
Palmitic acid	8.2 (0.2)	6.3 (0.0)	7.4 (0.1)	7.4 (0.1)
Stearic acid	3.2 (0.1)	2.6 (0.0)	1.8 (0.0)	1.9 (0.1)
Oleic acid	75.0 (0.8)	14.0 (0.3)	61.2 (0.4)	72.1 (0.2)
Linoleic acid	6.8 (0.2)	61.3 (0.4)	26.7 (0.2)	13.3 (0.2)
α-Linolenic acid	0.4 (0.0)	14.3 (0.1)	0.1 (0.0)	0.8 (0.0)
α-Tocopherol, mg/100 g	14.7 (0.0)	4.9 (0.1)	48.4 (0.9)	38.8 (1.5)
β-Tocopherol, mg/100 g	4.3 (0.0)	2.0 (0.1)	5.4 (0.9)	8.8 (1.5)
γ-Tocopherol, mg/100 g	0.4 (0.0)	50.2 (1.3)	6.0 (0.2)	20.7 (0.4)
Total sterols, mg/100 g	155.8 (0.0)	198.5 (7.8)	224.2 (25.4)	174.6 (8.6)
β-Sitosterol, %	95.5 (0.1)	84.0 (0.8)	79.1 (0.5)	82.8 (1.1)
Campesterol, %	3.2 (0.0)	5.3 (0.0)	3.3 (0.0)	5.2 (0.1)
Δ-5-Avenasterol, %	<0.1	7.6 (0.9)	6.3 (1.2)	11.1 (0.2)

* Values are means (SD) of 6 measurements of random samples from different lots.

Appendix Table 3. Randomized Feeding Trials Comparing a Mediterranean Diet with Other Healthy Diets for Intermediate Cardiovascular Outcomes*

Author, Year (Reference)	Country	Study Sample	Study Design	Duration	Main Outcomes	Results†
Michalsen et al., 2006 (60)	Germany	101 patients with CHD	Parallel group: Mediterranean diet vs. low-fat diet	1 y	Lipid profile, insulin, CRP, fibrinogen, homocysteine	No differences in changes of risk factors or inflammatory markers
Stachowska et al., 2005 (61)	Poland	37 kidney graft recipients	Parallel group: Mediterranean diet vs. low-fat diet	6 mo	Oxidative status in plasma and red blood cells	Decreased oxidative status
Vincent-Baudry et al., 2005 (62)	France	212 men and women with ≥ 1 risk factor	Parallel group: Mediterranean diet vs. low-fat diet	3 mo	BMI, lipids, glucose, insulin, homocysteine	No differences in changes of risk factors
Bravo-Herrera et al., 2004 (63)	Spain	41 healthy participants	Crossover: Mediterranean diet vs. low-fat diet vs. high-fat, high-saturated fat diet	3 mo	Lipids, tissue factor expression by circulating monocytes	Improvement in all outcomes except lower HDL cholesterol levels vs. high-fat diet; no differences vs. low-fat diet
Esposito et al., 2004 (12)	Italy	180 participants with the metabolic syndrome	Parallel group: Mediterranean diet vs. prudent western diet	24 mo	BMI, BP, insulin resistance, lipid profile, endothelial function, inflammatory markers	Improvement in all outcomes
Rodríguez-Villar et al., 2004 (64)	Spain	21 patients with type 2 diabetes mellitus	Crossover: Mediterranean diet vs. low-fat diet	6 wk	Glycemic control, lipids, LDL oxidizability	Reduced VLDL lipid levels; no effect on other outcomes
Ros et al., 2004 (42)	Spain	21 participants with hypercholesterolemia	Crossover: Mediterranean diet vs. a similar diet where walnuts replaced 32% of energy from MUFAs	4 wk	Endothelial function in the brachial artery, adhesion molecules, CRP, lipid profile, homocysteine, oxidation biomarkers	Reduced endothelium-dependent vasodilatation; increased levels of VCAM-1, total cholesterol, and LDL cholesterol
Søndergaard et al., 2003 (65)	Denmark	131 patients with CHD and hypercholesterolemia	Parallel group: Mediterranean diet vs. usual diet; both groups received fluvastatin, 40 mg	12 mo	Endothelial function in the brachial artery	Improved outcome
Toobert et al., 2003 (66)	United States	279 postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus	Parallel group: Mediterranean diet nutrition education vs. usual diet	6 mo	BMI, BP, glycemic control, lipids, quality of life	Improvements in BMI, glycemic control, and quality of life
Singh et al., 2002 (67)	United Kingdom	54 healthy participants	Parallel group: Mediterranean diet vs. vitamin C, 1 g/d, vs. placebo	6 wk	Forearm blood flow by venous occlusion plethysmography	Improved outcome
Fuentes et al., 2001 (10)	Spain	22 men with hypercholesterolemia	Crossover: Mediterranean diet vs. low-fat diet after baseline high-fat, high-saturated-fat diet	4 wk	Lipids, endothelial function in the brachial artery, inflammatory markers	Improvement of all outcomes vs. baseline; marginal improvement of endothelium-dependent vasodilatation vs. low-fat diet
Mezzano et al., 2001 (68)	Chile	42 healthy participants	Parallel group: Mediterranean diet vs. high-fat diet; wine was added after the second month	90 d	Prothrombotic and profibrinolytic factors	Improved outcomes; improvement enhanced by addition of wine
Pérez-Jiménez et al., 2001 (69)	Spain	59 healthy participants	Crossover: Mediterranean diet vs. low-fat diet after baseline high-fat, high-saturated-fat diet	4 wk	Lipids, free fatty acids, insulin sensitivity, glucose uptake by isolated monocytes	Improvement of all outcomes except reduced HDL cholesterol levels vs. baseline; no differences vs. low-fat diet
Zambón et al., 2000 (8)	Spain	49 patients with hypercholesterolemia	Crossover trial: Mediterranean diet vs. a similar diet where walnuts replaced 35% of energy from MUFAs	6 wk	Lipid profile, LDL resistance to in vitro oxidative stress	Higher total and LDL cholesterol levels, other outcomes similar
Ferro-Luzzi et al., 1984 (70)	Italy	48 healthy participants	Sequential: Mediterranean diet vs. high-fat western diet	6 wk	Lipid profile	Lower total and LDL cholesterol levels
Strazzullo et al., 1986 (38)	Italy	57 healthy participants	Sequential: Mediterranean diet vs. high-fat western diet	6 wk	BP	Lower systolic BP

* With the exception of 2 widely cited Italian papers from the 1980s (38, 70), which were not randomized, we included only randomized feeding trials with intermediate outcomes in which 1 diet was a Mediterranean diet containing at least 15% energy as MUFA derived in part from olive oil. BMI = body mass index; BP = blood pressure; CHD = coronary heart disease; CRP = C-reactive protein; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein; MUFA = monounsaturated fatty acid; VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule-1; VLDL = very-low-density lipoprotein.

† Mediterranean diet vs. comparator diet(s).

Articles pendents d'acceptació per a ser publicats:

- Mena MP, Sacanella E, **Vázquez-Agell M**, Morales M, Fitó M, Viñas C, Serrano-Martínez M, Serra M, Salas-Salvadó J, Benages N, Casas R, Lamuela-Raventós RM, Ros E, Estruch R. *Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular anti-inflammatory effect of the Mediterranean Diet.*

La doctoranda a participat en congressos que han permès completar la seva formació:

- R Estruch, E Sacanella, E Badia, **M Vázquez**, J Fernández-Solá, JM Nicolàs, E Antúnez, C Andrés-Lacueva, RM Lamuela-Raventós. *El consumo moderado de cava también reduce los marcadores sistémicos de arteriosclerosis.* **XVII Congrés Nacional Societat Espanyola Arteriosclerosi.** Múrcia, 2-5 juny 2004.
- E Sacanella, R Estruch, E Badia, R Gelabert, **M Vázquez**, E Antunez, J Fernandez-Sola, JM Nicolás, A Urbano-Marquez. *Expresión de moléculas de adhesión (VLA-4, Mac-1 y sialyl-lewis), MCP-1 y CD40 disminuida en monocitos circulantes de sujetos que consumen alcohol a dosis bajas.* **XVII Congrés Nacional Societat Espanyola Arteriosclerosis.** Múrcia, 2-5 juny 2004.
- R Estruch, E Sacanella, E Badia, **M Vázquez**, J Fernández-Solá, JM Nicolàs, E Antúnez, C Andrés-Lacueva, RM Lamuela-Raventós, A Urbano-Márquez. *Reducción de la expresión y funcionalismo de las moléculas de adhesión celulares relacionadas con la arteriosclerosis tras el consumo moderado de vino en mujeres.* **XVII Congrés Nacional Societat Espanyola Arteriosclerosi.** Múrcia, 2-5 juny 2004.
- R Estruch, E Sacanella, E Badia, **M Vázquez**, J Fernández-Solá, JM Nicolàs, E Antúnez, C Andrés-Lacueva, RM Lamuela-Raventós, A Urbano-Márquez. *Decreased expresion and function of cellular adhesion molecules related to atherosclerosis after moderate consumption of wine in women.* **XII Congress Biomedical Alcohol Research.** Heidelberg, 29 Set -2 Oct 2004.
- Sacanella E, Estruch R, Badia E, **Vázquez M**, Fernandez-Sola J, Nicolás JM, Antúnez E, Lamuela-Raventós RM, Andrés-Lacueva C, Urbano-Marquez A. *Moderate consumption of sparkling wine (cava) also reduces inflammatory biomarkers of atherosclerosis.* **XII Congress Biomedical Alcohol Research.** Heidelberg, 29 Set-2 Oct 2004.

- Nicolás JM, Garcia-Segarra G, Espinosa G, **Vázquez M**, Badía E, Tassies D, Oriola J. *Increased mortality with 4G/AG genotype of PAI-1 in patients with septic shock*. **17TH Annual Congress European of Society Intensive Care Medicine**. Berlin, 10-13 Oct 2004.
- Nicolás JM, García-Segarra G, Badía E, **Vázquez M**, Valencia M, Sacanella E, Fernández-Solà J, Estruch R. *Decreased expresion and function of cellular adhesion molecules in patients with septic shock*. **17TH Annual Congress European Society of Intensive Care Medicine**. Berlin, 10-13 Oct 2004.
- R Zamora-Ros, M Urpí-Sardà, O Jáuregui, RM Lamuela-Raventós, M Ibern-Gómez, R Estruch, **M Vázquez**, C Andrés-Lacueva. *Identification of resveratrol glucoronide in unrine after moderate sparkling wine consumption by LC-ESI-MS/MS*. **II Reunió Nacional Espectrometria de Masses**, 29 Nov- 1 Des 2004.
- **Vázquez-Agell M**, Estruch R, Sacanella E, Mena MP, Antúnez E, Fernández-Solà J, Nicolás JM, Urbano-Márquez A. *Down-regulation of adhesion molecules related to atherosclerosis in childbearing healthy women after moderate wine consumption*. **European Society Biomedical Research Alcoholism (ESBRA)**. Canterbury, 4-7 Set 2005.
- Estruch R, Sacanella E, **Vázquez-Agell M**, Gelabert R, Mena MP, Antúnez E, Fernández-Solà J, Nicolas JM, Urbano-Márquez A. *Moderate alcohol consumption reduces carotid intima-media thickness and inflammatory biomarkers related to atherosclerosis*. **European Society Biomedical Research Alcoholism (ESBRA)**. Canterbury, 4-7 Set 2005.
- Estruch R, Sacanella E, **Vázquez-Agell M**, Badia E, Fernández-Solà J, Antúnez E, Urbano-Márquez. *Down-regulation of adhesion molecules related to atherosclerosis in women after moderate wine consumption*. **Internation Society Biomedical Research Alcoholism (ISBRA)**. Sydney, 10-13 Set 2006.
- **Vázquez-Agell M**, Estruch R, Sacanella E, Mena MP, Antúnez E, Fernández-Solà J, Nicolás JM. *Down-regulation of inflammatory biomarkers related to atherosclerosis after moderate sparkling wine consumption*. **European Atherosclerosis Society (EAS)**. Helsinki, 10-13 Juny 2007.
- **M Vázquez-Agell**. Conferència titulada: *Disminución de los biomarcadores de inflamación relacionados con la arteriosclerosis tras el seguimiento de una dieta mediterránea tradicional y el consumo moderado de vino*. **I Symposium CIBERobn**, 22-24 Nov 2007, Santiago de Compostela.