



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**ACTIVIDAD FÍSICA Y DIETA
MEDITERRÁNEA COMO
PRECONDICIONANTES A LA ISQUEMIA
CEREBRAL EN EL ICTUS POR OCLUSIÓN
DE GRAN VASO INTRACRANEAL**

TESIS DOCTORAL

María Castañón Apilánez

TESIS DOCTORAL



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

ACTIVIDAD FÍSICA Y DIETA MEDITERRÁNEA COMO PRECONDICIONANTES A LA ISQUEMIA CEREBRAL EN EL ICTUS POR OCLUSIÓN DE GRAN VASO INTRACRANEAL

Doctoranda:

María Castañón Apilánez



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: ACTIVIDAD FÍSICA Y DIETA MEDITERRÁNEA COMO PRECONDICIONANTES A LA ISQUEMIA CEREBRAL EN EL ICTUS POR OCCLUSIÓN DE GRAN VASO INTRACRANEAL	Inglés: PHYSICAL ACTIVITY AND MEDITERRANEAN DIET AS ISCHEMIC PRECONDITIONING FACTORS IN BRAIN ISCHEMIA DUE TO A LARGE VESSEL OCCLUSION
2.- Autor	
Nombre: MARÍA CASTAÑÓN APILÁNEZ	
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: UNIVERSIDAD DE OVIEDO	

RESUMEN (en español)

Introducción: Pese al desarrollo de tratamientos eficaces en la fase aguda del ictus isquémico, hasta el 50% de los pacientes no alcanzan un buen pronóstico. Una vez establecido el infarto, no existen terapias que promuevan la recuperación del tejido dañado.

Los hábitos de vida saludables, como la actividad física (AF) y la dieta mediterránea (DMed), se han asociado a una menor incidencia y mortalidad por enfermedades vasculares. Además de la prevención primaria, ambas podrían tener efectos neuroprotector y neuroreparador, gracias a sus efectos antiinflamatorio y antitrombótico, neovascularización, neurogénesis y optimización de la función endotelial. Aunque las vías moleculares exactas son poco conocidas, se conocen algunos intermediarios como las células progenitoras endoteliales (CPEs) y algunos metabolitos circulantes, especialmente de la vía de la colina (MVC), relacionados con fenómenos inflamatorios, aterogénesis, resistencia insulínica (RI) y riesgo vascular.

Hipótesis: Un mayor grado de AF y una mayor adherencia a la DMed se asociarán a un menor volumen de infarto y un mejor pronóstico funcional y cognitivo por sus efectos neuroprotectores y neuroreparadores que estarían mediados por una menor RI, un adecuado balance en los MVC, menor inflamación y mayor liberación de CPEs.

Métodos: Estudio clínico: Reclutamiento de pacientes con ictus isquémico por oclusión de circulación anterior y tratados con trombectomía mecánica en el Hospital Universitario Central de Asturias. Evaluación del grado de AF y adherencia a DMed mediante cuestionarios validados. Análisis de biomarcadores en sangre periférica: RI (índice HOMA), CPEs y marcadores inflamatorios mediante citometría de flujo (CF), adipocinas mediante ELISA y MVC (betaina, colina y TMAO) mediante espectrometría de masas.

Estudio animal: Estudio de intervención caso-control en modelo animal en rata. Se establecieron cuatro grupos de intervención y se indujo la isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media. Se evaluó el volumen final del infarto, la recuperación funcional mediante escalas validadas, las CPEs y marcadores inflamatorios mediante CF y se realizaron análisis inmunohistoquímicos para cuantificar neurogénesis y vasculogénesis.

Resultados: En el estudio clínico, se incluyeron 70 pacientes, con una edad media de 74.7 años (+/-10.7 DE). Aquellos con mayor adherencia a la DMed tenían mejor evolución neurológica precoz y mejor pronóstico funcional, comportándose como un factor independiente de buen pronóstico a 3 meses (OR 4.88, 95% IC [1.26-18.93], p 0.02). El sedentarismo se asoció al deterioro cognitivo a 3 meses (OR 4.79, 95% IC [1.49-15.53], p 0.008). El MCP-1 se asoció con el desarrollo de deterioro cognitivo y la movilización de CPEs con un mejor pronóstico y menor volumen final del infarto. El HOMA se correlacionó con el volumen de infarto.

En el modelo animal, se incluyeron un total de 10 animales por grupo. En todos los grupos, especialmente en el de "dieta", observamos una menor respuesta inflamatoria basal, mantenida hasta la primera semana tras la isquemia, así como una tendencia a menores volúmenes de infarto, mayor movilización de CPEs y una tendencia a una mejor recuperación funcional. El grupo "AF" es en el que se observó una mayor angiogénesis y neurogénesis a los 28 días.



Universidad de Oviedo

Conclusiones:

En el modelo animal, la DMed parece tener un efecto neuroprotector a través de la modulación de la respuesta inflamatoria basal y en los primeros días tras el ictus y una mayor movilización de CPEs, resultando en unos menores volúmenes de infarto y una tendencia a una mejor recuperación. En el estudio clínico, la DMed tiene efectos similares, condicionando una mejor recuperación y pronóstico, posiblemente por una menor RI y una mayor movilización de CPEs. Por su parte, la AF parece tener un efecto positivo en el desarrollo de deterioro cognitivo.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction: Despite the development of effective treatments in the acute phase of ischemic stroke, up to 50% of patients do not achieve a good prognosis. Once the infarction is established, there are no therapies that promote the recovery of damaged tissue. Healthy lifestyle habits, such as physical activity (PA) and the Mediterranean diet (MD), have been associated with a lower incidence and mortality from vascular diseases. In addition to primary prevention, both may have neuroprotective and neurorepair effects, thanks to their anti-inflammatory and antithrombotic effects, neovascularization, neurogenesis, and optimization of endothelial function. Although the exact molecular pathways are poorly understood, some intermediaries such as endothelial progenitor cells (EPCs) and certain circulating metabolites, especially from the choline pathway (MVC), related to inflammatory phenomena, atherogenesis, insulin resistance (IR), and vascular risk are known.

Hypothesis: Higher levels of PA and greater adherence to MD will be associated with a smaller infarct volume and a better functional and cognitive prognosis due to their neuroprotective and neurorepair effects, which may be mediated by lower IR, a balanced MVC profile, reduced inflammation, and increased release of EPCs.

Methods: Clinical study: Recruitment of patients with anterior circulation ischemic stroke treated with mechanical thrombectomy at the Central University Hospital of Asturias. Evaluation of the degree of PA and adherence to MD using validated questionnaires. Analysis of biomarkers in peripheral blood: IR (HOMA index), EPCs, and inflammatory markers using flow cytometry (FC), adipokines using ELISA, and MVC (betaine, choline, and TMAO) using mass spectrometry. Animal study: Case-control intervention study in a rat animal model. Four intervention groups were established, and cerebral ischemia was induced by occlusion of the middle cerebral artery. Final infarct volume, functional recovery using validated scales, EPCs and inflammatory markers using FC were evaluated, and immunohistochemical analyses were performed to quantify neurogenesis and vasculogenesis.

Results: In the clinical study, 70 patients were included, with a mean age of 74.7 years (+/-10.7 SD). Those with greater adherence to MD had better early neurological evolution and a better functional prognosis, behaving as an independent factor of good prognosis at 3 months (OR 4.88, 95% CI [1.26-18.93], p 0.02). Sedentary behavior was associated with cognitive decline at 3 months (OR 4.79, 95% CI [1.49-15.53], p 0.008). MCP-1 was associated with the development of cognitive decline, and the mobilization of EPCs was associated with a better prognosis and a smaller infarct volume. HOMA correlated with infarct volume. In the animal model, a total of 10 animals per group were included. In all groups, especially in the "diet" group, a lower basal inflammatory response was observed, maintained up to the first week after ischemia, as well as a tendency towards smaller infarct volumes, greater mobilization of EPCs, and a trend towards better functional recovery. The "PA" group showed greater angiogenesis and neurogenesis at 28 days.

Conclusions: In the animal model, MD appears to have a neuroprotective effect through modulation of the basal inflammatory response in the early days after stroke and increased mobilization of EPCs, resulting in smaller infarct volumes and a tendency towards better recovery. In the clinical study, MD has similar effects, conditioning better recovery and prognosis, possibly due to lower IR and increased mobilization of EPCs. On the other hand, PA appears to have a positive effect on the development of cognitive decline.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

*"Si he logrado ver más lejos ha sido porque
he subido a hombros de gigantes"*

Isaac Newton, adaptada a su vez de Juan De Salisbury

A todos mis gigantes.

A

ACM: Arteria cerebral media

ACM-M1: Segmento proximal de la arteria cerebral media

ACM-M2: Segmento distal de la arteria cerebral media

AF: Actividad física

AGM: Ácidos grasos monoinsaturados

AGP: Ácidos grasos poliinsaturados

AGS: Ácidos grasos saturados

AGT: Ácidos grasos trans

AngioTC: Angiografía por Tomografía Computerizada

AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

ASPECTS: *Alberta Stroke Program Early CT Scores*

B

BDNF: Factor neurotrófico Derivado del Cerebro

BHE: Barrera Hematoencefálica

C

CPE: Célula Progenitora Endotelial

D

DM: Diabetes mellitus

DMed: Dieta Mediterránea

DL: Dislipemia

F

FA: Fibrilación auricular

FC: Factor de crecimiento.

FRV: Factor de riesgo vascular

H

HTA: Hipertensión arterial

HDL-colesterol: *Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad*

I

IPAQ: *The International Physical Activity Questionnaire*

L

LDL-colesterol: *Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad*

M

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1

MET: Unidad de Medida del Índice Metabólico

MMP-9: Metaloproteínasa de matriz – 9.

MOCA: *Montreal Cognitive Assessment*

mRS: Escala de Rankin modificada

N

NIHSS: *National Institute of Health Stroke Scale*

P

PASE: The Physical Activity Scale for Elderly

R

RIQ: Rango intercuartílico

rtPA: Activador tisular del plasminógeno recombinante (alteplasa)

T

TAD: Tensión arterial diastólica

TAS: Tensión arterial sistólica

TICA: Arteria carótida interna intracraneal.

TICI: *Thrombolysis in cerebral ischemia*

tMCAO: Oclusión de la arteria cerebral media en el modelo animal (inducción isquemia)

TOAST: Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment

V

VEGF: Factor de crecimiento Vascular Endotelial

INDICE DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. ICTUS ISQUÉMICO Y HáBITOS SALUDABLES	17
1.1.1. CONCEPTOS GENERALES: ICTUS ISQUÉMICO, CASCADA ISQUÉMICA, NEUROPROTECCIÓN Y NEURORREPARACIÓN	17
1.1.2. HáBITOS SALUDABLES EN LA PREVENCIÓN DEL ICTUS	22
1.2. DIETA MEDITERRÁNEA	27
1.2.1. DEFINICIÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA. SISTEMAS DE VALORACIÓN DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA	27
1.2.2. PRINCIPALES COMPONENTES DE LA DMED CON INTERÉS BIOLÓGICO	33
1.2.3. IMPACTO GLOBAL DE LA DIETA MEDITERRÁNEA EN LA SALUD	44
1.2.4. BENEFICIOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA SOBRE LA SALUD VASCULAR Y EL ICTUS	46
1.2.5. MECANISMOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LOS POTENCIALES EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA DIETA EN EL PRONÓSTICO DEL ICTUS	49
1.3. ACTIVIDAD FÍSICA	56
1.3.1. SISTEMAS DE EVALUACIÓN DEL GRADO DE ACTIVIDAD FÍSICA	56
1.3.2. IMPACTO GLOBAL DE LA ACTIVIDAD FÍSICA SOBRE LA SALUD	58
1.3.3. ACTIVIDAD FÍSICA, SALUD VASCULAR E ICTUS	60
1.3.4. MECANISMOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LOS POTENCIALES EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA ACTIVIDAD FÍSICA EN EL PRONÓSTICO DEL ICTUS	64
1.4. CONCLUSIONES DE LA INTRODUCCIÓN	69
2. HIPÓTESIS	73
3. OBJETIVOS	77
4. MATERIAL Y MÉTODOS	81
4.1. MODELO ANIMAL	83
4.2. ESTUDIO CLÍNICO	94
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	106
5. RESULTADOS	109
5.1. MODELO ANIMAL	111
5.1.1. ANIMALES INCLUIDOS	111
5.1.2. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y ACTIVIDAD FÍSICA SOBRE EL VOLUMEN FINAL DEL INFARTO	112
5.1.3. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y ACTIVIDAD FÍSICA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA	114
5.1.4. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y ACTIVIDAD FÍSICA EN LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS	119
5.1.5. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y LA ACTIVIDAD FÍSICA EN LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL	120
5.1.6. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y ACTIVIDAD FÍSICA EN LOS ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS	122
5.2. ESTUDIO CLÍNICO	127
5.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	127
5.2.1.1. Descripción general de la muestra	127
5.2.1.2. Descripción variables de dieta	133
5.2.1.3. Descripción variables de ejercicio físico	136
5.2.1.4. Biomarcadores CIRCULANTES y variables basales	138
5.2.1.5. Resumen análisis descriptivo de la muestra	142
5.2.2. FACTORES ASOCIADOS A LAS VARIABLES PRONÓSTICAS PRINCIPALES	143
5.2.2.1. Características basales y pronóstico	143
5.2.2.2. Dieta previa al ictus y pronóstico	144
5.2.2.3. Actividad física previa al ictus y pronóstico	145
5.2.2.4. Biomarcadores circulantes y pronóstico	147
5.2.2.5. Sinergismo entre adherencia a la dieta mediterránea y actividad física	148
5.2.2.6. Resumen de los factores asociados al pronóstico	150

6. DISCUSIÓN	153
6.1. SÍNTESIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	155
6.1.1. MODELO ANIMAL	155
6.2.2. ESTUDIO CLÍNICO	158
6.3.3. CONCLUSIONES DE AMBOS ESTUDIOS	163
6.2. LIMITACIONES	164
6.3. DIRECCIONES FUTURAS	165
7. CONCLUSIONES	169
8. BIBLIOGRAFÍA	173
9. ANEXOS	197
ANEXO 1: ESCALAS DE DESNUTRICIÓN (MUST Y MNA)	199
ANEXO 2: ESCALA MEDAS-14 ADAPTADA	200
ANEXO 3: ESCALAS DE AF	202
ANEXO 4: ESCALAS DE EVALUACIÓN COGNITIVA	205
ANEXO 5: ESCALA DE RANKIN MODIFICADA (MRS)	207
ANEXO 6: ESCALA NIHSS	208
ANEXO 7: TABLA CITOQUINAS/QUIMIOCINAS	209
ANEXO 8: CARACTERÍSTICAS BASALES EN FUNCIÓN DE LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA	211
ANEXO 9: FRECUENCIAS DE CONSUMO DE ALIMENTOS (G/DÍA) EN FUNCIÓN DE LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA	212
ANEXO 10: CARACTERÍSTICAS BASALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE ACTIVIDAD FÍSICA PREVIA AL ICTUS	213



INTRODUCCIÓN



1.1. ICTUS ISQUÉMICO Y HÁBITOS SALUDABLES

1.1.1. CONCEPTOS GENERALES: ICTUS ISQUÉMICO, CASCADA ISQUÉMICA, NEUROPROTECCIÓN Y NEURORREPARACIÓN

EL ICTUS Y SU FISIOPATOLOGÍA: LA CASCADA ISQUÉMICA

Un ictus se produce como consecuencia de un trastorno súbito de la circulación cerebral, que altera la funcionalidad de una determinada región del cerebro. El ictus se divide en dos grandes subtipos: el hemorrágico, cuando esta alteración es consecuencia de la rotura de una arteria, y el isquémico, por interrupción de la circulación cerebral a consecuencia de la oclusión de un vaso. Es en este último en el que se centrará la presente tesis y en concreto, en el ictus isquémico por oclusión de gran vaso cerebral.

Cuando se produce la oclusión arterial, la consecuente disminución del flujo cerebral activa una serie de cambios moleculares, denominados cascada isquémica, que acaban produciendo muerte neuronal y pérdida de la viabilidad del tejido¹. Se trata de un proceso complejo y dinámico que se inicia en el momento del insulto isquémico y perdura en las horas y días siguientes, en el que intervienen múltiples vías y que conlleva a la muerte celular a través de dos mecanismos principales: la necrosis y la apoptosis¹⁻⁴. Los principales mecanismos detallados se muestran en la **Figura 1**.

Necrosis

Tras la isquemia, la reducción del aporte de oxígeno y glucosa produce una disminución del adenosín trifosfato (ATP) y un fallo energético secundario. La disminución del ATP, necesario para el funcionamiento de las bombas de membrana intercambiadoras de iones, condiciona una despolarización de la misma y una entrada masiva de calcio en la célula y secundariamente, edema citotóxico y necrosis. Por otra parte, el aumento de calcio intracelular produce la liberación de neurotransmisores excitadores (glutamato) que, al interaccionar con sus receptores AMPA y NMDA, intensifican aún más la entrada de calcio a la célula, perpetuando el mecanismo previamente descrito.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

Por otra parte, la hipoxia producirá en la célula un cambio metabólico, pasando de un metabolismo aerobio a uno anaerobio, con aumento de los niveles de ácido láctico, acidosis metabólica y finalmente, necrosis.

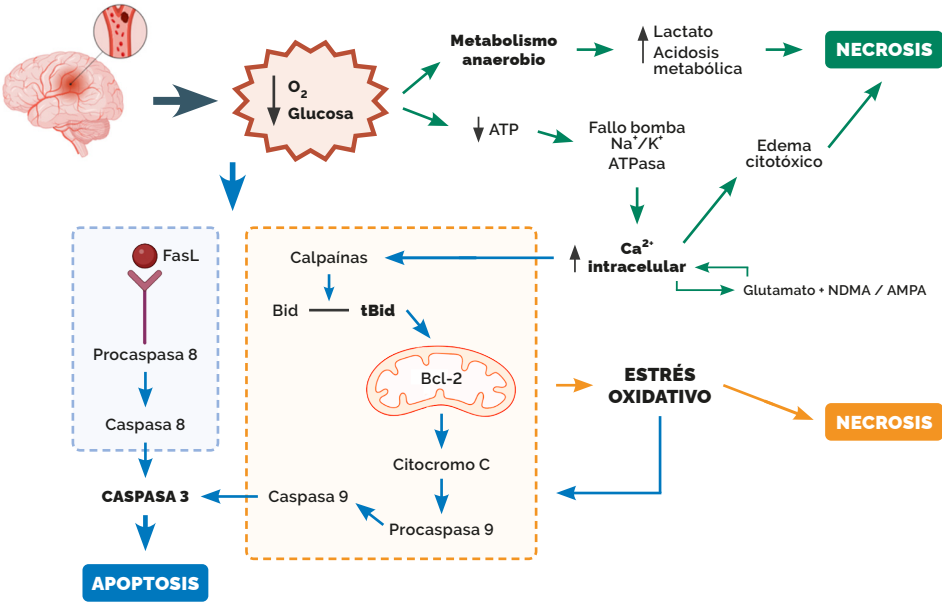


Figura 1: La cascada isquémica.

Resumen de las vías activadas en la cascada isquémica que conllevan a la muerte neuronal de distintas formas: **1)** apoptosis a través de la activación de la vía de las caspasas; **2)** necrosis por el fallo energético secundario a la disfunción de las bombas de membrana; **3)** necroptosis o muerte caspasa-independiente, activada por algunos receptos de membrana implicados en la apoptosis, como el factor de necrosis tumoral, que en este caso conlleva a la muerte celular a través de procesos caspasa-independientes, entre los que está la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo. A diferencia de la apoptosis, en la necroptosis no se produciría fragmentación del ADN.

FasL: ligando Fas; **Bid:** tBid: forma truncada de la proteína Bid (forma bioactiva);
AMPA, NMDA: receptores de glutamato ionotrópicos.

Apoptosis

Por su parte, la apoptosis se activará por dos vías, intrínseca y extrínseca, en ambos casos mediadas por caspasas. La vía extrínseca se inicia con un estímulo externo (en este caso, la isquemia) que promueve la unión de ligandos a la superfamilia de los receptores de membrana TNF (Fas y CD95 entre otros) y la activación secundaria de

la cascada de las caspasas y apoptosis. La vía intrínseca, a diferencia de la anterior, no está mediada por receptores sino por proteínas intracelulares: como consecuencia de la isquemia, la excitotoxicidad mediada por glutamato y el aumento del calcio intracelular, se produce la activación de las calpainas. Estas proteasas promueven el cambio de la proteína Bid a su forma truncada o tBid, una proteína proapoptótica. tBid migra a la mitocondria donde interacciona con otras familias de proteínas proapoptóticas (Bcl-2, entre otras), conduciendo a una disfunción mitocondrial y a la activación de la vía de las caspasas a través de la liberación de citocromo C.

De forma añadida, con la isquemia se produce la activación de vías inflamatorias y la producción de radicales libres de oxígeno y especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico (NO), que inducen estrés oxidativo y apoptosis mediada por caspasas y necroptosis o muerte celular caspasa-independiente.

Penumbra, core y oligohemia

El flujo sanguíneo cerebral (FSC) normal se encuentra entre los 60 y 100 mL/100 g/min mientras que en la zona hipoperfundida, descendería por debajo de los 60 mL/100 g/min. Dependiendo del FSC de cada región, en el tejido isquémico encontramos 3 regiones bien diferenciadas en las que el proceso de muerte neuronal ocurrirá de forma distinta ⁵ (**Figura 2**):

- ▶ **Core:** se trata del núcleo del infarto o la zona donde la isquemia es máxima y el daño irreversible. El FSC está gravemente disminuido, por debajo de 10 mL/100 g/min.
- ▶ **Penumbra:** es la región de tejido en riesgo y potencialmente salvable con terapias de reperfusión. En este caso, el FSC estaría entre 10 y 22 mL/100 g/min y a nivel molecular destaca la persistencia de la homeostasis iónica y potenciales transmembrana, pero ausencia de los potenciales espontáneos o inducidos.
- ▶ **Oligohemia:** tejido hipoperfundido pero funcional, que tiende a recuperarse espontáneamente. El FSC en esa región es inferior a 60 mL/100 g/min y superior a 22 mL/100 g/min.

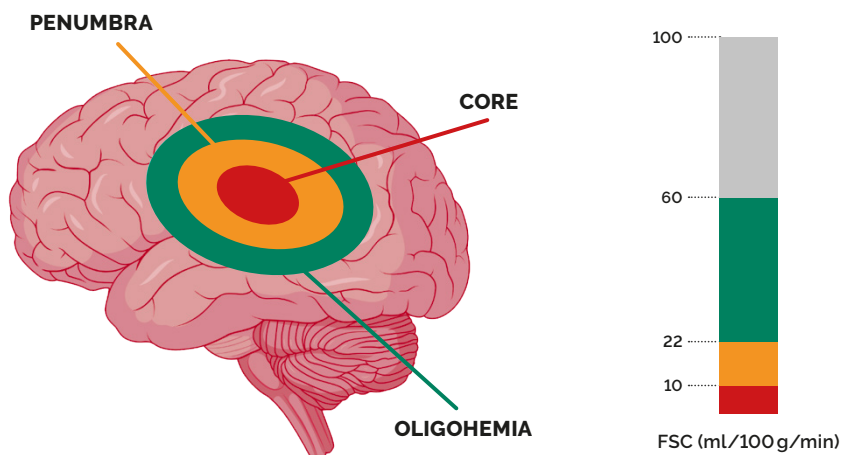


Figura 2: Regiones del tejido isquémico según flujo sanguíneo cerebral (FSC).

Core (<10 ml/100 g/min de FSC), **penumbra** (entre 10 y 22 ml/100 g/min) y **oligohemia** (entre 22 y 60 ml/100 g/min de FSC).

Las dos vías de muerte celular previamente descritas (necrosis y apoptosis) ocurren de forma simultánea, siendo más predominante la necrosis en el core del infarto y la apoptosis en la zona de penumbra, puesto que para que este proceso se lleve a cabo es precisa cierta reserva energética celular. En el core del infarto, la depleción energética es prácticamente total e irreversible, predominando los fenómenos de necrosis. En la penumbra, donde la depleción energética no es total ni irreversible, predominan los fenómenos de apoptosis⁴. Es esta zona de penumbra la que constituye por tanto la principal diana de tratamiento del ictus agudo, a fin de evitar que el daño se perpetúe en el tiempo y termine convirtiéndose, al igual que ocurre en el core del infarto, en un daño cerebral irreversible.

NEUROPROTECCIÓN Y NEURORREPARACIÓN EN EL ICTUS AGUDO

Se conoce como neuroprotección a la preservación estructural y/o funcional del tejido neuronal dañado y como neurorreparación, a aquellos fenómenos que restauran el adecuado funcionamiento y/o estructura cerebral tras la isquemia⁶. En el caso del ictus isquémico, se trata por tanto de los fenómenos que atenúan el daño que ejerce la isquemia, actuando antes y/o en el momento del insulto isquémico. Bajo este pretexto,

se han ensayado hasta la fecha múltiples estrategias terapéuticas que, a través de su acción sobre las distintas vías metabólicas implicadas en el daño por la isquemia (estrés oxidativo, excitotoxicidad, inflamación...) intentaban atenuar el mismo ⁷.

El preconditionamiento a la isquemia sería un fenómeno neuroprotector, que actuaría antes de la isquemia y aumentaría la tolerabilidad del tejido al efecto nocivo de la misma ⁸. Se trata de un proceso adaptativo y mediado por diversos mecanismos, desde las vías clásicas de la cascada isquémica como excitotoxicidad por glutamato o estrés oxidativo, hasta modificaciones genéticas. Bajo la hipótesis de que esta adaptación a la isquemia podría entrenarse o modificarse por mecanismos exógenos, a finales de los años 80 el grupo de Murry probó en perros a realizar oclusiones transitorias de las arterias coronarias antes de hacer una oclusión más duradera y posiblemente letal. A diferencia de lo que cabría esperar por la gravedad de la oclusión, los animales desarrollaron cierta tolerancia a la misma mediante modificaciones adaptativas en el tejido cardíaco. Acuñaron en base a ello el término de "preconditionamiento isquémico" ⁹. Posteriormente se demostró también este mecanismo en el caso de la isquemia cerebral: en el año 1990 y simulando el modelo utilizando por Murry, el grupo de Kitagawa indujo pequeñas isquemias cerebrales en jerbos, observando que secundariamente a las mismas se retrasaba la muerte neuronal ¹⁰. Siguiendo esta observación, se hipotetizó que en los pacientes que habían tenido un accidente isquémico transitorio (AIT) y desarrollaban después un ictus isquémico, la severidad de éste sería menor que en aquellos sin eventos cerebrovasculares previos ¹¹. Más allá de este preconditionamiento inducido por isquemias, se probaron otros mecanismos como la hipoxia, la privación de glucosa o la hipotermia.

Otros de los fenómenos claves en estos procesos serían aquellos implicados directamente en la reparación del tejido afecto o neuroreparación, entre los que destacan la neovascularización y la neurogénesis ¹². La neovascularización se refiere a la formación o reparación de los vasos sanguíneos e incluye a su vez diversos procesos: la vasculogénesis (formación de nuevos vasos a través de células progenitoras endoteliales o CPEs),

1 ◀ INTRODUCCIÓN

angiogénesis (formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes gracias a la multiplicación de células endoteliales maduras) y arteriogénesis (formación de arterias a partir de vasos de menor calibre, fenómeno clave en la creación de circulación colateral). La neurogénesis consiste en la formación de nuevas neuronas, sinapsis y glía. De forma muy resumida, ya que se explicará con detalle en el apartado de mecanismos moleculares, ambos procesos (neovascularización y neurogénesis) se activan en respuesta a la isquemia mediados por la liberación de factores de crecimiento neuronal y vascular pero también por la movilización de CPEs, conllevando a una mayor capacidad de regeneración del tejido y por ende, a un mejor pronóstico y menor volumen final del infarto.

1.1.2. HÁBITOS SALUDABLES EN LA PREVENCIÓN DEL ICTUS

El ictus continúa siendo en España la segunda causa de mortalidad global (la primera en mujeres y la tercera en hombres) y la primera causa de discapacidad ¹³.

Dado el elevado impacto socioeconómico de esta patología, cobran especial relevancia las estrategias de prevención, entre las que se encuentran los hábitos de vida saludables. En el INTERSTROKE, un estudio internacional de casos y controles que incluyó cerca de 30000 participantes, tomando como casos pacientes con un primer ictus (tanto isquémico como hemorrágico), se encontraron 10 factores modificables que explicarían el 90% del riesgo de desarrollar un ictus, entre los que están la dieta, el consumo de alcohol y la actividad física además de otros como el hábito tabáquico, el estrés, la hipertensión arterial, la diabetes, el ratio de apolipoproteína B/A1 y el índice cintura-cadera ¹⁴. A continuación, se describirán algunos de estos factores de riesgo modificables en forma de hábitos de vida.

TABAQUISMO

Múltiples estudios han demostrado la relación existente entre el consumo de tabaco y el riesgo de desarrollar un ictus de cualquier tipo, especialmente isquémico. Así, se estima que los fumadores tienen el doble de riesgo de sufrir un ictus isquémico que

los no fumadores y cerca del cuádruple en aquellos que fuman más de 20 cigarrillos al día, tratándose por tanto de una asociación dosis-dependiente^{15,16}. Los mecanismos a través de los cuales el tabaco conlleva un aumento del riesgo de ictus son múltiples, entre los que están la reducción del HDL, el efecto nocivo de la carboxihemoglobina o el aumento de la agregación plaquetaria y niveles de fibrinógeno, habiéndose demostrado además una progresión de la aterosclerosis y el daño arterial temprano¹⁷. En prevención secundaria, se ha demostrado también una reducción en el riesgo de ictus recurrente al abandonar el hábito tabáquico, pudiendo igualarse el riesgo a los no fumadores a los 5 años del cese de consumo¹⁸. Así, tanto las guías Americanas como españolas, recomiendan el abandono del tabaco tanto en prevención primaria como secundaria del ictus (recomendación clase 1, nivel de evidencia B)^{15,16,19}.

ALCOHOL

En cuanto al consumo de alcohol, los resultados de distintos estudios son controvertidos. Si bien parece claro que un consumo excesivo de alcohol se relaciona con el riesgo de desarrollar un ictus, especialmente hemorrágico, los resultados no están tan claros cuando se trata de un consumo moderado o leve. De esta forma, hay algunos estudios que han demostrado un teórico efecto protector del alcohol, especialmente del vino tinto, cuando éste se ingiere en baja cantidad^{20,21}. Las guías americanas y españolas de prevención del ictus recomiendan evitar el consumo excesivo de alcohol (recomendación clase 1, nivel de evidencia B)^{15,16}. Lo que parece claro y se evita actualmente desde todas las sociedades científicas, es recomendar el consumo moderado de alcohol como medida de prevención.

ESTRÉS

Por mecanismos que aún no están claros, pero se cree que probablemente secundario a una activación del sistema nervioso simpático y del eje hipotálamo-hipofisario, el estrés psicosocial se ha relacionado en varios estudios con el riesgo de ictus, tanto isquémico como hemorrágico^{22,23}. Tal es así que la guía española de prevención del

1 ◀ INTRODUCCIÓN

ictus, recomienda evitar el estrés para minimizar el riesgo de ictus (grado de recomendación 2A, nivel de evidencia B) ¹⁶.

OBESIDAD

Son múltiples los estudios que han relacionado la obesidad con el riesgo cardiovascular global y el ictus en particular, estimándose que las personas con sobrepeso y obesidad tienen un riesgo de 22% y 64% de tener un ictus isquémico en comparación con personas en normopeso ²⁴. Según la Encuesta Europea de Salud, en el año 2020 en España el 16.5% de los hombres y el 15.5% de las mujeres padecían obesidad y un 44.9% de hombres y 30.6% de mujeres sobrepeso, estimándose un aumento en estos porcentajes en los próximos años.

Los mecanismos a través de los cuales la obesidad condiciona un mayor riesgo de sufrir un ictus y otros eventos vasculares son, entre otros, su asociación con algunos factores de riesgo vascular como la resistencia a la insulina, la diabetes, la hipertensión, la dislipemia y el sedentarismo. Además, la obesidad proporciona un ambiente proinflamatorio que se relaciona con la expresión de la aterosclerosis.

Aunque la obesidad es un factor de riesgo demostrado en la incidencia de ictus, existen resultados discrepantes en cuanto a su efecto sobre el pronóstico. El término "paradoja de la obesidad" fue acuñado en el año 2011 y hace referencia a un mejor pronóstico y menores tasas de mortalidad en pacientes con sobrepeso y obesidad frente a aquellos con normopeso e infrapeso, en contra de lo que cabría esperar ²⁵, aunque la evidencia disponible es escasa y discutida ²⁶.

Las distintas guías nacionales e internacionales de prevención de ictus son unánimes en cuanto sus recomendaciones a este respecto: tanto en prevención primaria como secundaria, se recomienda perder peso para mejorar el riesgo vascular en pacientes con sobrepeso y obesos (grado de recomendación 1, nivel de evidencia B) ^{15, 16, 19}.

DIETA

Los patrones dietéticos de la población son múltiples y muy variados, aunque sí parece que algunos de los componentes de la misma están relacionados con la salud vascular en general y con la prevención del ictus en particular. En concreto, se ha ahondado especialmente en el posible efecto beneficioso de la dieta mediterránea, que será abordada con más detalle en el siguiente apartado, dietas bajas en sal y algunos componentes de la dieta en particular como las frutas, verduras, pescado o fibra.

En cuanto a la dieta mediterránea (DMed), puesto que los ensayos clínicos disponibles son escasos, según una reciente revisión de la librería Cochrane, la evidencia científica es baja en cuanto a que este patrón de dieta reduzca el riesgo de sufrir un primer ictus o una recurrencia, aunque sí parece existir cierto efecto protector en la mayoría de estudios realizados ²⁷. Ocurre lo mismo con la acción protectora de la DMed sobre el control de algunos factores de riesgo vascular como la obesidad o el síndrome metabólico: aunque sí parece existir un efecto positivo, éste parece escaso y la evidencia, nuevamente, es baja ²⁷. En cuanto a la prevención primaria, el PREDIMED (PREvenición con Dieta MEDiterránea) es hasta la fecha el principal ensayo clínico realizado en este ámbito. Se trató de un estudio realizado en España que incluyó un total de 7447 sujetos con riesgo vascular alto, aleatorizándolos a tres brazos de intervención: unos recibieron una dieta de control baja en grasas, otro grupo seguía un esquema de dieta mediterránea suplementado con aceite de oliva y un tercero, dieta mediterránea suplementada con frutos secos, realizándose un seguimiento de 4.8 años y evaluándose la incidencia de eventos vasculares. En los resultados finales, si bien no se demostró una reducción significativa en la mortalidad global, mortalidad cardiovascular ni cardiopatía isquémica en los grupos que seguían dieta mediterránea, sí que se evidenció una reducción en la incidencia de ictus tras el seguimiento a 4.8 años (HR 0.6, 95% CI 0.45 - 0.80) ²⁸. En cuanto a la prevención secundaria del ictus, no existen hasta la fecha estudios realizados que respondan con solidez a la pregunta de si la DMed disminuye el riesgo de sufrir un segundo evento cerebrovascular ²⁷.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

Se conoce como dieta DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*) a un patrón dietético con alimentos bajos en sodio y grasas saturadas y ricos en productos de origen vegetal, que demostró ser útil no solo en el control de la tensión arterial ^{29,30} sino también en la disminución de eventos vasculares en general e ictus en particular ³¹.

Las guías americanas recomiendan la DMed frente a otro tipo de dietas para prevenir tanto un primer evento cerebrovascular (grado de recomendación 2b, nivel de evidencia B) como su recurrencia (grado de recomendación 2, nivel de evidencia B-R) ^{15,19}, mientras que las guías nacionales la recomiendan para reducir el riesgo de ictus con un grado de recomendación 1, nivel de evidencia A ¹⁶. Asimismo, la guía americana de prevención secundaria recomienda limitar el consumo de sal diario (2.5 g/día) en pacientes que hayan sufrido un ictus y tengan además hipertensión, a fin de reducir el riesgo de recurrencia (grado de recomendación 2A, nivel de evidencia B-R) ¹⁹.

ACTIVIDAD FÍSICA

El sedentarismo es uno de los factores de riesgo modificables más frecuentemente asociados a la enfermedad vascular. Son numerosos los estudios publicados hasta la fecha en los que se ha relacionado la práctica de actividad física regular con un menor riesgo vascular en general, incluyendo el ictus ^{32,33}.

En prevención secundaria parece que la actividad física disminuye el riesgo de sufrir un nuevo evento cerebrovascular. El ensayo clínico SAMMPRIS (*Stenting and Aggressive Medical Management for Preventing Recurrent Stroke in Intracranial Stenosis*) comparó la evolución de pacientes con ictus isquémico por ateromatosis intracraneal aleatorizados a tratamiento médico agresivo con y sin tratamiento endovascular en fase aguda. Un subanálisis posterior del brazo de los aleatorizados a tratamiento médico demostró que la práctica de actividad física (más de 30 minutos de actividad moderada al menos 3 días por semana) fue el predictor más potente de buena evolución posterior, con menor incidencia de recurrencia isquémica ³⁴.

Tanto las guías nacionales como internacionales de prevención primaria del ictus recomiendan la práctica regular de actividad física (de intensidad moderada 150 minutos a la semana o actividad vigorosa 75 minutos a la semana, o una combinación de ambas) para disminuir el riesgo de sufrir un ictus (grado de recomendación 1, nivel de evidencia B) ^{15,16}. En prevención secundaria, también se recomienda la práctica de actividad física regular adaptada a las capacidades de los pacientes para disminuir la recurrencia isquémica (grado de recomendación 1, nivel de evidencia C-LD) ¹⁹.

De entre todos los factores de riesgo modificables y hábitos saludables que tienen un efecto beneficioso en la prevención del ictus, se detallarán a continuación los relacionados con la dieta mediterránea y la actividad física, como factores que además podrían ejercer efectos neuroprotectores y neurorreparadores, y siendo ambos en los que se basan los principales trabajos realizados en la presente tesis doctoral.

1.2. DIETA MEDITERRÁNEA

1.2.1. DEFINICIÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA. SISTEMAS DE VALORACIÓN DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

■ DEFINICIÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA

Se conoce como dieta mediterránea (DMed) al patrón de alimentación que tradicionalmente se ha seguido en los países ubicados en torno al mar Mediterráneo, fundamentalmente Grecia y el sur de Italia (**Figura 3**). Aunque con siglos de antigüedad, las primeras descripciones de la DMed en la literatura se remontan a la década de los 60, momento en que, a consecuencia de la globalización, se asistió a un cambio en los estilos de vida que produjo modificaciones en el modelo clásico de DMed, si bien las características básicas o comunes de la misma se han mantenido estables a lo largo de los años ³⁵. Actualmente y desde el año 2010, la DMed está considerada por la UNESCO como parte del Patrimonio Cultural Inmaterial.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

La DMed es el resultado de un cruce de culturas propiciado por el comercio y la movilidad que ofrecía el mar Mediterráneo. Esto, junto con una cultura agrícola y un clima favorable para la producción y cultivo de algunas materias primas, hicieron que a lo largo de los siglos se fuera conformando una dieta basada en productos vegetales autóctonos, tales como los olivos o las vides. Gracias al comercio se incorporaron otros productos como algunas frutas y legumbres, procedentes de países orientales y que se cree llegaron a la Cuenca Mediterránea de la mano de los árabes. Además del clima y la flora de las regiones mediterráneas, la economía también actuó como un determinante histórico fundamental en el desarrollo del modelo de DMed clásico ya que se trataba en muchos casos de poblaciones con escaso poder adquisitivo en las que el acceso a algunos alimentos de elevada cuantía económica, como las carnes rojas, era muy limitado ³⁶. Todos esto se fue integrando en la dieta hasta conformar la DMed que ha llegado a nuestros días ³⁷.



Figura 3: *Mapa de la cuenca mediterránea.*

No se trata de un modelo único de dieta, sino de un concepto que aúna unas características comunes en la alimentación de estas regiones con algunas particularidades propias de cada zona, como un mayor consumo de pasta en Italia o de pescado en España. Como elementos comunes, se trata de una dieta caracterizada por una elevada ingesta de productos de origen vegetal (frutas, verduras, frutos secos, cereales no procesados y legumbres), aceite de oliva como principal fuente de grasa, un consumo moderado o alto de pescados y moluscos, un consumo moderado-bajo de huevos, pollo y lácteos (principalmente queso y yogur), un consumo bajo de carnes rojas y un consumo de alcohol, en forma de vino, en cantidades bajas-moderadas durante las comidas (**Figuras 4 y 5**). Características principales de esta dieta la componen también la diversidad, la elevada densidad de nutrientes, el consumo de productos de proximidad y estacionales y las formas clásicas de cocina y preparación de los alimentos.



Figura 4: Pirámide de alimentos de la Dieta Mediterránea.

Se representan los principales elementos de la dieta y su frecuencia de consumo recomendada. La base está representada por los alimentos que deberían incluirse diariamente en cada comida y el vértice aquéllos con una frecuencia recomendada más esporádica. Se incluirían también (no representados en la pirámide) actividades de tiempo libre y actividad física como hábitos recomendados.

Adaptado de Fundación Dieta Mediterránea.

Un concepto importante a la hora de definir la DMed es el hecho de recordar que se trata de una dieta con alto contenido en grasas, ya que suponen entre el 30 - 45% del total de los nutrientes ingeridos. La importancia radica no tanto en la cantidad sino en el tipo de ácidos grasos consumidos y su fuente de procedencia: en la DMed,

1 ◀ INTRODUCCIÓN

los ácidos grasos principales se obtienen del aceite, los frutos secos y el pescado y se trata predominantemente de ácidos grasos saludables, monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP), mientras que la cantidad de ácidos grasos saturados (AGS), perjudiciales, es en general baja ³⁵.

Decálogo de la DMed	
1	Utilizar el aceite de oliva como principal grasa de adición
2	Consumo diario de alimentos de origen vegetal
a	Vegetales: 2 o más raciones por comida
b	Fruta: 1 o 2 raciones por comida
c	Frutos secos: 1 ración al día
d	Legumbres
3	Consumo diario de pan y cereales, principalmente en sus formas integrales
a	1 o 2 raciones por comida. Preferiblemente formas integrales sin procesar
4	Priorizar el consumo de alimentos frescos y de temporada, evitando procesados
5	Consumir frecuentemente lácteos, principalmente yogur y quesos (2 raciones al día, preferiblemente formas desnatadas)
6	El consumo de carnes rojas y procesadas debe limitarse. Las carnes, preferiblemente blancas (ave o conejo, dos raciones a la semana)
7	Consumir pescado en abundancia (2 o más raciones/semana) y huevos con moderación (2 o 4 raciones/semana)
8	Evitar el consumo de dulces y pasteles. Priorizar el consumo de frutas como postre
9	Consumo moderado de vino tinto. Consumo entre 1.5-2 litros de agua al día
10	Realizar actividad física diaria

Figura 5: Decálogo de la Dieta Mediterránea

SISTEMAS DE VALORACIÓN DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

Otro punto clave en el estudio de la DMed y sus efectos sobre la salud ha sido el desarrollo de escalas de puntuación o cuestionarios validados que evalúan ya no sólo el tipo de alimento consumido sino la adherencia a la DMed clásica. Estas escalas sirvieron de base para valorar la asociación de la DMed con resultados tales como la mortalidad global ³⁹, el riesgo vascular y eventos vasculares ²⁸, la enfermedad coronaria, el ictus, la diabetes mellitus o el síndrome metabólico, entre otros ⁴⁰⁻⁴⁴.

El primero de estos cuestionarios o escalas de puntuación fue el propuesto por Trichopoulou y colaboradores en el año 1995, conocido como *Mediterranean Dietary*

Score (MDS) ⁴⁵ y modificado posteriormente ⁴⁶. En él, se valoraron 9 componentes de la DMed y la adherencia al consumo de los mismos, tomando como referencia de punto de corte una media ajustada por sexo. En función de si el consumo de un individuo en concreto estuviera por encima o por debajo de ese punto de corte, se sumaba o restaba un punto, dependiendo del alimento en cuestión. De esta forma, se obtenía una puntuación total de entre 0 (adherencia a DMed mínima) a 9 (adherencia máxima). Puesto que los puntos de corte se definieron utilizando como referencia la población griega, el cuestionario era poco aplicable a otras poblaciones por lo que con el tiempo surgieron cuestionarios alternativos que valoraban puntos de corte predefinidos y no basados en medias poblacionales, tales como las raciones recomendadas diarias de consumo de un alimento concreto. Otros de los cuestionarios más utilizados fue el desarrollado por Panagiotakos y colaboradores ⁴⁷. En este caso, evaluaron 11 ítems de la dieta y los puntuaron con una escala entre 0 - 5 en función de la frecuencia de consumo recomendada para cada alimento y la realizada por cada individuo, de tal forma que las puntuaciones más altas indicaban una mayor adherencia a la DMed (por ejemplo, se asignó un 5 para aquéllos que consumían >18 raciones de verduras al mes y también 5 para aquéllos que nunca consumían carne roja y derivados). Encontraron que puntuaciones más altas en el cuestionario estaban relacionadas con valores más bajos de tensión arterial, colesterol total e índice de masa corporal (IMC).

En población española se desarrollaron varios cuestionarios. Uno de ellos, utilizado en la cohorte española del estudio EPIC, se ideó basándose en el tradicional de Trichopoulou previamente descrito. En este caso, se evaluó el consumo en gramos/día de cada alimento y se asignó este consumo a uno de los tres terciles posibles. A cada tercil se le asignó una puntuación de 0, 1 ó 2 puntos en función del alimento. Encontraron que una alta adherencia a la DMed según este cuestionario se relacionaba, en el seguimiento, con un 40% menos de riesgo de desarrollar un primer evento cardiovascular ⁴⁸.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar?	
☐ No - 0 puntos	☐ Sí - 1 puntos
¿Cuánto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc.)? (1 ración = 1 cucharada sopera = 10 mL) * Recomendado: 1-2 raciones de aceite de oliva por cada comida principal (3-6 raciones al día)	
☐ <4 cucharadas - 0 puntos	☐ 4 o más cucharadas - 1 puntos
¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día? (las guarniciones o acompañantes = ½ ración) (1 ración = 150-200 g = 1 ensalada, 1 plato de verdura cocida, 2 zanahorias...) * Recomendado: 2 ó más al día	
☐ Menos de 2 - 0 puntos	☐ 2 o más (al menos una en ensalada o cruda) - 1 puntos
¿Cuántas piezas de fruta , incluyendo zumo natural, consume al día? (1 ración = 120-200 g o 1 pieza mediana o 1 taza de frutas pequeñas (fresas, cerezas) o 2 rodajas de melón) * Recomendado: 3 o más raciones al día	
☐ Menos de 3 - 0 puntos	☐ 3 o más - 1 puntos
¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día? (ración: 100-150 g) * Recomendado: Menos de 2 raciones a la semana. Consumo ocasional o moderado	
☐ Una o más - 0 puntos	☐ Menos de una - 1 puntos
¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día? (porción individual habitual: 12 g = 1 ración) * Recomendado: Menos de 2 raciones a la semana. Consumo ocasional o moderado	
☐ Una o más - 0 puntos	☐ Menos de una - 1 puntos
¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas consume al día? * Recomendado: Menos de 2 bebidas a la semana. Consumo ocasional o moderado	
☐ Una o más - 0 puntos	☐ Menos de una - 1 puntos
¿Bebe usted vino ? ¿Cuánto consume a la semana? (1 Vaso = 100 ml) * Recomendado: consumo moderado.	
☐ Menos de 7 - 0 puntos	☐ 7 o más - 1 puntos
¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana? (1 plato o ración: 60-80 g) * Recomendado: 2-4 raciones/semana	
☐ Menos de 3 - 0 puntos	☐ 3 o más - 1 puntos
¿Cuántas raciones de pescado-mariscos consume a la semana? (1 plato, pieza o ración: 100-150 g de pescado o 4-5 piezas o 200 g de marisco) * Recomendado: 3-4 raciones/semana	
☐ Menos de 3 - 0 puntos	☐ 3 o más - 1 puntos
¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulce o pasteles a la semana? * Recomendado: 3-4 raciones/semana	
☐ 2 o más - 0 puntos	☐ Menos de 2 - 1 puntos
¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana? (ración: 30 g = 1 puñado o ración individual) * Recomendado: 3-7 raciones a la semana	
☐ Menos de 3	☐ 3 o más - 1 puntos
¿Consume usted preferentemente carnes de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas? (1 ración = 100-125 g = 1 filete pequeño / 1 cuarto de pollo o conejo) * Recomendado: 3-4 raciones/semana	
☐ No - 0 puntos	☐ Sí - 1 puntos
¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, arroz u otros platos aderezados con salsa de tomate, cebolla, ajo o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (Sofrito)?	
☐ Menos de 2 - 0 puntos	☐ 2 o más - 1 puntos

Tabla 1: Cuestionario MEDAS de adherencia a la Dieta Mediterránea

Basándose en uno previo validado en población española ⁴⁹, se desarrolló el cuestionario de 14 ítems utilizado en el PREDIMED o cuestionario MEDAS (Mediterranean Diet Adherence Screening) en el que se asignó una puntuación de 0 ó 1 a cada uno de los ítems, con una puntuación final desde 0 (nula adherencia) a 14 (adherencia máxima) (**Tabla 1**). Puntuaciones mayores de 10 indicaban una adherencia alta a la DMed ^{28,50}.

Más allá de la evaluación de la adherencia a la DMed, se desarrollaron cuestionarios que no sólo evaluaron la adherencia a la dieta sino a un estilo de vida saludable. Uno de ellos es el MEDLIFE ⁵¹ que incluyó no sólo la evaluación de ítems dietéticos, sino también de actividad física o actividades sociales siguiendo la pirámide de la Mediterranean Diet Foundation.

De forma complementaria a los cuestionarios de adherencia a la DMed, existen los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ). Se trata de cuestionarios también utilizados en grandes estudios poblacionales ⁵² y que, aunque son de aplicación más compleja que los de adherencia a DMed al evaluar una larga lista de alimentos de la dieta, tienen la ventaja de ofrecer datos más precisos sobre las cantidades ingeridas.

1.2.2. PRINCIPALES COMPONENTES DE LA DMED CON INTERÉS BIOLÓGICO

ÁCIDOS GRASOS

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos (AG) son moléculas orgánicas que se caracterizan por una composición molecular consistente en una cadena lineal hidrocarbonada en cuyo extremo final existe un grupo carboxilo. La longitud es variable, dependiendo del número de moléculas de carbono que contengan. En función de la existencia o no de dobles enlaces entre sus grupos carbono, se clasifican en ácidos grasos saturados (AGS; sin dobles enlaces) y ácidos grasos insaturados (con dobles enlaces). A su vez, estos últimos podrán ser monoinsaturados (AGM) si sólo tienen un doble enlace, o poliinsaturados

1 ◀ INTRODUCCIÓN

(AGP) si tienen más de uno. Estos dobles enlaces se encuentran habitualmente en la naturaleza en configuración *cis*, es decir, con los átomos de hidrógeno y la doble cadena en el mismo lado; cuando esta configuración se convierte en *trans*, generalmente a través de un proceso industrial, pasan a denominarse ácidos grasos *trans* (AGT), que constituirían el tercer grupo de ácidos grasos principales.

En la prevención de la enfermedad vascular, se sabe que la calidad y composición de los ácidos grasos ingeridos es más importante que la ingesta total de los mismos, por las distintas propiedades que contienen⁵³. De esta forma, y siguiendo una clasificación muy somera, se consideran ácidos grasos beneficiosos desde el punto de vista cardiovascular los AGM y los AGP, mientras que los AGS y los AGT, serían perjudiciales⁵⁴. Parte de este efecto sobre la enfermedad cardiovascular está determinada por la influencia que los distintos ácidos grasos tienen sobre el colesterol plasmático. De esta forma, se sabe que los AGS aumentan el colesterol LDL y los AGP y AGM lo reducen (especialmente los AGP), que los tres elevan sutilmente el HDL y que los AGT tienen los peores efectos sobre las lipoproteínas. De esta forma, reducir la ingesta de AGS y AGT es uno de los caballos de batalla de los sistemas públicos de salud⁵⁴.

Con la literatura disponible hasta la fecha, tanto las guías de la Sociedad Europea de Cardiología (SEC) como de la American Heart Association (AHA), son claras en la recomendación de limitar el consumo de ácidos grasos para disminuir el riesgo cardiovascular, entendiendo que la limitación debe hacerse fundamentalmente sobre los AGS. La AHA recomienda que el consumo de AGS no supere el 5 - 6% del total de calorías diarias para aquellos pacientes que requieran descender sus niveles de LDL-colesterol. El porcentaje restante de calorías diarias debería ser aportado por AGP>AGM>cereales>carbohidratos.

A continuación, se detallarán los efectos beneficiosos de cada uno de los tipos de ácidos grasos comentados. Los principales AG mencionados en este apartado se resumen en la **Tabla 2**.

ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS (AGM)

Los AGM son AG insaturados con un doble enlace en su cadena. El ácido oleico es el más habitual de los AGM, suponiendo >90% del total de los ingeridos con la dieta, seguido del ácido palmitoleico y el vaccínico.

Las fuentes de obtención de los distintos AGM son múltiples y dependen en gran medida de los hábitos dietéticos. En la DMed en particular, el principal aporte viene del aceite de oliva, aunque también pueden encontrarse en frutos secos, semillas y también en algunos productos de origen animal. En otras dietas, la fuente principal de obtención de AGM serán otros aceites, como el de colza o el de aguacate.

Aunque existen múltiples publicaciones que apuntan al efecto beneficioso de los AGM en la salud vascular, hay algunos trabajos que no confirman esta asociación. En el PREDIMED, el mayor consumo de AGM se relacionó con un menor riesgo cardiovascular y menos eventos cardiovasculares y mortalidad global ⁵³, resultados en consonancia con otras publicaciones de distintos grupos ⁵⁵⁻⁵⁷. En contrapartida, existen otros grupos que apuntan a un efecto neutral de los AGM sobre el perfil lipídico y el riesgo cardiovascular global ^{58,59}. Aunque no está claro, se cree que parte de esta discrepancia viene determinada por las distintas fuentes de obtención de los AGM y la heterogeneidad de los estudios. Tal como se describió previamente, las fuentes de obtención de AGM son múltiples y están muy determinadas por los hábitos dietéticos. En algunos alimentos coexisten con los AGS y otros nutrientes con efecto deletéreo sobre la salud por lo que el resultado global observado podría no deberse a un efecto intrínseco de los AGM sino más bien a estos otros componentes. Igualmente, muchos grupos coinciden en que parece difícil discernir si el efecto beneficioso de los AGM descrito en distintos estudios dependen intrínsecamente de éstos, o bien del tipo de dieta en global y los suplementos utilizados ⁶⁰. En concreto, el consumo del aceite de oliva, rico en AGM, y parte fundamental de la dieta mediterránea, es recomendado en la mayoría de las guías de prevención, si bien posee

1 ◀ INTRODUCCIÓN

otras características organolépticas beneficiosas más allá del contenido en AGM, como la presencia de polifenoles.

Por tanto, no hay aún suficiente evidencia científica que apoye al consumo de AGM para conseguir una reducción de eventos clínicos cardiovasculares o muerte, por lo que las principales guías internacionales de prevención ^{15,19} no establecen recomendaciones en cuanto a su consumo con el fin de prevenir eventos vasculares, pero sí para conseguir mejorar el perfil lipídico ⁶¹.

En cuanto a los mecanismos biológicos, son varios los que subyacen a los efectos previamente descritos, entre los que están la reducción de la presión arterial, la optimización del perfil lipídico y función endotelial y la disminución de la resistencia periférica a la insulina ^{54,62}.

ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (AGP)

A diferencia de los AGM, los AGP son ácidos grasos insaturados con más de un doble enlace en su cadena. Dependiendo de la longitud de la misma, la cantidad de dobles enlaces que contengan y su posición, recibirán una nomenclatura u otra. Tradicionalmente y por su mayor interés biológico, se han dividido en n-3 AGP y n-6 AGP (omega 3 y omega 6 respectivamente), indicando el número que sigue la "n" la cantidad de dobles enlaces que contienen. Los n-3 más frecuentes son el ácido alfa-linolénico (ALA, 18:3n-3), el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), el docosapentaenoico (DPA, 22:5n-3) y el docosahecaenoico (DHA, 22:6n-3). El ALA, que a su vez se metaboliza en EPA y DHA, se encuentra en la naturaleza en los cloroplastos de los vegetales de hoja verde y en las semillas de lino, colza, chía o nuez. El EPA y DHA se encuentran en la naturaleza en el aceite de pescado, principalmente pescados grasos. Por su parte, el n-6 más frecuente de la dieta es el ácido linoleico (LA, 18:2n-6), que junto con el ALA constituyen los AGP más habituales. El LA se encuentra en las semillas de la mayoría de las plantas, salvo en el coco y la palma. Se metaboliza en ácido araquidónico (AA) que

se encuentra en la naturaleza en animales herbívoros, productos lácteos y huevos. En comparación con una dieta occidental típica, las fuentes de n-3 (tanto de origen animal como vegetal), son superiores en la DMed mientras que las de n-6, son inferiores ³⁶.

Merece la pena reseñar que el DHA es uno de los lípidos más abundantes en las estructuras cerebrales lipídicas de los mamíferos y su obtención, como describimos previamente, puede hacerse por ingesta directa de los alimentos o bien por metabolismo desde el ALA, aunque estos procesos metabólicos son lentos. Asimismo, existe competición entre los n-3 y n-6 por las enzimas encargadas del metabolismo de los mismos, fundamentalmente la desaturasa de ácidos grasos 1 (FADS1) y 2 (FADS2). Estas enzimas tienen preferencia por ALA aunque en una dieta con un consumo elevado de LA (como una dieta occidental) y también de AGT podría interferir en el metabolismo del ALA por la competición en su metabolismo ⁶³.

Aunque existe algún estudio que sugirió un efecto neutro de los AGP sobre la salud cardiovascular ⁶⁴⁻⁶⁶, en general, la evidencia disponible hasta la fecha apunta a un beneficio global de estos ácidos grasos debido principalmente a su capacidad de reducción de los triglicéridos, la tensión arterial y la inflamación y una mejora en la función vascular ⁵⁴, relacionándose así con una reducción global de eventos cardiovasculares y muerte por enfermedad cardiovascular ⁶⁷⁻⁷². En el ensayo clínico REDUCE-IT, la utilización de etilo de icosapento, un éster etílico del ácido eicosapentaenoico (EPA), demostró frente a placebo una disminución de los eventos vasculares en una población de 8179 pacientes con niveles altos de triglicéridos a pesar de tratamiento con estatinas ⁷³.

La AHA recomienda que un 5 - 10% del consumo de calorías totales diarias provenga de los n-6 ^{74,75}. La European Stroke Organisation (ESO) concluye así que los efectos beneficios del pescado en el riesgo cardiovascular se atribuyen a los n-3 y estiman que ingerir al menos una ración a la semana puede reducir un 15% el riesgo de desarrollar cardiopatía isquémica ⁷⁶.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

Al igual que ocurre con los AGM, los AGP ejercen su efecto beneficioso a través de diversos mecanismos biológicos. Entre ellos, se ha descrito un efecto antitrombótico de los AGP (especialmente con los n-3) y también una mejoría en el perfil lipídico, inflamación, tensión arterial y función endotelial, mejorando de esta forma el perfil aterosclerótico y consecuentemente disminuyendo el riesgo vascular.

Ratio n-6/n-3

La proporción entre ácido grasos n-6 y n-3 ha ido modificándose a lo largo de la Historia. Durante el Paleolítico, la ingesta de n-3 y n-6 estaba bastante equilibrada, con ratios próximos a 1. Con el paso de los años y debido al cambio en los hábitos dietéticos, el desarrollo de la industria y la agricultura y unos medios de producción y obtención de alimentos distintos, la balanza se fue inclinando a favor de un mayor consumo de n-6, secundario a un mayor consumo de cereales y aceites de origen vegetal procesados en los que se redujo de forma industrial el contenido en n-3 (ALA) por sus propiedades organolépticas ⁷⁷. Así, en países que siguen una dieta occidental típica como Estados Unidos o la India, se alcanzan ratios de omega 3/omega 6 superiores a 15 mientras que en los países con DMed, aunque también superiores a 1, los cocientes no son tan elevados. Hasta el momento, hay escasa evidencia de que la ratio omega-3/omega-6 pueda influir directamente en el riesgo cardiovascular aunque sí se han descrito relaciones entre ratios elevados y obesidad ⁶³ y tasas inferiores de mortalidad al equilibrar y reducir la ratio n-6/n-3 ⁷⁸.

ÁCIDOS GRASOS TRANS (AGT)

Los AGT son aquellos ácidos grasos insaturados en los que el doble enlace se encuentra en configuración *trans*, en lugar de la configuración *cis* habitual. Aunque existen ácidos grasos naturales en configuración *trans*, éstos son los menos y se encuentran en la carne de ciertos rumiantes (vaca y cordero fundamentalmente) y productos lácteos ⁷⁹. La mayor parte de AGT de la dieta han obtenido la configuración *trans* de forma industrial, gracias a un proceso de hidroxigenación artificial de los ácidos grasos de

origen vegetal. Estos AGT, a diferencia de los de origen animal ⁸⁰, tienen un efecto perjudicial global sobre la salud aumentando el colesterol LDL, reduciendo el HDL y favoreciendo el desarrollo de cardiopatía isquémica y mortalidad, por lo que se recomienda que su consumo sea reducido al mínimo ⁵³.

La ESO y la AHA recomiendan limitar el consumo de AGT a <1% del total de calorías diarias y que estos provengan de fuentes naturales y no procesadas ^{74,76}.

ÁCIDOS GRASOS SATURADOS (AGS)

Se conoce por AGS a los ácidos grasos sin dobles enlaces en su cadena. En los últimos 10 años diversos estudios han sugerido que no importa tanto la cantidad de AGS total ingerida sino el tipo y la fuente de la que provienen, que pueden ser artificiales (productos preparados y bollería industrial) o naturales (carne, lácteos, aceites vegetales de coco y palma). Esto se debe a que, aunque de forma global la ingesta de AGS se asocia con mayor riesgo de muerte por enfermedades cardiovasculares, algunos autores han puntualizado esta generalización, observando efectos distintos según su origen ^{53,81,82}. De esta forma, algunos AGS tales como el ácido mirístico, láurico o esteárico tienen efectos dispares sobre los lípidos circulantes o la inflamación y, por tanto, se comportan de diversa forma en cuanto a su efecto sobre los factores de riesgo cardiovascular ⁸¹. En el caso particular del ácido esteárico (STA 18:0), obtenido fundamentalmente del coco y el chocolate negro, se ha probado un efecto neutral e incluso favorable sobre el perfil lipídico al compararlo con otros AGS ⁸³.

Al igual que ocurrió con la ratio n-6/n-3, la fuente de obtención de AGS fue variando a lo largo del tiempo y pasó de basarse en productos de origen animal a productos procesados derivados del aceite de palma, mantequillas o del cacao. Por este hecho, se recomienda en general un consumo bajo de AGS en la dieta y que el aporte de ácidos grasos venga determinado fundamentalmente por AGP y AGM, ya que esto conllevaría a una reducción del riesgo vascular ⁵³.

INSATURADOS	AGM	Oleico Palmitoleico Vaccínico	Aceite (oliva, colza, aguacate), frutos secos, semillas
	AGP	n-3 (omega 3) ALA, EPA, DPA, DHA	Vegetales hoja verde, semillas (lino, colza, chia, nuez), aceites de pescados grasos
		n-6 (omega 6) LA	Carnes de animales herbívoros, lácteos, huevos
SATURADOS	Mirístico Láurico Esteárico		Bollería industrial, carne roja, embutidos, mantequilla, queso, aceite de coco y palma. Chocolate negro y coco (estéarico)
TRANS			Productos industriales, comida procesada, margarina

Tabla 2: Resumen de los principales grupos de ácidos grasos y fuentes alimentarias de obtención.

AGM: ácidos grasos monoinsaturados; **AGP:** ácidos grasos poliinsaturados;
ALA: ácido alfa-linolénico; **EPA:** ácido eicosapentaenoico; **DPA:** ácido docosapentaenoico;
DHA: ácido docosahexaenoico; **LA:** ácido linoleico.

POLIFENOLES DEL VINO Y LA OLIVA

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos moleculares de los vegetales que se caracterizan por contar con uno o más anillos fenólicos en su estructura, responsable de sus propiedades organolépticas. En estos anillos es donde radica el interés biológico fundamental de estos compuestos, ya que tienen propiedades antioxidantes gracias a su capacidad de reducir especies reactivas de oxígeno. En la DMed, los polifenoles se obtienen fundamentalmente de la fruta (manzana y pera, uva, olivas, frutos rojos y cítricos principalmente), verduras, legumbres, frutos secos y cereales ⁸⁴. Recientemente se ha relacionado el consumo de polifenoles con una reducción del 20% de la mortalidad por cualquier causa y del 40% por enfermedad vascular ⁸⁵.

En el vino, la proporción de polifenoles varía en función del tipo de vino y mecanismos de producción. El vino tinto se obtiene de la fermentación del racimo, incluyendo la uva con sus semillas y la piel. Difiere así del vino blanco en que en este caso se produce al fermentar el zumo de la uva, ya sin el resto de los componentes del racimo y el fruto. Puesto que la mayor parte de los polifenoles de la uva se encuentran en la piel,

es el vino tinto y no los de otra clase el que tiene mayor interés biológico por la mayor composición de polifenoles. Así, una botella de vino tinto puede contener 1.8 g/L de polifenoles, fundamentalmente flavonoides y en particular el resveratrol ⁸⁶. Son múltiples los estudios que han descrito que un consumo moderado de vino tinto tendría un efecto beneficioso sobre la salud cardiovascular, aunque es más correcto incidir en que los perjuicios asociados al consumo de alcohol hacen que el mejor consumo sea la abstinencia. Este teórico beneficio del vino tinto se cree que dependería, en gran parte, del resveratrol y el resto de polifenoles a través de la reducción del LDL, aumento del HDL, reducción de la tensión arterial (tanto sistólica como diastólica) y disminución de la actividad de enzimas proinflamatorias, interleucinas y especies reactivas de oxígeno, implicadas todas ellas en el proceso de aterogénesis ⁸⁶.

En el aceite de oliva, la cantidad de polifenoles varía entre los 50 y los 800 mg/kg y el más frecuente es la oleuropeína y sus productos de degradación metabólica: el hidroxitirosol y el tirosol ⁸⁷. No obstante, los componentes varían según el tipo de oliva y los mecanismos de extracción del aceite y maduración, siendo el aceite de oliva virgen extra (AOVE) el que mayor porcentaje de polifenoles contiene y por tanto, el de mayor interés biológico. Los efectos beneficiosos del aceite de oliva en la salud se atribuyen no sólo a su composición en ácidos grasos, alta en AGM y baja en AGS, sino también a los polifenoles que contiene, que se han relacionado con un mejor perfil lipídico, disminución de cifras de tensión arterial y, al igual que todos los polifenoles, una reducción de las moléculas proinflamatorias e implicadas en el estrés oxidativo, previniendo así la aterogénesis. En la misma línea, el hidroxitirosol se ha propuesto como un compuesto prometedor en el ictus agudo, mejorando la recuperación funcional en modelos preclínicos de isquemia ⁸⁸.

En consonancia con lo previo, una baja adherencia a la DMed se ha asociado con el desarrollo de aterosclerosis en pacientes con riesgo vascular bajo ⁸⁹.

■ METABOLITOS DE LA VÍA DE LA COLINA

La microbiota se conforma por el conjunto de microorganismos de la flora habitual de nuestro organismo, especialmente abundantes en el tracto digestivo. Los cambios en su composición o disbiosis se han relacionado con múltiples patologías ⁹⁰. En el caso concreto del sistema nervioso central (SNC), se ha descrito una comunicación bidireccional con esta microbiota, conocida como "eje microbiota intestino-cerebro". Este sistema de comunicación se establece a través de dos vías fundamentales, una mediada por neuronas a través del nervio vago y otra independiente de éstas, a través de metabolitos liberados al torrente sanguíneo. Debido a esta interconexión, se ha estudiado la posible implicación de este eje en distintas enfermedades que afectan al SNC, fundamentalmente neurodegenerativas y autoinmunes ⁹¹, aunque también se ha estudiado su posible implicación en la patogenia y pronóstico del ictus ⁹².

Algunos metabolitos plasmáticos relacionados con la dieta cobraron interés en los últimos años tras haberse probado su relación con el desarrollo de algunas patologías, entre ellas las cardiovasculares. En el año 2011, el grupo de Wang describió por primera vez la relación existente entre los metabolitos de la vía de la colina, la microbiota intestinal y la salud cardiovascular en roedores. La fosfatidil-colina (o lecitina) es un lípido que se obtiene de la dieta, fundamentalmente de la carne roja, huevos y productos lácteos y constituye la principal fuente de colina en el ser humano. La colina es necesaria, entre otras cosas, para la formación de membranas celulares, la regulación del metabolismo de la homocisteína, así como para determinadas funciones cerebrales como la cognición, siendo necesaria para la síntesis del neurotransmisor acetilcolina. Ya en el organismo, la colina se oxida a betaina y ambas, por mediación de la microbiota intestinal, se transforman al gas TMA (trimetilamina) que posteriormente se transforma en TMAO (n-óxido trimetilamina) por la acción de enzimas hepáticas, con efectos proaterogénicos, tal y como se resume en la **Figura 6** ⁹³. Tras esta primera observación realizada en roedores, se demostró también en humanos el papel de la microbiota intestinal en la producción de TMAO y su relación con la aparición de

eventos cardiovasculares en general ^{94,95} y con el ictus isquémico en particular ⁹⁶. Desde entonces, son muchos los grupos que han evaluado algunos de estos metabolitos y su implicación en el riesgo cardiovascular: en el Jackson Heart Study describieron una relación inversa entre la colina plasmática y la incidencia de ictus ⁹⁷; en una cohorte que combinó pacientes de dos grandes estudios observacionales: el Nurses' Health Study y el Health Professionals Follow-Up Study, encontraron que los niveles de fosfatidilcolina se relacionaban con la mortalidad global y la mortalidad por enfermedad cardiovascular ⁹⁸. De forma similar, en el estudio PREDIMED se analizaron en los participantes algunos de los metabolitos de esta vía (colina, betaina, TMAO, fosfocolina y alfa-glicerofosfocolina), encontrando una relación entre la colina, fosfocolina y alfa-glicerofosfocolina con la incidencia de eventos cardiovasculares e ictus a los 4.8 años de seguimiento. Aunque no demostraron asociación entre eventos clínicos cardiovasculares y los niveles de TMAO y betaina, sí describieron una asociación entre los mayores niveles de este último metabolito y la prevalencia de DM y sobrepeso ⁹⁹. En un estudio posterior, encontraron asociación de los niveles altos de colina, betaina y dimetilglicina con la fibrilación auricular incidente y la insuficiencia cardiaca, ambos factores asociados al riesgo de ictus. Sin embargo, no encontraron relación entre los niveles de estos metabolitos de la colina y los alimentos ricos en los mismos ingeridos en la dieta, hipotetizando que probablemente existen vías metabólicas intermedias que pueden modificar estos niveles ¹⁰⁰.

En cuanto a los mecanismos, se ha descrito que el efecto deletéreo de estos metabolitos sobre la salud cardiovascular radica en una mayor activación plaquetaria, un mayor riesgo de trombosis y en la alteración del metabolismo y transporte de los esteroides y la glucosa ^{101,102}. En conclusión, se cree por tanto que a través de la dieta se podría mejorar el perfil de estos metabolitos por una doble vía, tanto por la ingesta de la fosfatidilcolina como por la modificación de la microbiota y una menor producción de TMAO secundaria.

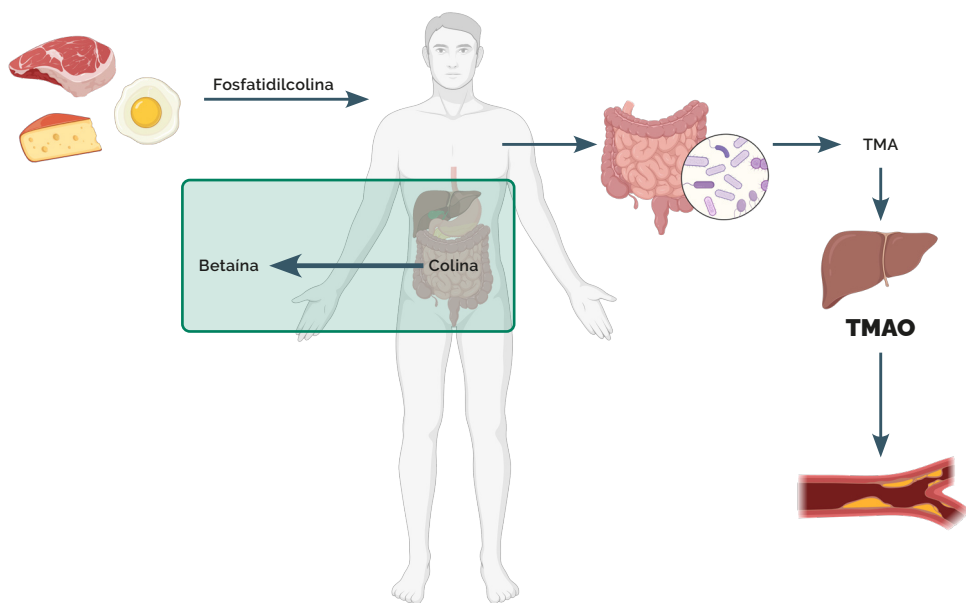


Figura 6: Metabolitos de la vía de la colina.

A través de la fosfatidil-colina obtenida de la dieta (carne roja, huevos, lácteos) se obtiene la colina, que se convierte a betaina en el organismo. Por la acción de la microbiota intestinal, la betaina y la colina, se convierten a trimetilamina (TMA), un gas que se oxida en el hígado convirtiéndose en n-óxido de trimetilamina o TMAO, con efectos aterogénicos.

1.2.3. IMPACTO GLOBAL DE LA DIETA MEDITERRÁNEA EN LA SALUD

Para conocer la primera evidencia de los beneficios de la DMed sobre la salud nos tenemos que remontar a la década de los 60, cuando el equipo de Ancel Keys desarrolla el llamado Seven Countries Study. Se trató de un estudio observacional que siguió a más de 10000 participantes de distintas áreas geográficas que incluían países de la cuenca mediterránea, norte de Europa y Estados Unidos. Tras un seguimiento de 30 años, encontraron que los participantes que seguían una DMed tenían menores tasas de enfermedad coronaria y mortalidad, que relacionaron con un menor consumo de AGS¹⁰³. En los años siguientes y hasta la actualidad, el número de publicaciones relacionadas con los efectos de la DMed sobre la salud fue aumentando de forma progresiva, especialmente en el área de la salud vascular, tal y como se discutirá en el siguiente epígrafe. No obstante, también son múltiples los estudios que han

descrito beneficios en otras áreas y patologías, tales como la Diabetes Mellitus (DM), la obesidad, la cognición o el cáncer¹⁰⁴, así como su efecto en la mortalidad, reduciendo no solo la mortalidad por causas vasculares sino también la global y por otras enfermedades como el cáncer^{85, 105}.

En el caso de la DM, el beneficio de la DMed parece claro, disminuyendo tanto el riesgo de desarrollar DM (con reducciones de riesgo que varían entre el 19 y 40%), como mejorando el perfil glucémico de pacientes con DM ya conocida¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. De la misma forma, en el caso del síndrome metabólico existe suficiente evidencia que apoya que la DMed reduce no solo su incidencia, sino que consigue también un mejor control y mayor probabilidad de resolución del síndrome^{110, 111}. En la obesidad, la DMed ha demostrado conseguir un mejor control del peso y mayor pérdida ponderal, también al compararla con dietas hipocalóricas^{112, 113}.

El cáncer es otra de las áreas de la salud en las que se ha investigado si la DMed pudiera tener o no un efecto positivo. A diferencia de los anteriores, en este caso la evidencia no es tan sólida y existen pocos estudios que hayan evaluado este aspecto¹¹⁵. En ellos, se observó cierto efecto protector de la DMed frente al desarrollo de esta enfermedad, pero los casos detectados de cáncer fueron muy pocos, por lo que se recomienda tomar este resultado con cautela. Los mayores beneficios parecen encontrarse en el cáncer de mama y aparato digestivo^{104, 115}.

Son varios los metaanálisis y revisiones sistemáticas que relacionaron la DMed con un mejor perfil cognitivo y menor riesgo de desarrollar deterioro cognitivo y enfermedades neurodegenerativas¹¹⁶⁻¹²⁰. Al compararla con otros tipos de dieta, la DMed es la que más evidencia tiene hasta la fecha en cuanto a su efecto positivo sobre la cognición¹²¹. En el estudio PREDIMED, los pacientes aleatorizados a los grupos de DMed (suplementada con AOVE o con nueces) obtuvieron mejores puntuaciones en los test cognitivos tras 6.5 años de seguimiento que aquellos aleatorizados al grupo control¹²².

1.2.4. BENEFICIOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA SOBRE LA SALUD VASCULAR Y EL ICTUS

De entre todos los beneficios evaluados de la DMed, es en su efecto positivo sobre la salud vascular en el que se disponen de más evidencias, revisadas en un metaanálisis publicado en el año 2019 ²⁷.

Desde las primeras evidencias arrojadas por el Seven Countries Study, se publicaron varios ensayos clínicos que intentaron responder a si la DMed tenía o no relevancia en la prevención de la enfermedad vascular. El primero de ellos fue el desarrollado por Lorgèril y su equipo a principios de los 90 y conocido como Lyon Heart Study. En él, se evaluó el efecto de la DMed en prevención secundaria, comparándola con una dieta estándar recomendada para pacientes con cardiopatía. Se incluyeron 605 pacientes con antecedentes de cardiopatía isquémica y, tras un seguimiento de 48 meses, observaron una menor incidencia de nuevos eventos coronarios y mortalidad global en el grupo aleatorizado a DMed ⁷⁸. No fue hasta varios años después que se publicó un nuevo ensayo clínico en prevención secundaria. Desarrollado en España y conocido como CORDIOPREV, se incluyeron 1002 pacientes con enfermedad coronaria que se aleatorizaron a dos grupos de estudio: uno seguiría una DMed y el otro una dieta hipocalórica. Nuevamente y tras 7 años de seguimiento, reportaron una menor incidencia de eventos cardiovasculares mayores en los pacientes que recibían DMed, especialmente en los hombres (16.2% de eventos frente a 22.8% en el otro grupo) ¹²³.

En prevención primaria, el principal ensayo clínico realizado fue el PREDIMED. De forma resumida, se trató de un estudio realizado en población española en el que se incluyeron 7447 pacientes sin enfermedad vascular definida, pero con riesgo vascular elevado. Se les aleatorizó a tres grupos: un grupo control (con dieta baja en grasa), otro con DMed suplementada con AOVE y un tercer grupo con DMed suplementada con frutos secos. Comparado con el grupo control y tras un seguimiento de 4.8 años, se encontró que los pacientes que recibían DMed experimentaron menos eventos vasculares

(IAM, ictus y/o muerte cardiovascular) que los controles: un 30% menos en los que recibieron DMed suplementada con AOVE (HR 0.69, 95% CI 0.53 - 0.91) y un 28% en los que recibían DMed con frutos secos (HR 0.72, 95% CI, 0.54 - 0.95)²⁸. En concreto y de todos los objetivos primarios evaluados, el ictus fue el único evento cuya incidencia se vio significativamente reducida en los pacientes aleatorizados a DMed²⁸. Esta aparente asociación entre DMed y menor incidencia de ictus ya había sido descrita con anterioridad dentro del estudio Nurses' Health Study en mujeres de origen estadounidense¹²⁴. Posteriormente, en las cohortes griegas e italianas del estudio prospectivo europeo de cáncer y nutrición (EPIC, por sus siglas en inglés), se encontró nuevamente una relación inversa entre la adherencia a la DMed y la incidencia de ictus isquémico^{42,125}. En un metaanálisis publicado en el año 2013 que evaluó la adherencia a la DMed y el riesgo de ictus, se corroboró esta observación, identificando además un mayor efecto protector en prevención secundaria de ictus en varones que en mujeres¹²⁶.

En consonancia con lo observado en la cohorte griega del EPIC, se analizó la incidencia de ictus en la cohorte REGARDS (REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke), que tomó como muestra pacientes sanos de la "Stroke Belt" de Estados Unidos, localizada en el sudeste del país y conocida así por la alta incidencia de ictus en comparación con el resto de estados. Tras un seguimiento de 6.5 años analizaron la incidencia de ictus (isquémicos y hemorrágicos) y su asociación con la adherencia a la DMed (alta, moderada o baja), concluyendo que la incidencia de ictus isquémico, pero no hemorrágico, era mayor en aquellos con baja adherencia a la DMed¹²⁷.

En el año 2015, un grupo de investigadores italianos publicaron los resultados de un estudio observacional que evaluaba la relación entre la adherencia a la DMed y la etiología del ictus según la clasificación TOAST, así como su severidad medida por la escala NIHSS. Observaron una asociación entre la adherencia a DMed y la severidad del ictus, así como sobre los ictus de etiología aterotrombótica, no así para los ictus de otras causas. Hipotetizan que esta probable relación observada sea debida

1 ◀ INTRODUCCIÓN

al efecto beneficioso que la DMed ejerce sobre factores asociados con este tipo de ictus, tales como el perfil lipídico, la resistencia a la insulina o efectos positivos sobre los marcadores antiinflamatorios y sobre la función endotelial ¹²⁸.

En un metaanálisis reciente, publicado en el año 2019, nuevamente se confirma la observación previa del efecto positivo de la DMed sobre el riesgo de ictus. Concluyen que por cada 4 puntos de incremento en la escala de adherencia MedDiet Score, el riesgo de ictus se reduce un 16%. Analizando por separado ictus isquémicos y hemorrágicos, se observa una reducción de la incidencia en ambos tipos ¹²⁹.

De la misma forma que se estudió la incidencia de ictus y su asociación con la adherencia a la DMed, también se evaluó su relación con lesiones isquémicas silentes en la resonancia magnética cerebral. De esta forma, los pacientes con mayor adherencia a la DMed presentaban menos lesiones isquémicas en la neuroimagen ^{130, 131} y también menos leucoaraiosis, que relacionan fundamentalmente con el ratio AGM/AGP ¹³².

Un trabajo previo de nuestro grupo en colaboración con la Red Norte de Patología Vascular Cerebral (NORDICTUS), evaluó la adherencia a la DMed en una cohorte de pacientes con ictus isquémico de circulación anterior con oclusión de gran vaso cerebral y sometidos a trombectomía mecánica. Se incluyeron 239 pacientes y se observó que los que tenían mayor adherencia a la DMed tenían mejor perfil lipídico y que el consumo de aceite de oliva como principal fuente de grasa se comportó como un factor independiente asociado al buen pronóstico funcional a los 3 meses ¹³³.

Finalmente, en una revisión sistemática reciente se evaluaron 6 estudios que incluyeron la DMed como parte de los programas de cuidados tras el ictus, observando que este tipo de dieta ayudaba a optimizar la tensión arterial, el peso y la cintura abdominal tras un ictus, todos ellos reconocidos factores de riesgo en el desarrollo de esta patología ¹³⁴.

RESUMEN DE LOS PRINCIPALES ENSAYOS CLÍNICOS RELEVANTES SOBRE PREVENCIÓN 1ª Y 2ª DE LA DMed Y LA SALUD VASCULAR QUE EVALUARON ENDPOINTS CLÍNICOS		
Prevención primaria		
DMed Vs. No intervención		
No EC incluidos en metaanálisis (pequeño tamaño, poco seguimiento)		
DMed vs. Otras dietas		
PREDIMED. Estruch, 2018.	Dieta control: baja en grasas. Evaluación de adherencia: MEDAS. Endpoints primarios: Incidencia de mortalidad total y vascular, IAM e ictus.	n = 7447, pacientes con alto riesgo vascular. Parado precozmente por beneficio de DMed tras 4.8 años de seguimiento. Mortalidad total HR 1, 95% CI 0.81 - 1.24 Mortalidad CV: HR 0.81, 95% CI 0.50 - 1.32 IAM: HR 0.79, 95% CI 0.57 - 1.10 Ictus: HR 0.60, 95% CI 0.45 - 0.80
Prevención secundaria		
Lyon Heart Study	Dieta control: recomendada habitual en cardiopatas. Endpoints primarios: mortalidad, IAM	n = 605, antecedentes de IAM. Muerta vascular e IAM no fatal, HR 0.28, 95% CI 0.15 - 0.82 Mortalidad total HR 0.44, 95% CI 0.21 - 0.92
CORDIOPREV, Delgado-Lista J.	Dieta control: baja en grasas. Endpoints primario: eventos cardiovasculares (IAM, ictus, arteriopatía periférica, muerte por enf. Cardiovascular) Evaluación adherencia: 14-puntos (MEDAS) y adaptación 9 -puntos	n = 1002, con enfermedad coronaria previa. Seguimiento 7 años. Eventos cardiovasculares (HR de los distintos modelos): 0.72 (95% CI 0.54 - 0.96) - 0.75 (0.67 - 0.99).
The AUSMED Heart Trial, Itsiopoulos C.	Dieta control: baja en grasas. Endpoints primarios: eventos cardiacos. Evaluación adherencia: 14-puntos (PREDIMED).	Pacientes con un evento coronario previo. No disponibles resultados.

Tabla 3: Resumen de los principales ensayos clínicos relevantes sobre prevención 1ª y 2ª de la DMed y la salud vascular que evaluaron endpoints clínicos

1.2.5. MECANISMOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LOS POTENCIALES EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA DIETA EN EL PRONÓSTICO DEL ICTUS

MECANISMOS BIOLÓGICOS

EFFECTO SOBRE LA INFLAMACIÓN Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Se sabe que la disfunción endotelial y algunas moléculas y mediadores inflamatorios juegan un papel fundamental en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis ¹³⁵. La aterogénesis es un proceso dinámico y complejo, con participación de múltiples moléculas, células y mediadores. De forma resumida, en el proceso de aterogénesis la infiltración de LDL colesterol en la íntima de la arteria es uno de los primeros procesos. Éste LDL se oxida en la íntima, lo cual conlleva a la liberación de fosfolípidos que a su vez activan células endoteliales. La activación del endotelio

1 ◀ INTRODUCCIÓN

produce la migración y adhesión de distintos tipos celulares, entre los que están las plaquetas y los monocitos, que a su vez conllevan a una mayor activación endotelial. Algunas de estas moléculas de adhesión endotelial son la molécula tipo 1 de adhesión vascular celular (VCAM-1) o la intercelular (ICAM-1). Los monocitos, al adherirse y migrar, se diferencian en macrófagos que liberan radicales libres, citoquinas proinflamatorias y proteasas, promoviendo así un estado proinflamatorio y la lesión del tejido. Las células activadas en la placa aterosclerótica inducen la producción de citoquinas proinflamatorias, fundamentalmente interferon - gamma, IL-1 y factor de necrosis tumoral (TNF), que a su vez producen interleucina-6. La IL-6, por su parte, fomenta la producción de reactantes de fase aguda como el fibrinógeno o la proteína C reactiva ¹³⁶.

En el año 2004, un grupo de investigadores italianos desarrollaron un ensayo clínico en el que incluyeron a pacientes con síndrome metabólico a los que aleatorizaron a dos grupos de intervención: uno siguió una DMed y el otro una dieta baja en grasas, recomendada en pacientes con factores de riesgo vascular. Tras 2 años de seguimiento, los pacientes del grupo de DMed tenían un mejor perfil inflamatorio, con niveles más bajos de interleucinas 6 (IL-6), 7 (IL-7) y 18 (IL-18), así como una menor resistencia insulínica y una mejor función endotelial ¹¹⁰. En población griega también se probó una asociación entre una mayor adherencia a la DMed y niveles inferiores de IL-6, proteína C reactiva y TNF-alfa, entre otros ¹³⁷.

Posteriormente, en el PREDIMED, encontraron que los pacientes que consumían mayores cantidades de fruta y cereales tenían menores concentraciones de IL-6 y que los participantes que consumían más frutos secos y aceite de oliva tenían niveles más bajos de las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1, de los ligandos proinflamatorios CD49 y CD40 y también de IL-6 ^{138,139}, implicados en el reclutamiento leucocitario y adhesión celular endotelial.

Existe un subtipo particular de citoquinas producidas fundamentalmente en el tejido adiposo y conocidas como adipoquinas, con un papel fundamental en el desarrollo del estado inflamatorio asociado a la obesidad. Esta familia de moléculas tiene efectos pro y antiinflamatorios a través de su interacción con la producción de IL-6, TNF-alfa o MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos), entre otros. La adiponectina es la más abundante de ellas, su concentración plasmática es inversa a la cantidad de tejido adiposo (y, en concreto, a la grasa visceral) y, en líneas generales, parece tener un efecto anti-aterogénico, disminuye la resistencia a la insulina y promueve la oxidación de los ácidos grasos ^{140,141}. Niveles bajos de adiponectina se han relacionado con la disfunción endotelial y un estado proinflamatorio ¹⁴². Por otra parte, se ha visto que esta adipoquina disminuye la liberación de citoquinas proinflamatorias relacionadas con la obesidad y desarrollo de DM, como la IL-6, IL-8 y MCP-1 ¹⁴³. En la enfermedad vascular, se describió una relación inversa entre los niveles de adiponectina y el desarrollo de síndrome coronario agudo ¹⁴⁴, con un peor perfil metabólico en pacientes con ictus isquémico y con un mayor grosor íntima – media carotídeo ^{145,146}, pero no claramente con el riesgo de ictus *per se* ¹⁴⁷. De forma contraria, la leptina y la resistina son adipoquinas que se han asociado a disfunción endotelial, estados proinflamatorios y aterosclerosis, entre otros ¹⁴¹. En el caso del ictus, los niveles de leptina se relacionaron en algún estudio previo con la incidencia de ictus en hombres ¹⁴⁸ y también en mujeres post-menopáusicas, con independencia de la obesidad ¹⁴⁹.

La DMed, a través de las propiedades antioxidantes de algunos de sus componentes y la reducción de la obesidad, podría mejorar el perfil de adipoquinas circulantes, en concreto aumentando los niveles de adiponectina plasmática y el ratio adiponectina/leptina ^{150,151}.

EFFECTO SOBRE LA RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)

La RI se define como una menor sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina circulante, lo cual conlleva una hiperinsulinemia compensadora. Ésta, junto con la

1 ◀ INTRODUCCIÓN

disfunción de la célula beta pancreática, son los procesos principales implicados en la patogénesis de la DM tipo 2 y están íntimamente relacionados con la obesidad. Por otra parte, la RI se ha asociado *per se* con un estado proinflamatorio y también protrombótico, mediante el incremento de moléculas como el PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno – 1), condicionando así una situación de hipercoagulabilidad y de disminución de la fibrinólisis endógena.

La DMed se ha relacionado con una menor RI y menor desarrollo de DM tipo 2 a largo plazo ^{109,152}, también al compararla con otros tipos de dieta, como las bajas en grasas y carbohidratos ¹¹³. Los mecanismos que median en este proceso son múltiples y están relacionados en gran parte con los efectos antiinflamatorios de la DMed ya descritos con anterioridad. En el desarrollo de la RI juegan un papel importante citoquinas proinflamatorias, muchas de ellas segregadas en el tejido adiposo, como la IL-6, TNF-alfa o resistina. Algunos componentes de la DMed, como los AGP o los polifenoles, a través de su efecto antiinflamatorio antagonizan el efecto deletéreo de estas citoquinas y favorecen la sensibilidad a la insulina. Además, los AGP estimulan la liberación del péptido similar al glucagón (GLP-1), disminuyendo la hiperglucemia postprandial ¹⁵³.

EFFECTO SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO

La adherencia a la DMed se ha relacionado con un mejor perfil lipídico, con niveles más altos de HDL-colesterol y menores de triglicéridos ¹⁵⁴.

Por otra parte, se sabe que las partículas de LDL-colesterol son heterogéneas y tienen distintos tamaños, lo cual condiciona en parte sus efectos biológicos. De esta forma, las partículas de menor tamaño serían las más aterogénicas ya que, entre otras cosas, pasan más tiempo en circulación al retirarse con mayor dificultad del torrente sanguíneo, tienen mayor facilidad para adherirse al endotelio y penetrar en la íntima de las arterias y son más susceptibles a los procesos de oxidación ¹⁵⁵.

Este perfil más o menos aterogénico de las moléculas de LDL puede modificarse por la dieta y, en concreto, por la DMed, habiéndose demostrado una disminución del LDL total y las partículas de menor tamaño con este patrón dietético ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

EFFECTO EN CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES (CPEs)

Las CPEs son una subpoblación de células inmaduras CD34+ derivadas de la médula ósea, con capacidad de proliferación y diferenciación en células endoteliales maduras y son las precursoras fundamentales en el proceso de vasculogénesis y mantenimiento del endotelio ¹⁵⁹. Originalmente, se creía que la vasculogénesis solo tenía lugar en la fase embrionaria del desarrollo del SNC hasta que Asahara y colaboradores aislaron CPEs en sangre periférica de adultos, concluyendo que podían jugar un papel importante en la neovascularización ¹⁶⁰. Las fuentes de origen de las CPEs son múltiples e incluyen no solo la médula ósea, como se creía en un inicio, sino las paredes vasculares de todos los órganos ¹⁶¹. En condiciones normales, las CPEs en sangre son casi indetectables, existiendo múltiples factores que inducen su liberación al torrente sanguíneo ¹⁶², entre los que destacan la hipoxia, la dieta, el ejercicio físico y patologías como el ictus agudo y el IAM, principalmente. Su liberación también puede ser promovida por otras moléculas, como el VEGF, que estimula su liberación, proliferación, migración y reclutamiento, y el BDNF. Por el contrario, los FRV y la edad se han asociado a niveles bajos de CPEs en sangre ¹⁶³.

Estas células progenitoras tienen un papel clave en la optimización de la función endotelial, favoreciendo la reendotelización, inhibiendo la hiperplasia de la neoíntima y permitiendo así obtener una superficie vascular lisa y antitrombótica ¹⁶⁴. Además, las CPEs están implicadas en la neovasculogénesis de tejidos sometidos a la isquemia ¹⁶⁵. En un estudio, se observó que pacientes con estenosis carotídea o de la arteria cerebral media y niveles altos de CPEs tenían mayor grado de vasculogénesis que aquellos con niveles bajos ¹⁶⁶.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

Puesto que las CPEs están íntimamente relacionadas con los factores de riesgo vascular clásicos, se cree que podrían ser un marcador biológico de riesgo vascular acumulado. En un estudio observacional de Werner y colaboradores, encontraron que los niveles basales de CPEs en sangre periférica se comportaron como predictores independientes de mortalidad por causa vascular y de un primer evento vascular ¹⁶⁷.

Tal como se hizo referencia previamente, algunos autores han probado que la DMed induce la liberación de CPEs. En un estudio, se comparó la movilización de CPEs entre 3 grupos de pacientes que se aleatorizaron a dietas distintas: una dieta baja en grasas y rica en carbohidratos, otra rica en AGS y un tercer grupo con una DMed, encontrando niveles superiores de CPEs circulantes en los que seguían esta última ¹⁶⁸. Esta misma observación la realizó otro grupo al comparar la DMed con una dieta ovo-lacto-vegetariana ¹⁶⁹. En pacientes ancianos también se ha demostrado que la DMed favorece la movilización de CPEs. Así, en un estudio se demostró que los pacientes nonagenarios con buena adherencia a la DMed, y especialmente con alto consumo de AOVE, fruta y vegetales, tenían mayor número de CPEs circulantes que aquellos con baja adherencia, lo cual podría además contribuir a mantener una mejor función endotelial ¹⁷⁰.

Por todo lo anterior, es lógico pensar que las CPEs pueden estar implicadas en un mejor pronóstico en el ictus isquémico. El grupo de Sobrino y colaboradores describió que en el ictus agudo existe una primera fase (<24 h) en que existe una liberación de CPEs al torrente sanguíneo y una segunda fase subaguda de inducción de la capacidad de neovascularización de las CPEs (capacidad de formar colonias) ¹⁷¹. Este mismo grupo mostró que los pacientes con un ictus agudo y mayores niveles de unidades formadoras de colonias de CPEs en sangre periférica tenían menor volumen final del infarto y mejor pronóstico funcional tras el ictus ¹⁷². Esta observación se repitió en estudios posteriores, encontrando que un nivel elevado de CPEs circulantes es un marcador independiente de menor volumen final del infarto, menor gravedad inicial y mejor pronóstico funcional al alta ¹⁷³⁻¹⁷⁵.

MODELOS ANIMALES

Como ya se reseñó previamente, los polifenoles del aceite de oliva son los responsables de parte del efecto neuroprotector y neurorreparador atribuido a la DMed. En modelos animales y estudios in vitro se evidenció que este efecto podría explicarse por mecanismos antiinflamatorios, antioxidantes y antiapoptóticos relacionados con los polifenoles ^{176,177}. De esta forma, en un estudio de cultivo celular en el que se sometió a las células del tejido cerebral a estrés oxidativo, se observó que tres componentes (grupos catecol) de los polifenoles del AOVE tenían capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, reducir el daño por hipoxia y disminuir la muerte celular ¹⁷⁸. Partiendo de este efecto neuroprotector y neurorreparador de los polifenoles, el grupo de Montaner y colaboradores evaluó el efecto de la *Salicornia ramosissima*, una planta halófila que crece cerca del litoral o de lagunas saladas y que sintetiza gran cantidad de polifenoles en respuesta al estrés del entorno. Observaron que la administración de extractos de polifenoles de esta planta a la mosca *Drosophila melanogaster* atenuaba el daño inducido por hipoxia. Probaron el extracto de la *Salicornia* también en ratas, observando una reducción del volumen final del infarto en aquellos animales que recibieron este compuesto antes de la inducción de la isquemia cerebral ¹⁷⁹. En un modelo de isquemia cerebral en rata, se probó que la administración simultánea del polifenol EGCG y el fibrinolítico endovenoso (rt-PA) en ventana extendida, condicionaba menores daños post-isquemia ¹⁸⁰.

Tal como se describe con anterioridad, otros de los compuestos fundamentales que median los efectos neuroprotectores y neurorreparadores de la DMed son los ácidos grasos insaturados (AGP y AGM). En un modelo de isquemia transitorio, nuevamente el grupo de Montaner probó que las ratas que se alimentaban con una dieta enriquecida con EPA, DHA y antioxidante tenían una mejor recuperación funcional con mayor recuperación del déficit motor, mejor flujo sanguíneo cerebral y menos inflamación en el tejido dañado ¹⁸¹. En otro estudio, las ratas que recibieron DHA antes de la isquemia cerebral tenían menor volumen de infarto y edema y menor inflamación, con menos expresión de IL-6 y una disminución de la actividad de la caspasa-3 ¹⁸². De forma similar,

1 ◀ INTRODUCCIÓN

las ratas que recibían una dieta rica en AGM y/o AGP antes de la isquemia cerebral tenían mejor recuperación funcional que aquellas que recibían dietas bajas en grasas o dietas ricas en AGS ¹⁸¹.

Otros experimentos en modelos animales de isquemia en roedor probaron que la expresión de la apolipoproteína E4 (apoE4) estaba asociada a un mayor daño neuronal tras la isquemia y peor recuperación funcional y que esta expresión de apoE era mayor en los animales que seguían una dieta rica en grasas, simulando una "dieta occidental" ¹⁸³.

1.3. ACTIVIDAD FÍSICA

1.3.1. SISTEMAS DE EVALUACIÓN DEL GRADO DE ACTIVIDAD FÍSICA

Tal y como se describió previamente, la actividad física (AF) es uno de los principales factores de riesgo modificables con un gran impacto sobre la salud, más aún en una sociedad con unas altas tasas de sedentarismo, en aumento en los últimos años. No solo la práctica de actividad física sino también su intensidad, se han relacionado con el desarrollo de enfermedades vasculares. Cobra así interés intentar determinar y homogeneizar los grados de AF realizada. Para ello, se dispone de mecanismos de evaluación objetivos, capaces de dar una información veraz y directa de la AF realizada a través de dispositivos de registro de actividad tales como podómetros o actímetros, aunque su coste hace difícil su utilización en los grandes estudios poblacionales ¹⁸⁴. Por ello, se han desarrollado distintos cuestionarios y escalas de evaluación de AF.

La intensidad de la AF se puede cuantificar en equivalentes metabólicos o METs, de tal forma que 1 MET correspondería a 3.5 ml O₂/kg/min, que sería el consumo mínimo del organismo en una situación basal o de reposo.

The Physical Activity Scale for the Elderly (PASE)

Desarrollada en la década de los 90, se creó con el objetivo de cuantificar el grado de AF en pacientes de edad avanzada ¹⁸⁵. Validada inicialmente al comparar los resultados del

cuestionario con el estado de salud de los participantes y algunas variables fisiológicas, como el equilibrio o el balance muscular, corroborándose en estudios posteriores ¹⁸⁶.

Se trata de un cuestionario sencillo y de rápida aplicación, que puede ser cumplimentado por el participante o guiado por un entrevistador. En él, se evalúan 12 ítems que incluyen actividades lúdicas, recreativas u ocupacionales y se determina la frecuencia de su realización en la última semana, expresada en horas por día. El cálculo es sencillo a través de una tabla de conversión que permite estimar la puntuación total.

El rango de puntuación del PASE oscila entre los 0 y más de 400 puntos. Se recomienda expresar los resultados como variable continua, pero en base a los resultados de estudios poblacionales se han determinado puntuaciones medias ajustadas por edad y sexo que permiten categorizar el nivel de AF en baja (<40 puntos), moderada (40 - 165) y alta (>165).

Versión reducida del cuestionario de actividad física en el tiempo libre de Minnesota (VREM)

El cuestionario original de evaluación de actividad física en el tiempo libre de Minnesota se publicó en los años 70, desarrollado inicialmente para ser aplicado en hombres americanos de mediana edad ¹⁸⁷ y validado posteriormente en población española ^{188, 189}. Para facilitar su aplicación, se creó años después su versión reducida o VREM, simplificando los más de 50 ítems iniciales en los 6 finales que conforman el cuestionario, con una buena correlación con su versión extendida y también validado en población española ¹⁹⁰.

En este caso, se incluyen únicamente actividades del tiempo libre excluyéndose aquellas propias de la actividad laboral pero sí se interroga acerca del tiempo empleado en ir a comprar o a limpiar la casa, entre otras. En total, se evalúan 6 ítems y se pregunta acerca de su realización en el último año, determinando los días al mes, minutos al día

1 ◀ INTRODUCCIÓN

y meses al año que se ha realizado. El resultado total se expresa en METS-min/14 días y según los resultados obtenidos se clasifica el grado de AF en muy activos (>5000 METS-min/14 días), activos (3000 - 4999 METS-min/14 días), moderadamente activos (1250 - 2999 METS-min/14 días) y sedentarios (<1250 METS-min/14 días).

The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)

De forma similar al VREM, en el IPAQ el grado de AF se expresa en METs-min/semana y permite clasificar a los sujetos en tres grupos según su nivel de AF (baja, moderada o alta). Tras una exhaustiva evaluación de validez, se publicó finalmente en el año 2003 y se dispone de dos versiones (larga y corta), aptas para su aplicación ¹⁹¹.

1.3.2. IMPACTO GLOBAL DE LA ACTIVIDAD FÍSICA SOBRE LA SALUD

Existe hasta la fecha suficiente evidencia que apoya que la práctica regular de AF redunde en un mejor estado de salud, reduce la mortalidad global y se asocia a un menor riesgo de desarrollar múltiples enfermedades, muchas de ellas de gran prevalencia e impacto en la sociedad, como el cáncer o las enfermedades vasculares ³³. De esta forma, más allá de las recomendaciones de las guías internacionales de prevención primaria y secundaria de algunas enfermedades, la OMS recomienda la práctica regular de AF durante al menos 150 - 300 minutos semanales, si se trata de actividad aeróbica de intensidad moderada, o 75 - 150 minutos semanales si es actividad aeróbica vigorosa. Estiman que con el cambio de la sociedad hacia una más activa físicamente, podrían evitarse entre 4 y 5 millones de muertes al año ¹⁹². Múltiples estudios estiman que la práctica regular de AF comporta una reducción global del riesgo relativo de muerte prematura por cualquier causa de un 25 - 30% ³³. Este beneficio se mantiene en ambos sexos evaluados de forma independiente. De esta forma, algunos autores apuntan a que los hombres activos presentan una disminución del riesgo relativo de muerte de hasta un 50% respecto a los sedentarios ¹⁹³. Por su parte, en mujeres se ha observado que el sedentarismo junto con el sobrepeso son causantes del 31% de muertes prematuras, 59% de muertes por enfermedad cardiovascular y 21% de muertes por cáncer ¹⁹⁴.

Igualmente se ha demostrado que existe una relación dosis-dependiente en el beneficio de la AF sobre la salud global. En una revisión sistemática publicada en el año 2016 se evaluó si la cantidad de AF realizada tenía impacto en la reducción de 5 enfermedades distintas (cáncer de colon, mama, DM, IAM e ictus). Concluyeron que, más allá de que todos los que realizaban AF de forma regular veían reducido el riesgo de sufrir estas patologías, el beneficio era mayor en aquellos que realizaban más AF (fundamentalmente con más de 3000 - 4000 METs/min/semana) ¹⁹⁵.

Más allá de los efectos que la AF tiene sobre la salud vascular y el ictus, que se discutirán en el siguiente epígrafe, se han descrito beneficios claros sobre múltiples enfermedades crónicas.

En una revisión sistemática se observó que los sujetos activos presentan una reducción de entre el 10 - 20% del riesgo de padecer un cáncer (incluyendo colon, mama, gástrico, renal, vejiga y endometrio) y una reducción del 40 - 50% de la mortalidad asociada a estos tipos de cáncer ¹⁹⁶. En las enfermedades osteoarticulares se han descrito también importantes beneficios asociados a la AF, disminuyendo el riesgo de osteoporosis en las mujeres postmenopáusicas y favoreciendo el mantenimiento de una correcta mineralización ósea a lo largo de los años ^{197,198}. En una revisión sistemática, se observó que los pacientes con Enfermedad de Parkinson que realizaban ejercicio físico mejoraban sus síntomas motores y obtenían puntuaciones más altas en cuestionarios de calidad de vida ¹⁹⁹. Se ha observado también que la AF se asocia con menor riesgo de demencia vascular y previene el deterioro cognitivo ¹²⁰, además de mejorar los síntomas cognitivos en pacientes con Enfermedad de Alzheimer ²⁰⁰.

La práctica habitual de AF se ha asociado también a un mejor bienestar mental ²⁰¹, reduciendo el nivel de estrés y el riesgo de desarrollar una depresión. En un estudio, se estimó que la práctica de ejercicio físico durante una hora a la semana podría prevenir un 12% de depresiones futuras ²⁰².

1.3.3. ACTIVIDAD FÍSICA, SALUD VASCULAR E ICTUS

ACTIVIDAD FÍSICA, ENFERMEDAD VASCULAR Y FACTORES DE RIESGO VASCULAR

En la literatura existe un amplio número de revisiones sistemáticas y metaanálisis que han analizado el impacto beneficioso de la AF en patología cardiovascular ^{195, 203, 204}, de tal forma que las principales guías americanas de prevención en enfermedad cardiovascular, consideran el sedentarismo como un factor de riesgo independiente ya desde el año 1992 ²⁰⁵.

Múltiples estudios prospectivos han evidenciado que la práctica regular de AF disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares en torno al 40% tanto en mujeres como en hombres, independientemente de la presencia de enfermedades y factores de riesgo vascular ²⁰⁶⁻²⁰⁸. Aunque la mayor parte de la evidencia disponible proviene de estudios realizados en población de edad media, el efecto positivo de la AF parece mantenerse también en poblaciones más envejecidas. En un estudio que incluyó pacientes con edad media de 66 años, los pacientes más activos reducían en un 38% la incidencia de enfermedad coronaria ²⁰⁹. En otro estudio que incluyó pacientes de hasta 90 años, se observó que los pacientes que caminaban más de 1.6 km al día disminuían la incidencia y mortalidad por enfermedad vascular en casi la mitad, especialmente si sufrían DM ²¹⁰.

Una vez establecida la enfermedad cardiovascular, incluso a baja intensidad y frecuencia, la AF enlentece su progresión ^{211, 212} y reduce el tamaño de las placas de ateroma ²¹³. No obstante, publicaciones recientes resaltan la importancia que tiene la intensidad de la AF practicada en la reducción de la incidencia de eventos cardiovasculares ²¹⁴.

Parte de los beneficios de la AF en la salud vascular se explican por el control de los factores de riesgo clásicos, como la obesidad, la DM y la HTA. Se ha observado que la reducción de peso a través de la dieta y la AF disminuye la incidencia de DM tipo

2 en sujetos con alto riesgo de padecerla en un 40 - 60% en 3 - 4 años ²¹⁵. Además, en paciente ya diabéticos, la AF asociada al tratamiento médico habitual mejora la homeostasis de la glucosa ²¹⁶. En relación a la tensión arterial, se ha descrito que los individuos inactivos o sedentarios tienen un riesgo 30 - 40% mayor de padecer HTA a lo largo de 6 - 10 años, comparado con los individuos que practican AF de forma regular ^{217, 218}. En un metaanálisis, se observó que la práctica regular de AF (de intensidad moderada o vigorosa, 3 - 5 veces por semana) reducía la presión arterial sistólica (-3.4 mmHg; 95% CI [-4.5 a -2.3]) y diastólica (-2.4 mmHg; 95% CI [-3.2 a -1.6]) ²¹⁹.

■ ACTIVIDAD FÍSICA E ICTUS

RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD FÍSICA CON LA PREVENCIÓN DEL ICTUS

En el estudio INTERSTROKE, al que ya se hizo referencia con anterioridad en la presente tesis, se identificaron 10 factores de riesgo modificables asociados con aproximadamente el 90% de los ictus. Entre ellos, la práctica regular de AF (que definieron como la realización de ejercicio de intensidad moderada o vigorosa durante al menos 4 horas a la semana) se asoció con una reducción en la incidencia de ictus de cualquier tipo (OR 0.41, IC 95% [0.35 - 0.48]) ¹⁴. Resultados similares en cuanto al beneficio de la AF en la prevención primaria del ictus ya se habían publicado con anterioridad. En un metaanálisis de 18 estudios de cohortes y 5 casos-contróles, Lee y colaboradores encontraron que los sujetos activos (moderadamente o muy activos), tenían menor riesgo de sufrir un ictus (20% y 27% menos que los pacientes poco activos, respectivamente) y también menor mortalidad ³². La reducción del riesgo se observó en ambos sexos y tanto para ictus isquémicos como hemorrágicos.

La dificultad a la hora de evaluar el grado de AF y qué considerar AF, dada la gran variabilidad existente entre los distintos trabajos publicados, sumado a que los pacientes que han sufrido un ictus presentan en muchas ocasiones limitaciones físicas que les impiden realizar ejercicio, dificultan la evaluación de este hábito en la prevención secundaria de la enfermedad cerebrovascular.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

Se estima que después de un ictus, hasta el 78% de los pacientes son sedentarios ²²⁰. Aunque hasta ahora no hay evidencia clara que relacione la AF directa e independientemente con el riesgo de sufrir un segundo ictus ²²¹, sí parece claro que las intervenciones de ejercicio físico afectan positivamente a la discapacidad ²²² y mejoran los factores de riesgo vascular clásicos asociados con la recurrencia isquémica ^{223, 224}. En el estudio BUST-Stroke (Breaking Up Sitting Time After Stroke), encontraron que, en pacientes que habían sufrido un ictus, compaginar la sedestación con 3 minutos de actividad física ligera durante 30 minutos descendía la tensión arterial sistólica 3.5 mmHg comparado con los pacientes que permanecían 8 horas seguidas sentados ²²⁵. Entre los pacientes con ictus aterotrombótico aleatorizados al brazo de tratamiento médico del estudio SAMMPRIS ³⁴, se diagnosticaron 32 ictus isquémicos tras 3 años de seguimiento. Los investigadores encontraron que la AF fue el único factor asociado a menor recurrencia de ictus durante el seguimiento. Los pacientes que no alcanzaron las recomendaciones de AF sugeridas tenían mayor riesgo de recurrencia que aquellos que sí las alcanzaron (OR 6.7, IC 95% [2.5 - 18.1]).

RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD FÍSICA PREVIA CON LA GRAVEDAD Y PRONÓSTICO DEL ICTUS

En el año 2006, el grupo de Deplanque evaluó la relación que tenían algunas prácticas y características basales previas al ictus con su severidad y pronóstico. Entre ellas, incluyeron la práctica de AF recreativa, que evaluaron mediante una entrevista estructurada teniendo en cuenta la frecuencia semanal y la intensidad. Encontraron que el grado de AF era un factor independiente asociado a una menor gravedad del ictus en fase aguda (escala NIHSS 0 - 5 al ingreso) y a mejor pronóstico funcional a corto plazo (escala mRS 0 - 1 o Índice Barthel 95 - 100 a los 8 días) con independencia de la edad y los factores de riesgo vascular clásicos. En su publicación, apuntan a un efecto dosis-dependiente, encontrando los mayores beneficios en los que practicaban entre 2 y 5 h de AF a la semana, mientras que la práctica inferior a 2 h o mayor de 5 h no se asoció a mejor pronóstico. En la evaluación de la intensidad, observaron que el mayor efecto protector lo confería la AF de intensidad moderada ²²⁶.

Posteriormente, en el año 2008, Krarup y colaboradores evaluaron el grado de AF previo al ictus medido por la escala PASE con su gravedad inicial y pronóstico a largo plazo. En este caso, incluyeron únicamente pacientes con ictus isquémico que habían sido incluidos en el estudio *ExStroke Pilot Trial*, en el que se evaluaba si el estímulo verbal, vigoroso y repetido a realizar AF después de un ictus aumentaba el nivel de ejercicio. Los resultados mostraron que la puntuación en la escala PASE fue uno de los predictores más importantes de una menor gravedad inicial (OR 1.53, IC 95% [1.25 - 1.86]) y de mejor pronóstico funcional a largo plazo (OR 0.64, IC 95% 0.52 - 0.79)²²⁷.

Este efecto beneficioso de la AF en la gravedad y pronóstico del ictus se corroboró en estudios posteriores. En el año 2014, Ricciardi y colaboradores publicaron los resultados de un estudio observacional y prospectivo en el que incluyeron un total de 159 pacientes con un ictus isquémico por oclusión de gran vaso de circulación anterior. El grado de AF previo se evaluó mediante la escala IPAQ y los pacientes se categorizaron en tres grupos según los METs obtenidos. Encontraron que los pacientes con mayor grado de AF previo al ictus tenían mejor pronóstico funcional, mayores tasas de recanalización precoz tras la fibrinólisis intravenosa y volúmenes de infarto final más pequeños. Además, encontraron que el mayor nivel de AF previo al ictus se asoció de forma independiente a una menor gravedad inicial y a una mayor probabilidad de mejoría neurológica dramática precoz²²⁸.

Por su parte, el grupo noruego de Ursin evaluó el efecto de los paseos que realizaban los pacientes antes del ictus sobre su recuperación funcional. Interrogaron a los pacientes incluidos acerca de sus hábitos al caminar, el tiempo de los paseos y su intensidad a través del cuestionario *Walking Habits*. En los resultados, encontraron que los pacientes que daban paseos cortos (menos de 30 minutos) tenían peor situación funcional tras el ictus, con mayores dificultades en la marcha y mayor inestabilidad, tanto en fase aguda como después de un año de seguimiento²²⁹.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

En población asiática, el grupo de Wen y colaboradores publicaron resultados similares a lo previamente descrito. En su trabajo, concluyeron que la práctica de AF previa al ictus (al menos 30 minutos al día, 3 veces por semana) estaba relacionada con ictus más leves, menos complicaciones, menor mortalidad y mejor pronóstico funcional a 1, 3 y 6 meses de seguimiento ²³⁰.

También se ha descrito un aparente efecto neuroprotector de la actividad física que parece influir en la severidad del ictus. Así, en el año 2018 se publicaron los resultados del estudio PAPSIGOT, desarrollado en Suecia. En él, se evaluó el grado de AF previa en pacientes que habían sufrido un ictus (tanto isquémico como hemorrágico), a través de la escala Saltin-Grimby's 4-level Physical Activity (SGPALS) y su relación con la gravedad del ictus, medida por la escala NIHSS. Encontraron que aquellos pacientes que practicaban algún tipo de AF antes del ictus, con independencia de su intensidad y duración, tenían ictus más leves (OR 2.30 95% CI [1.64 - 3.22]) ²³¹. Observaciones similares se obtuvieron en estudios posteriores, demostrando que los pacientes físicamente activos tenían ictus más leves y con menor mortalidad ^{232, 233}, menor dependencia ²³⁴ y mejor percepción de calidad de vida ²³⁵.

1.3.4. MECANISMOS BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LOS POTENCIALES EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA ACTIVIDAD FÍSICA EN EL PRONÓSTICO DEL ICTUS

MECANISMOS BIOLÓGICOS

Como ya se ha hecho referencia con anterioridad en la presente tesis, la práctica habitual de AF induce una serie de cambios fisiológicos en el organismo que modifican y ayudan a controlar los factores de riesgo vascular ^{15, 19, 236}. De esta forma, la práctica regular de la AF reduce el IMC y previene el sobrepeso, mejora la homeostasis de la glucosa y disminuye la resistencia insulínica, mejora el perfil lipídico y optimiza las cifras de presión arterial. Pero, más allá de este efecto sobre los

factores de riesgo, los beneficios de la AF sobre el pronóstico del ictus se explican por una serie de mecanismos biológicos ²³⁷, algunos de los cuales se explicarán a continuación.

MANTENIMIENTO DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)

La disrupción de la BHE que acontece después de un ictus favorece el paso de moléculas que median el daño cerebral por isquemia y reperusión y contribuyen así a la formación de edema cerebral. La AF promueve la integridad de la BHE, ya que, por un lado, mantiene el grosor de la BHE al disminuir las enzimas proteolíticas activadas por la isquemia que destruyen la lámina basal, como la metaloproteasa-9 (MMP-9) ²³⁸, y por otro, aumenta la regeneración de astrocitos, ofreciendo mayor estabilidad a la BHE ²³⁹.

EFFECTO ANTIINFLAMATORIO Y ANTITROMBÓTICO

La AF ejerce sus efectos antiinflamatorio y antitrombótico a través de la reducción de la resistencia insulínica y disminuyendo la capacidad de migración, adhesión e infiltración de los leucocitos en el área de isquemia y tras la reperusión del tejido, lo que condiciona un menor daño neuronal ²⁴⁰.

NEOVASCULARIZACIÓN, NEUROGÉNESIS Y OPTIMIZACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL.

La formación y remodelación de nuevos vasos o neovascularización engloba diversos procesos: cuando estos vasos se forman a partir de la migración y diferenciación de células progenitoras endoteliales circulantes (CPEs), incorporadas y atraídas el tejido dañado a través de diversos estímulos, se habla de vasculogénesis. En la angiogénesis, estos nuevos vasos se forman a partir de los ya existentes, gracias a la migración y multiplicación de células endoteliales ya maduras. Finalmente, en la arteriogénesis, fenómeno clave en la creación de colaterales, vasos preexistentes de menor calibre aumentan su diámetro, generalmente en repuesta a cambios de presión arterial ²⁴¹.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

La AF previa al ictus favorece la neovascularización del tejido a través de diversos mecanismos, en los que está implicado el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Éste, favorece la formación de neovasos no solo de forma directa sino también a través de la vasodilatación inducida por la óxido nítrico sintentasa endotelial (eNOs) y las CPEs ²⁴². La mayor biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) estimula la movilización de CPEs de la médula ósea, bazo y sangre, e incrementa a su vez la expresión del VEGF ^{243, 244}.

La neurogénesis consiste en la formación de nuevas neuronas, sinapsis y glía y tiene lugar fundamentalmente a nivel subventricular y subgranular del giro dentado del hipocampo. La AF parece estimular la neurogénesis mediante el incremento de la expresión y de los niveles de ciertos factores de crecimiento neurogénicos (BDNF, NGF) y también VEGF ²³⁹. Además, a través de la neovascularización y el secundario aumento de flujo sanguíneo en el área adyacente a la isquemia, se facilita el transporte de glucosa y oxígeno a las neuronas, haciéndolas así más resistentes a la isquemia y disminuyendo su probabilidad de muerte ²⁴⁵. La AF atenúa también la apoptosis neuronal secundaria a la isquemia mediante la estimulación de factores antiapoptóticos y disminución de proapoptóticos, asegurando una mayor supervivencia neuronal ²⁴⁰.

Células progenitoras endoteliales

Tal como se hizo referencia previamente y al igual que ocurre con la DMed, la AF induce la liberación de CPEs circulantes, en este caso gracias al aumento de VEGF y a la expresión de eNOS, optimizando también su capacidad de migración, de formar colonias y de disminuir su grado de apoptosis, favoreciendo así la vasculogénesis ²⁴⁶⁻²⁴⁸.

Factores de crecimiento neuronal y vascular

Los factores de crecimiento (FC) son sustancias generalmente proteicas, segregadas por distintas células y tejidos, que estimulan el crecimiento, la migración, diferenciación

y mantenimiento de la supervivencia celular. En el caso de los FC neuronales y endoteliales, intervienen tanto en la neurogénesis como en la neovascularización, procesos íntimamente relacionados y codependientes ^{243, 249}.

En algunos modelos experimentales se demostró que las ratas sometidas a programas de ejercicio presentaban niveles más elevados de algunos factores de crecimiento que las sedentarias ^{244, 246}, observación que también se realizó posteriormente en algún estudio clínico: en una revisión de Knaepen y colaboradores se concluyó que distintos grados de AF aumentaban los niveles de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), y que estos niveles disminuían al interrumpir la actividad ²⁵⁰. En otros, se observaron niveles más elevados de VEGF en sujetos activos frente a sedentarios ²⁵¹.

Como ya se comentó previamente, los FC establecen una compleja red de interacción mutua y con otras células y tejidos que estimula la neurogénesis y neovascularización en el tejido cerebral isquémico ^{252, 253}. En el ictus isquémico, el papel del VEGF ha sido ampliamente estudiado. Este FC actúa de forma directa e indirecta en la neovascularización y neurogénesis a través de la estimulación de la eNOS y también promoviendo la maduración y liberación de las CPEs. Tras el ictus, se detectan niveles más elevados de VEGF y de su receptor en el área isquémica, donde modula la maduración, estabilización y remodelación de los vasos, incrementando así la densidad vascular local ²⁵⁴ pero también promoviendo la liberación de BDNF desde las células endoteliales, disminuyendo la apoptosis e incrementando la proliferación y diferenciación de las células neuronales tras el ictus ²⁵⁵.

En modelos experimentales, el VEGF se ha relacionado con menor volumen de infarto y mejor pronóstico funcional tras el ictus ²⁵⁶. El BDNF es un FC nervioso que actúa en la remodelación cerebral de forma directa e indirecta a través de la estimulación y reclutamiento de otros FC, promoviendo la supervivencia neuronal y disminuyendo su muerte tras la isquemia, así como interviniendo en procesos de sinaptogénesis

1 ◀ INTRODUCCIÓN

y plasticidad axonal implicados en la recuperación funcional del tejido dañado ²⁵⁷. A nivel experimental, se ha demostrado una asociación positiva entre el BDNF y el menor volumen de infarto y mejor recuperación funcional ²⁵⁸.

En pacientes con ictus isquémico, el grupo de Sobrino y colaboradores relacionaron niveles basales de VEGF más elevados con mayores tasas de recanalización arterial precoz ²⁵⁹. Posteriormente, en un estudio observacional y publicado por el grupo de López-Cancio, se encontró que los pacientes con ictus agudo y con mayores niveles de AF antes del evento isquémico tenían niveles más elevados de VEGF, y que este factor de crecimiento se comportaba como un predictor independiente de buen pronóstico y menor volumen final del infarto ²⁶⁰.

MODELOS ANIMALES

Hasta la fecha, se han publicado múltiples trabajos que evalúan el impacto de la AF en el ictus isquémico y los posibles mecanismos implicados a través de distintos modelos de isquemia en animales ^{249,261}, algunos ya descritos en el epígrafe anterior de la presente tesis.

Alguno de estos trabajos más relevantes es el publicado por el grupo de Gertz y colaboradores, en el que compararon la evolución de dos grupos de ratas (activas y sedentarias) a las que se practicó una oclusión transitoria de la ACM. La AF fue la realizada voluntariamente por el animal sobre una rueda. Observaron que el grupo de ratas activas tenía volúmenes de infarto un 38% inferiores al otro grupo y mejores puntuaciones en las escalas de valoración funcional ²⁶². De forma similar, el grupo de Guo encontró que las ratas activas (en este caso, con un entrenamiento diseñado sobre *treadmill*) tenían menos déficits a las 24 horas del ictus y también volúmenes de infarto inferiores ²³⁸. Además, la AF parece también disminuir el daño por reperfusión en animales gracias a una aceleración del metabolismo de glucosa, manteniendo así un adecuado aporte energético ²⁶³.

Aunque, de forma global, la mayoría de los estudios muestran beneficios de la AF a través de diversas vías, cabe reseñar que existe gran variabilidad en los entrenamientos diseñados, desde el entrenamiento en *treadmill* o en rueda, hasta los tiempos por ejercicio, la duración antes de la isquemia y el tiempo determinado por sesión. Por este motivo, más allá del efecto global de la AF, algún trabajo evaluó también si disminuyendo la intensidad o duración de la AF este beneficio neto se mantenía. Así, en un trabajo publicado por Pianta en el año 2019, observaron que incluso las ratas que practicaban AF durante cortos periodos de tiempo tenían mejor pronóstico que las sedentarias, con mejor recuperación funcional, menos células apoptóticas en la región peri-infarto y mayores concentraciones de factores pro-angiogénicos ²⁶⁴.

1.4. CONCLUSIONES DE LA INTRODUCCIÓN

Los hábitos de vida saludables, entre los que se encuentran la adherencia a una dieta mediterránea y la práctica regular de actividad física, aportan beneficios en la salud y en especial en la prevención de enfermedades vasculares, entre las que se encuentra el ictus. Ambos factores parecen tener un efecto positivo no sólo en la prevención de un primer evento vascular, si no en mejorar el pronóstico de los pacientes después de haber sufrido un ictus. A través de múltiples mecanismos biológicos y moleculares (resumidos en la **Figura 7**), muchos de ellos interconectados y otros no tan conocidos, ambos hábitos de vida parecen ejercen un efecto neuroprotector y neurorregador, favoreciendo la tolerancia a la isquemia.

No obstante, existe gran variabilidad en los métodos de evaluación de ambos hábitos en los estudios tanto clínicos como preclínicos, lo cual dificulta en muchos casos la reproducibilidad y extrapolación de resultados. Por otra parte, aunque ambos factores podrían compartir vías y mecanismos a través de los cuales ejercer su efecto neuroprotector y neurorregador, existen escasos trabajos que hayan evaluado esta posible interacción cuando ambas prácticas se realizan antes de un ictus, así como su influencia en el pronóstico del mismo.

1 ◀ INTRODUCCIÓN

En este sentido, sería interesante evaluar los potenciales efectos neuroprotectores y neurorreparadores de los hábitos de vida saludables, en concreto del grado de AF y DMed previos al ictus, en el pronóstico de esta patología, ahondando en los potenciales mecanismos fisiopatológicos implicados en la tolerancia a la isquemia.

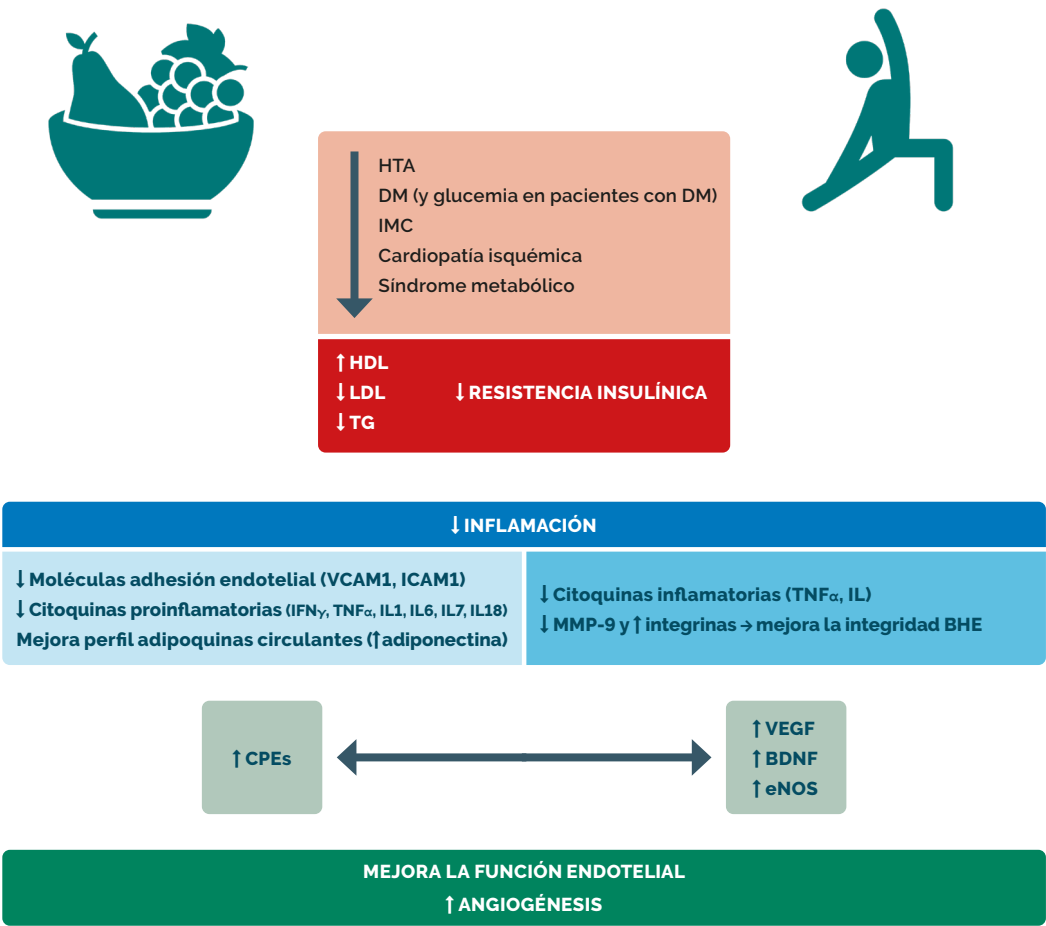


Figura 7: Resumen de los principales mecanismos biológicos asociados a la dieta mediterránea y la práctica de actividad física que resultan en un efecto beneficioso para la salud.



HIPÓTESIS



- En un modelo animal de isquemia cerebral evaluando las intervenciones previas al infarto isquémico "Dieta Mediterránea" y "Actividad Física", hipotetizamos que los animales de los grupos de intervención presentarán menor volumen final del infarto y mejor recuperación funcional que los animales de los grupos control, y que ambas intervenciones podrían tener efectos sinérgicos.
- En un grupo de pacientes con ictus isquémico por oclusión de circulación anterior, postulamos que tanto la realización de un mayor grado de actividad física como una mayor adherencia a la dieta mediterránea previos al ictus, se asociarán a una menor gravedad inicial del ictus, un menor volumen final del infarto, una mayor probabilidad de mejoría neurológica precoz y un mejor pronóstico funcional y cognitivo a largo plazo.
- Hipotetizamos que los efectos beneficiosos (neuroprotectores y neurorreparadores) que ejercerían la práctica regular de actividad física y la adherencia a la dieta mediterránea sobre el pronóstico del ictus estarían mediados, al menos en parte, por una menor resistencia insulínica, un adecuado balance en los metabolitos de la vía de la colina, un menor estado inflamatorio, así como por una mayor liberación de células progenitoras endoteliales.



OBJETIVOS



1. Estudiar en un modelo animal de isquemia cerebral los efectos de las intervenciones previas a la inducción de isquemia "dieta estilo mediterráneo" y "actividad física" en el pronóstico radiológico y funcional de los animales incluidos, y estudiar las vías metabólicas implicadas.
2. Estudiar, en una muestra de pacientes con ictus isquémico por oclusión de circulación anterior y tratados con trombectomía mecánica, la relación entre el grado de actividad física y el de adherencia a la dieta mediterránea previos al ictus con la gravedad inicial, el volumen final del infarto, la mejoría neurológica precoz y la recuperación funcional y cognitiva a los tres meses tras el ictus.
3. Estudiar potenciales biomarcadores y vías metabólicas implicados en los efectos neuroprotectores y neurorreparadores de la actividad física y dieta mediterránea en el ictus: índice de resistencia insulínica, metabolitos de la vía de la colina, células progenitoras endoteliales circulantes, adipocinas y citoquinas inflamatorias.



MATERIAL Y MÉTODOS

4

4.1. MODELO ANIMAL

DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo del modelo animal fue determinar el efecto de las intervenciones "actividad física" y "dieta estilo mediterráneo", iniciadas con anterioridad a la inducción de isquemia cerebral, en el volumen de la lesión isquémica, test funcionales, inmunomodulación, movilización de células progenitoras endoteliales (CPEs) y procesos de angiogénesis, neurogénesis y sinaptogénesis en el parénquima cerebral.

Para alcanzar este objetivo, se siguió el siguiente protocolo (*Figura 8*):

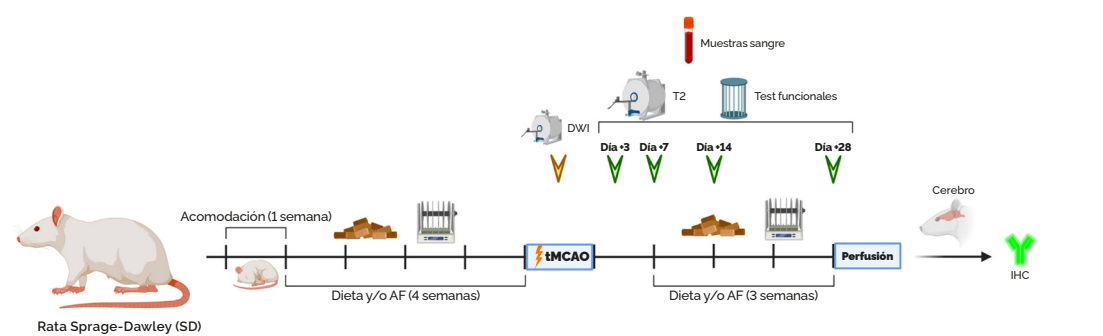


Figura 8: Cronograma del modelo experimental.

DWI: secuencias de difusión de RM; IHC: inmunohistoquímica

Se definieron 5 grupos experimentales: un grupo sham (n = 5), en el que se simuló la cirugía pero sin realizarse oclusión de ACM y por tanto, sin inducir isquemia cerebral, y cuatro grupos de intervención con 10 ratas en cada grupo, como se muestra en la tabla, en función de si recibieron la intervención "actividad física" y/o "dieta estilo mediterráneo" previa a la inducción de la isquemia:

INTERVENCIONES	Dieta normal	Dieta estilo mediterráneo
Sin Actividad física	GRUPO "CONTROL" (n = 10)	GRUPO "DIETA" (n = 10)
Con Actividad física	GRUPO "ACTIVIDAD FÍSICA" (n = 10)	GRUPO "DIETA+ACTIVIDAD FÍSICA" (n = 10)

MANEJO ANIMAL

Los protocolos de experimentación fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, de acuerdo con la legislación de la Unión Europea (86/609/CEE, 2003/65/CE and 2010/63/EU) y las directrices de las guías ARRIVE.

Se utilizaron machos adultos de ratas Sprague-Dawley de entre 300 y 350 g aproximados en el momento de la operación. Las ratas dispusieron de agua y alimento *ad libitum* en todo momento y se mantuvieron en ciclos diurnos/nocturnos alternos cada 12 horas con una temperatura media de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad del $60 \pm 5\%$.

Para los procedimientos quirúrgicos y la realización de estudios de neuroimagen, los animales fueron anestesiados mediante sevoflurano inhalado, en una mezcla de óxido nitroso y oxígeno al 70/30. Se utilizó una inhalación del 6% para la inducción y del 3 - 4% para el mantenimiento de la anestesia. La temperatura rectal se mantuvo durante los procedimientos en $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ gracias a la utilización de una placa calefactora (Neos Biotec, Pamplona, España).

Tanto en la primera semana de adaptación en el laboratorio como en la primera semana tras la cirugía todas las ratas recibieron la misma dieta (Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet, Ref: 2018, ENVIGO) y no realizaron sesiones de entrenamiento de actividad física. Las ratas del grupo sham recibieron este tipo de dieta durante todo el seguimiento y no realizaron sesiones de entrenamiento.

INTERVENCIÓN "ACTIVIDAD FÍSICA"

Los animales de los grupos sometidos a la intervención "actividad física", tras la primera semana de adaptación al laboratorio, comenzaron con sesiones de entrenamiento de actividad física diaria en un rotarod, cinco días a la semana, hasta la cirugía. Una semana tras ésta, se reinició la actividad física, aunque a menor intensidad y se mantuvo hasta el

final del seguimiento, según se describe a continuación. La primera semana de entrenamiento consistió en una adaptación al rotarod, con sesiones de 5 minutos de duración a una velocidad de 5 revoluciones por minuto (rpm) que equivale a casi 1 m/min. Las siguientes semanas se realizaron las sesiones de entrenamiento diseñadas, consistentes en 5 minutos de aceleración desde 5 a 20 rpm seguidas de 20 minutos a 20 rpm (4 m/min). Para definir estas velocidades, se estimó el 60% del VO_{max} de los animales, que equivaldría al ejercicio físico sano en humanos. La segunda semana tras la cirugía los animales reiniciaron los entrenamientos con sesiones consistentes en 5 minutos de aceleración de 5 a 10 rpm (2 m/min) seguidas de 20 minutos a 10 rpm.

Las sesiones de los animales que no recibieron la intervención "actividad física", consistieron en colocar al roedor sobre el rotarod parado durante 2 minutos, tras lo cual los animales eran devueltos a su jaula.

■ INTERVENCIÓN "DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO"

Las ratas de los grupos de intervención "dieta" y "dieta+AF" se alimentaron con una dieta "estilo mediterráneo" basada en el aceite de oliva y la anchoa como fuente de ácidos grasos (85% oliva, 15% anchoa), (Ref: U8978 Version 01 AIN93, SAFE, France). Asimismo, estos grupos recibieron un suplemento de polifenoles en forma de 200 mg/kg/día de hidroxitirosol disuelto en agua (de extractos de aceites de frutas, 20% HT, nutexa, nº batch: 21001-012)

Por su parte, las ratas de los grupos "control" y "actividad física" fueron alimentadas con una dieta estándar de control basada en mantequilla como fuente de ácidos grasos, semejante a una dieta occidental (Ref: U8978 Version 017 AIN93, SAFE, France).

Todos los grupos de animales recibieron estas dietas durante las 5 semanas previas a la cirugía y las reiniciaron una semana después de la misma hasta el final del seguimiento.

MODELO DE ISQUEMIA

El modelo de isquemia empleado fue el de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO), considerado uno de los mejores modelos animales que imitan el ictus isquémico en humanos y utilizado en múltiples estudios^{265, 266} (**Figura 9**). Brevemente, a través de un microscopio quirúrgico se disecciona el tejido conectivo de la arteria carótida común, externa e interna mediante una incisión en el cuello del animal. La carótida externa y la rama ptérigopalatina de la carótida interna se separan y ligan mediante sutura de seda 6-0. A través de la carótida externa y hacia la carótida común se inserta un monofilamento de silicona revestido de goma (403512PK5Re; Doccoll Corporation, USA) que se va avanzando a través de la carótida interna a 20 mm de la bifurcación, para ocluir el origen de la ACM. En el teórico territorio de la ACM, sobre la superficie craneal y a 4 mm laterales del bregma, se coloca un un láser Doppler de 1 mm de diámetro conectado a un medidor de flujo (PeriFlux 5000, Perimed AB, Stockholm, Sweden) obteniendo así un registro continuo del flujo de la ACM durante la oclusión. Una vez se consigue la oclusión, comprobada mediante la reducción de la señal de Doppler, los animales se transfieren cuidadosamente a la resonancia magnética (RM) para comprobar la correcta oclusión de la arteria y el territorio isquémico mediante los mapas de difusión (DWI/ADC) y angioRM, definiendo así la lesión isquémica en tiempo 0 (T0). Tras la realización de la neuroimagen, los animales se devuelven a la mesa quirúrgica y se coloca nuevamente el Doppler. Tras 75 minutos de oclusión, se retira el filamento y las suturas de tal forma que la rama ptérigopalatina se reperfunde mientras que la carótida externa (utilizada para introducir la sutura) persiste ligada para evitar sangrados. Tal como se describió previamente²⁶⁷, este modelo de isquemia transitoria combinando la DWI/ADC y angioRM con Doppler constituye un modelo adecuado de inclusión, reduce la variabilidad intergrupos y garantiza la reproducibilidad en los volúmenes de infarto.

Se utilizaron los siguientes criterios de exclusión: **1)** reducción del flujo arterial inferior al 70% del basal; **2)** malformaciones arteriales detectadas en angioRM; **3)** lesión isquémica

TO menor del 25% o mayor del 45% del hemisferio afecto y 4) ausencia de reperfusión o reperfusión prolongada tras la retirada del filamento (más de 10 minutos transcurridos tras la retirada hasta alcanzar al menos el 50% del flujo basal). Todos los animales excluidos durante el procedimiento o fallecidos antes de los 3 días siguientes fueron reemplazados para alcanzar el número total de animales indicado para cada grupo.

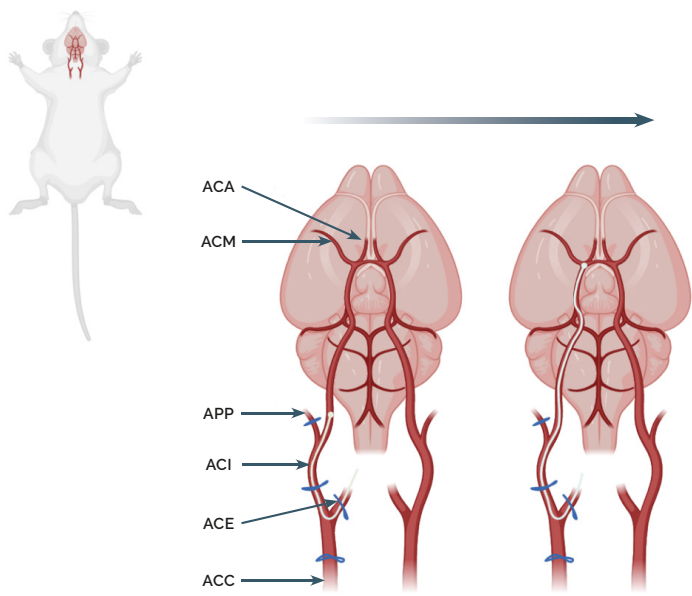


Figura 9: Modelo de isquemia mediante oclusión intraluminal de la ACM (tMCAO)

Se representa el avance del filamento (en color blanco) a través de la luz de la arteria, hasta alcanzar el inicio de la ACM y conseguir así su oclusión.
ACA: arteria cerebral anterior; **ACM**: arteria cerebral media; **APP**: arteria ptérigopalatina; **ACI**: arteria carótida interna; **ACE**: arteria carótida externa; **ACC**: arteria carótida común.

RESONANCIA MAGNÉTICA

Los estudios de RM se llevaron a cabo en un sistema de RM de imán horizontal de 9.4 teslas, Biospec 94/20USR, (Bruker BioSpin, Alemania) con una bobina de gradiente con blindaje activo de 20 cm de ancho (440 mT/m). La transmisión de radiofrecuencia se logró con un resonador de volumen de jaula de pájaros; la señal se detectó utilizando una bobina de superficie de cuatro elementos, colocada sobre la cabeza del animal, que se fijó con una barra de dientes, tapones para los oídos y cinta adhesiva. Las bobinas de transmisión y recepción se desacoplaron activamente entre sí.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron exploraciones localizadores de eco gradiente al principio de cada sesión para posicionar con precisión al animal dentro del orificio del imán. Durante la oclusión se utilizó la angioRM para identificar el polígono de Willis y evaluar la oclusión efectiva de la ACM. Las imágenes axiales de angioRM del cerebro de rata son una pila de 58 cortes donde se mapea todo el cerebro. Los parámetros para la secuencia TOF-MRA 3D Flash fueron: campo de visión (FOV) $30.72 \times 30.72 \times 14 \text{ mm}^3$, matriz de imagen $256 \times 256 \times 58$, tiempo de repetición 15 ms, 2 medias y tiempo de eco 2.5 ms. También se adquirieron mapas de ADC utilizando secuencias de imágenes ecoplanares de spin-eco con los siguientes parámetros de adquisición: FOV $24 \times 16 \text{ mm}^2$, matriz de imagen 96×64 , 14 cortes consecutivos de 1 mm de espesor, tiempo de repetición 4 s, 4 promedios, tiempo de eco 26.91 ms, ancho de banda espectral 200,000 Hz y 7 valores de difusión b: 0; 300; 600; 900; 1200; 1600 y 2000.

En los seguimientos siguientes las ratas se exploraron con imágenes ponderadas en T2 utilizando una secuencia RARE (factor $n = 4$) con los siguientes parámetros de adquisición: FOV $19.2 \times 19.2 \text{ mm}^2$, matriz de imagen 192×192 , 14 cortes consecutivos de 1 mm de espesor, tiempo de repetición = 3 s, tiempo de eco efectivo = 45 ms. Se adquirieron imágenes ponderadas en T2 a los 3, 7, 14 y 28 días después de la tMCAO. Todas las imágenes se procesaron y los mapas se construyeron con ImageJ (Rasband WS, ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009).

Los volúmenes de difusión se determinaron mediante selección manual a partir de los mapas de DWI y los volúmenes de las lesiones isquémicas a partir de los mapas de T2 mediante selección manual. Con el fin de evitar la posible sobrestimación del volumen de la isquemia debida al edema, se utilizó la siguiente fórmula para estimar el edema (%), ajustando el volumen de lesión en función del mismo²⁷⁰:

$$\text{Edema (\%)} = 100 \times \left[\frac{\text{Volumen hemisferio ipsilateral} - \text{Volumen hemisferio contralesional}}{\text{Volumen hemisferio contralesional}} \right]$$

El volumen final ajustado por edema se expresó de forma absoluta en milímetros cúbicos.

TEST FUNCIONALES

En todos los animales se realizó una batería de pruebas funcionales durante el ciclo de oscuridad, antes de la tMCAO y los días 3, 7, 14 y 28 después de la misma.

Se realizó la prueba del cilindro para evaluar la función motora y las pruebas de Bederson y Wahl para evaluar el déficit sensitivomotor.

A través de la prueba del cilindro se evalúa la asimetría en el uso de las extremidades anteriores durante el comportamiento exploratorio del animal. Para ello, las ratas se colocan en un cilindro transparente de 20 cm de diámetro y se graban durante 10 minutos. En este tiempo, los roedores exploran el cilindro tocando la pared con sus extremidades delanteras. Durante el visionado de los videos, se cuentan las colocaciones de los miembros anteriores ipsilaterales y contralaterales a la lesión. Con estos datos, se calcula el índice de asimetría de la siguiente forma: nº de veces que toca el cilindro con la pata derecha durante la ascensión por el nº de veces que lo toca con cada una de las dos patas. Las ratas sanas tienen un índice próximo a 0.5 y tiende a 0 y 1 en los animales que usan preferentemente la pata izquierda o la derecha, respectivamente²⁷¹.

Por su parte, las pruebas de Bederson y Wahl son escalas validadas con varios ítems para evaluar los déficits sensoriomotores. Estas pruebas se basan en la presencia o ausencia de una actividad refleja o espontánea del animal^{272,273}. En la **Tabla 4** se enumeran los ítems evaluados en cada escala. De forma resumida, en el test de Bederson se otorgan puntuaciones de 0 cuando el roedor realiza movimientos normales y de 1 - 3 cuando existe algún déficit, por lo que, a menor puntuación total en el test, menores déficits presenta

el animal. En el test de Wahl ocurre al contrario, ya que las puntuaciones próximas a 0 reflejan déficits más graves y las próximas a 8 serían las consideradas normales.

BEDERSON TEST		
Movimiento espontáneo	0-1	2-3
Movimiento circular espontáneo	0	1
Flexión espontánea de la extremidad anterior contralateral	0	1
Movimiento circular en suspensión	0	1
Reflejo extensor en suspensión	0	1
Detección de esquinas	0	1
Total	0-1	8
WAHL TEST		
Detección de esquinas		
Con la extremidad anterior	1	0
Con la extremidad posterior	1	0
Colocación visual	1	0
Flexión espontánea de la extremidad anterior contralateral	1	0
Flexión espontánea de la extremidad posterior contralateral	1	0
Movimiento circular espontáneo	1	0
Reflejo extensor en suspensión	1	0
Torsión torácica en suspensión	1	0
Total	8	0

Tabla 4: Test funcionales (Bederson y Wahl)

CITOMETRÍA DE FLUJO Y ANÁLISIS DE LAS LÍNEAS HEMATOPOYÉTICAS

Se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola antes de la tMCAO (muestra basal), a la 1 h, y los días 3, 7, 14 y 28 días después de la tMCAO. Las muestras se recogieron en tubos de K2EDTA (BD Microtainer, EE.UU.). La tinción celular por inmunofluorescencia se realizó con los anticuerpos fluorescentes conjugados anti-CD34 (ref.: sc-7324, Santa Cruz Biotechnology), anti-ckit (ref.: sc-19619, Santa Cruz Biotechnology), anti-KDR (ref.: bs-10412R, Bioss) y anti-CD43 (ref.: 202814, Biolegend). La fluorescencia celular se midió inmediatamente después de la tinción mediante citometría de flujo con BD FACS Aria II (BD, Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

Se analizaron los niveles de células progenitoras circulantes (CPC), identificadas como CD34 positivas (CD34+); células progenitoras hematopoyéticas (CPH) identificadas como CD34 y CD43 positivas (CD34+/- CD43+); y células progenitoras endoteliales (CPEs), identificadas como CD34, ckit y KDR positivas (CD34+/ckit+/KDR+). Los números de cada linaje celular se calcularon utilizando el software FACSDiva (BD Biosciences, EE.UU.).

EFFECTO INMUNOMODULADOR Y DAÑO OXIDATIVO DEL ADN

Se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola antes de la tMCAO (muestra basal), a 1 h, y los días 3, 7, 14 y 28 días después de la tMCAO. Las muestras se recogieron en tubos de K2EDTA (BD Microtainer, EE.UU.) y se centrifugaron a 1000 g durante 7 minutos, almacenando el suero a -80 °C hasta su análisis.

Los niveles séricos de citocinas/quimiocinas se determinaron utilizando el kit Milliplex MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Cat. RECYTMAG-65K, EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). Las 27 citocinas/quimiocinas incluidas en este kit son las siguientes: G-CSF, GM-CSF, VEGF, eotaxina, leptina, MIP-1α, MIP-2, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-18, IFNγ, IP-10, TNFα, EGF, MCP-1, GRO/KC, LIX, RANTES y Fractalkina. En la **Tabla 5** se agrupan según sus efectos pro o antiinflamatorios.

Del mismo modo, la medición del daño oxidativo del ADN en suero se realizó mediante un kit ELISA (ensayo de 8-hidroxi-deoxiguanosina, 8-OHdG) (Cat. STA-320; Cell Biolabs, San Diego, CA, EE.UU.).

Citocinas/quimiocinas proinflamatorias
TNFα, IFNγ, IL-1β, IL-1α, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, G-CSF, GM-CSF, MIP-1α, MIP-2α, Leptina, RANTES, Eotaxina, MCP-1, GRO-KC, LIX, VEGF
Citocinas/quimiocinas antiinflamatorias
IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, EGF, Fractalkina

Tabla 5: *Citoquinas analizadas clasificadas por su función predominante, pro o anti-inflamatoria.*

PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS

A los 14 días, tres animales de cada grupo y a los 28 días todos los restantes, fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestesia y, a continuación, perfundidos transcardialmente con una solución helada de PBS seguida de paraformaldehído (PFA) al 4%. Por último, se diseccionaron los cerebros y los tejidos se fijaron durante la noche a 4 °C en la misma solución fijadora.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

El procesamiento de los tejidos se realizó como se ha descrito previamente ²⁷⁴. Brevemente, se incubaron en sacarosa al 30% para su crioprotección. Los cerebros se embebieron en compuesto OCT y se congelaron. Posteriormente, se seccionaron transversalmente con un criostato a un grosor de 20 μm . Para la inmunohistoquímica, las secciones se lavaron primero con Triton-PBS al 0.2% y el protocolo de recuperación de antígenos se llevó a cabo con citrato de sodio (pH 6.0) a 99 °C durante 20 min. A continuación, las secciones se bloquearon y permeabilizaron (0.4% de Triton, 5% de sueros de la misma especie que los anticuerpos secundarios, 1× PBS) durante 1 h a temperatura ambiente. La incubación en la solución de anticuerpos primarios (véanse las concentraciones más adelante) se realizó a 4 °C durante toda la noche. Se lavaron las secciones y, a continuación, se procedió a la tinción con anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente (soluciones de anticuerpos a 1:500). A continuación, las secciones se lavaron de nuevo, se incubaron con Hoechst 33342 durante 10 min y se montaron con Aqua-Poly/Mount (Polysciences).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: conejo anti-Ki67 (1:50, Abcam) como marcador de la proliferación celular, conejo anti-DCX (1:500, Sigma-Aldrich) como marcador de la migración neuronal, cobaya anti-NeuN (1:200, Sigma-Aldrich) como marcador de neuronas maduras, conejo anti-CD31 (1:50, Cell Signaling Technology) como marcador de células endoteliales y conejo anti-VGLUT1 (1:100, Cell Signaling Technology) como marcador de la transmisión glutaminérgica.

■ ENSAYO TIPO TUNEL

Se utilizó el kit Tdt-mediated dUTP Nick End Labelling (TUNEL) (Roche, Mannheim, Alemania) para detectar núcleos apoptóticos como se ha descrito previamente ^{275, 276}. Brevemente, las secciones se pretrataron con MetOH a -20 °C durante 15 min y, a continuación, con tampón citrato 0.01 M pH 6.0 durante 30 min a 90 °C. Tras lavados con PBS, cada portaobjetos se incubó con una mezcla de 5 μL de solución enzimática (desoxinucleotidil transferasa terminal) y 45 μL de solución de marcaje (nucleótidos marcados con

rojo TMR) durante 90 min a 37 °C. A continuación, las secciones se enjuagaron en PBS, se dejaron secar durante 30 min a 37 °C y se montaron con Aqua-Poly/Mount.

■ OBTENCIÓN DE IMÁGENES DEL TEJIDO CEREBRAL

Se fotografiaron secciones de tejido teñidas utilizando un microscopio invertido (Leica CTR6000). Se fotografiaron tres secciones de cortes coronales de cerebro de cada animal. Las fotomicrografías se tomaron con aumentos de 5× (áreas DCX+ o CD31+) y 20× (estudios de TUNEL, neurogénesis, angiogénesis, sinapsis y microglía) sin cambiar la ganancia del amplificador ni la compensación para evitar la introducción de variabilidad experimental. Todas las imágenes se procesaron con el software ImageJ.

Tras las cuantificaciones, el contraste y el brillo se ajustaron mínimamente en las figuras, de manera uniforme en todos los paneles de cada experimento, con Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems).

■ CUANTIFICACIONES DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para cuantificar la intensidad de cada señal de inmunofluorescencia (IF), se determinó la intensidad fluorescente media (o valor gris medio) utilizando el software ImageJ. El experimentador fue ciego durante las cuantificaciones. Todos los valores se sometieron a normalización interna con respecto a las mismas áreas contralaterales y luego se normalizaron con respecto a los valores de control.

En la región peri-infarto, se evaluó por un lado la sinaptogénesis mediante la IF de vGLUT1 y por otro la apoptosis, determinando el número de neuronas TUNEL+ (NeuN+/TUNEL+). Por su parte, la neurogénesis y angiogénesis se estudiaron en la zona subventricular (ZSV), mediante la determinación de las células Ki67+ dentro del área DCX+ en el caso de la neurogénesis y en el área CD31+ para la angiogénesis.

4.2. ESTUDIO CLÍNICO

Se diseñó un estudio observacional prospectivo de pacientes consecutivos con los siguientes criterios de inclusión: **1.** Ictus isquémico de circulación anterior con oclusión arterial de arteria carótida interna terminal y/ arteria cerebral media (segmentos M1 o M2); **2.** Escala Rankin modificada previa al ictus 0 - 1 (pacientes con independencia funcional); **3.** Ausencia de deterioro cognitivo previo al ictus; **4.** Realización de trombectomía mecánica en fase aguda. **5.** Ingreso inicial en la Unidad de Ictus; **6.** Firma de consentimiento informado.

Se excluyeron los pacientes con imposibilidad de administración de escalas de dieta y ejercicio (p.ej, pacientes afásicos sin familiares de primer grado o que viven solos, o aquellos que ingresaron inicialmente en Unidad de Cuidados Intensivos). Tampoco se incluyeron los pacientes que se trasladaron precozmente a sus centros de referencia al no poder completar los procedimientos del estudio.

El presente proyecto fue sometido al Comité de Ética de Investigación con Medicamentos del Principado de Asturias (aprobación 014/2020) y fue financiado por el Instituto de Salud Carlos III (Proyecto FIS (PI18/01096): Estudio Dieta Mediterránea Y Actividad Física Como Precondicionantes A La Isquemia Cerebral En El Ictus Por Oclusión De Gran Vaso Intracraneal, IP Elena López-Cancio). Inicialmente el proyecto se planteó como multicéntrico (3 centros) pero debido a la coincidencia de la pandemia por COVID durante el periodo de reclutamiento, el estudio se realizó únicamente en nuestro hospital (Hospital Universitario Central de Asturias).

Todos los pacientes fueron tratados según los protocolos internos, que están en consonancia con las guías nacionales e internacionales. Se creó una base de datos prospectiva para la inclusión de las variables de interés y el posterior análisis.

En la **Figura 10** se resumen los procedimientos realizados en el estudio.

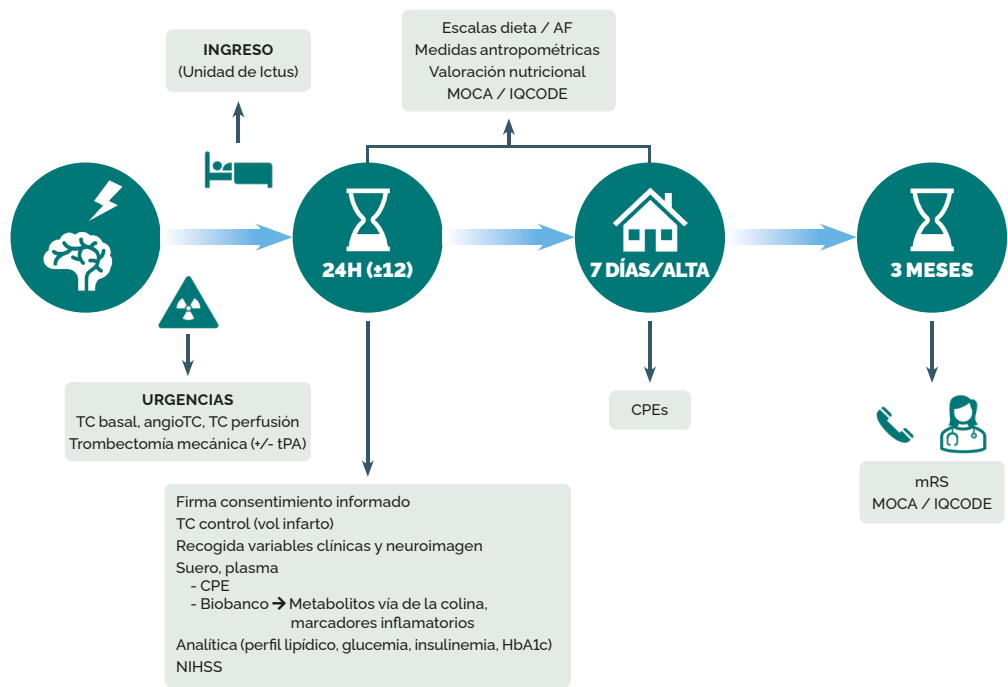


Figura 10: Resumen de los principales procedimientos realizados en el estudio clínico.

RECOGIDA DE VARIABLES CLÍNICAS, RADIOLÓGICAS Y ANALÍTICAS

Al ingreso en la Unidad de Ictus se realizó la recogida de variables clínicas, analíticas y radiológicas habituales, que se incluyen en el registro de reperfusión de nuestro centro y que incluyen entre otras: edad, sexo, escala Rankin modificada (mRS) previa al ictus, hábitos tóxicos, antecedente de factores de riesgo vascular clásicos (hipertensión arterial, diabetes, dislipemia, hiperuricemia), antecedente de enfermedades vasculares previas (cardiopatía isquémica, vasculopatía periférica, ictus), antecedente de insuficiencia renal y de hiperuricemia. En cuanto a los tratamientos preventivos previos se recogió la toma de antiagregación (y tipo), anticoagulación (y tipo) y de estatinas.

En la analítica habitual realizada en urgencias y en la analítica tras el ingreso se recogieron las variables urea, creatinina, perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos), glucemia en ayunas, insulinemia basal, hemoglobina glicosilada, prealbúmina y proteína C reactiva.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

A todos los pacientes se le realizó un TAC cerebral multimodal previo al tratamiento endovascular incluyendo secuencias de TAC simple, TAC perfusión y angioTAC, recogiendo las variables de ASPECTS basal, volumen del core, volumen de la hipoperfusión y de la penumbra (mediante el software RAPID), lugar de la oclusión arterial y grado de colaterales. Se registró el uso de fibrinolítico endovenoso previo a la trombectomía, así como las variables en relación a dicho procedimiento endovascular (punción femoral, recanalización arterial final según la escala TICI, uso de stent) y el lugar de ingreso inmediato del paciente. A las 24 h $\pm$ 12 h tras la trombectomía se realizó un TAC cerebral de control para evaluar la existencia de transformación hemorrágica y para medir el volumen final del infarto (según la fórmula $A \times B \times C / 2$).

Se evaluó clínicamente al paciente con la escala NIHSS al ingreso, y cada 24 h o antes si existía empeoramiento clínico. Asimismo, se recogieron todos los tiempos de intervención (tiempo desde el inicio del ictus a la llegada al hospital, tiempo a la neuroimagen, tiempo hasta la punción femoral, tiempo hasta la recanalización)

A todos los pacientes se les extrajo tras el ingreso una muestra de plasma, suero y sangre total que se almacenó en el biobanco del ISPA (Instituto de Investigación Biosanitaria del Principado de Asturias) para los análisis de los metabolitos indicados más adelante (metabolitos de la vía de la colina, citoquinas inflamatorias, resistina, adiponectina y leptina). Además, a las 24 h-48 h del ingreso y a los 7 días del ingreso (o antes si se producía el alta), se extrajo una muestra de plasma para la determinación de las células progenitoras endoteliales circulantes (CPEs) en la Unidad de Citometría de Flujo del ISPA.

EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

En todos los pacientes se registró el peso y altura al ingreso para el cálculo del IMC [con la fórmula (peso/altura en m²)] y se realizó la medición de la cintura abdominal.

En la valoración del estado nutricional se utilizaron las escalas Mini Nutritional Assessment (MNA) y la escala Malnutrition Universe Screening Tool (MUST). La escala MNA tiene una puntuación mínima de 0 puntos y máxima de 14 y se agrupa a los sujetos en tres grupos según los resultados obtenidos: malnutrición confirmada (0 - 7 puntos), en riesgo de malnutrición (8 - 11 puntos) y estado nutricional normal (12 - 14 puntos). Por su parte, la escala MUST abarca una puntuación de entre 0 hasta 6 puntos; al igual que la MNA, clasifica a los sujetos en 3 categorías según el resultado obtenido: riesgo bajo de malnutrición (0 puntos), riesgo medio de malnutrición (1 punto), riesgo alto de malnutrición (2 ó más puntos). Se creó una tercera variable unificando aquellos pacientes en riesgo de malnutrición o con malnutrición confirmada en alguna de estas escalas.

Ambas escalas se recogen en el **Anexo 1**.

■ EVALUACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO

Para la definición de síndrome metabólico se utilizaron los criterios de la NCEP ATP III. Los pacientes tenían que cumplir 3 de los 5 criterios propuestos: perímetro de cintura abdominal superior o igual a 102 cm en hombres u 88 en mujeres, hipertensión arterial (> 130/85 mmHg), triglicéridos elevados (>= 150 mg/dl), descenso del HDL-colesterol (<= 40 mg/dl en hombres o 50 en mujeres) y glucemia basal alterada (>= 100 mg/dl) o toma de medicación para la DM²⁷⁷.

■ EVALUACIÓN DE LA DIETA

Para la evaluación de la dieta, se utilizó el cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 ítems utilizado en PREDIMED o MEDAS-14²⁷⁸, previamente descrita en la presente tesis. El cuestionario se administró al propio paciente o al familiar conviviente en referencia a la dieta habitual en los últimos 6 meses. Para facilitar la interpretación de los datos, categorizamos los resultados del cuestionario de 14-ítems en dos grupos tomando como referencia la mediana de nuestra cohorte: baja adherencia si < 9 puntos y alta adherencia para >= 9 puntos.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Para enriquecer la información sobre la dieta, se añadieron preguntas acerca de la frecuencia de consumo de alimento en cada una de los ítems, con 9 posibles respuestas (**Anexo 2**), similar a las opciones de respuesta disponibles en los cuestionarios de frecuencias de consumo de alimentos (FFQ) aplicados en los grandes estudios epidemiológicos poblacionales (52,279). Tal como se recomienda, la frecuencia de consumo de alimentos se convirtió a "consumo diario" (raciones por día) y "gramos/día", multiplicando el número de raciones diario por los gramos de cada ración (tomando como referencia los gramos por ración utilizados en el PREDIMED)⁵². En el caso de las bebidas, se utilizó como medida de referencia los centímetros cúbicos (cc) diarios y también los gramos de alcohol, para el caso del vino.

Se aplicó también un recordatorio dietético de 24 horas en que se recogieron todos los alimentos y bebidas ingeridas por el paciente en el día previo al ingreso (o día habitual en su defecto), como una medida de la ingesta habitual del paciente. Este recordatorio fue realizado por el paciente o por la persona conviviente y hacía referencia a la dieta realizada en el día previo al ingreso o dieta habitual (en caso de haber sido día especial). A partir de esos datos, se obtuvo la composición de macronutrientes de la dieta (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) y micronutrientes (ver en el apartado de resultados la tabla con los principales micronutrientes analizados) utilizando la calculadora nutricional IENVA (www.ienva.es). En el caso de los macronutrientes se convirtieron los gramos a kilocalorías ingeridas según la fórmula habitual (factor de conversión X4 para hidratos de carbono y proteínas; X9 para lípidos). Una vez pasado a Kcal se calculó el porcentaje de macronutrientes que suponían respecto al consumo calórico diario habitual.

ACTIVIDAD FÍSICA

En la evaluación de la actividad física, se utilizaron las escalas PASE y VREM previamente descritas y recogidas en el **Anexo 3**.

El resultado del PASE se expresó como la puntuación total obtenida en la escala (variable continua) y también se establecieron 3 grupos según la puntuación total y en base a las medias establecidas según las puntuaciones de estudios poblacionales: actividad baja (< 40 puntos), moderada (40 - 165) y alta (> 165).

El VREM se dicotomizó en dos grupos según los resultados obtenidos: sedentarios o moderadamente activos (VREM <2999 METS-min/14 días) y activos o muy activos (VREM >3000 METS-min/14 días). Puesto que estos valores están estandarizados y permiten una categorización sencilla de los pacientes, fueron estas las variables utilizadas para los análisis principales. Asimismo, se añadió una variable de sedentarismo, correspondiente a aquellos con una puntuación VREM <1250.

■ DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES CIRCULANTES

ÍNDICE HOMA

La RI se determinó con el Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), descrita por Matthew en 1985 [$\text{glucemia (mg/dl)} \times \text{insulina (mUI/ml)} / 405$]²⁸⁰.

METABOLITOS DE LA VÍA DE LA COLINA

La determinación de los metabolitos de la vía de la colina (colina, betaina y TMAO) se realizó mediante espectrometría de masas en la Universidad de Oviedo. Se resume a continuación el método utilizado.

INSTRUMENTACIÓN

Las separaciones cromatográficas se realizaron con un sistema Agilent 1290 Infinity II 2D-HPLC. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro de masas Agilent 6460 de triple cuadrupolo equipado con una fuente de electrospray con una corriente de chorro. Se utilizó el software OpenLab CDS Chemstation y MassHunter Acquisition (Agilent Technologies) para controlar el sistema de 2D-HPLC y el triple cuadrupolo, respectivamente. La primera dimensión incorporaba una bomba binaria 1290 Infinity conectada a un

4 MATERIAL Y MÉTODOS

automuestreador, un compartimento de columna con termostato y un detector de longitud de onda variable 1260 Infinity. Un 2-pos/4-port duo valve se utilizó para conectar las dos dimensiones y se acopló a válvulas selectoras que incluyen seis bucles de muestreo de 80 µl. Todas las soluciones y mezclas se prepararon gravimétricamente utilizando una balanza analítica modelo MS205DU (Mettler Toledo, Zürich, Suiza). Se utilizó una microcentrifuga Micro Star 17 (VWR International, Radnor, EE.UU.) para la centrifugación de las muestras de plasma y un mezclador vortex FB 15024 (Fisher Scientific, Hampton, NH, EE.UU.) para la homogeneización de las muestras y las soluciones de trabajo. El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación de agua Purelab Flex 3 (Elga Labwater, Lane End, Reino Unido). Se utilizó un concentrador centrifugo de vacío de ADN miVac (Genevac, Suffolk, Reino Unido) para eliminar los disolventes. Para el cálculo de las concentraciones de metabolitos se utilizaron los programas IDMS Microsoft Excel© e IsoPatrn©.

REACTIVOS Y MATERIALES

El clorhidrato de betaina, el cloruro de colina y el óxido N dihidratado de trimetilamina se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Los análogos marcados, el bromuro de colina (metil-¹³C) se adquirió en Sigma-Aldrich mientras que la betaina D11 e hidrato de trimetilamina-¹³C₃ N-óxido en Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá). El acetonitrilo y el metanol (Optima™ LC-MS Grade) se adquirió en Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). El formiato de amonio, de Fluka (Waltham, MA, EE.UU.). El ácido fórmico (98%) y el ácido trifluoroacético (99%) se adquirieron en Sigma-Aldrich.

Las muestras de suero se mezclaron, se alicuotaron y se almacenaron a -80 °C hasta que se realizaron los análisis para todos los procedimientos experimentales de desarrollo y validación.

ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUERO POR 2D-LC-MS/MS

Una cantidad de 0.065 g de una solución con los tres análogos marcados isotópicamente con 2, 2.5 y 1 µg g⁻¹ de betaina, colina y TMAO respectivamente, se añadió a

0.2 g de muestra de suero en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Las cantidades de muestra y estándares marcados se controlaron gravimétricamente con una balanza analítica. A continuación, la mezcla resultante se mezcló en un agitador durante 1 minuto para una homogeneización completa y se añadieron 300 µl de metanol para la precipitación de proteínas. Después, la solución se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un Eppendorf y se evaporó. A continuación, la muestra se reconstituyó con la fase móvil (agua 0.1% TFA) y se filtró a través de un filtro de jeringa de fluoruro de polivinilideno (13 mm de diámetro, 0.2 µm de tamaño de poro) antes de la inyección en el 2D- LC-MS/MS. La columna 1D fue una ZORBAX Eclipse Plus C18 de resolución rápida HD (3.0 x 50 mm, 1.8 µm, Agilent Technologies) mantenida a 35 °C. Las fases móviles A y B fueron TFA al 0.1% en agua y acetonitrilo. Se inyectó un volumen de muestra de 10 µl y el caudal se fijó en 0.4 mL min⁻¹. Antes de la inyección, la aguja se sometió a un ciclo de lavado durante 12 s con una mezcla de 25:25:25:25 acetoni-trilo/metanol/agua/isopropanol. El método cromatográfico de la primera dimensión mantuvo la composición inicial de la fase móvil 1%B durante 2 min. A continuación, se aplicó un gradiente lineal al 90%B hasta 4 minutos y se mantuvo durante 3 minutos y el gradiente se redujo hasta el 2%B durante 1 min. Por último, se aplicó la composición inicial de la fase móvil y se equilibró con la columna durante 4 min hasta completar las separaciones 2D. Teniendo en cuenta la coelución y el bajo tiempo de retención de los metabolitos en la columna C18, se almacenó una fracción de 80 µL de la fase móvil de la primera dimensión en el bucle de muestreo a los 0.84 min para transferirla a la segunda dimensión. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Zorbax 300-SCX (2.1 x 50 mm, 5 µm) suministrada por Agilent Technologies y también se mantuvo a 35 °C. Las fases móviles A y B fueron ácido fórmico al 0.1% ácido fórmico y 20% de metanol en agua y 0.1% de ácido fórmico, 20% de metanol y 15 mM de formiato de amonio en agua, respectivamente. El gradiente comenzó a 2%B durante 1 min y luego la composición de la fase móvil se incrementó linealmente a 70%B en 4 minutos, manteniéndose constante durante 1 minuto. Finalmente, se alcanzó la composición original de %B en 1 minuto y se mantuvo constante durante 4 minutos.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Se aplicó un tiempo de postanálisis de 2 minutos para equilibrar la columna. El tiempo total de ejecución fue de 14 minutos. El análisis 2D-LC-MS/MS se realizó utilizando ionización por electrospray de iones positivos en el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). El voltaje iónico se fijó en -2500 V. La temperatura del gas de secado se mantuvo a 250 °C. El caudal de gas de secado se fijó en 7 L/min, y la presión del nebulizador se fijó en 25 psi. Se seleccionó el ion molecular protonado $[M+H]^+$ como ion precursor para todos los compuestos. Las transiciones MRM adquiridas para el análogo natural y etiquetado fueron para la betaina 118 → 58, 119 → 59, 129 → 66, 130 → 67; para la colina, las transiciones MRM fueron 104 → 60, 105 → 61, 106 → 62 y TMAO 76 → 58, 77 → 59, 78 → 60, 79 → 61. El fragmentador se fijó en 110.70 y 60V. La energía de colisión optimizada se fijó en 30.18 y 20V, para betaina colina y TMAO, respectivamente.

ADIPOCINAS

Se evaluaron los niveles de adiponectina, leptina y resistina. Las tres determinaciones se realizaron en el laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario Central de Asturias mediante métodos comerciales.

Los niveles séricos de Leptina, Resistina y Adiponectina se determinaron mediante kits comerciales de análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) obtenidos de BioVendor R&D (Karasek, República Checa. Leptina: RD191001100; Resistina: RD191016100; Adiponectina: RD195023100), siguiendo las instrucciones de la casa comercial en un sistema automatizado Triturus (Grifols; Barcelona, España).

CITOQUINAS INFLAMATORIAS

Las muestras de sangre recogidas al ingreso en tubos de gel se centrifugaron a 3,600 rpm durante 10 minutos y el suero se conservó a -80 °C para su posterior análisis. Las concentraciones de interferón (IFN)- α 2, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 e IL-33 en suero se midieron en todas las muestras mediante un ensayo de

citometría de flujo multiplexado (LegendPLEX human inflammation panel 1 "13-plex", BioLegend, EE.UU.). Brevemente, justo antes del ensayo, todas las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron durante 5 minutos a 2500 RPM y se diluyeron 2 veces. Se realizó un ensayo LEGENDplex de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACS ARIA IIu (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) aplicando un láser de 488 nm con filtro 536/40 (BP) para el fluorocromo PE y un láser de 638 nm con filtro 675/20 (BP) para el fluorocromo APC. La concentración de cada factor de crecimiento/citoquina se determinó mediante una curva estándar generada durante la realización del ensayo.

CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES (CPES)

La determinación de las CPES se realizó en la Unidad de Citometría de Flujo del Instituto de Investigación Biosanitaria del Principado de Asturias (ISPA) según métodos descritos previamente²⁸¹. Las muestras de sangre, tal como se describió previamente, se obtuvieron al ingreso y al séptimo día o al alta, si éste fue antes de cumplirse los 7 días. Las muestras fueron procesadas en las 1 - 2 horas siguientes a la recogida por un único investigador que no tenía conocimiento de los resultados clínicos o radiológicos de los pacientes. En resumen, se analizó la expresión de antígenos de superficie específicos de las CPES circulantes mediante citometría de flujo directa. Las células se marcaron con anti-CD45 conjugado con PE- Cy7 (Biolegend, San Diego, EE.UU.), anti-CD34 conjugado con FITC (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), anti-KDR conjugado con PE y anti-CD133 conjugado con APC (Immunostep, Salamanca, España). Antes de lisar los eritrocitos con solución de lisis FACS (BD) y sin lavar las muestras se analizaron en un citómetro FACS Aria IIu (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

Se consideraron CPES las células con triple tinción CD133+/CD34+/KDR+ en la fracción de células mononucleares. El recuento de células se expresó siempre por 10^6 eventos. Se determinó el "incremento" de CPES cuando los niveles a los 7 días fueron superiores a los niveles basales.

EVALUACIÓN COGNITIVA

Para la evaluación cognitiva durante el ingreso y a los 3 meses, se utilizó un test de MOCA o en su defecto un test del informador en su versión reducida (IQCODE) si el primero no se pudo aplicar (limitaciones motoras o trastorno del lenguaje, imposibilidad para desplazarse presencialmente a la consulta, situación clínica). Ambas escalas se recogen en el **Anexo 4**.

Se consideraron como patológicos a tres meses aquellos con puntuación MOCA <26 puntos. En aquellos en los que no fue posible realizar un MOCA, se consideraron alteradas puntuaciones en el IQCODE >3.3²⁸².

EVALUACIÓN DEL PRONÓSTICO FUNCIONAL

La evaluación del pronóstico funcional a los 3 meses del ictus se realizó mediante la escala Rankin modificada (mRS, **Anexo 5**), que comprende 6 valores, desde el 0 (ningún tipo de secuela ni afectación funcional) hasta el 6 (fallecimiento). La evaluación se hizo de forma presencial siempre que fue posible.

DEFINICIÓN DE VARIABLES PRONÓSTICAS PRINCIPALES

La gravedad inicial del ictus se evaluó mediante la escala NIHSS previo a la trombectomía, que se describe en el **Anexo 6**. El volumen inicial de la lesión y la hipoperfusión se calcularon usando el volumen (ml) del core del infarto y de la hipoperfusión determinados por el software RAPID (CBF<30% y Tmax 6 s respectivamente). La penumbra se calculó como la resta entre los anteriores volúmenes (ml).

Para la estimación del grado de colateralidad se utilizó la escala automatizada del software Brainomix que categoriza en 4 posibles grupos según las mismas: 0%, 0 - 50%, 50 - 90% y >90%. Para simplificar los análisis, se agruparon en dos variables que llamamos "malas colaterales" si eran <50% o "buenas colaterales" si eran >50%.

Para determinar la recanalización exitosa, se utilizó el conocido como "efecto primer pase" (FPE) que equivale a la recanalización completa (TICI 3), tras un solo pase del dispositivo extractor.

La mejoría neurológica precoz se determinó como la reducción de 4 puntos o más en la escala NIH a las 24 horas respecto a la basal y la mejoría dramática precoz, como la disminución de 10 puntos o más o una puntuación de 0 - 1.

El volumen del infarto se calculó en el TC de control tras la trombectomía, realizado en las 24 +/- 12 horas siguientes al tratamiento, mediante la fórmula $A \times B \times C / 2$ y con los resultados expresados en centímetros cúbicos. En este TC se evaluó también la presencia o no de transformación hemorrágica y el tipo. La transformación hemorrágica se consideró "sintomática" cuando se trató de un hematoma parenquimatoso con empeoramiento de 4 o más puntos en la escala NIHSS o empeoramiento funcional significativo (según definición de Heidelberg)²⁸³.

Se valoró el pronóstico funcional mediante la escala de Rankin modificada (mRS) a los 3 meses. Los pacientes fueron categorizados a "buen pronóstico funcional" cuando el mRS fue de 0 - 2 y a "pronóstico funcional excelente" cuando alcanzaron valores 0 o 1 en la mRS a los 3 meses.

Finalmente, se clasificó a los pacientes con deterioro cognitivo a los 3 meses en función de los resultados de los test administrados (MOCA < 26 o IQCODE >3.3).

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

MODELO ANIMAL

El tamaño de la muestra se calculó con el programa informático EPIDAT (<http://www.sergas.es/Saude-publica/EPIDAT-4-2>), sobre la base de $\alpha = 0.05$ y una potencia de $\beta = 0.8$. El análisis estadístico se realizó con Prism 8 (GraphPad software, La Jolla, CA). Los datos se presentaron como media $\pm$ E.S.M. La normalidad de los datos se determinó mediante dos pruebas diferentes en función de los números n: la prueba ómnibus de D'Agostino-Pearson cuando los números n eran iguales o superiores a 10, y la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk cuando los números n eran inferiores a 10. Los datos con comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA unidireccional o la prueba de Kruskal-Wallis cuando procedía, y pruebas post hoc de comparaciones múltiples de Dunn. Los datos de peso se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas de dos vías con prueba post hoc de Dunnett. El análisis de correlación se evaluó con la prueba del coeficiente de correlación de Spearman. El nivel de significación se fijó en 0.05. En las figuras, los valores de significación se representaron con distintos números de asteriscos: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

ESTUDIO CLÍNICO

Se creó una base de datos prospectiva con la información clínica, radiológica, de laboratorio y resultados de las escalas de todos los pacientes. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 24.0 (SPSS Inc. Chicago IL USA) para IOS.

Los resultados se representaron mediante el valor absoluto y porcentaje para las variables categóricas y como la media y desviación estándar (DE) para las variables continuas de distribución normal o con la mediana y rango intercuartílico para las que no seguían una distribución normal. La comparación bivariada entre grupos se utilizó el test Chi-cuadrado para variables categóricas, t-Student para variables cuantitativas de distribución normal y U-Mann-Whitney para variables cuantitativas que no seguían una distribución normal. Para establecer la correlación entre variables cuantitativas,

se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) para las variables que seguían una distribución normal o el de Spearman (sp), para las que no seguían una distribución normal.

Los análisis multivariados se realizaron teniendo en cuenta las variables habituales asociadas con los factores pronósticos estudiados y con las que se asociaron de forma significativa en los análisis univariados. Los resultados se expresaron como odds ratio ajustadas con los correspondientes intervalos de confianza del 95%.



RESULTADOS



5.1. MODELO ANIMAL

Los resultados principales del modelo animal desarrollado en esta tesis han sido publicados en una revista del primer decil durante la elaboración de la misma, siendo la doctoranda co-primer autora: Romaus-Sanjurjo D, Castañón-Apilánez M, et al. *Neuro-protection Afforded by an Enriched Mediterranean-like Diet Is Modified by Exercise in a Rat Male Model of Cerebral Ischemia*. Antioxidants (Basel). 2024 Jan 23;13(2):138. doi: 10.3390/antiox13020138. PMID: 38397735; PMCID: PMC10885962.

5.1.1. ANIMALES INCLUIDOS

Se incluyeron un total de 72 ratas SD en el estudio, de las cuales 27 fueron excluidas (13 por complicaciones asociadas a la cirugía, 8 por una reducción de flujo en ACM inferior al 70% respecto al basal, 4 por volúmenes de infarto en DWI inferiores al 25% y 2 por lesiones muy extensas en DWI, >45%). El porcentaje de exclusión fue del 38.03%.

Por tanto, se incluyeron finalmente un total de 45 ratas que se aleatorizaron a los siguientes grupos: SHAM (n = 5); grupo "control" (dieta normal y sin actividad física), n = 10; grupo "dieta" (dieta "estilo mediterráneo" y sin actividad física), n = 10; grupo "actividad física" (actividad física y con dieta normal), n = 10; grupo "actividad física/dieta" (sometidas a ambas intervenciones, dieta "estilo mediterráneo" y actividad física), n = 10.

No se encontraron diferencias significativas en la evolución del peso de los animales, aunque el grupo "dieta" fue el que menor ganancia ponderal experimentó durante el seguimiento, tal como se observa en la **Figura 11**. En todos los grupos, se produjo una pérdida ponderal posterior a la tMCAO que fue recuperándose en los seguimientos posteriores.

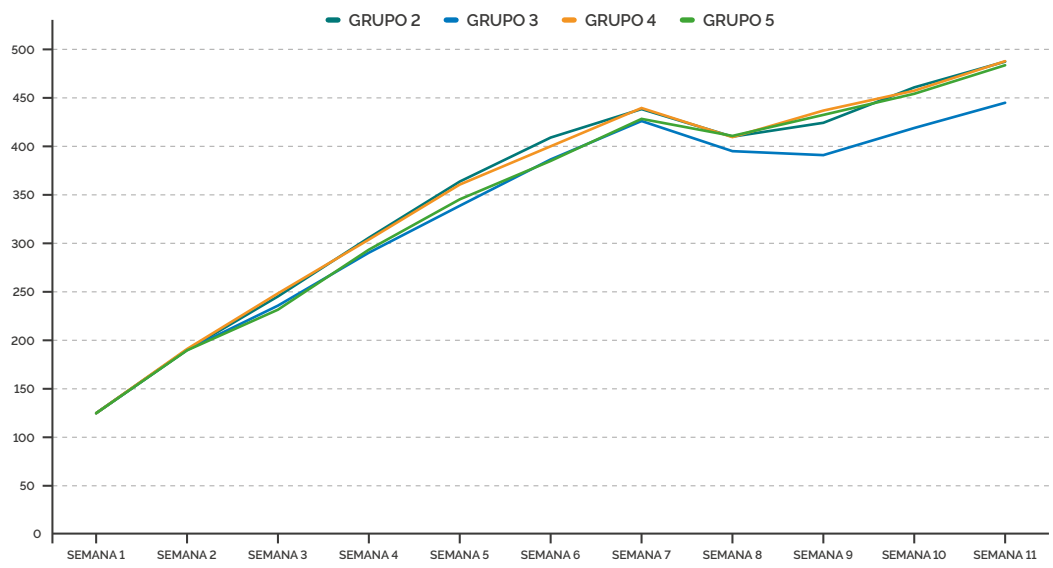


Figura 11: Evolución del peso de los animales incluidos.

Grupo 2: control; **grupo 3:** dieta; **grupo 4:** actividad física; **grupo 5:** actividad física + dieta.
El peso (eje ordenadas) se expresa en gramos.

**5.1.2. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y ACTIVIDAD FÍSICA
SOBRE EL VOLUMEN FINAL DEL INFARTO**

El análisis y la cuantificación de las imágenes de RM mostraron que las ratas de todos los grupos partieron de un volumen de infarto inicial similar (medido en secuencia DWI de la RM). En el tercer día, el grupo "dieta" es el único que experimenta una reducción respecto al grupo control, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. A partir del séptimo día se observó una tendencia a una mayor reducción en el volumen de infarto en todas las intervenciones respecto al control, especialmente en el grupo "dieta" a los 14 días ($p = 0.17$) (**Figura 12**). En el caso del grupo "actividad física", a los 3 días observamos volúmenes similares al "control", disminuyendo en los seguimientos posteriores. Finalmente, no observamos un efecto sinérgico entre ambas intervenciones "actividad física/dieta" en la reducción del volumen del infarto.

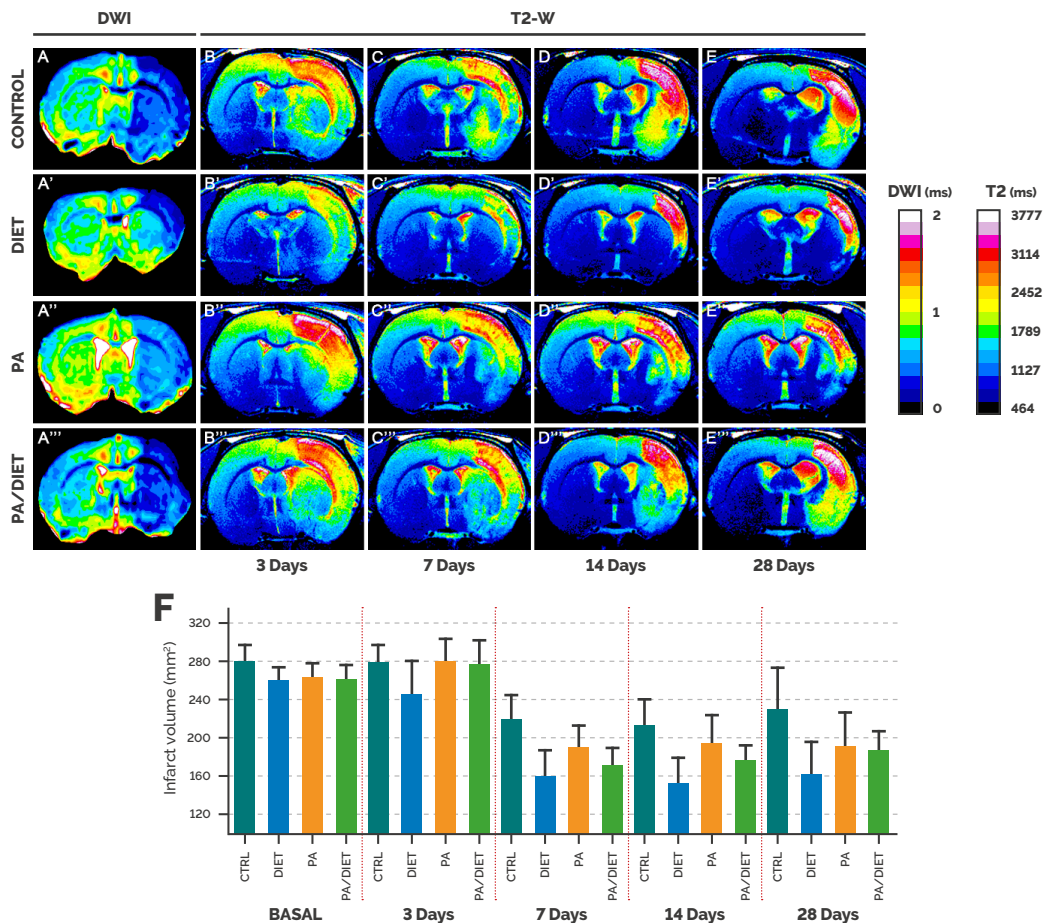


Figura 12: Volumen del infarto en los distintos grupos de intervención.

En la primera parte de la imagen (superior), se representan cortes de RM en los distintos momentos de evaluación mostrando la evolución de la lesión isquémica visible en la neuroimagen (la primera columna muestra la secuencia de DWI para medición del volumen inicial o basal de la lesión tras la oclusión de ACM y el resto de columnas muestran las secuencias potenciadas en T2 a los 3, 7, 14 y 28 días).

En la segunda parte de la imagen (inferior, F): Volumen del infarto en ml de cada grupo y en cada punto temporal. Se observa una reducción no significativa del volumen en todas las condiciones, comparados con el control, en los sucesivos seguimientos (medias±DE). Se representan los grupos **CTRL**: control; **DIET**: "dieta" (mediterránea); **PA**: "actividad física"; **PA/DIET**: "actividad física/dieta".

En conjunto, concluimos que todas las intervenciones parecen tener un efecto positivo sobre el volumen del infarto respecto al grupo control, especialmente la dieta estilo mediterráneo.

5.1.3. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y ACTIVIDAD FÍSICA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA

Para determinar los efectos de la actividad física y de la dieta estilo mediterráneo en la respuesta inflamatoria, se analizaron las muestras de plasma recogidas antes (medición basal) y después de la isquemia en diferentes puntos temporales (1 hora, 3 días, 7 días, 14 días y 28 días) (**Figura 13** y **Anexo 7**).

Comparación de citocinas/quimiocinas entre el grupo dieta y el grupo control

Tal y como se observa en la tabla del **Anexo 7** y la **Figura 13**, en la determinación basal (previa a la isquemia) los niveles de 14 citocinas/quimiocinas inflamatorias resultaron significativamente más bajos en el grupo "dieta" en comparación con el grupo "control": factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) ($p = 0.0075$), eotaxina (citocina quimiotáctica de eosinófilos) ($p = 0.0043$), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α ($p = 0.006$), MIP-2 ($p = 0.0314$), interleucina (IL)-1 α ($p = 0.0055$), IL-1 β ($p = 0.0115$), IL-4 ($p = 0.0064$), IL-5 ($p < 0.0001$), IL-6 ($p = 0.0075$), IL-12p70 ($p = 0.0002$), IL-13 ($p = 0.0158$), IL-17 ($p = 0.0023$), IL-18 ($p = 0.0086$) e interferón gamma (IFN γ) ($p = 0.0091$). De estas citocinas/quimiocinas, en el grupo "dieta", el G-CSF y las interleucinas 1 α , 4, 5, 12p70 y 13 se mantuvieron con niveles más bajos que el grupo control en todos los puntos temporales, siendo las diferencias estadísticamente significativas no sólo a nivel basal, sino también una hora post-isquemia y a los 3 días post-isquemia. Los niveles de IFN γ fueron más bajos en el grupo "dieta" que en el grupo "control" en todos los puntos temporales, siendo estas diferencias estadísticamente significativas a la hora, a los 3 días y también tardíamente, a los 28 días post-isquemia. En cuanto al factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la IL-2, los niveles fueron significativamente más bajos en el grupo "dieta" sólo tardíamente, a los 28 días post isquemia.

Por tanto, parece que los animales alimentados con dieta "estilo mediterráneo" previo al insulto isquémico presentaban a nivel basal un estado menos inflamatorio que

las ratas control, manteniendo a la baja muchas interleucinas en la fase inicial de la isquemia y hasta 7 días después. En cuanto a la respuesta inflamatoria tardía a los 28 días, se observaron niveles más bajos de IFN γ , IL-2 y GM-CSF (**Anexo 7** y **Tabla 6**).

Comparación de citocinas/quimiocinas entre el grupo actividad física y el grupo control

En el momento basal (previo a la isquemia), en el grupo de "actividad física" se observó que 6 mediadores inflamatorios presentaban niveles significativamente inferiores a los del grupo control: IL-1 α ($p = 0.0156$), IL-1 β ($p = 0.0494$), IL-5 ($p = 0.0085$), IL-12p70 ($p = 0.0098$), IL-17 ($p = 0.0362$) e IFN γ ($p = 0.0457$) (**Figura 13** y **Anexo 7**). De estas interleucinas, la IL-1 α permaneció más baja que en el grupo "control" en todos los puntos temporales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa de nuevo a los 28 días post-isquemia. La IL-1 β tuvo un comportamiento diferente, siendo sus niveles superiores a los del grupo control a partir de la primera hora y hasta los 28 días post isquemia, cuando los niveles volvieron a ser inferiores al grupo control (diferencias no significativas). La IL-5 y la IL-12p70 permanecieron con niveles inferiores en el grupo de "actividad física" respecto al "control" en todos los puntos temporales, siendo también significativa esta diferencia a los 3 días post isquemia. La IL-17 permaneció con niveles más bajos en el grupo de actividad física hasta los 7 días, siendo también significativa esta diferencia a los 3 días post isquemia, y a partir del séptimo día se asemejaron al grupo control. Finalmente, el IFN γ permaneció con niveles más bajos en todos los puntos temporales, siendo la diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control de nuevo a los 28 días post-isquemia.

Además, en el grupo de "actividad física", la IL-2 mostró niveles inferiores previo a la isquemia (NS) y posteriormente de forma significativa a los 7 y a los 28 días. De forma similar, se observaron niveles inferiores de MIP-1 α en el grupo de "actividad física" respecto al "control", siendo estas diferencias estadísticamente significativas a los 3, 7 y 28 días post-isquemia. Por último, el GM-CSF se mantuvo en niveles inferiores al grupo control, siendo la diferencia significativa sólo a los 28 días.

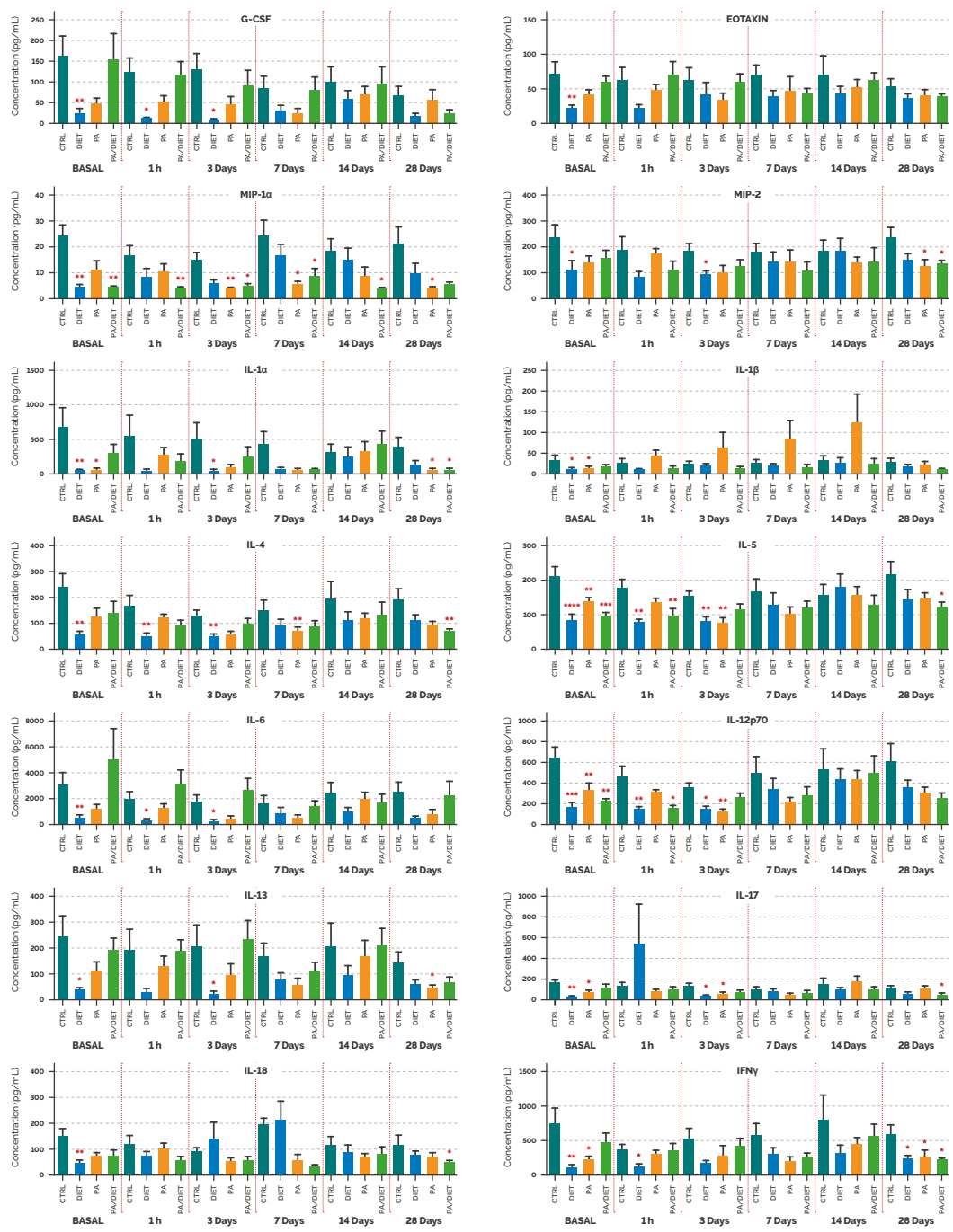


Figura 13: Concentraciones de las distintas citoquinas/quimiocinas analizadas en los distintos momentos de evaluación.

Se representan las concentraciones plasmáticas en forma de media +/- ESM. Se hicieron comparaciones en cada punto temporal con el grupo "control". * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. Los datos crudos se representan en la tabla del **Anexo 7**.

Comparación de citocinas/quimiocinas entre el grupo actividad física+dieta y el grupo control

Finalmente, respecto al grupo control, en el grupo de “actividad física+dieta” se observaron niveles significativamente menores de 3 citocinas/quimiocinas en el momento basal y una hora post-isquemia: MIP-1α (p = 0.0035), IL-5 (p = 0.0002) e IL-12p70 (p = 0.0022) (**Figura 13, Anexo 8**). La MIP-1α permaneció con niveles significativamente más bajos respecto al control en todos los puntos temporales, excepto a los 28 días (tendencia). La IL-5 permaneció con niveles significativamente más bajos que en el grupo control a la hora y a los 28 días post-isquemia.

Además, la IL-18, si bien no mostró diferencias significativas a nivel basal (previo a la isquemia) ni en las primeras fases, sí fue significativamente inferior que en el grupo “control” a los 7 y a los 28 días. De forma similar, los niveles de IFNγ y GM-CSF fueron significativamente inferiores a los 28 días post-isquemia.

	BASAL	1 HORA	3 DÍAS	7 DÍAS	14 DÍAS	28 DÍAS
DIETA estilo mediterráneo	G-CSF, eotaxina, MIP1a, MIP2, IL1a, IL1b, IL4, IL5, IL6, IL12p70, IL13, IL17, IL18, IFNγ	G-CSF, IL4, IL5, IL6, IL12p70, IFNγ, MCP1	G-CSF, MIP2, IL1a, IL4, IL5, IL6, IL12p70, IL13, IL17			GM-CSF, IL2, IFNγ
ACTIVIDAD FÍSICA	IL1a, IL1b, IL5, IL12p70, IL17, IFNγ		MIP1a, IL4, IL5, IL12p70, IL17, LIX	MIP1a, IL2		MIP1a, GM-CSF, leptina, MIP2, IL1a, IL4, IL5, IL17, IL18, IFNγ
DIETA + ACTIVIDAD FÍSICA	MIP1a, IL5, IL12p70	MIP1a, IL5, IL12p70	MIP1a	MIP1a, IL2, IL18, fractalkina	MIP1a	GM-CSF, MIP2, IL1a, IL4, IL5, IL17, IL18, IFNγ

Tabla 6: Resumen de los hallazgos principales en los niveles de citoquinas circulantes.

Se representan las que experimentan una reducción estadísticamente significativa en cada grupo de intervención respecto al grupo control y en cada punto temporal.

En resumen, las citocinas/quimiocinas MIP-1α, IL-5 y IL-12p70 se vieron reguladas a la baja en los tres grupos de intervención (“dieta”, “actividad física” y “actividad física+dieta”) respecto al grupo control, especialmente en las primeras fases post-isquemia (hasta el séptimo día). En la fase tardía (28 días), se vieron reducidos los niveles de GM-CSF e IFNγ en los tres grupos de intervención frente al grupo control. En la **Tabla 6** se resumen

5 RESULTADOS

las citocinas en las que se observó una reducción significativa respecto al control en los distintos puntos temporales.

En la **Figura 14** se representan los resultados del 8-OHdG como marcador de estrés oxidativo (daño oxidativo del ADN). Se puede observar cómo el grupo control tiene en el momento basal (previo a la isquemia) niveles más altos de este metabolito que en los grupos de intervención, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En los grupos “dieta” y “actividad física” el estrés oxidativo permaneció inferior que en el grupo control a los 3 y 7 días, y por su parte, el grupo “actividad física+dieta” presentó niveles más altos de 8-OHdG a los 7 y 28 días, y este aumento fue estadísticamente significativo en comparación con el grupo dieta ($p = 0.0199$).

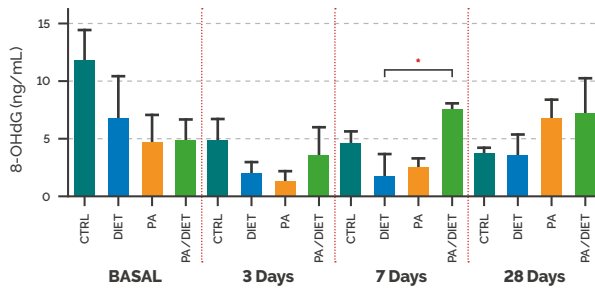


Figura 14: Estrés oxidativo: Concentraciones de 8-OHdG en los distintos momentos evaluados.

Se representan las concentraciones plasmáticas en forma de media $\pm$ ESM.
* $p = 0.0199$. Se incluyeron para el análisis 6 ratas por cada grupo.

En resumen, las ratas alimentadas con “dieta estilo mediterráneo” mostraron, respecto al grupo control, los niveles más bajos de citocinas/quimiocinas inflamatorias antes de la isquemia (14 de 27 citoquinas) y mantuvieron a la baja la respuesta inflamatoria aguda fundamentalmente en las fases iniciales post isquemia, hasta 7 días después de la lesión. Las ratas del grupo de “actividad física” presentaron también, aunque en menor medida, una respuesta inflamatoria menor a nivel basal (6 de las 27 citocinas), al igual que las del grupo “actividad física+dieta” (3 de 27 citocinas). En cuanto a la respuesta inflamatoria tardía a los 28 días, se observaron

niveles significativamente más bajos de IFN γ y de GM-CSF en todos los grupos de intervención, comparados con el grupo control.

En cuanto al estrés oxidativo, se observó que las tres intervenciones condicionaron un ambiente menos oxidativo previo a la isquemia, comparadas con el grupo control, y que en el grupo dieta este ambiente oxidativo fue menor hasta los 7 días post isquemia, si bien estas diferencias no fueron significativas. Llamativamente, el grupo de "actividad física+dieta" presentó a partir de los 7 días unos niveles de 8-OHdG superiores al grupo control, y significativamente superiores al grupo dieta.

5.1.4. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y ACTIVIDAD FÍSICA EN LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS

Analizamos los niveles de células progenitoras circulantes (CPC), identificadas como CD34 positivas (CD34+); células progenitoras hematopoyéticas (CPH), etiquetadas como CD34 y CD43 positivas (CD34+/ CD43+); y células progenitoras endoteliales (CPEs), positivas a CD34, ckit y KDR, mediante citometría de flujo.

En la **Figura 15** se representa la evolución el número de células progenitoras CD34+. Tal y como se representa, si bien parece observarse un repunte en el número de CPCs y CPHs una hora tras la isquemia en el grupo "dieta", a los 3 días en el grupo "actividad física+dieta" y a los 7 días en el "control", ninguna diferencia fue significativa entre los distintos grupos.

En cuanto a las CPEs, encontramos que el grupo "dieta" tenía un número significativamente menor de estas células respecto al grupo control en el momento pre-isquemia ($p = 0.0291$) (**Figura 15A**) y fue el único grupo que experimentó un incremento significativo en el número de estas células respecto a los valores basales (mayor movilización) una hora tras la isquemia ($p = 0.012$) (**Figura 15B**). Este incremento se mantuvo en los seguimientos posteriores (especialmente a los 7 y a los 28 días), si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control.

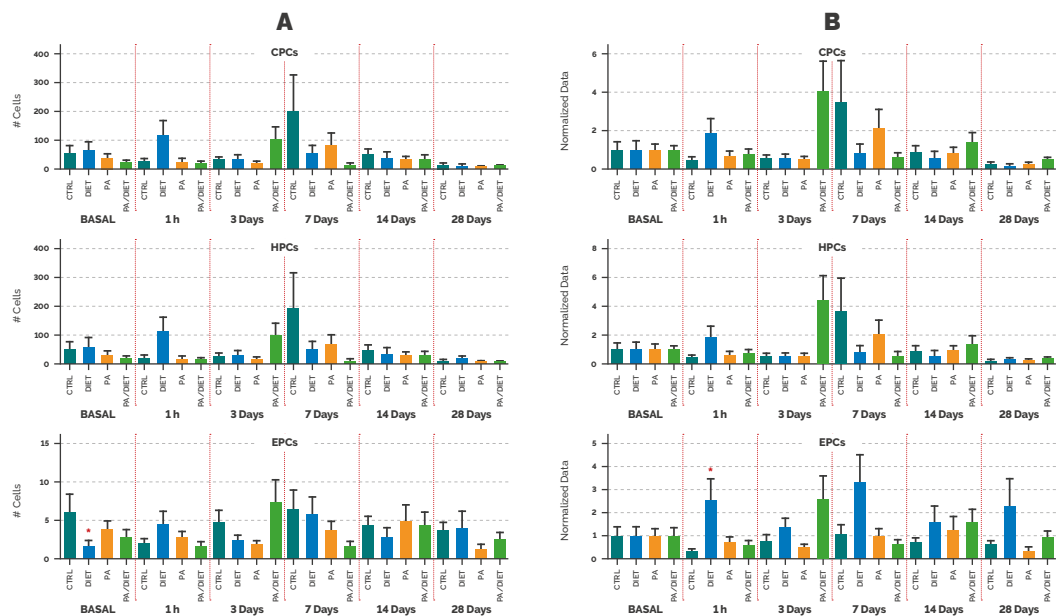


Figura 15: (A) Evolución del número de células progenitoras CD34+ en cada momento de evaluación: células progenitoras circulantes (CPC), células progenitoras hematopoyéticas (HPC) y células progenitoras endoteliales (EPC) (cuenta de 250000 células en cada una). Los datos representados en cada momento de evaluación son comparativos vs. el grupo "control". Se representan los datos como media +/- ESM.

(B) Valores normalizados respecto a la cifra basal. Comparativas realizadas frente al grupo "control". * p < 0.05. Se incluyeron un total de 10 ratas por cada grupo hasta el día 14 y 7 de cada grupo a los 28 días.

5.1.5. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y LA ACTIVIDAD FÍSICA EN LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL

En el análisis de los test funcionales, cuyos resultados se resumen en la **Figura 16**, observamos que el grupo "dieta" es el que obtiene puntuaciones más bajas (y por tanto, mejores) en el test de Bederson en todos los seguimientos, especialmente a los 3 días, donde la diferencia respecto al control está próxima a la significación estadística (p = 0.054). Los otros dos grupos de intervención, "actividad física" y "actividad física + dieta", obtuvieron resultados similares a los controles. En el test de Wahl, aunque sin haber encontrado diferencias significativas, sí que se observó que el grupo "dieta" fue el que mejor puntuación obtuvo a los 3 días, aunque en seguimientos posteriores tendieron a igualarse todos los grupos.

En la prueba del cilindro, observamos que los grupos "actividad física" y "actividad física+dieta" tenían las peores puntuaciones tanto en el uso de la extremidad afecta como en el índice de lateralidad desde los 3 hasta los 14 días de seguimiento, aunque estas diferencias no fueron significativas (**Figura 16C y 16D**). El grupo "dieta" obtuvo puntuaciones similares al grupo control hasta 28 días después de la lesión, donde mejoró los resultados, al igual que el grupo "actividad física" (**Figura 16C y 16D**).

En resumen, se observó que el grupo alimentado con dieta "estilo mediterráneo" mostró una tendencia a una mejor recuperación funcional en los primeros días tras el ictus, algo que no se observó en el grupo que combinó la dieta "estilo mediterráneo" con actividad física.

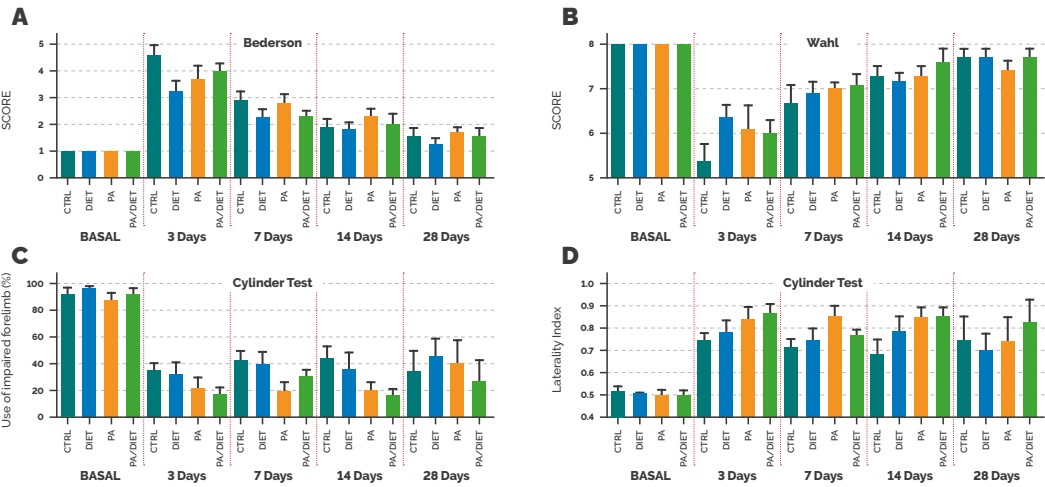


Figura 16: (A) Puntuaciones en el test de Bederson; **(B)** Puntuaciones en el test de Wahl; **(C)** Puntuaciones en el test del cilindro (porcentaje de utilización de la extremidad afecta respecto al total); **(D)** Puntuaciones en el test del cilindro (índice de lateralidad).

Los análisis en cada punto representado se realizaron vs. el grupo "control".

Se muestran los datos como medias $\pm$ ESM. Se incluyeron un total de 10 ratas por cada grupo hasta los 14 días y 7 por grupo a los 28 días.

5.1.6. EFECTO DE LA DIETA ESTILO MEDITERRÁNEO Y ACTIVIDAD FÍSICA EN LOS ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS

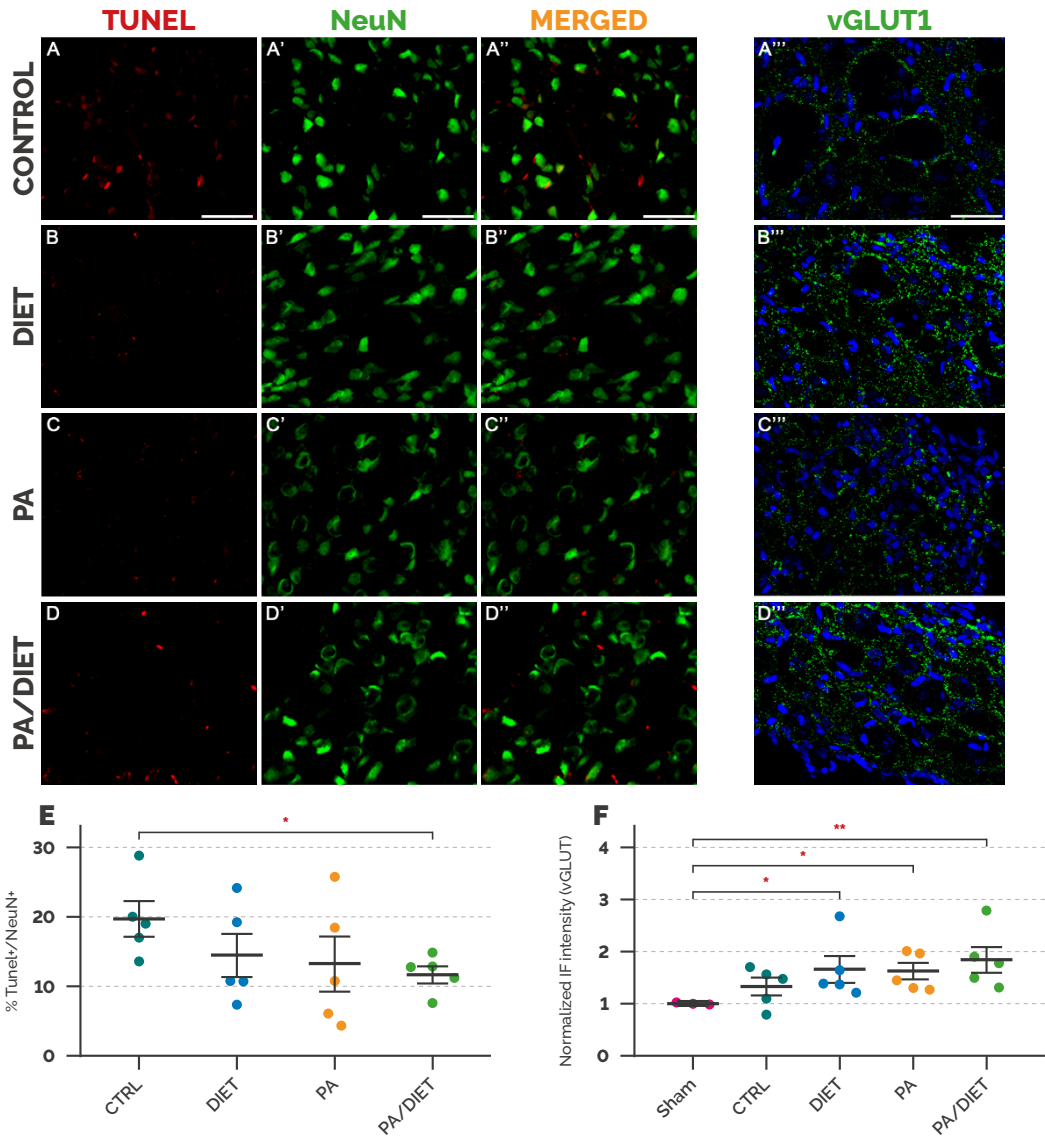


Figura 17: Imágenes del marcaje TUNEL (A-D), NeuN (A'-D') y vGLUT1 (A'''-D''') en la región periinfarto de los distintos grupos. (E) Cuantificación del porcentaje de células NeuN+ con el marcaje TUNEL, * p = 0.0149. (F) Cuantificación de la inmunorreactividad de vGLUT1, * p = 0.0153 (grupo dieta), ** p = 0.0376 (grupo "actividad física").

Escala de las barras: 100 microm. Los datos se representan como medias +- ESM.

Se incluyeron para los análisis un total de 3 ratas sham y 5 de cada uno de los otros grupos.

TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA Y MUERTE NEURONAL

En el análisis del TUNEL en células NeuN⁺ en las capas corticales V/VI, se detectó menos muerte neuronal apoptótica en todos los grupos de intervención frente a los controles, aunque esta diferencia sólo fue significativa en el grupo de "actividad física+dieta" ($p = 0.0149$) (**Figura 17A-C''', E**). Además, observamos una mayor inmunoreactividad de vGLUT1 en las capas corticales V y VI de la región periinfarto en los grupos de intervención frente a los grupos control y sham a los 28 días, aunque estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas al compararlos con el grupo sham (Grupo Dieta: $p = 0.0153$; Grupo AF: $p = 0.0376$; Grupo AF+Dieta: $p = 0.0030$) (**Figura 17D-D''', F**).

En conjunto, todas las condiciones experimentales fueron capaces de aumentar el número de neuronas piramidales glutamatérgicas corticales cerca de la lesión, y esto fue especialmente notable en el grupo "actividad física+dieta".

VASCULOGÉNESIS/ANGIOGÉNESIS Y NEUROGÉNESIS

Para el análisis de la angiogénesis se utilizó la medición del número de vasos CD31⁺/Ki67⁺ y área CD31⁺ en la zona subventricular. Nuestros resultados, representados en la **Figura 18**, mostraron que, a los 28 días, el grupo "actividad física" incrementó notablemente el número de vasos CD31⁺/Ki67⁺ en la zona subventricular (ZSV), no sólo comparado con los grupos sham y control ($p = 0.0071$ y $p = 0.0446$, respectivamente) sino también comparado con el grupo "dieta" ($p = 0.0018$). Además, estos resultados concordaron con las mayores áreas CD31⁺ observadas en todos los grupos de intervención en comparación con los controles. En definitiva, nuestros resultados pueden sugerir la existencia de una mayor reparación vascular en el grupo "actividad física" después de la tMCAO.

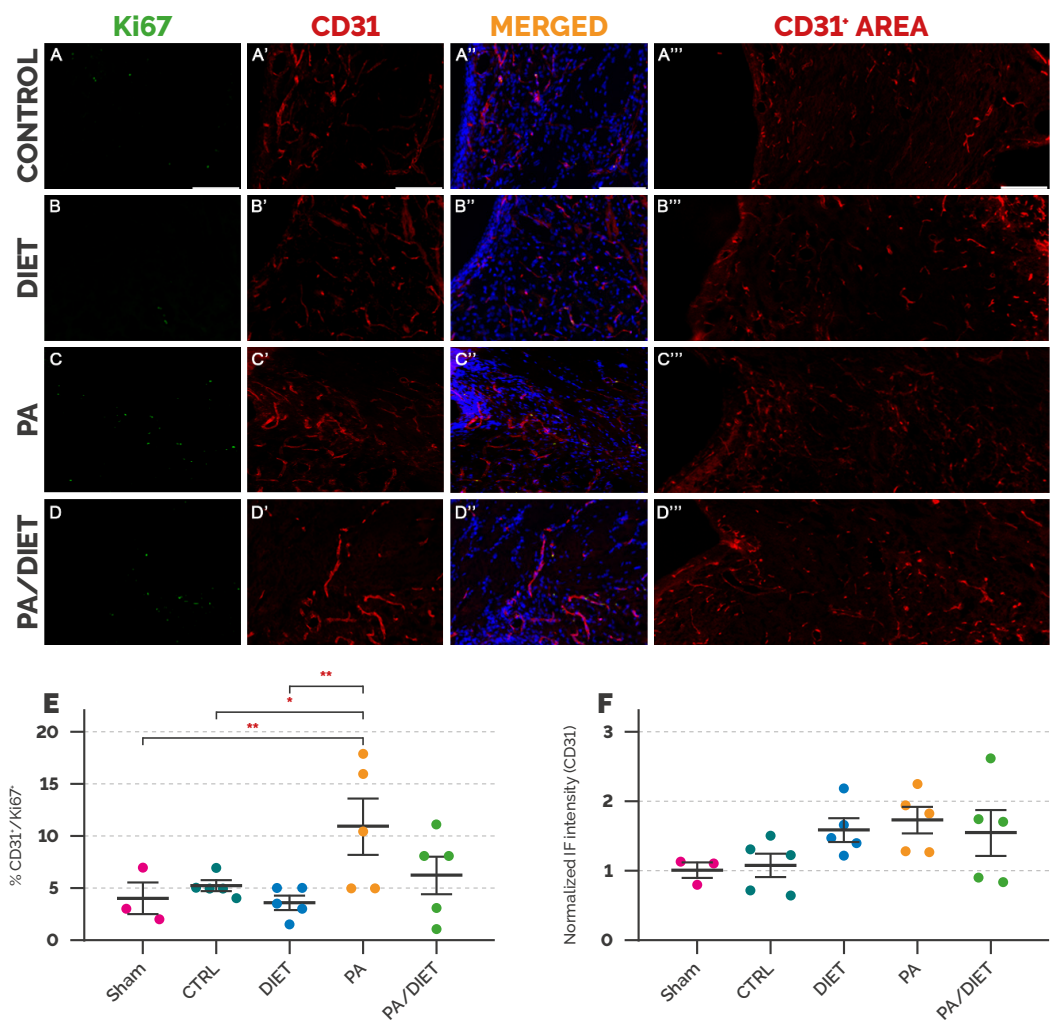


Figura 18: Análisis inmunohistoquímicos: angiogénesis/vasculogénesis.

(A-D) Expresión de Ki67, CD31, fusinado de ambos y área CD31+, como marcadores de vasculogénesis en la región subventricular; (E) % de células CD31+/Ki67+; (F) valores normalizados de inmunofluorescencia del área CD31+.

Escalas de las barras: 400 microm. En las barras se representan las medias ± ESM. Se incluyeron un total de 3 ratas sham y 5 de cada grupo de intervención. ** p = 0.0071 ("actividad física" vs. sham), *p = 0.0446 ("actividad física" vs. "control"), ** p = 0.0018 ("actividad física" vs. "dieta").

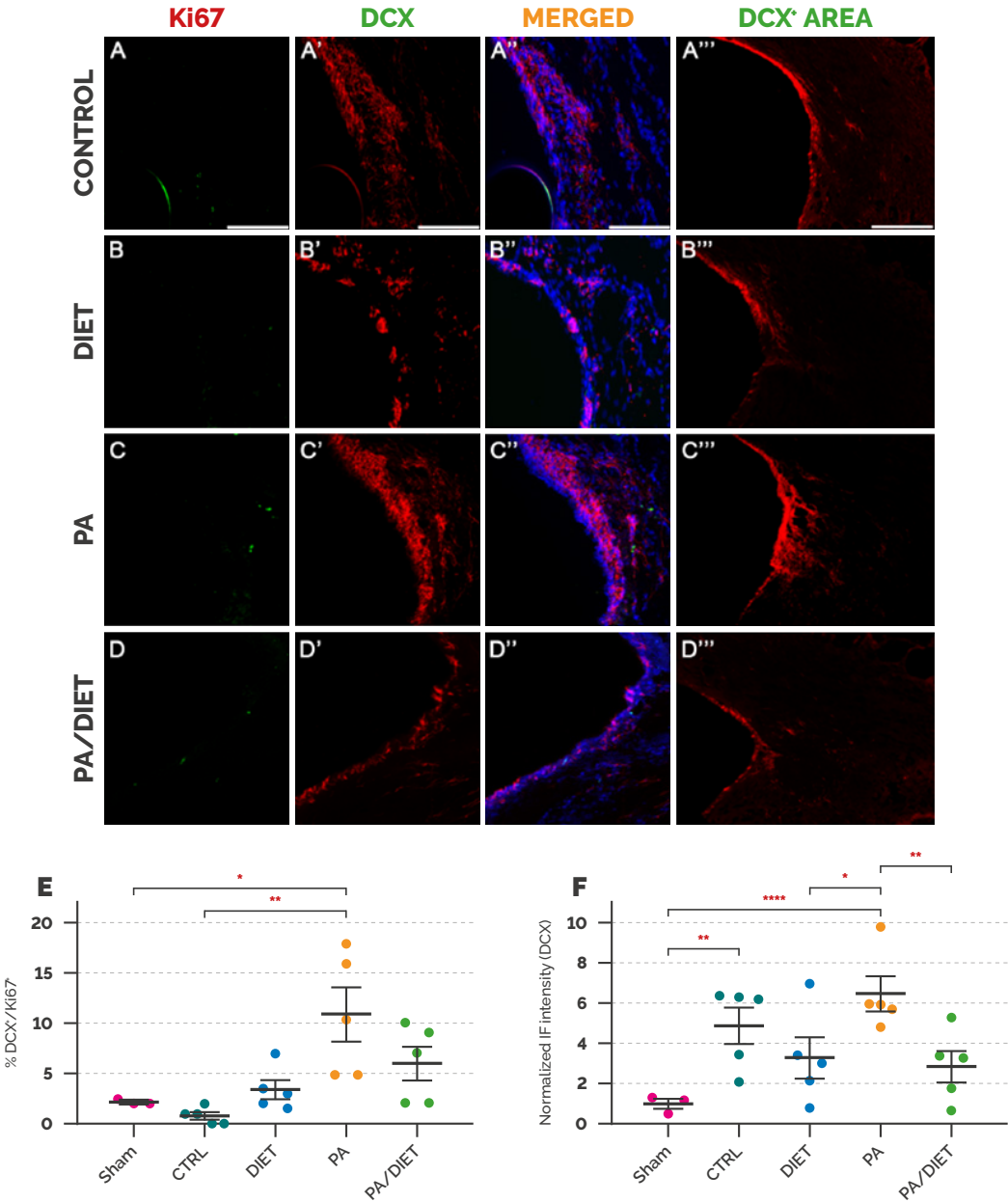


Figura 19: Análisis inmunohistoquímicos: neurogénesis.

(A-D) Expresión de Ki67, DCX, fusión de ambos y área DCX+ como marcadores de neurogénesis en la zona subventricular. **(E)** Cuantificación del porcentaje de células DCX+/Ki67+ respecto al total de células DCX+, * p = 0.0468 ("actividad física" vs. sham), ** p = 0.0013 ("actividad física" vs. "control"). **(F)** Cuantificación de la inmunorreactividad del área DCX+, ** p = 0.0055 ("control" vs sham), **** p < 0.0001 ("actividad física" vs. sham), * p = 0.0239 ("actividad física" vs. "dieta"), ** p = 0.0083 ("actividad física" vs. "actividad física+dieta"). Escala de las barras: 100 microm. Se representan las medianas ± ESM.

5 RESULTADOS

Con respecto a la neurogénesis en la ZSV (células DCX+/Ki67+), sólo se observaron niveles superiores en el grupo "actividad física" tanto frente al grupo sham como frente a los controles ($p = 0.0468$ y $p = 0.0013$, respectivamente) (**Figura 19**). Respecto al área DCX+, el grupo "actividad física" fue en el que se observaron los mejores resultados respecto al resto de condiciones (Vs sham: $p < 0.0001$; Vs "dieta": $p = 0.0239$, Vs "actividad física+dieta": $p = 0.0083$).

En resumen, las ratas que realizaron ejercicio físico experimentaron más angiogénesis y neurogénesis a los 28 días posteriores a la lesión y no se encontraron efectos sinérgicos en el grupo "actividad física+dieta".

5.2. ESTUDIO CLÍNICO

5.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

5.2.1.1. Descripción general de la muestra

Se incluyeron pacientes en el estudio entre el 11/1/2021 y el 14/6/2022. Cabe remarcar que durante el período de reclutamiento se declararon tres picos de incidencia ("olas") de la pandemia COVID (enero 2021, julio 2021, enero 2022) que interfirieron parcialmente en el desarrollo del protocolo del proyecto, bien por cambios organizativos de las diferentes unidades relacionadas con el mismo (lugar de ingreso inicial del paciente, horarios de biobanco, unidad de citometría de flujo) o bien por limitación horaria de las visitas a familiares que dificultaron la firma del consentimiento informado y/o la administración de las escalas del estudio.

Durante el período de reclutamiento, un total de 359 pacientes con ictus isquémico fueron sometidos a trombectomía mecánica en nuestro centro, de los cuales 60 pacientes presentaban oclusión distinta de TICA, M1 o M2, y 87 pacientes presentaban una escala Rankin modificada >1 previo al ictus (criterios principales de exclusión). Además, 20 fueron excluidos por ingreso inicial en unidad de cuidados intensivos y no en Unidad de Ictus.

De los 192 pacientes restantes, 55 se excluyeron por ser trasladados a sus hospitales de referencia de forma precoz antes de completar todos los procedimientos del estudio, 22 por mala evolución precoz y 35 por ausencia de familiares convivientes del paciente para responder los cuestionarios. Finalmente, 10 pacientes no se incluyeron por falta de personal disponible clínico o de laboratorio (período vacacional).

Por tanto, finalmente se incluyeron 70 pacientes con todos los procedimientos del estudio realizados según el protocolo (**Figura 20**).

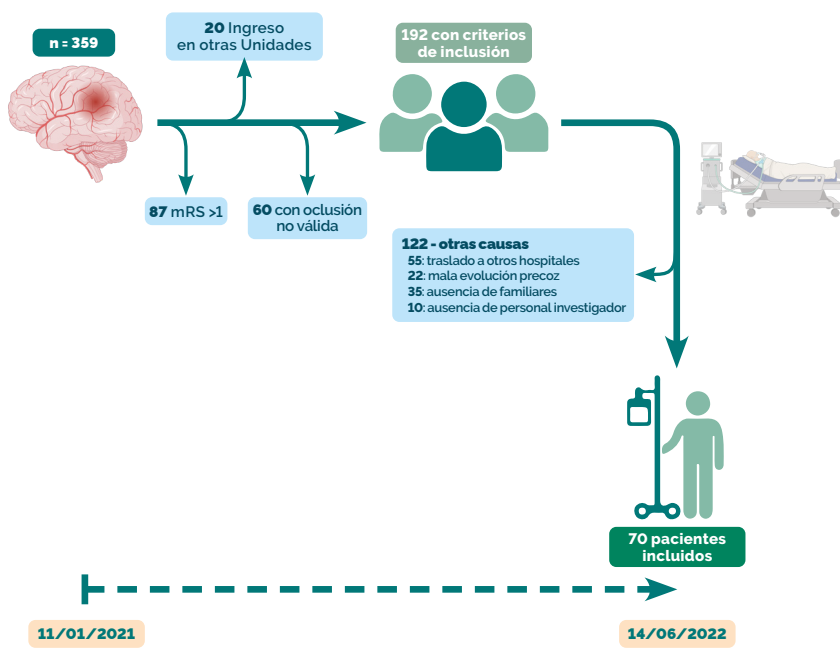


Figura 20: Periodo de reclutamiento y pacientes incluidos.

Se representan de forma esquemática los motivos de exclusión en el estudio y el número total de pacientes incluidos.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA (PACIENTES INCLUIDOS)

I. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y FACTORES DE RIESGO

El 60% de los pacientes incluidos fueron hombres y el 40% restante mujeres, con edades medias de 74.21 y 75.43 años respectivamente. La mayoría de los pacientes tenían una escala Rankin modificada (mRS basal) de 0 (77.1%), lo que implica una independencia funcional completa previa al ictus.

En cuanto a los factores de riesgo vascular clásicos, un 50% tenían antecedentes de tabaquismo (15.7% tabaquismo activo y 34.3% exfumadores), 62.9% eran hipertensos, 32.9% diabéticos y un 57.1% presentaban dislipemia. La fibrilación auricular (FA) estaba presente en el 65.7% de los casos (de estos, 56.5% tenían una FA conocida antes del ictus y 43.5% se diagnosticaron durante o tras el ictus). Finalmente, un 25.7% habían tenido ya alguna manifestación clínica de aterosclerosis (cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica y/o ictus previo).

II. PERFIL ANTROPOMÉTRICO DE LOS PACIENTES Y ESTADO NUTRICIONAL

En cuanto a los parámetros antropométricos de los pacientes, la mediana de IMC fue de 27,6 [25,2 - 30,1]. Según la puntuación en esta escala, un 24,3% de los pacientes se encontraban en el rango de normopeso, un 48,6% el de sobrepeso y un 27,1% en el de obesidad. La cintura abdominal fue 87,7 cm [80,6 - 97,5] en mujeres y 97 cm [92 - 106] en hombres. Se determinó que un 48,6% (n = 34) presentaban síndrome metabólico (22,9% cumplían 3 criterios, 18,6% cumplían 4 y 7,1% cumplían 5).

Según las escalas utilizadas de desnutrición, un 14,3% (n = 10) cumplían criterios de riesgo de desnutrición o desnutrición confirmada por alguna de las escalas aplicadas.

Las principales características de la muestra se resumen en la **Figura 21**.

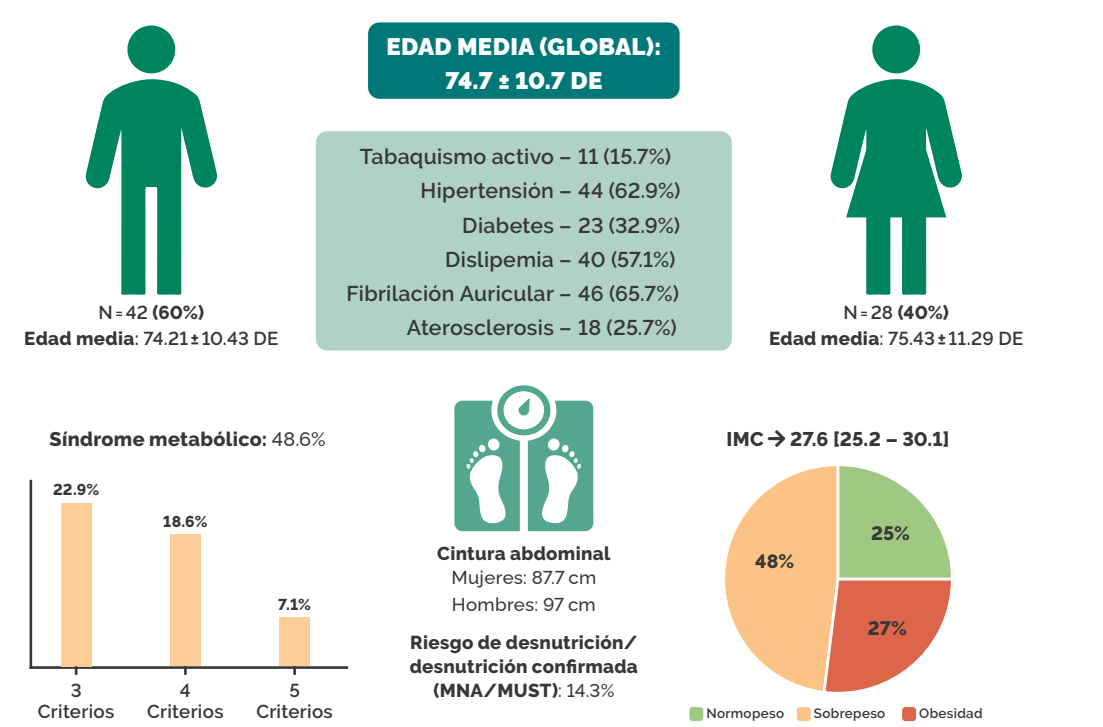


Figura 21: Características basales principales de los pacientes incluidos.

Las variables dicotómicas se expresan como un porcentaje y las continuas, como la media +/- DE o mediana y rango intercuartílico.

III. CARACTERÍSTICAS DEL ICTUS

El 40% de los ictus fueron de cronología indeterminada, de los cuales un 57.1% fueron ictus del despertar. La arteria más frecuentemente ocluida fue el segmento M1 de la cerebral media (52.9%), seguida del segmento M2 (31.4%) y carótida interna terminal distal o TICA (15.7%). Únicamente 10 pacientes (14.3%) presentaron una oclusión en tándem (oclusión o estenosis grave concomitante de carótida interna a nivel cervical).

La mediana de puntuación en la escala NIHSS al ingreso fue de 14 [10 - 18]. En cuanto a la etiología del ictus, las causas cardioembólicas (por FA previa o diagnosticada a raíz del ictus) fueron las predominantes (70% del total). Un 10% fueron ictus aterotrombóticos (en su gran mayoría por ateromatosis extracraneal), un 4.3% de causa inhabitual y un 15.7% de origen indeterminado (fundamentalmente de mecanismo embólico y fuente desconocida-ESUS).

Las características previas se resumen en la **Figura 22**.

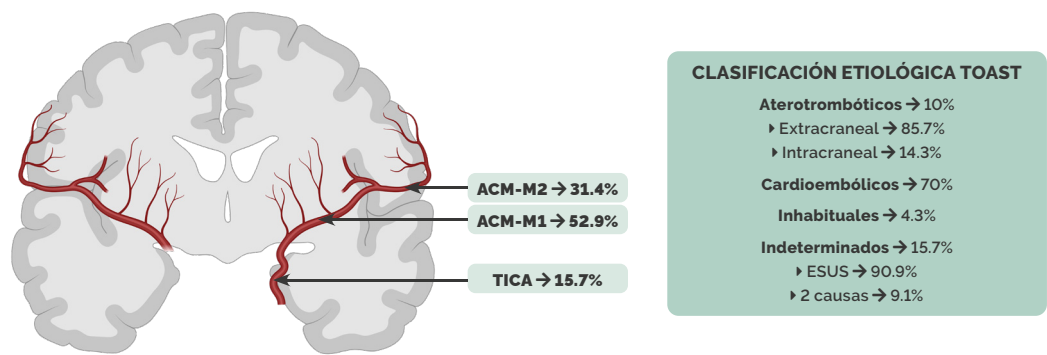


Figura 22: Puntos de oclusión y etiología según la clasificación TOAST

TICA, segmento terminal de la arteria carótida interna; **ACM-M1**, segmento proximal de la arteria cerebral media; **ACM-M2**, segmento distal de la arteria cerebral media; **ESUS**, ictus embólico de fuente indeterminada (*Embolic Stroke of Undetermined Source*)

IV. CARACTERÍSTICAS DE LA NEUROIMAGEN Y TRATAMIENTO RECIBIDO

En todos los casos se realizó una TC craneal simple, TC de perfusión y angioTC en la fase aguda del ictus. La mediana de la escala ASPECTS fue de 8 [7 - 9]. En cuanto a los volúmenes estimados por el software RAPID, la mediana del volumen del core del

infarto fue de 14 cc [0 - 38] y la del mismatch de 81 cc [51 - 115]. Al evaluar la colateralidad, encontramos que la mayoría (77.1% del total) tenían buenas colaterales (>50%).

La mayor parte de los pacientes incluidos (81.4%) recibieron tratamiento endovascular primario, sin administración de fibrinolítico endovenoso previo. El resultado angiográfico fue bueno en la mayoría de los casos, con una recanalización exitosa (TICI 2b-3) en el 97.1% de los casos, un 38.6% de ellos con efecto primer pase ("FPE" o recanalización exitosa TICI 3 tras un solo pase del dispositivo). Sólo un paciente requirió intubación orotraqueal durante el procedimiento.

En cuanto a los tiempos, la mediana de llegada al hospital desde el inicio de los síntomas fue de 89 minutos [64.7 - 124.2], el puerta-imagen se situó en 30 minutos [24 - 42.5] y el puerta-ingle en 82.7 [95 - 112]. En cuanto al tiempo de duración del tratamiento endovascular, la mediana fue de 22 minutos [14 - 41.5].

V. VARIABLES PRONÓSTICAS PRINCIPALES

Los resultados de las variables pronósticas principales de la muestra se recogen en la **Tabla 7**. La mediana de NIH a las 24 horas fue de 3 [1 - 8] y al alta de 1 [0 - 3]. Un gran porcentaje de los pacientes (88.6%), presentó mejoría neurológica precoz a las 24 h (entendida como mejoría de al menos 4 puntos en la escala NIH a las 24 h) y un 62.9% mejoría neurológica dramática precoz (entendida como mejoría en la escala NIH de 10 o más puntos, o bien NIH 0 - 1 a las 24 h).

La mediana del volumen del infarto medido en el TC de control a las 24 h fue de 7.8 ml [1.3 - 25.2]. Un 31.5% presentaron transformación hemorrágica de algún tipo (fundamentalmente hemorragia subaracnoidea), pero ninguna de ellas fue sintomática.

El porcentaje de buen pronóstico funcional (mRS 0 - 2) a los 3 meses fue del 71.4% y el de pronóstico funcional excelente (mRS 0 - 1), del 50%. La mortalidad a 3

meses fue del 7.1% (n = 5 pacientes, 2 de los cuales fallecieron durante el ingreso hospitalario).

VARIABLES PRONÓSTICAS PRINCIPALES (n = 70)	
NIHSS 24 horas, Me [rango IQ]	3 [1-8]
NIHSS al alta, Me [rango IQ]	1 [0-3]
Mejoría NRL precoz (%)	62 (88.6)
Mejoría NRL dramática precoz (%)	44 (62.9)
Volumen del infarto en TC 24 horas, Me [rango IQ], ml	78 [1.3-25.2]
Transformación hemorrágica (%)	
IH1	6 (8.6)
IH2:	3 (4.3)
PH1:	2 (2.9)
PH2:	1 (1.4)
Remota/HSA:	10 (14.3)
Mortalidad intrahospitalaria (%)	2 (2.9)
Mortalidad a 3 meses (%)	5 (7.1)
Deterioro cognitivo a 3 meses (%)	24 (36.9)
mRS 0-2 a 3 meses (%)	50 (71.4)
mRS excelente (0-1) a 3 meses (%)	35 (50)

Tabla 7: Variables pronósticas principales.

Se representan las variables dicotómicas como porcentaje y las continuas como mediana y rango intercuartílico.

La mayoría de los pacientes (61.4%) habían cursado estudios primarios, un 21.4% estudios secundarios y un 15.7% estudios superiores. Un paciente del total de incluidos era analfabeto. La puntuación basal (durante el ingreso) en el MOCA fue de 24 [20.5 - 27] y de 27 [24.25 - 28.75] a 3 meses (en 26 pacientes no se pudo realizar el MOCA a los 3 meses por su situación clínica o por imposibilidad para hacer una visita presencial, en cuyo caso se aplicó el IQCODE o test del informador). A los 3 meses, el 36.9% cumplían por uno u otro cuestionario criterios de deterioro cognitivo. Al comparar los resultados a los 3 meses con los basales, encontramos que un 43.1% de los pacientes mejoraron los resultados de los test, un 30.7% empeoraron y un 26.1% se mantuvieron estables. En aquellos pacientes con deterioro cognitivo a los 3 meses según la definición empleada, los dominios del MOCA más afectados fueron el recuerdo diferido, con una mediana de puntuación de 1 [0 - 2.75] sobre 5 puntos totales, seguido de la atención, con una mediana de 4.5 [4 - 5]

sobre 6 puntos totales en ese apartado. La puntuación en el resto de los dominios fue de 4 [2.5 - 5] en el dominio visuoespacial (máximo 5 puntos); de 3 en identificación (máximo 3 puntos); de 2 [2 - 3] en lenguaje (máximo de 3 puntos); 1 [1 - 2] en abstracción (máximo 2 puntos) y de 6 [5 - 6] en orientación (máximo de 6 puntos).

5.2.1.2. Descripción variables de dieta

ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

El 52.9% de los pacientes tenían una buena adherencia a la DMed según la escala MEDAS-14, con una mediana [rango intercuartílico] de 9 [7 - 10].

El porcentaje de respuestas positivas en cada uno de los 14 ítems se recogen en la **Tabla 8**. Cabe destacar que, dentro de cada ítem, el porcentaje de adherencia fue bajo en el consumo recomendado de frutas (34.3%), pescado/marisco (37%) y frutos secos (28.6%). Sin embargo, el consumo de aceite de oliva como fuente principal de grasa fue mayoritario (95.7%) y también fue alto el consumo recomendado de legumbres (64.3%) y el consumo preferente de carne "blanca" de ave/conejo (71.4%). En la columna derecha de la tabla 8 se representan también las frecuencias de consumo alimentos, traducidas a raciones por día y gramos por día, de cada alimento principal de la encuesta.

Se realizó una pregunta específica sobre la frecuencia de consumo de huevos al no estar este alimento incluido en el cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea. Un 60% de los pacientes consumían 3 o más huevos a la semana, con una mediana de consumo semanal de 3 [2 - 4].

Respecto al consumo de vino, entendido en la escala de adherencia a la dieta mediterránea como tomar al menos 1 vaso de vino tinto al día, sólo se cumplió en el 21.4% de pacientes, siendo todos ellos varones.

CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DMED			
Cuestionario 14-ítem	Criterio para +1 punto	% de respuestas positivas	Mediana de consumo (FFQ) – consumo diario (raciones y g)
1. ¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar?	Sí	95.7	
2. ¿Cuánto aceite de oliva consume en total al día?	4 o más cucharadas	65.7	4 rac/día [2 - 4] 60 g/día [30 - 60]
3. ¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día? (las guarniciones y acompañamientos contabilizan como ½ ración)	2 o más (al menos una en ensaladas o crudas)	45.7	1 rac/día [0.5 - 2] 200 g/día [100 - 400]
4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día?	3 o más	34.3	2 rac/día [1 - 3] 300 g/día [150 - 450]
5. ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día?	Menos de 1	85.7	0.28 rac/día [0.07 - 0.43] 35.7 g/día [8.93 - 53.57]
6. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día?	Menos de 1	91.4	0 rac/día [0 - 0.09] 0 g /día [0 - 1.07]
7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas consume al día?	Menos de 1	84.3	0 rac/día [0 - 0.07] 0 cc [0 - 14.28]
8. ¿Bebe vino? ¿Cuánto consume a la semana?	7 o más vasos/ semana	21.4	0 rac/día [0 - 0.32] 0 cc/día [0 - 39.14]
9. ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana?	3 o más	64.3	0.43 rac/día [0.28 - 0.57] 85.7 g/día [57.14 - 114.28]
10. ¿Cuántas raciones de pescado o marisco consume a la semana?	3 o más	37.1	0.28 rac/día [0.14 - 0.43] 35.71 g/día [17.8 - 53.6]
11. ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulces o pasteles a la semana?	Menos de 2	58.6	0.14 rac/día [0 - 1.25] 7 g/día [0 - 62.5]
12. ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana?	3 o más	28.6	0.07 rac/día [0 - 0.43] 2.1 g/día [0 - 12.9]
13. ¿Consume preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas?	Sí	71.4	0.28 rac/día [0.12 - 0.43] 35.71 g/día [15.6 - 53.6]
14. ¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, el arroz u otros platos aderezados con una salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)?	2 o más	61.4	0.28 rac/día [0.07 - 0.28]

Tabla 8: Cuestionario de adherencia a la DMed.

% de respuestas positivas y frecuencia de consumo (mediana, [RICI]) de cada ítem.

RELACIÓN ENTRE ADHERENCIA A DIETA MEDITERRÁNEA Y VARIABLES BASALES

En una comparativa entre pacientes con baja y alta adherencia a la dieta mediterránea según la escala MEDAS-14 (**Anexo 8**), no se identificaron diferencias significativas en las características basales principales (edad, sexo) ni en la prevalencia de los principales factores de riesgo vascular, con la salvedad de la diabetes, significativamente más prevalente entre los pacientes con baja adherencia a la dieta mediterránea (48.5% de DM en pacientes con baja adherencia versus 18.9% en aquellos con alta adherencia, p 0.009). El porcentaje de pacientes con diagnóstico de síndrome metabólico y de obesidad fue similar en ambos

grupos de adherencia a la dieta mediterránea, así como el porcentaje de pacientes en riesgo de desnutrición. En las variables analíticas habituales, se detectaron glucemias basales e insulinemias inferiores en el grupo de alta adherencia a la dieta mediterránea, así como niveles significativamente más bajos de HbA1. En el grupo de alta adherencia a dieta mediterránea los niveles de colesterol HDL fueron superiores (tendencia a la significación), y no se encontraron diferencias en los niveles de colesterol total o triglicéridos.

En cuanto al tipo de ictus, variables de neuroimagen y etiología del ictus, se observó que las oclusiones en tándem y por ende los ictus de etiología aterotrombótica, fueron significativamente más frecuentes en pacientes con baja adherencia a la dieta mediterránea (24.2% frente a 5.4% en el caso de las oclusiones en tándem, p 0.038; y 18.2% frente a 2.7% en la etiología aterotrombótica, p 0.046).

FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Se analizaron las raciones y gramos diarios de los principales alimentos con interés biológico de la DMed. Las frecuencias de consumo de cada alimento del cuestionario MEDAS en función de la adherencia a la DMed se recogen en el **Anexo 9**.

Los pacientes en el grupo de alta adherencia a la dieta mediterránea consumían más gramos de aceite de oliva, de verdura, frutos secos, vino tinto, carne de ave (pollo) y sofritos, así como menos gramos de repostería comercial. No se observaron diferencias en los gramos de fruta ni legumbres consumidos entre ambos grupos de adherencia.

Valorando las características clínicas y antropométricas de los pacientes, encontramos que el consumo de AOVE (g/día) fue significativamente inferior en pacientes diabéticos frente a no diabéticos (Me 30 g/día [30 - 60] Vs 60 g/día [45 - 60], p <0.01) y en pacientes con ictus de etiología aterotrombótica (30 g/día [7.5 - 60] Vs 60 g/día [30 - 60] en pacientes con otras etiologías, p 0.06). El consumo de aceite de oliva (gramos/día) se correlacionó negativamente con los niveles de HbA1c ($r=-0.28$,

5 RESULTADOS

$p = 0.03$), y de forma contraria, el consumo de repostería comercial se correlacionó positivamente con los niveles de HbA1 ($r = 0.29$, $p = 0.02$). Los pacientes con obesidad, aunque sin alcanzar la significación, consumían menos fruta y verdura que aquellos en normopeso. Así, la cintura abdominal fue significativamente menor en los que más gramos de fruta consumían ($r = -0.27$, $p = 0.03$).

Un 27.1% de los pacientes declaró beber algún tipo de alcohol a diario, fundamentalmente vino, con una media semanal de consumo de unidades de bebida estándar (UBE) de 8.21 en varones y 0.73 en mujeres.

RECORDATORIO DIETA 24 HORAS (DÍA PREVIO AL ICTUS).

La media de ingesta calórica del día previo al ictus o día habitual fue de 1446.5 kcal/día (± 563.7), con un 37.4% proveniente de hidratos de carbono, un 44.8% de lípidos y un 17.4% de proteínas. La media de consumo de AGS fue de 21.97 ± 11.10 gramos, de AGM de 33.23 ± 14.41 g y de AGP de 10.25 ± 7.51 g.

En el grupo de alta adherencia a la dieta mediterránea, se identificó un mayor consumo de AGM y EPA y menor de AGS en comparación con el de baja adherencia, aunque sin alcanzar la significación estadística. En cuanto al perfil lipídico, se observaron niveles más altos de HDL entre los pacientes que más gramos/día consumían de AGM ($r = 0.45$, $p < 0.01$), de ácido oleico ($r = 0.47$, $p < 0.01$) y de EPA ($r = 0.34$, $p < 0.01$).

5.2.1.3. Descripción variables de ejercicio físico

RESULTADOS EN LAS ESCALAS

La puntuación en ambos cuestionarios de actividad física aplicados (VREM y PASE) se correlacionó de forma significativa ($r = 0.65$, $p < 0.01$).

En el VREM la mediana de puntuación se situó en los 4234.9 METS-min/14 días [2253 - 7952]. Según las categorías de la escala VREM, un 38.6% de los pacientes serían

sedentarios o poco activos y un 61.4% activos o muy activos. Los sedentarios, incluidos dentro del primer grupo, supondrían un 14.3% del total. Dentro de las actividades recogidas en la escala VREM, los pacientes activos o muy activos realizaban (respecto a los menos activos) con más frecuencia actividades relacionadas con la limpieza del hogar (84.4% vs 48.1%), caminar (79.1% vs 55.6%) y trabajos en el huerto (32.6% vs 11.1%). No se encontraron diferencias en la actividad relacionada con ir a comprar ni en subir escaleras. Según los resultados del VREM, el 27.1% realizaban algún tipo de deporte (o baile) y solo un paciente practicaba dos deportes. En el global de pacientes, las actividades que más gasto energético supusieron y que además fueron las más frecuentemente practicadas fueron caminar, limpiar la casa e ir a comprar a pie.

El rango de puntuación en la escala PASE fue 0–127 puntos, con una mediana de 80.5 [42–121.5]. Analizando los resultados del PASE, encontramos que la mayor parte de los pacientes encuestados (85.7%) caminaban como actividad física habitual, práctica que además realizaban con frecuencia (un 68.6% reconocían realizarla “casi siempre”). El deporte “ligero” lo practicó un 15.7% de la muestra, el moderado un 8.6% y solo un paciente realizaba lo considerado como deporte extenuante, mientras que un 5.7% realizó algún tipo de deporte de fuerza. La mayoría de los pacientes (77.1%) realizaron trabajo doméstico ligero la semana previa al ictus, un 54.3% trabajo pesado y un 10% realizó alguna reparación doméstica. En cuanto al trabajo en exterior, un 27% realizaron trabajos de jardinería o trabajo en el huerto.

RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD FÍSICA Y VARIABLES BASALES

Las características basales principales de los pacientes, categorizados según el grado de actividad física evaluado por la escala VREM en sedentarios/poco activos y activos/muy activos, se resumen en el **Anexo 10**.

En resumen, ambos grupos de actividad física previa al ictus (sedentarios/poco activos versus activos/muy activos) fueron bastante similares con la salvedad del estado nutricional, ya que había mayor porcentaje de pacientes con desnutrición o en riesgo

5 ◀ RESULTADOS

de desnutrición en el grupo de sedentarios (25.9% vs. 7%, p 0.03). Tal como se recoge en la tabla del **Anexo 10**, aunque no significativo, sí se identificó una tendencia a un mayor consumo de alcohol en el grupo de sedentarios/poco activos y también mayor porcentaje de pacientes con antecedente de HTA y DM. Los niveles de HDL-colesterol fueron superiores en aquellos con mayor grado de actividad física (49.5 mg/dl Vs. 38 mg/dl, p 0.07).

No se encontraron diferencias en las características de imagen (oclusión de arteria principal, ASPECTS, oclusión en tándem) ni en la etiología TOAST entre ambos grupos de actividad física.

En una comparativa entre los pacientes sedentarios (VREM <1250) y el resto de grupos, encontramos que entre los sedentarios había mayor porcentaje de DM (60% vs. 28.3%, p 0.06), de obesidad (60% vs. 21.7%, p 0.02) y también de síndrome metabólico (70% vs. 48.2%, p 0.18).

Finalmente, la alta adherencia a la dieta mediterránea fue superior en el grupo de pacientes activos/muy activos respecto a poco activos/sedentarios si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa (58.1% vs 44.4%, p = 0.19)

5.2.1.4. Biomarcadores CIRCULANTES y variables basales

ÍNDICE DE RESISTENCIA INSULÍNICA HOMA

En 8 pacientes no pudo determinarse la insulinemia debido a la hemólisis de la muestra.

La mediana del HOMA fue de 3.9 [1.97 - 6.63]. Otra medición indirecta de la resistencia insulínica es el índice triglicéridos y glucosa (TyG) según la fórmula $\text{Ln}(\text{TG}[\text{mg/dL}] \times \text{glucosa}[\text{mg/dL}]/2)$. Ambos índices de resistencia insulínica (HOMA y TyG) se encontraron directamente correlacionados en nuestra muestra (r = 0.39, p <0.01).

Se halló una correlación positiva entre el índice HOMA y la cintura abdominal ($r = 0.27$, $p 0.048$) y el IMC ($r = 0.24$, $p 0.057$). De esta forma, el índice fue significativamente superior entre los pacientes obesos (4.87 Vs. 3.52, $p 0.049$) y en los diabéticos (6.56 Vs. 3.35, $p 0.004$). No se encontraron diferencias significativas entre el índice HOMA y el resto de variables basales ni características del ictus.

En cuanto a la dieta, la mediana del índice HOMA fue superior en el grupo de pacientes con baja adherencia a la dieta mediterránea (4.66 [2.03 - 7.09] Vs. 3.5 [1.96 - 5.08]), aunque las diferencias no fueron significativas. De entre los componentes de la dieta, se observó una correlación negativa entre el índice HOMA y el consumo de aceite de oliva (-0.37 , $p 0.003$). En referencia al recordatorio de la dieta de 24 h previa, el índice HOMA se correlacionó negativamente con el consumo de AGM (-0.38 , $p 0.006$) y AGP (-0.36 , $p 0.009$), y en concreto, con el consumo de ácido oleico (-0.39 , $p 0.004$), linoleico (-0.33 , $p 0.017$) y de DHA (-0.29 , $p 0.034$).

Respecto a las variables de actividad física, se observó una tendencia a una mayor resistencia insulínica en el grupo de sedentarios (medianas de HOMA 7.24 [2.28 - 9.30] en sedentarios Vs. 3.54 [1.96 - 6] en no sedentarios, $p 0.09$). No se encontraron diferencias en el resto de las categorías de actividad física ni con las puntuaciones globales de las dos escalas aplicadas (VREM y PASE).

METABOLITOS DE LA VÍA DE LA COLINA

La mediana de betaína en la muestra fue de 3.5 PPM [2.7 - 4.4], de colina 1.89 PPM [1.63 - 2.37] y de TMAO de 0.21 PPM [0.12 - 0.34].

Respecto a las variables clínicas, los niveles de betaína fueron significativamente superiores en pacientes hipertensos (3.6 [3 - 4.8] PPM vs. 3.2 [2.6 - 4.1], $p 0.024$), obesos (4.2 [3.5 - 4.8] PPM vs. 3.3 [2.7 - 4.3], $p 0.022$) e hiperuricémicos (5 [3 - 8] PPM vs. 3.5 [2.8 - 4.3], $p 0.04$) y también en aquellos con fibrilación auricular (3.9 [2.8 - 4.7] PPM vs.

5 RESULTADOS

3.1 [2.7 - 3.9], p 0.047), mientras que en diabéticos fueron inferiores (2.9 [2.5 - 3.6] PPM vs. 4 [3.1 - 4.7], p 0.002). Por su parte, el TMAO fue superior en pacientes con síndrome metabólico (0.25 PPM vs. 0.19, p 0.05) y no se encontraron asociaciones de los niveles de colina con las características basales.

Respecto a las variables de dieta, los valores de TMAO fueron significativamente inferiores en el grupo de pacientes con alta adherencia a la DMed (0.19 [0.11 - 0.28] PPM vs. 0.25 [0.18 - 0.43], $p < 0.05$), no observándose diferencias en los niveles de betaina ni de colina. Los niveles de TMAO estaban correlacionados negativamente con el consumo de verduras ($r = -0.26$, p 0.03) y de legumbres ($r = -0.24$, p 0.04).

En cuanto a las variables de actividad física, se encontraron diferencias con el TMAO, siendo los niveles más bajos en los que realizaban más actividad física (0.29 [0.22 - 0.76] PPM en el grupo de sedentarios Vs. 0.20 [0.11 - 0.33] PPM en el resto, p 0.04), sin hallarse diferencias con el resto de metabolitos ni con el resto de categorías de las escalas o puntuaciones totales de las mismas.

ADIPOQUINAS

La mediana (RIC) de resistina, leptina y adiponectina fue de 8.6 ng/ml [6.7 - 11.8], 13 ng/ml [7.3 - 33] y 11.3 microg/ml [7.5 - 14.6], respectivamente.

La resistina fue significativamente mayor en los pacientes obesos (10.5 [7.57 - 13.6] ng/ml vs. 8.2 [6.09 - 10.97], p 0.05) y se correlacionó negativamente con el consumo de AGM (-0.34, p 0.008) y ácido oleico (-0.31, p 0.017). Los sedentarios también tenían niveles de resistina superiores (10.75 [10.16 - 18.15] ng/ml Vs. 8.03 [6.51 - 11.5], $p < 0.01$).

La adiponectina fue significativamente menor en los pacientes con ictus de origen aterotrombótico (4.76 [3.76 - 12] microg/ml Vs. 11.35 [8.86 - 14.7] microg/ml, p 0.02). Se observaron correlaciones positivas entre los niveles de adiponectina y el consumo de

AGM ($r = 0.35$, $p 0.005$), AGP ($r = 0.29$, $p 0.025$), ácido oleico ($r = 0.38$, $p 0.003$), linoleico ($r = 0.26$, $p 0.049$), EPA ($r = 0.38$, $p 0.003$) y DHA ($r = 0.27$, $p 0.036$).

La leptina fue significativamente superior en obesos (27.1 [13 - 50] ng/ml en obesos vs 11.6 [6.25 - 16.4] ng/ml en el resto, $p 0.001$), mientras que sus niveles fueron similares en los diferentes grupos de adherencia a dieta mediterránea, sin encontrarse correlaciones significativas con los gramos de consumo de los diferentes alimentos ni con los valores analíticos de perfil lipídico y glicémico. Asimismo, no se encontró relación entre los niveles de leptina y el grado de actividad física previo al ictus.

CITOQUINAS INFLAMATORIAS

Los niveles de MCP-1 fueron significativamente más altos en los pacientes con aterosclerosis clínica (606.53 pg/ml [192.72 - 814] Vs. 255.4 pg/ml [37.96 - 551.12], $p 0.04$).

En cuanto a las variables de dieta, el consumo de AOVE se correlacionó negativamente con los niveles de MCP-1 ($r = -0.34$, $p 0.004$), IL-8 ($r = -0.25$, $p 0.039$) e IL-18 ($r = -0.19$, $p 0.10$).

Respecto al grado de actividad física, únicamente se encontraron diferencias con la IL-18, que fue significativamente inferior en el grupo de sedentarios (317.9 [59.59 - 505.76] vs. 653.27 [346.31 - 1324.78], $p < 0.01$), si bien no se encontró correlación entre los valores de las distintas citoquinas y la puntuación en la escala VREM/PASE.

CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES

Se obtuvo muestra para análisis de las CPE basales en 68 de los 70 pacientes. La mediana (RIC) de CPEs basales fue de 30/millón de eventos [10 - 97.7] y se correlacionaron negativamente con la edad ($r = -0.28$, $p 0.02$) y con la gravedad del ictus medida por NIH basal ($r = -0.23$, $p 0.06$). Los niveles de CPEs basales fueron superiores en hombres (51 [10 - 133] mill/eventos Vs. 17 [10 - 45] mill/eventos en mujeres, $p 0.06$) y

5 RESULTADOS

en obesos (71 [17 - 231] mill/eventos Vs. 26 [9 - 75.5] mill/eventos, p 0.03). No se encontraron diferencias entre los niveles basales de CPEs circulantes y el resto de características basales, antropométricas ni en las características del ictus.

Respecto a la adherencia a la dieta mediterránea, no se observaron diferencias significativas en el número de CPEs basales, si bien el número de CPEs basal se correlacionó negativamente con el consumo de AOVE ($r=-0.27$, p 0.027). No se encontraron correlaciones significativas entre la puntuación en las escalas de actividad física VREM/PASE y el número basal de CPEs.

Para el análisis del incremento o movilización de las CPEs, se excluyeron los pacientes que no tenían muestra de control ($n = 17$). El incremento de CPEs se observó en el 66% de los pacientes, con una mediana de movilización de 35.5 millones/eventos [14.7 - 93.2], sin encontrarse diferencias en relación a edad, sexo o factores de riesgo vascular. En relación a la dieta, no se observaron diferencias significativas en la movilización de CPEs entre los diferentes grados de adherencia a la dieta mediterránea, sin embargo, los pacientes en los que se observó movilización de CPEs consumían más AOVE (g) (60 g/día [30 - 60] Vs. 37.5 g/día [30 - 60] p 0.04) y presentaban un índice HOMA inferior (2.89 [1.89 - 5.12] vs 6.01 [2.92 - 11.69], $p = 0.027$). No se identificaron diferencias entre la movilización de CPEs y el grado de AF previo al ictus.

5.2.1.5. Resumen análisis descriptivo de la muestra

DIETA MEDITERRÁNEA Y VARIABLES BASALES

El análisis descriptivo de la muestra revela que algo más de la mitad de los pacientes presentaba una alta adherencia a la dieta mediterránea, y que este hecho se asoció a menor prevalencia de diabetes y menores valores de glucemia basal, HbA1c y resistencia insulínica, así como a menor prevalencia de ictus de origen aterotrombótico. De entre los componentes de la dieta mediterránea, el consumo de aceite de oliva fue el que se asoció a menor prevalencia de diabetes, menor resistencia insulínica y

menos aterotrombosis. En el análisis de metabolitos de la vía de la colina, los niveles de TMAO fueron significativamente más bajos en los pacientes con alta adherencia a la dieta mediterránea, estando inversamente relacionados con el consumo de verduras y de legumbres. Respecto a las adipocinas, los niveles de resistina estaban inversamente relacionados y los de adiponectina directamente relacionados con el consumo de ácidos grasos monoinsaturados y en concreto, de ácido oleico. Además, el consumo de aceite de oliva se asoció a niveles más bajos de dos citoquinas inflamatorias (MCP-1 e IL-8). Finalmente, en el análisis de las CPEs se observó un mayor consumo de AOVE entre los que experimentaron movilización de CPEs.

ACTIVIDAD FÍSICA Y VARIABLES BASALES

Un 14% de los pacientes incluidos en la muestra se categorizaron en el grupo de sedentarios, y este hecho se asoció a mayor prevalencia de diabetes y una tendencia a una mayor resistencia insulínica. En el análisis de los metabolitos de la vía de la colina, los niveles de TMAO fueron significativamente más bajos en los pacientes más activos físicamente. Respecto a las adipocinas, los niveles de resistina fueron significativamente superiores en los pacientes sedentarios.

5.2.2. FACTORES ASOCIADOS A LAS VARIABLES PRONÓSTICAS PRINCIPALES

5.2.2.1. Características basales y pronóstico

Las variables basales relacionadas con el pronóstico de los pacientes son conocidas y similares a las publicadas en otras cohortes. Así, los pacientes que experimentaron mejoría neurológica precoz, mejoría dramática precoz y los que tuvieron mejor pronóstico funcional a los 3 meses (mRS 0 - 2 y mRS excelente), eran significativamente más jóvenes. La glucemia basal fue inferior en los pacientes que experimentaron mejoría NRL precoz y en los que tuvieron buen pronóstico funcional (mRS 0 - 2) a 3 meses. Los pacientes hipertensos tuvieron peor pronóstico funcional (mRS 0 - 2 a 3 meses) y los diabéticos, menos probabilidad de mejoría NRL precoz. La NIH basal fue superior en pacientes con peor pronóstico funcional. Además, la puntuación en esta escala se

correlacionó positivamente con el volumen final del infarto ($r = 0.37$, $p 0.002$). Por tanto, para ajustar los diferentes modelos de análisis multivariantes en relación al pronóstico, se utilizaron las variables edad, glucemia basal, DM y/o NIH basal.

Los pacientes con deterioro cognitivo en el seguimiento también tuvieron ictus más graves, con una puntuación en la escala NIH basal superior, y también mayores volúmenes finales de infarto. Por tanto, para ajustar los diferentes modelos de análisis multivariantes en relación al pronóstico cognitivo, se utilizaron las variables NIH y volumen final del infarto.

5.2.2.2. Dieta previa al ictus y pronóstico

En la **Tabla 9** se resumen las principales variables pronósticas en los distintos grupos de adherencia a la dieta mediterránea (baja vs. alta adherencia). La gravedad basal del ictus según la escala NIH fue similar en ambos grupos de adherencia, al igual que el volumen inicial de la lesión (core del infarto en la secuencia RAPID) y el grado de buena colateralidad.

	Global (n = 70)	Baja adherencia (n = 33)	Alta adherencia (n = 37)	p
NIH al ingreso	14 [10 - 18]	13 [10 - 17]	14 [10 - 18]	0.48
Core (ml)	14 [0 - 38]	7 [0 - 36.5]	15 [2 - 36]	0.33
Mismatch (ml)	91 [51 - 115]	81 [51 - 118]	77.5 [50.7 - 111.2]	0.66
Buena colateralidad (%)	54 (73.1)	27 (81.8)	27 (77.1)	0.63
FPE	27 (38.6)	13 (39.4)	14 (37.8)	0.89
Mejoría NRL precoz (%)	62 (88.6)	26 (78.8)	36 (97.3)	0.03
Mejoría NRL dramática (%)	44 (62.9)	18 (54.5)	26 (70.3)	0.17
Vol final del infarto	7.8 [1.3 - 25.2]	7.9 [1.5 - 23.9]	6.2 [1.2 - 25.6]	0.75
Deterioro cognitivo a 3m	24 (36.9)	11 (36.7)	13 (37.1)	0.97
mRS 0-2 a 3 m (%)	50 (71.4)	20 (60.6)	30 (81.8)	0.06
mRS excelente (0-1) a 3 m (%)	35 (50)	16 (48.5)	19 (51.4)	0.4

Tabla 9: Variables pronósticas principales y adherencia a la DMed.

Las variables dicotómicas se representan como porcentaje y las continuas, como mediana y rango intercuartílico. Nivel de significación $p < 0.05$.

Respecto al pronóstico a las 24 h, los pacientes con alta adherencia a la DMed tuvieron más frecuentemente mejoría NRL precoz (97.3% Vs. 78.8%, $p 0.03$). De los diferentes

ítems de la escala MEDAS, los pacientes que desarrollaron mejoría neurológica precoz consumían menos repostería comercial (Me, RIC) (7 g/día [0 - 50] Vs. 100 g/día [62.5 - 100], p 0.001). En el análisis multivariado ajustado por edad, sexo y glucemia basal, la buena adherencia a la DMed se comportó como un predictor independiente de mejoría NRL precoz con una OR de 11.98 (95% IC [1.1 - 130.32], p 0.04) y el menor consumo de gramos de repostería comercial con una OR de 0.97 (95% IC [0.94 - 0.99], p 0.01).

En cuanto al pronóstico funcional a los 3 meses, aquellos que alcanzaron buen pronóstico (mRS 0 - 2) tenían mayor adherencia a la DMed (81.8% de pacientes con alta adherencia Vs. 60.6%, p 0.06) y consumían menos repostería comercial (7 g/día [0 - 50] Vs. 100 g/día [9 - 100], p 0.038). El consumo de verduras, por su parte, fue significativamente superior en los que alcanzaron un pronóstico funcional excelente o mRS 0 - 1 (400 g/día [100 - 400] Vs. 200 g/día [100 - 400], p 0.034). En los análisis multivariados ajustado por edad, sexo, diabetes y NIH basal, la buena adherencia a la DMed se comportó como un predictor independiente de buen pronóstico funcional (mRS 0 - 2) a los 3 meses con una OR de 4.88 (95% IC [1.26 - 18.93], p 0.02) y el consumo de gramos de repostería comercial con una OR de 0.99 (95% IC [0.97 - 0.99], p 0.03). Además, el mayor consumo en gramos de verduras se asoció de forma independiente a un pronóstico funcional excelente (mRS 0 - 1) a los 3 meses con una OR de 1.004, (95% IC [1.000 - 1.007], p 0.03).

Finalmente, en cuanto al pronóstico cognitivo, no se encontraron diferencias entre pacientes con baja y alta adherencia a la dieta mediterránea ni tampoco en función del consumo de alimentos concretos ni en los valores de macro y micronutrientes obtenidos del recordatorio de 24 h.

5.2.2.3. Actividad física previa al ictus y pronóstico

En la **Tabla 10** se resumen las principales variables pronósticas entre los dos grupos principales de actividad física (sedentarios/moderadamente activos versus activos/muy

5 RESULTADOS

activos) según los resultados del VREM. No se encontraron diferencias en la gravedad basal del ictus medida por la escala NIH, ni tampoco en el volumen inicial del infarto (core) o el grado de colaterales. En cuanto a las variables pronósticas a las 24 h, se observó una tendencia a mayor probabilidad de mejoría neurológica precoz en el grupo de pacientes activos, sin observarse diferencias en el pronóstico funcional a los 3 meses.

	Global (n = 70)	Sedentarios/ poco activos (n = 27)	Activos/ muy activos (n = 43)	p
NIH al ingreso	14 [10 - 18]	14.5 [9.75 - 18]	13 [10 - 17.5]	0.69
Core (ml)	14 [0 - 38]	9.5 [0 - 33.5]	15 [3.5 - 38.5]	0.58
Mismatch (ml)	91 [51 - 115]	115 [58 - 145]	101 [58 - 146.5]	0.91
Buena colateralidad (%)	54 (73.1)	20 (74.1)	34 (82.9)	0.37
FPE	27 (38.6)	11 (40.7)	16 (37.2)	0.77
Mejoría NRL precoz (%)	62 (88.6)	22 (81.5)	40 (93)	0.14
Mejoría NRL dramática (%)	44 (62.9)	16 (59.3)	28 (65.1)	0.62
Vol final del infarto	7.8 [1.3 - 25.2]	7.9 [1.5 - 24.9]	6.2 [1.2 - 31.5]	0.85
Deterioro cognitivo a 3m	24 (36.9)	15 (57.7)	9 (23.1)	<0.01
mRS 0 - 2 a 3 m (%)	50 (71.4)	18 (66.7)	32 (74.4)	0.48
mRS excelente (0 - 1) a 3 m (%)	35 (50)	13 (48.1)	22 (51.2)	0.81

Tabla 10: Variables pronósticas principales y grado de AF.

Las variables dicotómicas se representan como porcentaje y las continuas, como mediana y rango intercuartílico. Nivel de significación p <0.05.

Respecto al pronóstico cognitivo, los pacientes con menor grado de AF previo al ictus tenían más probabilidad de ser diagnosticados de deterioro cognitivo a los 3 meses de seguimiento (57.7% entre los sedentarios/poco activos Vs. 23.1% en el grupo de activos, p <0.01). En una comparativa entre los sedentarios (<1250 METs) y el resto de grupos (poco activos, activos o muy activos), encontramos que el 70% de los sedentarios tenían una puntuación en los tests compatible con deterioro cognitivo a los 3 meses de seguimiento, mientras que este porcentaje era del 30.9% en el resto (p 0.024). Evaluando las puntuaciones globales de la escala VREM, éstas fueron significativamente inferiores en el grupo con deterioro cognitivo a los 3 meses (2666.36 METS-min/14 días [908.92 - 6210.18] Vs. 5410.06 METS-min/14 días [2898.57 - 8505.52], p 0.01). En el análisis multivariado, el nivel de AF previo al ictus categorizado como sedentario/poco activo se comportó como un factor independiente de mal pronóstico cognitivo con una

OR de 4.79, (95 % IC [1.49 - 15.53], p 0.008), con independencia de la edad, NIH basal y volumen final del infarto.

5.2.2.4. Biomarcadores circulantes y pronóstico

Respecto a la resistencia insulínica, los pacientes con mejoría neurológica precoz y mejoría neurológica dramática precoz presentaban índices HOMA significativamente inferiores (Me, RIC): para la mejoría NRL precoz, 12 [7 - 19.7] Vs. 19 [13 - 23.45], p 0.03, y para la mejoría NRL dramática precoz, las medianas fueron 3 [1.89 - 6.24] Vs. 4.75 [3.56 - 8.31], p 0.024. El índice HOMA se correlacionó positivamente con el volumen del infarto a las 24 h (r 0.67, p <0.01).

En cuanto a las adipocinas analizadas, los pacientes con buen pronóstico funcional (mRS 0 - 2) tenían unos niveles de resistina significativamente menores (7.96 ng/ml [6.07 - 11.15] Vs. 9.45 ng/ml [8.07 - 14.35], p 0.04), con tendencia a la significación en el caso de pronóstico funcional excelente (mRS 0 - 1) (7.78 ng/ml [6.04 - 10.8] Vs. 9.09 [7.59 - 14.17], p 0.059).

No se encontraron diferencias entre los distintos metabolitos de la vía de la colina analizados y las variables pronósticas principales.

De entre todas las citoquinas inflamatorias analizadas, se observaron niveles más altos de MCP-1 en aquellos pacientes que desarrollaron deterioro cognitivo a los 3 meses (542.14 pg/ml [181.96 - 686.48] Vs. 178 pg/ml [0 - 628.58], p 0.058).

La movilización de CPEs se asoció significativamente con la mejoría neurológica dramática precoz (84.6% vs 52.6%, p 0.019) y con el pronóstico funcional excelente (mRS 0 - 1) a los 3 meses (81.8% Vs. 60.87%, p 0.12). En cuanto al volumen final del infarto, observamos una tendencia a una correlación negativa entre las CPEs basales y el volumen final (r = -0.23, p 0.06) y encontramos asimismo que los pacientes con volúmenes mayores (Q4) experimentaban menos movilización de

CPEs que aquellos con los volúmenes más pequeños de la muestra (Q1), aunque estas diferencias no fueron significativas.

5.2.2.5.Sinergismo entre adherencia a la dieta mediterránea y actividad física

Analizamos a través de una nueva variable el posible efecto sinérgico de la adherencia a la DMed y la AF y su relación con algunos de los principales biomarcadores circulantes y variables pronósticas, creando 4 grupos posibles en función de lo previo, similares a los grupos de comparación del modelo animal:

- 1. Sedentarios/poco activos + Baja adherencia a dieta mediterránea (n = 15)
- 2. Sedentarios/poco activos + Alta adherencia a dieta mediterránea (n = 12)
- 3. Activos/muy activos + Baja adherencia a dieta mediterránea (n = 18)
- 4. Activos/muy activos + Alta adherencia a dieta mediterránea (n = 25)

Los pacientes con alta adherencia a la dieta mediterránea presentaron volúmenes de infarto inferiores que aquellos con baja adherencia. Los mayores volúmenes de infarto se observaron en los pacientes con baja adherencia a la dieta mediterránea, y que además eran sedentarios o poco activos (*Figura 23*).

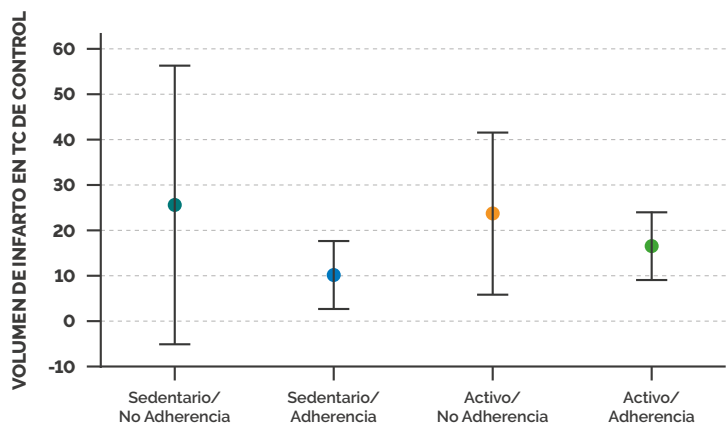


Figura 23: Volúmenes de infarto en ml (media) en cada grupo según actividad física y adherencia a DMed

Respecto a la mejoría NRL precoz a las 24 h (**Figuras 24 y 25**), ésta fue menos frecuente en el grupo de sedentarios/poco activos y con baja adherencia a la dieta mediterránea que en el resto de grupos. De forma similar, el peor pronóstico funcional a los 3 meses se observa en los pacientes sedentarios y que además tienen una baja adherencia a la dieta mediterránea (**Figura 26**), y es mejor en los que tienen adherencia a la dieta mediterránea (sean más o menos activos físicamente).

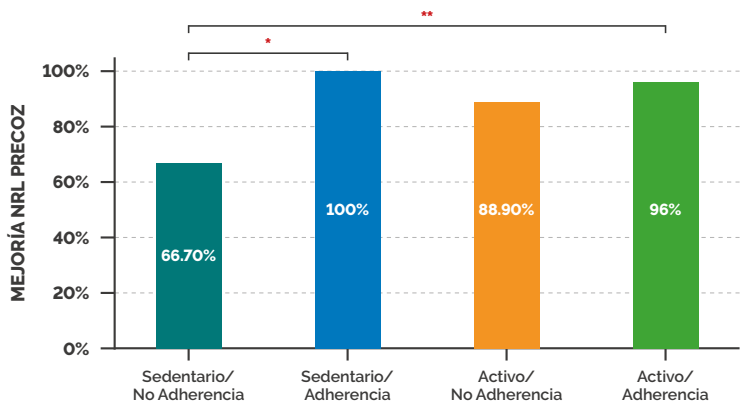


Figura 24: Porcentaje de pacientes que experimentan mejoría NRL precoz (mejoría de 4 o más puntos en NIH) en los distintos grupos según actividad física y adherencia a DMed.
* p = 0.027, ** p = 0.012.

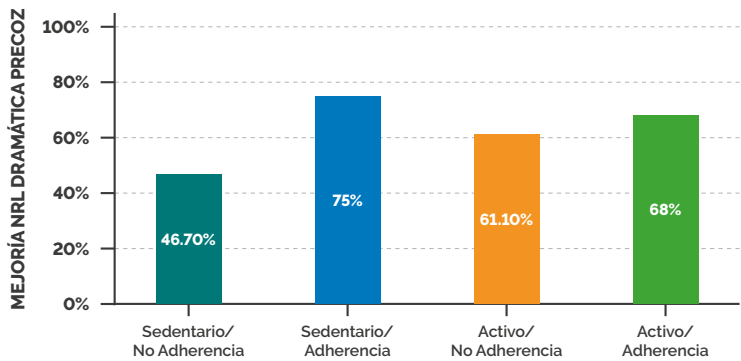


Figura 25: Porcentaje de pacientes que experimentan mejoría NRL dramática precoz (mejoría de 10 o más puntos en NIH o bien NIH 0) en los distintos grupos según actividad física y adherencia a DMed

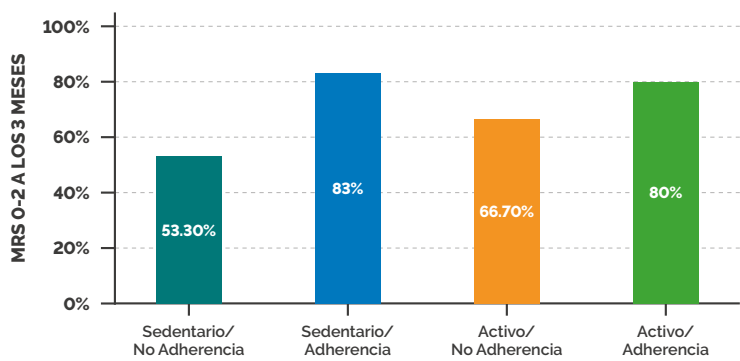


Figura 26: Porcentaje de pacientes de cada grupo y buena evolución a 3 meses (mRS 0 - 2), en los distintos grupos según actividad física y adherencia a DMed

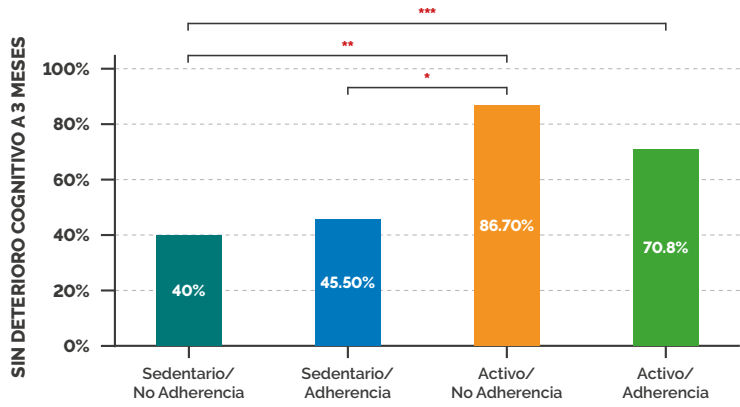


Figura 27: Porcentaje de pacientes sin deterioro cognitivo a los 3 meses de evolución en los distintos grupos según actividad física y adherencia a DMed
* p = 0.023, ** p = 0.008, *** p = 0.057.

Finalmente, teniendo en cuenta el pronóstico cognitivo (**Figura 27**), los grupos con mayor grado de actividad física fueron los que mejor evolución cognitiva presentaron, con menos desarrollo de deterioro cognitivo a los 3 meses de seguimiento.

No se observaron efectos sinérgicos entre la adherencia a la dieta mediterránea y la actividad física en las variables pronósticas evaluadas.

5.2.2.6. Resumen de los factores asociados al pronóstico

En la **Tabla 11** se resumen los factores clínicos y biomarcadores asociados a las variables pronósticas en nuestra muestra, y en la **Figura 28** se resumen las principales vías de interrelación entre dichos factores.

Mejoría NRL precoz	Mejoría NRL dramática	mRS 0-2 a 3 meses	mRS 0-1 a 3 meses	Menor volumen de infarto	Deterioro cognitivo
< Edad < DM/glucemia basal > Adherencia a DMed < Consumo repostería comercial > Consumo EPA < HOMA < Glucemia	< Edad < HOMA > Movilización CPES	< Edad < HTA < NIH basal > Adherencia a la DMed < Glucemia < Resistina	< Edad < resistina > consumo verduras	< NIH basal < HOMA > movilización CPES	> NIH basal > MCP-1 > Volumen infarto > Sedentarismo

Tabla 11: Variables asociadas al pronóstico.

Se representan en naranja las variables clínicas, en azul las radiológicas, en verde las relacionadas con la dieta, en rojo con la actividad física y en morado los biomarcadores.

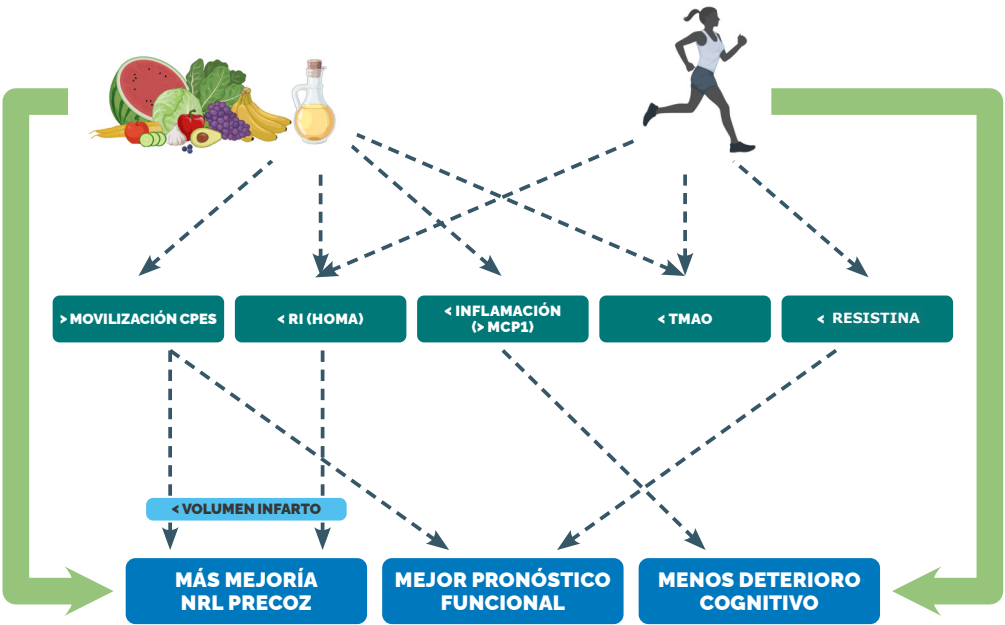


Figura 28: Resumen de los factores asociados a las principales variables pronósticas en nuestro estudio



DISCUSIÓN



6.1. SÍNTESIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente tesis se ha estudiado desde un punto de vista traslacional (modelo animal) y clínico la asociación de dos importantes hábitos de vida (dieta estilo mediterráneo y actividad física) como predictores del pronóstico tras un ictus isquémico por oclusión de gran vaso intracraneal. Los hallazgos, de forma global, parecen indicar que la dieta mediterránea, y en concreto el consumo de algunos componentes de la misma, como el aceite de oliva, podrían ejercer una influencia positiva en reducir el volumen final del infarto y el pronóstico funcional, gracias, entre otros, a diferentes mediadores como podrían ser un menor estado inflamatorio (hallazgos especialmente destacados en el modelo animal), una menor resistencia insulínica y una mayor movilización de CPEs. En cuanto a la actividad física, en el estudio clínico se ha observado la asociación de una menor actividad física previa al ictus con un peor pronóstico cognitivo a largo plazo, observándose en el modelo animal una mayor angiogénesis y neurogénesis en el grupo de ratas activas.

El modelo animal es un estudio de intervención randomizado y el estudio clínico un análisis observacional, y conjuntamente podemos extraer conclusiones muy interesantes acerca de los potenciales mecanismos biológicos implicados en la neuroprotección ejercida por la dieta y la actividad física. A continuación, se discutirán los principales hallazgos de esta tesis y su implicación en la búsqueda de estrategias que puedan condicionar una mejora pronóstica en los pacientes que sufren un ictus.

6.1.1. MODELO ANIMAL

A través de los resultados obtenidos en nuestro estudio y previamente descritos en otros, reforzamos con nuevos datos la evidencia ya existente acerca del posible efecto neuroprotector de la dieta mediterránea frente al daño isquémico cerebral, asociándose a un menor volumen del infarto y mejor recuperación funcional. Contrario a nuestra hipótesis de partida, no observamos un efecto sinérgico cuando se aplicaron conjuntamente las intervenciones "dieta estilo mediterráneo" y "actividad física" en los animales incluidos.

En nuestro estudio, las ratas que siguieron una "dieta estilo mediterráneo", la cual incluyó el aceite de oliva y la anchoa como fuente principal de ácidos grasos, así como un suplemento de hidroxitirosol, presentaron niveles inferiores de 14 citoquinas inflamatorias circulantes a nivel basal (pre-isquemia) comparadas con el grupo control. Además, estos niveles de citoquinas inflamatorias se mantuvieron a la baja en la fase aguda del seguimiento (a la hora y a los 3 días). Este mejor perfil de citoquinas basales no solo apoya el efecto antiinflamatorio de muchos de los componentes de la dieta mediterránea, sino que también refuerza el teórico efecto proinflamatorio de la dieta "tipo occidental"²⁸⁴, ya que ésta fue la dieta control utilizada en el estudio. Por otra parte, también encontramos que las ratas del grupo "actividad física" tenían un mejor perfil de citoquinas inflamatorias que las ratas del grupo "control". Puesto que ambos grupos ("control" y "actividad física") recibieron el mismo tipo de dieta ("tipo occidental"), concluimos que la actividad física atenuaría el efecto deletéreo de ésta, como ya ha sido descrito previamente²⁸⁵.

En cuanto al estrés oxidativo, se observó que las tres intervenciones condicionaron un ambiente menos oxidativo previo a la isquemia, comparadas con el grupo control, y que en el grupo de "dieta estilo mediterráneo" este efecto fue más prolongado y se mantuvo hasta los 7 días post isquemia, reforzando la evidencia sobre su acción antioxidante. De forma inesperada, encontramos que el grupo de ratas con ambas intervenciones "actividad física+dieta" presentó niveles de daño oxidativo del ADN superiores al grupo control a partir de los 7 días, y significativamente superiores al grupo dieta. En línea con estos resultados, un trabajo reciente mostró que una dosis de hidroxitirosol de 300 mg/kg/día administrada a animales que realizaban ejercicio físico parecía desencadenar un efecto deletéreo, cambiando la forma antioxidante del hidroxitirosol a una pro-oxidante²⁸⁶, hallazgos que ya se habían sugerido previamente *in vitro*²⁸⁷. De esta forma, nuestros resultados apoyarían las observaciones de estos trabajos y apuntarían así a un posible efecto pro-oxidante de 200 mg/kg/día de hidroxitirosol al combinarlo con la actividad física, aunque consideramos que se necesitan estudios futuros para dilucidar los mecanismos que subyacen a este proceso.

Por otra parte, encontramos un aumento agudo de los niveles de CPEs post-isquemia en el grupo "dieta estilo mediterráneo", que además fue el grupo que presentaba unos niveles basales más bajos de estas células. Varios trabajos previos también evaluaron el efecto de la dieta mediterránea en los niveles de CPEs tras inducir distintas lesiones, aunque no directamente tras la isquemia, y en general encontraron un efecto positivo de la dieta mediterránea sobre la movilización de CPEs^{170, 288, 289}, lo cual estaría en línea con nuestra observación. Recientemente, un estudio *in vitro* apuntó a que concentraciones bajas de hidroxitirosol podrían estimular la migración de células endoteliales²⁹⁰. Por su parte, estudios clínicos previos han demostrado que las células progenitoras CD34+, incluidas las CPEs, están relacionadas con una buena recuperación funcional tras un ictus^{275, 276, 291}, lo que coincide con los resultados de nuestro estudio. Por lo tanto, es concebible que la dieta mediterránea en general, el hidroxitirosol en particular, o ambos, podrían actuar sobre las células progenitoras CD34+, principalmente las CPEs, permitiéndoles llegar al lugar de la lesión. Desde ahí, liberarían diferentes factores que promoverían la angiogénesis y un mayor reclutamiento de CPEs, restaurando así el endotelio dañado y facilitando la creación de neovasos²⁹².

Como ya se ha descrito previamente, los polifenoles en general tienen propiedades antiapoptóticas y antioxidantes^{176-178, 180, 293, 294}. Entre ellos se encuentra el hidroxitirosol, componente del AOVE, al que se han asociado efectos neuroprotectores^{88, 295}. El ejercicio físico, por su parte, se ha relacionado con una mayor supervivencia neuronal tras una lesión²⁹⁶⁻²⁹⁸. En el análisis de la muerte neuronal y transmisión glutamatérgica en nuestro estudio, todas las condiciones experimentales fueron capaces de aumentar el número de neuronas piramidales corticales cerca de la lesión, y esto fue especialmente notable en el grupo "actividad física+dieta". Además, las ratas en el grupo de "actividad física" experimentaron más angiogénesis y neurogénesis a los 28 días posteriores a la lesión.

Existen estudios previos en modelos de isquemia en roedor en los que se probó que la administración de compuestos de aceite de oliva antes de la lesión^{299, 300} o de

hidroxitirosol después^{88, 295} conllevaba a un menor volumen de infarto y una mejor recuperación funcional. Siguiendo esta línea, encontramos resultados similares al observar que las ratas del grupo "dieta estilo mediterráneo" experimentaron una mejor recuperación a corto plazo (3 y 7 días) que creemos podría explicarse por los efectos antiinflamatorios y antioxidantes observados en el experimento, así como a la mayor movilización de CPEs y menor muerte neuronal. Además, observamos una tendencia a una mejor recuperación funcional precoz también en los otros grupos de intervención ("actividad física" y "dieta+actividad física") que hipotetizamos pueda estar influida por los efectos en la angiogénesis y neurogénesis observados en estos grupos de ratas activas.

6.2.2. ESTUDIO CLÍNICO

A través del estudio clínico observacional obtuvimos datos que refuerzan la evidencia ya disponible acerca del potencial efecto beneficioso de seguir una dieta mediterránea en la recuperación funcional a corto y largo plazo tras el ictus isquémico. Por otro lado, en el presente estudio no se determinó un papel tan determinante de la actividad física previa al ictus en el pronóstico funcional de los pacientes, si bien se observó su asociación con un mejor pronóstico cognitivo. Aunque no observamos efectos sinérgicos en la práctica de actividad física y adherencia a la dieta mediterránea en los principales resultados pronósticos, los pacientes sedentarios y que además tenían una baja adherencia a la dieta mediterránea presentaron una tendencia a peor evolución (mayor volumen de infarto, menor probabilidad de mejoría neurológica precoz y de independencia funcional a los 3 meses del ictus).

La dieta mediterránea puede ejercer su efecto beneficioso en el ictus a través de las propiedades de algunos de sus componentes, entre los que se encuentran los AGP y entre ellos, el EPA. En modelos animales, la utilización de este compuesto antes del ictus, bien solo o en combinación con otros AGP, propició un mejor pronóstico funcional^{181, 301}. En humanos, se ha probado que la utilización de un derivado de este AGP, el icosapento de etilo, en pacientes con riesgo vascular y niveles elevados de

triglicéridos, disminuye los eventos vasculares, incluido el ictus⁷³. Los mecanismos últimos a través de los cuales ejercen este beneficio no están claros, pero se ha apuntado a una reducción del estado proinflamatorio secundario al ictus que conduciría a una mejor recuperación y menores volúmenes de infarto y también a una reducción de la aterosclerosis y fenómenos protrombóticos, reduciendo así la incidencia de un primer evento vascular³⁰¹. En nuestra muestra de pacientes, la baja adherencia a la dieta mediterránea se asoció a mayor probabilidad de sufrir un ictus de origen aterotrombótico, algo ya observado en estudios previos^{128,133}. Así, y en base a los resultados obtenidos en nuestro estudio, aportamos nueva evidencia acerca de que el posible efecto beneficioso de la dieta mediterránea en el pronóstico tras el ictus venga en parte determinado por las funciones de los AGP y AGM, cuyo consumo es más frecuente en pacientes con alta adherencia a este tipo de dieta. Los niveles bajos de colesterol HDL, más allá de su implicación en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica y de los eventos clínicos asociados, también se han asociado con un peor pronóstico y peor recuperación tras haber sufrido un ictus³⁰², en parte por sus efectos antiinflamatorios. En nuestro estudio, encontramos una correlación positiva entre el consumo de EPA y los niveles de colesterol HDL, y observamos que el consumo de aceite de oliva se asoció a niveles más bajos de dos citoquinas inflamatorias (MCP-1 e IL-8). Es posible que la interrelación entre estos factores fomente una mejor recuperación funcional a través de mecanismos antiinflamatorios, aunque se necesitan más estudios que aclaren los mecanismos últimos que subyacen a esta asociación y efecto.

Respecto a las adipocinas, en nuestros pacientes los niveles de adiponectina estaban directamente relacionados con el consumo de AGM, AGP (EPA y DHA), ácido oleico y linoleico. La adiponectina, citocina mayoritaria secretada por los adipocitos y con funciones antiinflamatorias y anti-aterogénicas, está íntimamente relacionada con algunos componentes clásicos de la dieta mediterránea. En la misma línea, encontramos niveles significativamente inferiores de adiponectina entre los pacientes con ictus aterotrombótico. De forma similar, aportamos nueva evidencia que apoya la

relación entre este patrón de dieta y la resistina, adipocina con efectos en este caso inflamatorios y relacionada inversamente en nuestro estudio con la ingesta de AGM y ácido oleico. Los niveles de resistina fueron además significativamente superiores en los pacientes sedentarios. A diferencia de lo habitualmente descrito, no encontramos relación entre las concentraciones de adipocinas y la grasa abdominal (medida indirectamente a través de la cintura abdominal), si bien la leptina fue significativamente más alta en obesos. Esto quizás pueda explicarse por los diferentes componentes del tejido adiposo, siendo la función secretora principal la del tejido adiposo blanco. En los últimos años, ha cobrado interés la función endocrina del tejido adiposo blanco, que es el mayoritario en los seres humanos y se distribuye fundamentalmente a nivel visceral y subcutáneo. La disfunción de este tejido, clásicamente descrita en la obesidad, se ha asociado con una secreción de adipocinas que favorece un estado proinflamatorio. Hipotetizamos así que la dieta mediterránea influye no solo en la cantidad de tejido adiposo si no, y quizás más importante aún, en su composición y función, siendo esto determinante en favorecer un perfil de adipocinas balanceado hacia un estado menos inflamatorio. Esta orientación iría en la línea de investigaciones recientes que apuntan a la existencia de distintos fenotipos dentro de la obesidad y el sobrepeso, no todos ellos con efectos tan deletéreos sobre la salud, con una tendencia a desvincular la obesidad aislada de los estados inflamatorios, situando la disfunción del tejido adiposo asociado a la obesidad el principal actor³⁰³.

En un trabajo previo de nuestro grupo se encontró un mayor porcentaje de pacientes diabéticos en el grupo con mayor adherencia a la dieta mediterránea, hipotetizando que esto podría deberse a que los pacientes diagnosticados de esta patología seguían unos mejores hábitos dietéticos como parte de su tratamiento¹³³. Por el contrario, en este caso observamos que la adherencia a la dieta mediterránea, y especialmente el consumo de aceite de oliva, se asociaron a menor prevalencia de diabetes y menores valores de glucemia basal, HbA1 y resistencia insulínica. La resistencia insulínica (RI) es sobradamente conocida como el paso previo al desarrollo de DM y un factor de riesgo

independiente en el desarrollo del ictus isquémico. Más allá de esto, la RI influiría de forma deletérea en la evolución tras el ictus empeorando su pronóstico. Aunque no del todo conocido, se cree que parte de este efecto podría estar relacionado con la hiperglucemia asociada que, entre otros, se ha relacionado con el desarrollo de edema cerebral y volúmenes mayores de infarto^{304,305}. Nuestros datos apuntan a que una menor RI determinada por el índice HOMA se relaciona con un mejor pronóstico funcional y también con un menor volumen final del infarto, pero no encontramos en cambio asociación entre la glucemia basal y este último. Es por eso que hipotetizamos que en el efecto que ejerce la RI intervengan probablemente varios factores más allá de la hiperglucemia de forma aislada y que, de esta forma, la RI actuaría como un factor de riesgo también en pacientes no diabéticos, posiblemente porque la insulina tenga cierto efecto neuroprotector intrínseco que se atenúe en situaciones de resistencia a esta hormona, tal y como ya se apuntó previamente³⁰⁴.

Otro de los posibles mecanismos implicados, la movilización de CPEs, se relacionó en nuestro estudio con una mejor evolución clínica a corto plazo (mejoría NRL dramática precoz), sin observar en cambio efecto sobre las variables pronósticas a 3 meses. Además, en el análisis de las CPEs se observó una relación positiva entre la movilización de las mismas y el consumo de aceite de oliva, y una relación inversa con la RI. Es por eso que consideramos que esta movilización de CPEs está más condicionada por unos componentes concretos de la DMed y no tanto por una buena o mala adherencia en sí, cobrando mayor importancia la identificación de los elementos últimos que pueden llevar a mejorar o incrementar la movilización de estas células. Publicaciones recientes apuntan a que el efecto positivo de las CPEs en el pronóstico del ictus va más allá de la fase aguda y subaguda, hallazgos que también se han encontrado en el caso de la cardiopatía isquémica^{306,307}. Es sabido que hay distintos subtipos de CPEs, con orígenes también diversos (médula ósea y bazo fundamentalmente). Se ha señalado que, tanto en estudios experimentales como clínicos, la utilización de unas u otras podría conllevar distintos efectos³⁰⁸. En el caso particular del ictus,

no se ha investigado exactamente el efecto de los distintos subtipos a corto y largo plazo pero creemos interesante considerar el subtipo concreto de estas células a la hora de evaluar las distintas variables pronósticas e intentar clarificar así los mecanismos últimos que subyacen a la función de cada una de ellas.

En el análisis de los metabolitos de la vía de la colina, observamos que los pacientes que tenían una buena adherencia a la dieta mediterránea y aquellos que realizaban más actividad física previa al ictus, presentaban una menor concentración de TMAO, molécula asociada a eventos cardiovasculares en otros estudios^{94,96}. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los distintos metabolitos de la vía de la colina analizados y las variables pronósticas principales en nuestros pacientes.

En cuanto a los hallazgos en relación a la actividad física previa al ictus, el más destacado es que el sedentarismo se asoció de forma independiente al desarrollo de deterioro cognitivo a los tres meses post-ictus, algo que ya se ha publicado con anterioridad³⁰⁹. Consideramos que aportar más evidencia a esta observación es algo importante ya que, aunque la actividad física se repite frecuentemente como factor que puede influir en el desarrollo de deterioro cognitivo^{227,310}, hasta la fecha, no han sido muchos los trabajos publicados que hayan evaluado la posible asociación entre el nivel de AF previo al ictus y el desarrollo de deterioro cognitivo posterior^{309,311}. Aunque no pudimos esclarecer los mecanismos biológicos directamente relacionados, probablemente coexistan múltiples, entre los que se encuentren un efecto neuroprotector, un mejor control de los factores de riesgo vascular y posiblemente, y no menos importante, un mejor estado anímico, muy relacionado con un mal pronóstico cognitivo después de esta patología³¹². Aunque no evaluamos directamente la situación emocional de los pacientes incluidos, cabe reseñar que en las escalas de AF aplicadas se evalúan actividades de ocio y tiempo libre más allá de las puramente deportivas. De esta forma, los pacientes sedentarios no lo eran únicamente por no realizar un deporte con regularidad, sino que también realizaban

menos actividades lúdicas. Es probable que estos pacientes más inactivos sufrieran también de forma más significativa las secuelas neuropsicológicas del ictus y que esto conllevara a una peor puntuación en los test cognitivos practicados. Retrocediendo a lo observado en el modelo animal y la relación entre la AF y los fenómenos de neurogénesis y angiogénesis, no valorados en el estudio clínico, hipotetizamos que ambos procesos podrían influir en el desarrollo de deterioro cognitivo posterior y en esa mejor evolución cognitiva observada en los pacientes más activos, tal y como ya se describió previamente en modelos animales^{313, 314}. Aunque no pudimos establecer una relación directa entre la AF y las citoquinas inflamatorias estudiadas, sí observamos niveles más elevados de MCP-1 entre los pacientes con deterioro cognitivo en el seguimiento. El MCP-1 es una citoquina proinflamatoria que se ha asociado con algunos de los cambios anatomopatológicos descritos en la enfermedad de Alzheimer³¹⁵, pero también se ha descrito su asociación con el ictus, encontrando niveles más elevados en pacientes con esta patología frente a controles sanos, posiblemente actuando en procesos de aterogénesis³¹⁶. De hecho, en nuestra muestra encontramos niveles significativamente más elevados de MCP-1 entre los pacientes con aterosclerosis clínica, lo cual iría a favor de esta teoría. Asimismo, como se ha comentado previamente, los pacientes sedentarios presentaban niveles significativamente más altos de resistina, molécula que se ha relacionado con el deterioro cognitivo en un metanálisis reciente³¹⁷.

6.3.3. CONCLUSIONES DE AMBOS ESTUDIOS

En conjunto, nuestros hallazgos indican que la dieta mediterránea regula a la baja las citoquinas inflamatorias basales (previas a la isquemia) y atenúa la respuesta inmunitaria aguda posterior a la lesión isquémica cerebral, lo que se traduciría en un menor volumen del infarto y una recuperación funcional más rápida en el modelo animal. En el estudio clínico, realizamos una observación similar en términos genéricos, ya que los pacientes que seguían una buena adherencia a la dieta mediterránea alcanzaban una mejor recuperación funcional precoz y también a los 3 meses tras el ictus,

posiblemente en parte por mecanismos antiinflamatorios asociados a algunos de sus componentes, una menor resistencia insulínica y una mayor movilización de CPEs. Nuestro estudio proporciona la primera demostración in vivo de que el consumo regular de una dieta estilo mediterráneo suplementada con hidroxitirosol puede modular positivamente el sistema inmunitario, apoyando la hipótesis de que la inflamación tiene un papel clave en la fisiopatología del daño isquémico. Por otra parte, observamos una mayor angiogénesis y neurogénesis asociada a la actividad física en el modelo animal y un mejor pronóstico cognitivo en los pacientes activos físicamente en el modelo clínico. Finalmente, no pudimos demostrar un sinergismo entre la actividad física y la dieta mediterránea en la mejoría de las variables pronósticas.

Serán necesarios futuros estudios para determinar los mecanismos moleculares exactos que subyacen al efecto beneficioso de la dieta mediterránea en conjunto, o de sus componentes en particular, como tras el daño isquémico cerebral.

6.2. LIMITACIONES

Nuestro estudio presenta las que consideramos importantes limitaciones a destacar. En primer lugar, en el estudio clínico, la inclusión total de pacientes fue inferior al tamaño muestral calculado ($n = 150$). Este hecho obedece a varias razones. En primer lugar, el estudio fue diseñado para un reclutamiento multicéntrico pero este periodo coincidió con la pandemia por el virus SARS-CoV 2, lo cual dificultó la inclusión de pacientes en general y la coordinación con otros hospitales en particular. En segundo lugar, muchos de los pacientes tratados no pudieron ser incluidos porque, por motivos asistenciales, los pacientes fueron trasladados precozmente a sus hospitales de origen. En otras ocasiones, encontramos la dificultad de la cumplimentación de la información y las escalas, ya que las entrevistas se realizaron de forma retrospectiva y en muchas ocasiones, los pacientes no estaban capacitados para responder por la afectación clínica secundaria al ictus y no disponían de un contacto o familiar apto para aportar la información necesaria, por lo que muchos de estos pacientes no pudieron ser incluidos. Esta limitación está también

relacionada con otra importante, y es que los pacientes incluidos en general tuvieron una muy buena evolución clínica, lo cual dificultó la evaluación de algunos factores de mal pronóstico, tales como la mortalidad. Por otra parte, el modelo clínico siguió un diseño observacional y los pacientes se incluyeron después de haber sufrido el ictus. Todas las escalas se aplicaron de forma retrospectiva por lo que el sesgo de memoria a la hora de responder y completar las mismas puede haber influido en los resultados. Parece importante reseñar también que, a la hora de realizar la evaluación cognitiva, no disponíamos de un test cognitivo previo al ictus, simplemente la exclusión de pacientes con diagnóstico de deterioro cognitivo o demencia previos. Por último, la insulinemia se determinó en la muestra extraída a los pacientes tras el ingreso, el día siguiente a la trombectomía mecánica. Puesto que los pacientes en ese momento permanecen en dieta absoluta, se puede administrar insulina intravenosa para ajustar los niveles de glucemia en caso de que sea necesario. Esta insulina exógena es indiferenciable de la endógena por los métodos utilizados en nuestro centro para su determinación, por lo que los valores obtenidos en algunos casos pudieran estar sobreestimados y, por ende, el índice HOMA calculado. No obstante, es importante reseñar que los pacientes con altos requerimientos de insulina exógena eran pacientes con DM con mal control, por lo que creemos que la resistencia insulínica sería real, con gran seguridad.

En cuanto al modelo animal, hay que destacar que todas las ratas utilizadas fueron machos. Otra limitación es el control sobre el grado de actividad física que realizaban los roedores. Aunque ideamos un protocolo y entrenamiento específico para los grupos que realizaban AF, el nivel de actividad y movimiento que mantuvieron los animales fuera del tiempo de entrenamiento no fue algo controlable y posiblemente existiesen diferencias no cuantificables entre unos y otros animales.

6.3. DIRECCIONES FUTURAS

El ictus es una patología con una alta prevalencia e incidencia, que se prevé en ascenso en los próximos años, y una de las principales causas de mortalidad y discapacidad en

el adulto. Los tratamientos en fase aguda disponibles hoy en día no pueden aplicarse a todos los casos, siendo un pequeño porcentaje de pacientes los que pueden beneficiarse de ellos. Sumado a esto, se sabe que una vez establecido el infarto cerebral no existen hasta la fecha terapias que promuevan de forma significativa la recuperación del tejido dañado. Con todo ello, la búsqueda de vías moleculares, mecanismos y terapias con efecto neuroprotector y neurorregenerador han sido y continúan siendo un campo de investigación en desarrollo. Con este estudio aportamos nueva evidencia acerca del posible efecto neuroprotector de la dieta mediterránea y la actividad física. No obstante, puesto que muchos de los mecanismos continúan siendo una incógnita, la investigación a este respecto es de gran importancia a fin de intentar esclarecer las vías y moléculas que subyacen a este efecto beneficioso. Consideramos que, de esta forma, aproximarse a una terapia neurorregeneradora y neuroprotectora en el ictus agudo sería más plausible.

Más allá de esto, la prevención primaria continúa siendo fundamental en el desarrollo de esta patología. Dadas sus importantes implicaciones en los pacientes que la sufren y también en sus familiares, junto con su alta incidencia, hacen de suma importancia el desarrollo de campañas de prevención sólidas, en las que se conciencie seriamente a la población acerca de la importancia de los hábitos de vida saludables. La educación sanitaria ha de jugar un papel fundamental, con mensajes claros y accesibles a toda la población. Los sanitarios debemos ser partícipes también de esto y asesorar y motivar a los pacientes no solo en la adherencia al tratamiento farmacológico sino también en adoptar conductas beneficiosas para su salud. Las conclusiones de la presente tesis ayudan a reforzar el mensaje de que la dieta mediterránea y la práctica de actividad física no solo ayudan a disminuir la probabilidad de sufrir un ictus, sino que favorecen que la recuperación tras la isquemia sea más favorable, una vez acontecida esta.



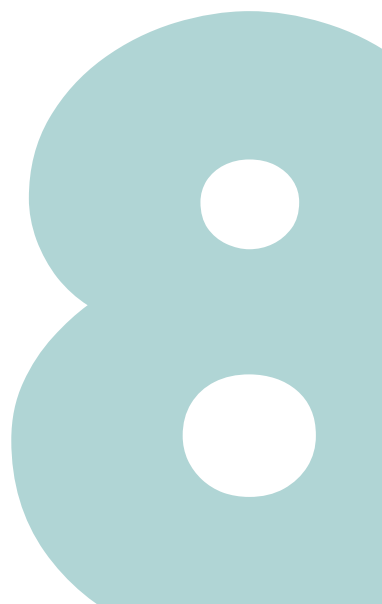
CONCLUSIONES



1. En el modelo animal, la dieta estilo mediterráneo enriquecida con hidroxitirosol parece ejercer un efecto neuroprotector a través de una modulación sobre la respuesta inflamatoria sistémica basal y en los primeros días tras el ictus, resultando todo ello en unos menores volúmenes de infarto y una tendencia a una mejor recuperación funcional a corto plazo.
2. En el estudio clínico incluyendo pacientes con ictus isquémico de circulación anterior, una mayor adherencia a la dieta mediterránea se asoció de forma independiente con la mejoría neurológica precoz y el mejor pronóstico funcional a 3 meses. El sedentarismo, se asoció de forma independiente con el desarrollo de deterioro cognitivo a los tres meses tras el ictus.
3. Una menor resistencia insulínica determinada por el índice HOMA, una mayor movilización de CPEs y un perfil más favorable de adipocinas (niveles más altos de adiponectina y más bajos de resistina) podrían estar relacionados con el pronóstico funcional favorable en pacientes con alta adherencia a la dieta mediterránea y con mayor consumo de ácidos grasos saludables. Tanto la adherencia a la dieta mediterránea como la práctica de actividad física se asociaron a niveles más bajos del metabolito de la vía de la colina TMAO.



BIBLIOGRAFÍA



1. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999 Sep 1;22(9):391-7.
2. Datta A, Sarmah D, Mounica L, Kaur H, Kesharwani R, Verma G, et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Translational Stroke Research*. 2020;11:1185-202.
3. Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke*. 2012;7(5):378-85.
4. Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP. Exciting, Radical, Suicidal. How Brain Cells Die After Stroke. *Stroke*. 2005 Feb 1;36(2):189-92.
5. Wu L, Wu W, Tali ET, Yuh WT. Oligemia, Penumbra, Infarction: Understanding Hypoperfusion with Neuroimaging. *Neuroimaging Clinics of North America*. 2018 Nov 1;28(4):599-609.
6. Wiendl H, Elger C, Förstl H, Hartung HP, Oertel W, Reichmann H, et al. Gaps Between Aims and Achievements in Therapeutic Modification of Neuronal Damage ("Neuroprotection"). *Neurotherapeutics*. 2015;12:449-54.
7. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet Neurology*. 2016 Jul 1;15(8):869-81.
8. Vijayakumar N T, Sangwan A, Sharma B, Majid A, GK R. Cerebral Ischemic Preconditioning: the Road So Far. *Molecular Neurobiology*. 2015 Jun 17;53(4):2579-93.
9. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
10. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain research*. 1990 Sep 24;528(1):21-4.
11. Johnston SC. Ischemic preconditioning from transient ischemic attacks? Data from the Northern California TIA Study. *Stroke*. 2004 Nov;35(11 Suppl 1):2680-2.
12. Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural regeneration research*. 2020 Jan 1;15(1):16-9.
13. El atlas del ictus en España 2019 [Internet]. [cited 2022 Oct 3]. Available from: https://www.sen.es/images/2020/atlas/Atlas_del_Ictus_de_Espana_version_web.pdf
14. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, et al. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet*. 2016 Aug;388(10046):761-75.
15. Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, Braun LT, Bravata DM, Chaturvedi S, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014 Dec 11;45(12):3754-832.
16. García Pastor A, López-Cancio Martínez E, Rodríguez-Yáñez M, Alonso de Leciñana M, Amaro S, Arenillas JF, et al. Recommendations of the Spanish Society of Neurology for the prevention of stroke. Interventions on lifestyle and air pollution. *Neurología (Barcelona, Spain)*. 2021 Mar;36(5):377-87.

17. Siasos G, Tsigkou V, Kokkou E, Oikonomou E, Vavuranakis M, Vlachopoulos C, et al. Smoking and atherosclerosis: mechanisms of disease and new therapeutic approaches. *Current medicinal chemistry*. 2014 Oct 18;21(34):3936–48.
18. Epstein KA, Viscoli CM, Spence JD, Young LH, Inzucchi SE, Gorman M, et al. Smoking cessation and outcome after ischemic stroke or TIA. *Neurology*. 2017 Oct 17;89(16):1723–9.
19. Kleindorfer DO, Towfighi A, Chaturvedi S, Cockcroft KM, Gutierrez J, Lombardi-Hill D, et al. 2021 Guideline for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack; A guideline from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2021;52:E364–467.
20. Zhang C, Qin YY, Chen Q, Jiang H, Chen XZ, Xu CL, et al. Alcohol intake and risk of stroke: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *International journal of cardiology*. 2014 Jul 1;174(3):669–77.
21. Haseeb S, Alexander B, Baranchuk A. Wine and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Circulation*. 2017 Oct 10;136(15):1434–48.
22. O'Donnell MJ, Denis X, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*. 2010;376(9735):112–23.
23. Booth J, Connelly L, Lawrence M, Chalmers C, Joice S, Becker C, et al. Evidence of perceived psychosocial stress as a risk factor for stroke in adults: a meta-analysis. *BMC neurology*. 2015 Nov 12;15(1):233.
24. Strazzullo P, D'Elia L, Cairella G, Garbagnati F, Cappuccio FP, Scalfi L. Excess Body Weight and Incidence of Stroke. Meta-analysis of Prospective Studies With 2 Million Participants. *Stroke*. 2010 May 1;41(5):418–26.
25. Vemmos K, Ntaios G, Spengos K, et al. Association between obesity and mortality after acute first-ever stroke: The obesity-stroke paradox. *Stroke*. 2011 May;42(1):30–6.
26. Dehlendorff C, Andersen KK, Olsen TS. Body mass index and death by stroke: no obesity paradox. *JAMA neurology*. 2014;71(8):978–84.
27. Rees K, Takeda A, Martin N, Ellis L, Wijesekara D, Vepa A, et al. Mediterranean-style diet for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. The Cochrane database of systematic reviews. 2019 Mar 13;3(3):CD009825.
28. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *New England Journal of Medicine*. 2018 Jun 21;378(25).
29. 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. *N Engl J Med*. 1997 Apr 17;336(16):1117–24.
30. 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. *N Engl J Med*. 2001 Jan 4;344(1):3–10.
31. Chiavaroli L, Viguiioulk E, Nishi SK, Mejia SB, Rahelić D, Kahleová H, et al. DASH Dietary Pattern and Cardiometabolic Outcomes: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients*. 2019 Feb 1;11(2).

32. Lee C Do, Folsom AR, Blair SN. Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke*. 2003 Oct 1;34(10):2475–81.
33. Warburton DER, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. *Curr Opin Cardiol*. 2017 Sep 1;32(5):541–56.
34. Turan TN, Nizam A, Lynn MJ, Egan BM, Le NA, Lopes-Virella MF, et al. Relationship between risk factor control and vascular events in the SAMMPRIS trial. *Neurology*. 2017 Jan 24;88(4):379–85.
35. Martínez-González MÁ, Hershey MS, Zazpe I, Trichopoulou A. Transferability of the Mediterranean Diet to Non-Mediterranean Countries. What Is and What Is Not the Mediterranean Diet. *Nutrients*. 2017;9(11):E1226.
36. Trichopoulou A, Martínez-González MA, Tong TY, Forouhi NG, Khandelwal S, Prabhakaran D, et al. Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. *BMC Medicine*. 2014;12:112.
37. Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy Traditional Mediterranean Diet: An Expression of Culture, History, and Lifestyle. *Nutrition Reviews*. 1997 Nov;55(11):383–9.
38. Fundación Dieta Mediterránea [Internet]. [cited 2020 Apr 14]. Available from: <https://dieta-mediterranea.com/nutricion-saludable-ejercicio-fisico/>
39. Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-De-Mesquita B, Ocké M, Peeters PH, et al. Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ*. 2005;330(7498):991.
40. Mente A, de Koning L, Shannon H, Anand S. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 2009 Apr 13;169(7):659–69.
41. de Lorgeril M. Mediterranean Diet and Cardiovascular Disease: Historical Perspective and Latest Evidence. *Curr Atheroscler Rep*. 2013;15:370.
42. Misirli G, Benetou V, Lagiou P, Bamia C, Trichopoulos D, Trichopoulou A. Relation of the Traditional Mediterranean Diet to Cerebrovascular Disease in a Mediterranean Population. *American Journal of Epidemiology*. 2012 Dec 15;176(12):1185–92.
43. Rossi M, Turati F, Lagiou P, Trichopoulos D, Augustin LS, La C, et al. Mediterranean diet and glycaemic load in relation to incidence of type 2 diabetes: results from the Greek cohort of the population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Diabetologia*. 2013;56:2405–13.
44. Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA, Panagiotakos DB. The Effect of Mediterranean Diet on Metabolic Syndrome and its Components A Meta-Analysis of 50 Studies and 534,906 Individuals. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(11):1299–313.
45. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, et al. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ*. 1995 Dec 2;311(7018):1457.
46. 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.

47. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Dec;16(8):559–68.
48. Buckland G, González CA, Agudo A, Vilardell M, Berenguer A, Amiano P, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC Cohort Study. *American journal of epidemiology*. 2009 Dec;170(12):1518–29.
49. Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Wright M, Gomez-Gracia E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *European journal of clinical nutrition*. 2004 Nov;58(11):1550–2.
50. 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. *Annals of Internal Medicine*. 2006 Jul 4;145(1):1–11.
51. Sotos-Prieto M, Santos-Beneit G, Bodega P, Pocock S, Mattei J, Luis Peñalvo J. Validation of a questionnaire to measure overall Mediterranean lifestyle habits for research application: the MEDiterranean LIFEstyle index (MEDLIFE). *Nutr Hosp*. 2015;32(3):1153–63.
52. Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, et al. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *The British journal of nutrition*. 2010 Jun;103(12):1808–16.
53. Guasch-Ferré M, Babio N, Martínez-González MA, Corella D, Ros E, Martín-Peláez S, et al. Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2015;102:1563–73.
54. Michas G, Micha R, Zampelas A. Dietary fats and cardiovascular disease: Putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis*. 2014;234:320–8.
55. Clarke R, Frost C, Collins R, Appleby P, Peto R. Dietary lipids and blood cholesterol: Quantitative meta-analysis of metabolic ward studies. *British Medical Journal*. 1997 Jan 11;314(7074):112–7.
56. Mozaffarian D, Clarke R. Quantitative effects on cardiovascular risk factor... [Eur J Clin Nutr. 2009] - PubMed result. *European journal of clinical nutrition*. 2009 May;63 Suppl 2:S22–33.
57. Schwingshackl L, Strasser B, Hoffmann G. Effects of monounsaturated fatty acids on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011 Dec;59(2–4):176–86.
58. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: Synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*. 2012 Dec 11;4(12):1989–2007.
59. Hooper L, Summerbell C, Thompson R, Sills D, Roberts F, Moore H, et al. Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;(5):CD002137.
60. Baum SJ, Kris-Etherton PM, Willett WC, Lichtenstein AH, Rudel LL, Maki KC, et al. Fatty acids in cardiovascular health and disease: A comprehensive update. *J Clin Lipidol*. 2012;6:216–34.

61. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, et al. Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack. *Stroke*. 2014 Jul;45(7):2160–236.
62. Mozaffarian D, Micha R, Wallace S. Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Medicine*. 2010 Mar;7(3):e1000252.
63. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*. 2016 Mar 2;8(3):128.
64. Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS, Elisaf MS. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: A systematic review and meta-analysis. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2012 Sep 5;308(10):1024–33.
65. Bosch J, Gerstein HC, Dagenais GR, Díaz R, Dyal L, Jung H, et al. N-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia. *New England Journal of Medicine*. 2012 Jul 26;367(4):309–18.
66. Roncaglioni MC, Tombesi M, Avanzini F, Barlera S, Caimi V, Longoni P, et al. N-3 fatty acids in patients with multiple cardiovascular risk factors. *New England Journal of Medicine*. 2013 Sep 5;368(19):1800–8.
67. Hu FB, Bronner L, Willett WC, Stampfer MJ, Rexrode KM, Albert CM, et al. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA*. 2002 Apr 10;287(14):1815–21.
68. Kotwal S, Jun M, Sullivan D, Perkovic V, Neal B. Omega 3 fatty acids and cardiovascular outcomes: Systematic review and meta-analysis. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2012 Nov;5(6):808–18.
69. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F. Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: A systematic review. *British Journal of Nutrition*. 2012 Jun;107(SUPPL. 2):S201-13.
70. Casula M, Soranna D, Catapano AL, Corrao G. Long-term effect of high dose omega-3 fatty acid supplementation for secondary prevention of cardiovascular outcomes: A meta-analysis of randomized, double blind, placebo controlled trials. *Atherosclerosis Supplements*. 2013;14(2):243–51.
71. Chowdhury R, Stevens S, Gorman D, Pan A, Warnakula S, Chowdhury S, et al. Association between fish consumption, long chain omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Online)*. 2012 Nov 3;345(7881).
72. Khaw KT, Friesen MD, Riboli E, Luben R, Wareham N. Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: The EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS Medicine*. 2012 Jul;9(7).
73. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Ketchum SB, et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *New England Journal of Medicine*. 2019 Jan 3;380(1):11–22.
74. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. AHA Dietary Guidelines. *Stroke*. 2000 Nov;31(11):2751–66.

75. Harris WS, Mozaffarian D, Rimm E, Kris-Etherton P, Rudel LL, Appel LJ, et al. Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2009 Feb 17;119(6):902–7.
76. Committee TESO (ESO) EC and the ESOW. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack 2008. *Cerebrovascular Diseases*. 2008 May 6;25(5):457–507.
77. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and pharmacotherapy*. 2002;56(8):365–79.
78. de Lorgeril M, Renaud S, Salen P, Monjaud I, Mamelle N, Martin JL, et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *The Lancet*. 1994 Jun 11;343(8911):1454–9.
79. Stender S, Astrup A, Dyerberg J. Ruminant and industrially produced trans fatty acids: health aspects. *Food Nutr Res*. 2008;52:10.3402/fnr.v52iO.1651.
80. Bendsen NT, Christensen R, Bartels EM, Astrup A. Consumption of industrial and ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2011;65:773–83.
81. De Oliveira Otto MC, Mozaffarian D, Kromhout D, Bertoni AG, Sibley CT, Jacobs DR, et al. Dietary intake of saturated fat by food source and incident cardiovascular disease: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2012 Aug 1;96(2):397–404.
82. Schwab U, Lauritzen L, Tholstrup T, Haldorsson TI, Riserus U, Uusitupa M, et al. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food Nutr Res*. 2014;58:25154.
83. Hunter JE, Zhang J, Kris-Etherton PM, Childs L. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: A systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010 Jan 1;91(1):46–63.
84. Zamora-Ros R, Knaze V, Rothwell JA, Hémon B, Moskal A, Overvad K, et al. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European journal of nutrition*. 2016 Jun 17;55(4):1359–75.
85. Mérida DM, Vitelli-Storelli F, Moreno-Franco B, Rodríguez-Ayala M, López-García E, Banegas JR, et al. Polyphenol intake and mortality: A nationwide cohort study in the adult population of Spain. *Clin Nutr*. 2023 Jul;42(7):1076–85.
86. Ditano-Vázquez P, Torres-Peña JD, Galeano-Valle F, Pérez-Caballero AI, Demelo-Rodríguez P, Lopez-Miranda J, et al. The Fluid Aspect of the Mediterranean Diet in the Prevention and Management of Cardiovascular Disease and Diabetes: The Role of Polyphenol Content in Moderate Consumption of Wine and Olive Oil. *Nutrients*. 2019 Nov 1;11(11).
87. Mazzocchi A, Leone L, Agostoni C, Pali-Schöll I. The Secrets of the Mediterranean Diet. Does [Only] Olive Oil Matter? *Nutrients*. 2019 Dec 1;11(12).
88. Calahorra J, Shenk J, Wielenga VH, Verweij V, Geenen B, Dederen PJ, et al. Hydroxytyrosol, the major phenolic compound of olive oil, as an acute therapeutic strategy after ischemic stroke. *Nutrients*. 2019 Oct 1;11(10).

89. Rojo-López MI, Bermúdez-López M, Castro E, Farràs C, Torres G, Pamplona R, et al. Low adherence to the Mediterranean diet is associated with increased prevalence and number of atherosclerotic plaques in the ILERVAS cohort. *Atherosclerosis*. 2023 Sep;380:117191.
90. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*. 2018 Nov 16;362(6416):776–80.
91. Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammation Influence Brain Physiology and Pathology. *Frontiers in immunology*. 2020 Dec 10;11.
92. Durgan DJ, Lee J, McCullough LD, Bryan RM. Examining the Role of the Microbiota-Gut-Brain Axis in Stroke. *Stroke*. 2019 Aug 1;50(8):2270–7.
93. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011 Apr 7;472(7341):57–65.
94. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2013 Apr 25;368(17):1575–84.
95. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 May;19(5):576–85.
96. Wang L, Nan Y, Zhu W, Wang S. Effect of TMAO on the incidence and prognosis of cerebral infarction: a systematic review and meta-analysis. *Front Neurol*. 2024;14.
97. Millard HR, Musani SK, Dibaba DT, Talegawkar SA, Taylor HA, Tucker KL, et al. Dietary choline and betaine; associations with subclinical markers of cardiovascular disease risk and incidence of CVD, coronary heart disease and stroke: the Jackson Heart Study. *European journal of nutrition*. 2018 Feb 1;57(1):51–60.
98. Zheng Y, Li Y, Rimm EB, Hu FB, Albert CM, Rexrode KM, et al. Dietary phosphatidylcholine and risk of all-cause and cardiovascular-specific mortality among US women and men 1,2. *Am J Clin Nutr [Internet]*. 2016 [cited 2020 Jan 21];104:173–80. Available from: <http://www.>
99. Guasch-Ferré M, Hu FB, Ruiz-Canela M, Bulló M, Toledo E, Wang DD, et al. Plasma Metabolites From Choline Pathway and Risk of Cardiovascular Disease in the PREDIMED (Prevention With Mediterranean Diet) Study. *Journal of the American Heart Association*. 2017 Nov 1;6(11):e006524.
100. Papandreou C, Bulló M, Hernández-Alonso P, Ruiz-Canela M, Li J, Guasch-Ferré M, et al. Choline Metabolism and Risk of Atrial Fibrillation and Heart Failure in the PREDIMED Study. *Clin Chem*. 2021 Jan 8;67(1):288–97.
101. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine*. 2013 May;19(5):576–85.
102. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk HHS Public Access. *Cell*. 2016;165(1):111–24.
103. Keys A, Mienotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *American Journal of Epidemiology*. 1986;124(6):903–15.

104. Guasch-Ferré M, Willett WC. The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. *Journal of internal medicine*. 2021 Sep 1;290(3):549–66.
105. Maroto-Rodríguez J, Delgado-Velandia M, Ortolá R, Perez-Cornago A, Kales SN, Rodríguez-Artalejo F, et al. Association of a Mediterranean Lifestyle With All-Cause and Cause-Specific Mortality: A Prospective Study from the UK Biobank. *Mayo Clin Proc*. 2023 Aug;
106. Jannasch F, Kröger J, Schulze MB. Dietary Patterns and Type 2 Diabetes: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *The Journal of nutrition*. 2017 Jun 1;147(6):1174–82.
107. Koloverou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoshoou C, Georgousopoulou EN, Grekas A, et al. Adherence to Mediterranean diet and 10-year incidence (2002-2012) of diabetes: correlations with inflammatory and oxidative stress biomarkers in the ATTICA cohort study. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2016 Jan 1;32(1):73–81.
108. Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, Ros E, Covas MI, Ibarrola-Jurado N, et al. Prevention of diabetes with mediterranean diets: A subgroup analysis of a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. 2014 Jan 7;160(1):1–10.
109. Esposito K, Maiorino MI, Bellastella G, Chiodini P, Panagiotakos D, Giugliano D. A journey into a Mediterranean diet and type 2 diabetes: a systematic review with meta-analyses. *BMJ open*. 2015;5(8).
110. 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. *Journal of the American Medical Association*. 2004 Sep 22;292(12):1440–6.
111. Babio N, Toledo E, Estruch R, Ros E, Martínez-González MA, Castañer O, et al. Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the PREDIMED randomized trial. *CMAJ*. 2014 Nov 18;186(17):E649–57.
112. Mancini JG, Filion KB, Atallah R, Eisenberg MJ. Systematic Review of the Mediterranean Diet for Long-Term Weight Loss. *The American journal of medicine*. 2016 Apr 1;129(4):407–415.e4.
113. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, et al. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *The New England journal of medicine*. 2008 Jul 17;359(3):229–41.
114. de Lorgeril M, Renaud S, Salen P, Monjaud I, Mamelle N, Martin JL, et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *The Lancet*. 1994 Jun 11;343(8911):1454–9.
115. Schwingshackl L, Schwedhelm C, Galbete C, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2017 Sep 26;9(10).
116. Psaltopoulou T, Sergentanis TN, Panagiotakos DB, Sergentanis IN, Kosti R, Scarmeas N. Mediterranean diet, stroke, cognitive impairment, and depression: A meta-analysis. *Ann Neurol*. 2013 Oct;74(4):580–91.
117. Singh B, Parsaik AK, Mielke MM, Erwin PJ, Knopman DS, Petersen RC, et al. Association of mediterranean diet with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimer Dis*. 2014;39(2):271–82.

118. Wu L, Sun D. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing cognitive disorders: An updated systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Sci Rep*. 2017 Jan 23;7:41317.
119. Van Den Brink AC, Brouwer-Brolsma EM, Berendsen AAM, Van De Rest O. The Mediterranean, Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH), and Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) Diets Are Associated with Less Cognitive Decline and a Lower Risk of Alzheimer's Disease-A Review. *Adv Nutr*. 2019 Nov 1;10(6):1040–65.
120. Key MN, Szabo-Reed AN. Impact of Diet and Exercise Interventions on Cognition and Brain Health in Older Adults: A Narrative Review. *Nutrients*. 2023 May 27;15(11):2495.
121. Chen X, Maguire B, Brodaty H, O'Leary F. Dietary Patterns and Cognitive Health in Older Adults: A Systematic Review. *J Alzheimer Dis*. 2019;67(2):583–619.
122. Martínez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E, Estruch R, Salas-Salvadó J, San Julián B, et al. Mediterranean diet improves cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomised trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(12):1318–25.
123. Delgado-Lista J, Alcalá-Díaz JF, Torres-Peña JD, Quintana-Navarro GM, Fuentes F, García-Ríos A, et al. Long-term secondary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet and a low-fat diet (CORDIOPREV): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2022 May 14;399(10338):1876–85.
124. Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence and mortality of coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*. 2010;119(8):1093–100.
125. Agnoli C, Krogh V, Grioni S, Sieri S, Palli D, Masala G, et al. A Priori-Defined Dietary Patterns Are Associated with Reduced Risk of Stroke in a Large Italian Cohort 1-3. *J Nutr*. 2011;141(8):1552–8.
126. Psaltopoulou T, Sergentanis TN, Panagiotakos DB, Sergentanis IN, Kostis R, Scarmeas N. Mediterranean diet, stroke, cognitive impairment, and depression: A meta-analysis. *Annals of Neurology*. 2013 Oct;74(4):580–91.
127. Tsvigoulis G, Psaltopoulou T, Wadley VG, Alexandrov A V, Howard G, Unverzagt FW, et al. Adherence to a Mediterranean diet and prediction of incident stroke HHS Public Access. *Stroke*. 2015;46(3):780–5.
128. Tuttolomondo A, Casuccio A, Butt C, Pecoraro R, Raimondo D Di, Corte V Della, et al. Mediterranean Diet in patients with acute ischemic stroke: Relationships between Mediterranean Diet score, diagnostic subtype, and stroke severity index. *Atherosclerosis*. 2015;243:260–7.
129. Chen GC, Neelakantan N, Martín-Calvo N, Koh WP, Yuan JM, Bonaccio M, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of stroke and stroke subtypes. *European Journal of Epidemiology*. 2019 Apr 15;34(4):337–49.
130. Escudero-Martínez I, Mancha F, Vega-Salvatierra Á, Ayuso MI, Ocete RF, Algaba P, et al. Mediterranean Diet and Physical Activity Protect from Silent Brain Infarcts in a Cohort of Patients with Atrial Fibrillation. *Journal of Stroke*. 2019;21(3):353–5.
131. Scarmeas N, Luchsinger JA, Stern Y, Gu Y, He J, Decarli C, et al. Mediterranean Diet and Magnetic Resonance Imaging-Assessed Cerebrovascular Disease NIH Public Access. *Ann Neurol*. 2011;69(2):257–68.

132. Gardener H, Scarmeas N, Gu Y, Boden-Albala B, Drph M, Elkind MS V, et al. A Mediterranean-Style Diet and White Matter Hyperintensity Volume: the Northern Manhattan Study NIH Public Access. *Arch Neurol*. 2012;69(2):251–6.
133. García-Cabo C, Castañón-Apilánez M, Benavente-Fernández L, Jimenez JM, Arenillas J, Castellanos M, et al. Impact of Mediterranean Diet prior to Stroke on the Prognosis of Patients Undergoing Endovascular Treatment. *Cerebrovasc Dis*. 2021;50(3):303–9.
134. Bayes J, Peng W, Adams J, Sibbritt D. The effect of the Mediterranean diet on health outcomes in post-stroke adults: a systematic literature review of intervention trials. *Eur J Clin Nutr*. 2023 May 20;77(5):551–60.
135. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003 Oct 1;170(2):191–203.
136. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21;352(16):1685–95.
137. Chrysoshoou 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 Jul 7;44(1):152–8.
138. Salas-Salvadó J, García-Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M, et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr*. 2008 May;62(5):651–9.
139. Mena MP, Sacanella E, Vazquez-Agell M, Morales M, Fito, M, Escoda R, et al. Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):248–56.
140. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005 May;26(3):439–51.
141. González-Juanatey JR, Paz FL, Eiras S, Teijeira-Fernández E. Adipocitocinas como nuevos marcadores de la enfermedad cardiovascular. Perspectivas fisiopatológicas y clínicas. *Rev Esp Cardiol*. 2009 Jan;62:9–16.
142. Ouedraogo R, Gong Y, Berzins B, Wu X, Mahadev K, Hough K, et al. Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. *J Clin Invest*. 2007 Jun 1;117(6):1718–26.
143. Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckardt K, Eckel J. Cytokine secretion by human adipocytes is differentially regulated by adiponectin, AICAR, and troglitazone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 May 12;343(3):700–6.
144. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*. 2004 Apr 14;291(14):1730–7.
145. Arregui M, Buijsse B, Fritsche A, Giuseppe R Di, Schulze MB, Westphal S, et al. Adiponectin and risk of stroke: prospective study and meta-analysis. *Stroke*. 2014 Jan;45(1):10–7.
146. Gardener H, Sjoberg C, Crisby M, Goldberg R, Mendez A, Wright CB, et al. Adiponectin and carotid intima-media thickness in the northern Manhattan study. *Stroke*. 2012 Apr;43(4):1123–5.

147. Matsumoto M, Ishikawa S, Kajii E. Association of Adiponectin With Cerebrovascular Disease. *Stroke*. 2008 Feb;39(2):323–8.
148. Soderberg S, Stegmayr B, Stenlund H, Sjostrom LG, Agren A, Johansson L, et al. Leptin, but not adiponectin, predicts stroke in males. *Journal of Internal Medicine*. 2004 Aug;256(2):128–36.
149. Rajpathak SN, Kaplan RC, Wassertheil-Smoller S, Cushman M, Rohan TE, McGinn AP, et al. Resistin, but Not Adiponectin and Leptin, Is Associated With the Risk of Ischemic Stroke Among Postmenopausal Women. *Stroke*. 2011 Jul;42(7):1813–20.
150. Lasa A, Miranda J, Bulló M, Casas R, Salas-Salvadó J, Larretxi I, et al. Comparative effect of two Mediterranean diets versus a low-fat diet on glycaemic control in individuals with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 2014 Jul 12;68(7):767–72.
151. Maiorino MI, Bellastella G, Petrizzo M, Scappaticcio L, Giugliano D, Esposito K. Mediterranean diet cools down the inflammatory milieu in type 2 diabetes: the MÉDITA randomized controlled trial. *Endocrine*. 2016 Dec 9;54(3):634–41.
152. Abiemo EE, Alonso A, Nettleton JA, Steffen LM, Bertoni AG, Jain A, et al. Relations of the Mediterranean dietary pattern with insulin resistance and diabetes incidence in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Br J Nutr*. 2013;109(8):1490–7.
153. Mirabelli M, Chiefari E, Arcidiacono B, Corigliano DM, Brunetti FS, Maggisano V, et al. Mediterranean Diet Nutrients to Turn the Tide against Insulin Resistance and Related Diseases. *Nutrients*. 2020 Apr 12;12(4):1066.
154. Kesse-Guyot E, Ahluwalia N, Lassale C, Hercberg S, Fezeu L, Lairon D. Adherence to Mediterranean diet reduces the risk of metabolic syndrome: A 6-year prospective study. *Nutr Metab Cardiovasc Disease*. 2013 Jul;23(7):677–83.
155. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM*. 2006 Jan 1;99(1):1–14.
156. Sabaté J, Oda K, Ros E. Nut consumption and blood lipid levels: A pooled analysis of 25 intervention trials. *Archives of Internal Medicine*. 2010 May 10;170(9):821–7.
157. Fitó M, Guxens M, Corella D, Sáez G, Estruch R, De La Torre R, et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: A randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*. 2007 Jun 11;167(11):1195–203.
158. Damasceno NRT, Sala-Vila A, Cofán M, Pérez-Heras AM, Fitó M, Ruiz-Gutiérrez V, et al. Mediterranean diet supplemented with nuts reduces waist circumference and shifts lipoprotein subfractions to a less atherogenic pattern in subjects at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2013 Oct;230(2):347–53.
159. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):343–53.
160. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van Der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964–7.
161. Doyle B, Metharom P, Caplice NM. Endothelial progenitor cells. *Endothelium*. 2006;13(6):403–10.

162. Liew A, Barry F, O'Brien T. Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations. *Bioessays*. 2006 Mar;28(3):261–70.
163. Matthias M, David N, Josef N. From Bench to Bedside: What Physicians Need to Know About Endothelial Progenitor Cells. *Am J Med*. 2011 Jun;124(6):489–97.
164. Kong D, Melo LG, Mangi AA, Zhang L, Lopez-Ilasaca M, Perrella MA, et al. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2004 Apr 13;109(14):1769–75.
165. Krenning G, van Luyn MJA, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med*. 2009 Apr;15(4):180–9.
166. Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, et al. Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Jun 30;28(6):1086–9.
167. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005 Sep 8;353(10):999–1007.
168. Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Carracedo J, et al. Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2011 Feb 1;93(2):267–74.
169. Cesari F, Dinu M, Pagliai G, Rogolino A, Giusti B, Gori AM, et al. Mediterranean, but not lacto-ovo-vegetarian, diet positively influence circulating progenitor cells for cardiovascular prevention: The CARDIVEG study. *Nutr Metab Cardiovasc Disease*. 2019 Jun;29(6):604–10.
170. Cesari F, Sofi F, Molino Lova R, Vannetti F, Pasquini G, Cecchi F, et al. Aging process, adherence to Mediterranean diet and nutritional status in a large cohort of nonagenarians: Effects on endothelial progenitor cells. *Nutr Metab Cardiovasc Disease*. 2018 Jan;28(1):84–90.
171. Navarro-Sobrinho M, Rosell A, Hernandez-Guillamon M, Penalba A, Ribó M, Alvarez-Sabin J, et al. Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke. *Microvasc Res*. 2010 Dec;80(3):317–23.
172. Sobrinho T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, et al. The Increase of Circulating Endothelial Progenitor Cells After Acute Ischemic Stroke Is Associated With Good Outcome. *Stroke*. 2007 Oct;38(10):2759–64.
173. Bogoslovsky T, Chaudhry A, Latour L, Maric D, Luby M, Spatz M, et al. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. *Neurology*. 2010 Dec 7;75(23):2059–62.
174. Yip HK, Chang LT, Chang WN, Lu CH, Liou CW, Lan MY, et al. Level and Value of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients After Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2008 Jan;39(1):69–74.
175. Cesari F, Nencini P, Nesi M, Caporale R, Giusti B, Abbate R, et al. Bone marrow-derived progenitor cells in the early phase of ischemic stroke: relation with stroke severity and discharge outcome. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009 Dec;29(12):1983–90.
176. Khalatbary AR. Olive oil phenols and neuroprotection. *Nutr Neurosci*. 2013 Nov 15;16(6):243–9.

177. Tressera-Rimbau A, Arranz S, Eder M, Vallverdú-Queralt A. Dietary Polyphenols in the Prevention of Stroke. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-10.
178. De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, López-Villodres JA, Reyes JJ, Espartero JL, et al. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *J Nutr Biochem*. 2015 May;26(5):549-55.
179. García-Rodríguez P, Ma F, Río C del, Romero-Bernal M, Najar AM, Cádiz-Gurrea M de la L, et al. Diet Supplementation with Polyphenol-Rich *Salicornia ramosissima* Extracts Protects against Tissue Damage in Experimental Models of Cerebral Ischemia. *Nutrients*. 2022 Nov 29;14(23):5077.
180. You YP. Epigallocatechin Gallate Extends the Therapeutic Window of Recombinant Tissue Plasminogen Activator Treatment in Ischemic Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016 Apr;25(4):990-7.
181. Gonzalo-Gobernado R, Ayuso MI, Sansone L, Bernal-Jiménez JJ, Ramos-Herrero VD, Sánchez-García E, et al. Neuroprotective Effects of Diets Containing Olive Oil and DHA/EPA in a Mouse Model of Cerebral Ischemia. *Nutrients*. 2019 May 18;11(5):1109.
182. Chang CY, Kuan YH, Li JR, Chen WY, Ou YC, Pan HC, et al. Docosahexaenoic acid reduces cellular inflammatory response following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J Nutr Biochem*. 2013 Dec;24(12):2127-37.
183. Dhungana H, Rolova T, Savchenko E, Wojciechowski S, Savolainen K, Ruotsalainen AK, et al. Western-type diet modulates inflammatory responses and impairs functional outcome following permanent middle cerebral artery occlusion in aged mice expressing the human apolipoprotein E4 allele. *J Neuroinflammation*. 2013 Dec 20;10(1):877.
184. Vanhees L, Lefevre J, Philippaerts R, Martens M, Huygens W, Troosters T, et al. How to assess physical activity? How to assess physical fitness? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2005;12(2):102-14.
185. Washburn RA, Smith KW, Jette AM, Janney CA. The Physical Activity Scale for the Elderly (PASE): development and evaluation. *Journal of clinical epidemiology*. 1993;46(2):153-62.
186. Washburn RA, McAuley E, Katula J, Mihalko SL, Boileau RA. The physical activity scale for the elderly (PASE): evidence for validity. *Journal of clinical epidemiology*. 1999 Jul;52(7):643-51.
187. Taylor HL, Jacobs DR, Schucker B, Knudsen J, Leon AS, Debacker G. A questionnaire for the assessment of leisure time physical activities. *Journal of chronic diseases*. 1978;31(12):741-55.
188. 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. *American journal of epidemiology*. 1994 Jun 15;139(12):1197-209.
189. Elosua R, Garcia M, Aguilar A, Molina L, Covas MI, Marrugat J. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group. *Medicine and science in sports and exercise*. 2000;32(8):1431-7.
190. Ruiz Comellas A, Pera G, Baena Díez J, Mundet Tudurí X, Alzamora Sas T, Elosua R, et al. Validación de una versión reducida en español del cuestionario de actividad física en el tiempo libre de Minnesota (VREM). *Rev Esp Salud Pública*. 2012;86(1):495-508.

191. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc.* 2003 Aug 1;35(8):1381–95.
192. Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OMS sobre actividad física y hábitos sedentarios: de un vistazo [WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour: at a glance]. Ginebra; 2020.
193. Myers J, Kaykha A, George S, Abella J, Zaheer N, Lear S, et al. Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men. *Am J Med.* 2004 Dec;117(12):912–8.
194. Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as Compared with Physical Activity in Predicting Mortality among Women. *N Engl J Med.* 2004 Dec 23;351(26):2694–703.
195. Kyu HH, Bachman VF, Alexander LT, Mumford JE, Afshin A, Estep K, et al. Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *BMJ.* 2016;354(i3857).
196. McTiernan A, Friedenreich CM, Katzmarzyk PT, Powell KE, Macko R, Buchner D, et al. Physical Activity in Cancer Prevention and Survival: A Systematic Review. *Med Sci Sports Exerc.* 2019 Jun;51(6):1252–61.
197. Warburton DER, Gledhill N, Quinney A. The Effects of Changes in Musculoskeletal Fitness on Health. *Can J Appl Physiol.* 2001 Apr 1;26(2):161–216.
198. Howe TE, Shea B, Dawson LJ, Downie F, Murray A, Ross C, et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Jul 6;7:CD000333.
199. Ernst M, Folkerts AK, Gollan R, Lieker E, Caro-Valenzuela J, Adams A, et al. Physical exercise for people with Parkinson's disease: a systematic review and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2023 Jan 5;2023(5).
200. Jia R xia, Liang J hong, Xu Y, Wang Y quan. Effects of physical activity and exercise on the cognitive function of patients with Alzheimer disease: a meta-analysis. *BMC Geriatr.* 2019 Dec 2;19(1):181.
201. Chekroud SR, Gueorguieva R, Zheutlin AB, Paulus M, Krumholz HM, Krystal JH, et al. Association between physical exercise and mental health in 12 million individuals in the USA between 2011 and 2015: a cross-sectional study. *Lancet Psychiatry.* 2018 Sep;5(9):739–46.
202. Harvey SB, Øverland S, Hatch SL, Wessely S, Mykletun A, Hotopf M. Exercise and the Prevention of Depression: Results of the HUNT Cohort Study. *Am J Psychiatry.* 2018 Jan;175(1):28–36.
203. Bauman AE. Updating the evidence that physical activity is good for health: an epidemiological review 2000–2003. *J Sci Med Sport.* 2004 Apr;7(1):6–19.
204. Nocon M, Hiemann T, Müller-Riemenschneider F, Thalau F, Roll S, Willich SN. Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008 Jun;15(3):239–46.

205. Fletcher GF, Blair SN, Blumenthal J, Caspersen C, Chaitman B, Epstein S, et al. Statement on exercise. Benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans. A statement for health professionals by the Committee on Exercise and Cardiac Rehabilitation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart association. *Circulation*. 1992 Jul;86(1):340–4.
206. Wannamethee SG, Shaper AG. Physical Activity in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Sports Med*. 2001;31(2):101–14.
207. Franklin BA, Lavie CJ. Triggers of Acute Cardiovascular Events and Potential Preventive Strategies: Prophylactic Role of Regular Exercise. *Phys Sportsmed*. 2011 Nov 13;39(4):11–21.
208. Shiroma EJ, Lee IM. Physical Activity and Cardiovascular Health. *Circulation*. 2010 Aug 17;122(7):743–52.
209. Lee IM, Sesso HD, Paffenbarger RS. Physical Activity and Coronary Heart Disease Risk in Men. *Circulation*. 2000 Aug 29;102(9):981–6.
210. Smith TC, Wingard DL, Smith B, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. Walking decreased risk of cardiovascular disease mortality in older adults with diabetes. *J Clin Epidemiol*. 2007 Mar;60(3):309–17.
211. Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M. Physical Activity and Mortality in Older Men With Diagnosed Coronary Heart Disease. *Circulation*. 2000 Sep 19;102(12):1358–63.
212. Dibben GO, Faulkner J, Oldridge N, Rees K, Thompson DR, Zwisler AD, et al. Exercise-based cardiac rehabilitation for coronary heart disease: a meta-analysis. *Eur Heart J*. 2023 Feb 7;44(6):452–69.
213. Franklin BA. Coronary revascularization and medical management of coronary artery disease: changing paradigms and perceptions. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2006 Oct 28;13(5):669–73.
214. Dempsey PC, Rowlands A V, Strain T, Zaccardi F, Dawkins N, Razieh C, et al. Physical activity volume, intensity, and incident cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2022 Dec 7;43(46):4789–800.
215. Williamson DF, Vinicor F, Bowman BA. Primary Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Lifestyle Intervention: Implications for Health Policy. *Ann Intern Med*. 2004 Jun 1;140(11):951.
216. Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. Effects of Exercise on Glycemic Control and Body Mass in Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*. 2001 Sep 12;286(10):1218.
217. Pereira MA, Folsom AR, McGovern PG, Carpenter M, Arnett DK, Liao D, et al. Physical Activity and Incident Hypertension in Black and White Adults: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Prev Med*. 1999 Mar;28(3):304–12.
218. Katzmarzyk PT, Janssen I. The Economic Costs Associated With Physical Inactivity and Obesity in Canada: An Update. *Can J Appl Physiol*. 2004 Feb 1;29(1):90–115.
219. Hardy ST, Loehr LR, Butler KR, Chakladar S, Chang PP, Folsom AR, et al. Reducing the Blood Pressure–Related Burden of Cardiovascular Disease: Impact of Achievable Improvements in Blood Pressure Prevention and Control. *J Am Heart Assoc*. 2015 Oct 27;4(10).
220. Fini NA, Holland AE, Keating J, Simek J, Bernhardt J. How Physically Active Are People Following Stroke? Systematic Review and Quantitative Synthesis. *Phys Ther*. 2017 Jul 1;97(7):707–17.

- 221.** Lloyd M, Skelton DA, Mead GE, Williams B, van Wijck F. Physical fitness interventions for nonambulatory stroke survivors: A mixed-methods systematic review and meta-analysis. *Brain Behav.* 2018 Jul;8(7):e01000.
- 222.** Saunders DH, Sanderson M, Hayes S, Johnson L, Kramer S, Carter DD, et al. Physical fitness training for stroke patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Mar 20;2020(3).
- 223.** Deijle IA, Van Schaik SM, Van Wegen EEH, Weinstein HC, Kwakkel G, Van den Berg-Vos RM. Lifestyle Interventions to Prevent Cardiovascular Events After Stroke and Transient Ischemic Attack. *Stroke.* 2017 Jan;48(1):174–9.
- 224.** D'Isabella NT, Shkredova DA, Richardson JA, Tang A. Effects of exercise on cardiovascular risk factors following stroke or transient ischemic attack: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rehabil.* 2017 Dec 19;31(12):1561–72.
- 225.** English C, Janssen H, Crowfoot G, Bourne J, Callister R, Dunn A, et al. Frequent, short bouts of light-intensity exercises while standing decreases systolic blood pressure: Breaking Up Sitting Time after Stroke (BUST-Stroke) trial. *Int J Stroke.* 2018 Dec 17;13(9):932–40.
- 226.** Deplanque D, Masse I, Lefebvre C, Libersa C, Leys D, Bordet R. Prior TIA, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity. *Neurology.* 2006 Oct 24;67(8):1403–10.
- 227.** Krarup LH, Truelsen T, Gluud C, Andersen G, Zeng X, Korv J, et al. Prestroke physical activity is associated with severity and long-term outcome from first-ever stroke. *Neurology.* 2008 Oct 21;71(17):1313–8.
- 228.** Ricciardi AC, López-Cancio E, Pérez De La Ossa N, Sobrino T, Hernández-Pérez M, Gomis M, et al. Prestroke physical activity is associated with good functional outcome and arterial recanalization after stroke due to a large vessel occlusion. *Cerebrovascular diseases .* 2014;37(4):304–11.
- 229.** Ursin M, Ihle-Hansen H, Fure B, Tveit A, Bergland A. Effects of premorbid physical activity on stroke severity and post-stroke functioning. *J Rehabil Med.* 2015;47(7):612–7.
- 230.** Wen CP, Liu CH, Jeng JS, Hsu SP, Chen CH, Lien LM, et al. Pre-stroke physical activity is associated with fewer post-stroke complications, lower mortality and a better long-term outcome. *Eur J Neurol.* 2017 Dec;24(12):1525–31.
- 231.** Reinholdsson M, Palstam A, Sunnerhagen KS. Prestroke physical activity could influence acute stroke severity (part of PAPSIGOT). *Neurology.* 2018;91(16):E1461–7.
- 232.** Viktorisson A, Buvarp D, Reinholdsson M, Danielsson A, Palstam A, Stibrant Sunnerhagen K. Associations of Prestroke Physical Activity With Stroke Severity and Mortality After Intracerebral Hemorrhage Compared With Ischemic Stroke. *Neurology.* 2022 Nov 8;99(19).
- 233.** Mediano MFF, Mok Y, Coresh J, Kucharska-Newton A, Palta P, Lakshminarayan K, et al. Prestroke Physical Activity and Adverse Health Outcomes After Stroke in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke.* 2021 Jun;52(6):2086–95.
- 234.** Susts J, Reinholdsson M, Sunnerhagen KS, Abzhandadze T. Physical inactivity before stroke is associated with dependency in basic activities of daily living 3 months after stroke. *Front Neurol.* 2023 Feb 7;14.

235. Zirnsak M, Meisinger C, Linseisen J, Ertl M, Zickler P, Naumann M, et al. Associations between pre-stroke physical activity and physical quality of life three months after stroke in patients with mild disability. *PLoS One*. 2022 Jun 29;17(6):e0266318.
236. Gallanagh S, Quinn TJ, Alexander J, Walters MR. Physical Activity in the Prevention and Treatment of Stroke. *ISRN Neurology*. 2011 Oct 1;2011:1–10.
237. Hafez S, Eid Z, Alabasi S, Darwiche Y, Channaoui S, Hess DC. Mechanisms of Preconditioning Exercise-Induced Neurovascular Protection in Stroke. *J Stroke*. 2021 Sep 30;23(3):312–26.
238. Guo M, Cox B, Mahale S, Davis W, Carranza A, Hayes K, et al. Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood–brain barrier dysfunction in stroke. *Neuroscience*. 2008 Jan;151(2):340–51.
239. Li J, Ding YH, Rafols JA, Lai Q, McAllister JP, Ding Y. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neurosci Lett*. 2005 Oct;386(3):160–4.
240. Ding YH, Young CN, Luan X, Li J, Rafols JA, Clark JC, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol*. 2005 Apr 23;109(3):237–46.
241. Cooke JP, Losordo DW. Modulating the Vascular Response to Limb Ischemia. *Circ Res*. 2015 Apr 24;116(9):1561–78.
242. Schmidt W, Endres M, Dimeo F, Jungehulsing GJ. Train the Vessel, Gain the Brain: Physical Activity and Vessel Function and the Impact on Stroke Prevention and Outcome in Cerebrovascular Disease. *Cerebrovas Dis*. 2013;35(4):303–12.
243. Greenberg DA, Jin K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell Mol Life Sci*. 2013 May 12;70(10):1753–61.
244. Ang ET, Wong PTH, Moochhala S, Ng YK. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience*. 2003 May;118(2):335–45.
245. Zwagerman N, Sprague S, Davis MD, Daniels B, Goel G, Ding Y. Pre-ischemic exercise preserves cerebral blood flow during reperfusion in stroke. *Neurol Res*. 2010 Jun 19;32(5):523–9.
246. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004 Jan 20;109(2):220–6.
247. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res*. 2010 May;79(3):184–92.
248. Lenk K, Uhlemann M, Schuler G, Adams V. Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical exercise on atherosclerosis and coronary artery disease. *J Appl Physiol*. 2011 Jul;111(1):321–8.
249. Zhang F, Wu Y, Jia J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. *Neuroscience*. 2011 Mar 17;177:170–6.
250. Knaepen K, Goekint M, Heyman EM, Meeusen R. Neuroplasticity – Exercise - Induced Response of Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Sports Med*. 2010 Sep;40(9):765–801.

251. Kraus RM, Stallings HW, Yeager RC, Gavin TP. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *J Appl Physiol*. 2004 Apr;96(4):1445–50.
252. Lanfranconi S, Locatelli F, Corti S, Candelise L, Comi GP, Baron PL, et al. Growth factors in ischemic stroke. *J Cell Mol Med*. 2011 Aug;15(8):1645–87.
253. Lichtenwalner RJ, Parent JM. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 Jan;26(1):1–20.
254. Leker RR, Teichner A, Ovadia H, Keshet E, Reinherz E, Ben-Hur T. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor. *Brain Res*. 2001 Aug;909(1–2):1–7.
255. Greenberg DA, Jin K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature*. 2005 Dec 14;438(7070):954–9.
256. Clayton JA, Chalothorn D, Faber JE. Vascular Endothelial Growth Factor-A Specifies Formation of Native Collaterals and Regulates Collateral Growth in Ischemia. *Circ Res*. 2008 Oct 24;103(9):1027–36.
257. Schäbitz WR, Berger C, Kollmar R, Seitz M, Tanay E, Kiessling M, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke*. 2004 Apr;35(4):992–7.
258. Nomura T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*. 2005;136(1):161–9.
259. Sobrino T, Millán M, Castellanos M, Blanco M, Brea D, Dorado L, et al. Association of growth factors with arterial recanalization and clinical outcome in patients with ischemic stroke treated with tPA. *J Thromb Haemost*. 2010 Jul;8(7):1567–74.
260. López-Cancio E, Ricciardi AC, Sobrino T, Cortés J, de la Ossa NP, Millán M, et al. Reported Prestroke Physical Activity Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Good Outcomes after Stroke. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2017 Feb 1;26(2):425–30.
261. Zhang H, Lee JY, Borlongan C V, Tajiri N. A brief physical activity protects against ischemic stroke. *Brain Circ*. 2019;5(3):112–8.
262. Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schröck H, et al. Physical Activity Improves Long-Term Stroke Outcome via Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Augmentation of Neovascularization and Cerebral Blood Flow. *Circ Res*. 2006 Nov 10;99(10):1132–40.
263. Dornbos D, Zwagerman N, Guo M, Ding JY, Peng C, Esmail F, et al. Preischemic exercise reduces brain damage by ameliorating metabolic disorder in ischemia/reperfusion injury. *J Neurosci Res*. 2013 Jun;91(6):818–27.
264. Pianta S, Lee JY, Tuazon JP, Castelli V, Mantohac LM, Tajiri N, et al. A Short Bout of Exercise Prior to Stroke Improves Functional Outcomes by Enhancing Angiogenesis. *Neuromolecular Med*. 2019 Dec 2;21(4):517–28.
265. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan;20(1):84–91.

266. Agulla J, Argibay B, Perez-Mato M, Brea D, Ramos-Cabrer P, Castillo J. [Comparison of the lesion produced by permanent focal cerebral ischaemia in three animal models using magnetic resonance imaging]. *Rev Neurol*. 2011 Sep 1;53(5):265–74.
267. Fernández-Susavila H, Iglesias-Rey R, Dopico-López A, Pérez-Mato M, Sobrino T, Castillo J, et al. Inclusion criteria update for the rat intraluminal ischaemic model for preclinical studies. *Dis Model Mech*. 2017 Dec 1;10(12):1433–8.
268. Philip M, Benatar M, Fisher M, Savitz SI. Methodological Quality of Animal Studies of Neuroprotective Agents Currently in Phase II/III Acute Ischemic Stroke Trials. *Stroke*. 2009 Feb;40(2):577–81.
269. Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development. *Stroke*. 1999 Dec;30(12):2752–8.
270. Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke*. 1993 Jan;24(1):117–21.
271. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000 Apr;39(5):777–87.
272. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986 May;17(3):472–6.
273. Wahl F, Allix M, Plotkine M, Boulou RG. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1992 Feb;23(2):267–72.
274. Romaus-Sanjurjo D, Saikia JM, Kim HJ, Tsai KM, Le GQ, Zheng B. Overexpressing eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A) proteins to promote corticospinal axon repair after injury. *Cell Death Discov*. 2022 Sep 20;8(1):390.
275. Fernández-López B, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. Anatomical recovery of the spinal glutamatergic system following a complete spinal cord injury in lampreys. *Sci Rep*. 2016 Nov 25;6(1):37786.
276. Rodríguez-Arrizabalaga M, Hernández-Núñez I, Candal E, Barreiro-Iglesias A. Use of vivo-morpholinos for gene knockdown in the postnatal shark retina. *Exp Eye Res*. 2023 Jan;226:109333.
277. Expert Panel on Detection E and T of HBC in AEP on DE and T of HBC in A. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486–97.
278. Schröder H, Fitó M, Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *The Journal of nutrition*. 2011 Jun 1;141(6):1140–5.
279. Vanegas P, Zazpe I, Santiago S, Fernandez-Lazaro CI, de la O V, Martínez-González MÁ. Macronutrient quality index and cardiovascular disease risk in the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *European journal of nutrition*. 2022 Oct 1;61(7):3517–30.

280. 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 Jul;28(7):412–9.
281. Pías-Peleteiro J, Pérez-Mato M, López-Arias E, Rodríguez-Yáñez M, Blanco M, Campos F, et al. Increased Endothelial Progenitor Cell Levels are Associated with Good Outcome in Intracerebral Hemorrhage. *Scientific Reports*. 2016 Jun 27;6(1):28724.
282. Harrison JK, Stott DJ, Mcshane R, Noel-Storr AH, Swann-Price RS, Quinn TJ. Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE) for the early diagnosis of dementia across a variety of healthcare settings. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016 Nov 21;11(11).
283. von Kummer R, Broderick JP, Campbell BCV, Demchuk A, Goyal M, Hill MD, et al. The Heidelberg Bleeding Classification. *Stroke*. 2015 Oct;46(10):2981–6.
284. Christ A, Lauterbach M, Latz E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*. 2019 Nov;51(5):794–811.
285. Gioscia-Ryan RA, Clayton ZS, Zigler MC, Richey JJ, Cuevas LM, Rossman MJ, et al. Lifelong voluntary aerobic exercise prevents age- and Western diet- induced vascular dysfunction, mitochondrial oxidative stress and inflammation in mice. *J Physiol*. 2021 Feb 28;599(3):911–25.
286. Al Fazazi S, Casuso RA, Aragón-Vela J, Casals C, Huertas JR. Effects of hydroxytyrosol dose on the redox status of exercised rats: the role of hydroxytyrosol in exercise performance. *J Int Soc Sports Nutr*. 2018 Jan 5;15(1).
287. Boots AW, Balk JM, Bast A, Haenen GRMM. The reversibility of the glutathionyl-quercetin adduct spreads oxidized quercetin-induced toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec;338(2):923–9.
288. Fernández JM, Rosado-Álvarez D, Da Silva Grigoletto ME, Rangel-Zúñiga OA, Landaeta-Díaz LL, Caballero-Villarraso J, et al. Moderate-to-high-intensity training and a hypocaloric Mediterranean diet enhance endothelial progenitor cells and fitness in subjects with the metabolic syndrome. *Clin Sci (London)*. 2012 Sep 1;123(6):361–73.
289. Maiorino MI, Bellastella G, Petrizzo M, Gicchino M, Caputo M, Giugliano D, et al. Effect of a Mediterranean diet on endothelial progenitor cells and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: Follow-up of a randomized trial. *Eur J Prev Cardiol*. 2017 Mar 27;24(4):399–408.
290. Abate M, Pisanti S, Caputo M, Citro M, Vecchione C, Martinelli R. 3-Hydroxytyrosol Promotes Angiogenesis In Vitro by Stimulating Endothelial Cell Migration. *Int J Mol Sci*. 2020 May 22;21(10):3657.
291. Romaus-Sanjurjo D, Saikia JM, Kim HJ, Tsai KM, Le GQ, Zheng B. Overexpressing eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A) proteins to promote corticospinal axon repair after injury. *Cell Death Discov*. 2022 Sep 20;8(1):390.
292. Romaus-Sanjurjo D, Custodia A, Ouro A, Sobrino T. CD34+ progenitor cells as diagnostic and therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 2023;18(3):535.
293. Wiesmann M, Zinnhardt B, Reinhardt D, Eligehausen S, Wachsmuth L, Hermann S, et al. A specific dietary intervention to restore brain structure and function after ischemic stroke. *Theranostics*. 2017;7(2):493–512.

294. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, et al. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos.* 2001 Nov;29(11):1492–8.
295. Barca C, Wiesmann M, Calahorra J, Wachsmuth L, Döring C, Foray C, et al. Impact of hydroxytyrosol on stroke: tracking therapy response on neuroinflammation and cerebrovascular parameters using PET-MR imaging and on functional outcomes. *Theranostics.* 2021;11(9):4030–49.
296. Chen YW, Chen SH, Chou W, Lo YM, Hung CH, Lin MT. Exercise pretraining protects against cerebral ischaemia induced by heat stroke in rats. *Br J Sports Med.* 2007 Sep 1;41(9):597–602.
297. Wang YL, Lin CH, Chen CC, Chang CP, Lin KC, Su FC, et al. Exercise Preconditioning Attenuates Neurological Injury by Preserving Old and Newly Formed HSP72-Containing Neurons in Focal Brain Ischemia Rats. *Int J Med Sci.* 2019;16(5):675–85.
298. Zhang H, Xie Q, Hu J. Neuroprotective Effect of Physical Activity in Ischemic Stroke: Focus on the Neurovascular Unit. *Front Cell Neurosci.* 2022 Mar 4;16.
299. Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulia B, Zeinanloo AA, Khoshbaten A. Dietary Virgin Olive Oil Reduces Blood Brain Barrier Permeability, Brain Edema, and Brain Injury in Rats Subjected to Ischemia-Reperfusion. *Scientific World Journal.* 2010;10:1180–91.
300. Rabiei Z, Bigdeli MR, Rasoulia B, Ghassempour A, Mirzajani F. The neuroprotection effect of pretreatment with olive leaf extract on brain lipidomics in rat stroke model. *Phytomedicine.* 2012 Jul;19(10):940–6.
301. Ueda M, Inaba T, Nito C, Kamiya N, Katayama Y. Therapeutic impact of eicosapentaenoic acid on ischemic brain damage following transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2013 Jun 26;1519:95–104.
302. Zheng X, Zeng N, Wang A, Zhu Z, Zhong C, Xu T, et al. Elevated C-reactive Protein and Depressed High-density Lipoprotein Cholesterol are Associated with Poor Function Outcome After Ischemic Stroke. *Curr Neurovasc Res.* 2018 Oct 18;15(3):226–33.
303. Konieczna J, Yañez A, Moñino M, Babio N, Toledo E, Martínez-González MA, et al. Longitudinal changes in Mediterranean diet and transition between different obesity phenotypes. *Clin Nutr.* 2020 Mar;39(3):966–75.
304. Ding PF, Zhang HS, Wang J, Gao YY, Mao JN, Hang CH, et al. Insulin resistance in ischemic stroke: Mechanisms and therapeutic approaches. *Front Endocrinol.* 2022 Dec 15;13.
305. Rehni AK, Cho S, Dave KR. Ischemic brain injury in diabetes and endoplasmic reticulum stress. *Neurochem Int.* 2022 Jan;152:105219.
306. Camps-Renom P, Jiménez-Xarrié E, Soler M, Puig N, Aguilera-Simón A, Marín R, et al. Endothelial Progenitor Cells Count after Acute Ischemic Stroke Predicts Functional Outcome in Patients with Carotid Atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2021 Dec;30(12):106144.
307. Pelliccia F, Pasceri V, Moretti A, Tanzilli G, Speciale G, Gaudio C. Endothelial progenitor cells predict long-term outcome in patients with coronary artery disease: Ten-year follow-up of the PROCREATION extended study. *Int J Cardiol.* 2020 Nov;318:123–5.

- 308.** Custodia A, Ouro A, Sargento-Freitas J, Aramburu-Núñez M, Pías-Peleteiro JM, Hervella P, et al. Unraveling the potential of endothelial progenitor cells as a treatment following ischemic stroke. *Front Neurol.* 2022 Sep 8;13.
- 309.** Damsbo AG, Mortensen JK, Kraglund KL, Johnsen SP, Andersen G, Blauenfeldt RA. Prestroke Physical Activity and Poststroke Cognitive Performance. *Cerebrovasc Dis.* 2020;49(6):632–8.
- 310.** Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker L, Foster JK, van Bockxmeer FM, Xiao J, et al. Effect of Physical Activity on Cognitive Function in Older Adults at Risk for Alzheimer Disease. *JAMA.* 2008 Sep 3;300(9):1027.
- 311.** Wong A, Lau AYL, Lo E, Tang M, Wang Z, Liu W, et al. Relations between Recent Past Leisure Activities with Risks of Dementia and Cognitive Functions after Stroke. *PLOS ONE.* 2016 Jul 25;11(7):e0159952.
- 312.** Bovim M, Indredavik B, Hokstad A, Cumming T, Bernhardt J, Askim T. Relationship between pre-stroke physical activity and symptoms of post-stroke anxiety and depression: An observational study. *J Rehabil Med.* 2019;51(10):755–60.
- 313.** Torres-López C, Cuartero MI, García-Culebras A, de la Parra J, Fernández-Valle ME, Benito M, et al. Ipsilesional Hippocampal GABA Is Elevated and Correlates With Cognitive Impairment and Maladaptive Neurogenesis After Cortical Stroke in Mice. *Stroke.* 2023 Oct;54(10):2652–65.
- 314.** Chen Y, Veenman L, Liao M, Huang W, Yu J, Zeng J. Enhanced angiogenesis in the thalamus induced by a novel TSPO ligand ameliorates cognitive deficits after focal cortical infarction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2023 Nov 21;271678X231214671.
- 315.** Shen XN, Niu LD, Wang YJ, Cao XP, Liu Q, Tan L, et al. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis and systematic review of 170 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019 May;90(5):590–8.
- 316.** Georgakis MK, Gill D, Rannikmäe K, Traylor M, Anderson CD, Lee JM, et al. Genetically Determined Levels of Circulating Cytokines and Risk of Stroke. *Circulation.* 2019 Jan 8;139(2):256–68.
- 317.** García-García I, Fernández-Andújar M, Narváez M, García-Casares N. Assessing adipokines as potential biomarkers of dementia, Alzheimer's disease, and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews.* 2023 Aug 10;24(8).

The top right corner features a teal pattern of interconnected dots and lines, overlaid with a grey geometric design of triangles and diamonds. The bottom right corner contains a large, light teal number '9'.

ANEXOS

ANEXO 1: ESCALAS DE DESNUTRICIÓN (MUST Y MNA)

MINI NUTRITIONAL ASSESSMENT – SHORT FORM (MNA – SF)

A. ¿Ha disminuido la ingesta de alimentos en los últimos 3 meses debido a la pérdida de apetito, problemas digestivos o dificultades para masticar o tragar? - ¿Ha comido menos de lo normal en los últimos 3 meses? - Si es así, ¿es por falta de apetito o tiene problemas para masticar o tragar? - En ese caso, ¿ha comido mucho menos que antes o sólo un poco menos?			
Ha comido mucho menos 0 puntos	Ha comido menos 1 punto	Ha comido igual 2 puntos	
B. ¿HA PERDIDO PESO DE FORMA INVOLUNTARIA EN LOS ÚLTIMOS 3 MESES? - ¿Ha perdido peso sin proponérselo en los últimos 3 meses? - ¿Le queda la ropa más suelta en la cintura? - ¿Cuánto peso cree que ha perdido? ¿Más o menos de 3 kg?			
Pérdida de peso >3 kg 0 puntos	No lo sabe 1 punto	Pérdida de peso 1-3 kg 2 puntos	Sin pérdida de peso 3 puntos
C. ¿MOVILIDAD? - ¿Es usted capaz de salir de la cama, levantarse de una silla o silla de ruedas sin la ayuda de otra persona? - ¿Es usted capaz de salir de la cama o levantarse de una silla, pero incapaz de salir de casa? - ¿Es usted capaz de salir de su casa?			
En cama o silla de ruedas 0 puntos	Es capaz de levantarse de cama o silla, pero no sale a la calle 1 punto	Sale a la calle 2 puntos	
D. ¿HA SUFRIDO EL PACIENTE ESTRÉS PSICOLÓGICO O ENFERMEDAD AGUDA EN LOS ÚLTIMOS 3 MESES? - ¿Se ha sentido estresado recientemente? - ¿Se ha encontrado usted gravemente enfermo recientemente?			
Sí - 0 puntos		No - 1 punto	
E. ¿PROBLEMAS NEUROPSICOLÓGICOS? - ¿Tiene usted demencia? - ¿Ha sentido una tristeza profunda o prolongada?			
Demencia o depresión graves 0 puntos	Demencia leve 1 punto	Sin problemas psicológicos 2 puntos	
F1. ¿IMC? IMC = peso (kg) / talla ² (cm)			
<19 - 0 puntos	19-20 - 1 punto	21-22 - 2 puntos	23 o más - 3 puntos
F2. ¿PERÍMETRO DE PANTORRILLA? (SÓLO SI NO ESE POSIBLE OBTENER EL IMC)			
<31 - 0 puntos		31 o más - 1 punto	

PUNTUACIÓN TOTAL: __ / 14

12 - 14 PUNTOS	ESTADO NUTRICIONAL NORMAL
8 - 11 PUNTOS	RIESGO DE DESNUTRICIÓN
0 - 7 PUNTOS	DESNUTRICIÓN

ESCALA MUST

A. IMC IMC = peso (kg) / talla ² (cm)		
>20 - 0 puntos	18.5 - 20 - 1 punto	<18.5 - 2 puntos
B. PÉRDIDA INVOLUNTARIA DE PESO EN LOS ÚLTIMOS 3 - 6 MESES (si es voluntaria: 0 puntos)		
<5 kg - 0 puntos	5 - 10 kg - 1 punto	>10 kg - 2 puntos
C. PACIENTE CON ENFERMEDAD GRAVE Y QUE HA ESTADO O ES PROBABLE QUE ESTÉ SIN APOORTE NUTRICIONAL POR MÁS DE 5 DÍAS		
No - 0 puntos		Sí - 1 punto

PUNTUACIÓN TOTAL: __

0 PUNTOS	RIESGO BAJO
1 PUNTOS	RIESGO MEDIO
2 o más PUNTOS	RIESGO ALTO

ANEXO 2: ESCALA MEDAS-14 ADAPTADA

¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar?								
☐ No - 0 puntos				☐ Sí - 1 puntos				

¿Cuánto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc.)? (1 ración = 1 cucharada sopera = 10 mL)								
☐ < 4 cucharadas - 0 puntos				☐ 4 o más cucharadas - 1 puntos				

Indique aproximadamente cuántas cucharadas (al día):								
--	--	--	--	--	--	--	--	--

Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +

¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día? (las guarniciones o acompañantes = ½ ración) (1 ración = 150-200 g - 1 ensalada, 1 plato de verdura cocida, 2 zanahorias...)								
☐ Menos de 2 - 0 puntos				☐ 2 o más (al menos una en ensalada o cruda) - 1 puntos				

Indique aproximadamente cuántas (al día):								
---	--	--	--	--	--	--	--	--

Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +

¿Cuántas piezas de fruta , incluyendo zumo natural, consume al día? (1 ración = 120-200 g o 1 pieza mediana o 1 taza de frutas pequeñas (fresas, cerezas) o 2 rodajas de melón)								
☐ Menos de 3 - 0 puntos				☐ 3 o más - 1 puntos				

Indique aproximadamente cuántas (al día):								
---	--	--	--	--	--	--	--	--

Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +

¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día? (ración: 100-150 g)								
☐ Una o más - 0 puntos				☐ Menos de una - 1 puntos				

Indique aproximadamente cuántas (a la semana):								
--	--	--	--	--	--	--	--	--

Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +

¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día? (porción individual habitual: 12 g = 1 ración)								
☐ Una o más - 0 puntos				☐ Menos de una - 1 puntos				

Indique aproximadamente cuántas (a la semana):								
--	--	--	--	--	--	--	--	--

Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +

¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas consume al día?								
☐ Una o más - 0 puntos				☐ Menos de una - 1 puntos				

Indique aproximadamente cuántas (a la semana):								
--	--	--	--	--	--	--	--	--

Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +

¿Bebe usted vino ? ¿Cuánto consume a la semana? (1 Vaso = 100 mL)								
☐ Menos de 7 - 0 puntos				☐ 7 o más - 1 puntos				

Indique aproximadamente cuántos vasos (a la semana):								
--	--	--	--	--	--	--	--	--

Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +

¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana? (1 plato o ración: 60-80 g)								
☐ Menos de 3 - 0 puntos					☐ 3 o más - 1 punto			
Indique aproximadamente cuántas (a la semana):								
Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
¿Cuántas raciones de pescado-mariscos consume a la semana? (1 plato, pieza o ración: 100-150 g de pescado o 4-5 piezas o 200 g de marisco)								
☐ Menos de 3 - 0 puntos					☐ 3 o más - 1 punto			
Indique aproximadamente cuántas (a la semana):								
Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulce o pasteles a la semana?								
☐ 2 o más - 0 puntos					☐ Menos de 2 - 1 punto			
Indique aproximadamente cuántas raciones (a la semana):								
Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana? (ración: 30 g = 1 puñado o ración individual)								
☐ Menos de 3 - 0 puntos					☐ 3 o más - 1 punto			
Indique aproximadamente cuántas raciones (a la semana):								
Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
¿Consume usted preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas? (1 ración = 100-125 g = 1 filete pequeño / 1 cuarto de pollo o conejo)								
☐ No - 0 puntos					☐ Sí - 1 punto			
Indique aproximadamente cuántas raciones (a la semana):								
Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, arroz u otros platos aderezados con salsa de tomate, cebolla, ajo o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (Sofrito)?								
☐ Menos de 2 - 0 puntos					☐ 2 o más - 1 punto			
Indique aproximadamente cuántas raciones (a la semana):								
Por término medio, ¿cuál diría que es su frecuencia de consumo para este alimento?								
Nunca o casi nunca	Al mes	A la semana			Al día			
	1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +

PUNTUACIÓN TOTAL: __

ANEXO 3: ESCALAS DE AF

ESCALA PASE

1. SENTADO	
En los últimos 7 días, ¿con qué frecuencia ha realizado actividades sentado tales como leer, ver la televisión o hacer manualidades?	
NUNCA. Ir a la pregunta número 2	0
CASI NUNCA (1-2 días)	1
DE VEZ EN CUANDO (3-4 días)	2
CON FRECUENCIA (5-7 días)	3
1a. ¿Qué actividades ha realizado?	
1b. Por término medio, ¿cuántas horas al día ha dedicado a dichas actividades?	
MENOS DE 1 HORA	1
MÁS DE 1 HORA PERO MENOS DE 2 HORAS	2
DE 2 A 4 HORAS	3
MÁS DE 4 HORAS	4
2. CAMINAR	
En los últimos 7 días, ¿con qué frecuencia ha salido de casa a caminar? Por ejemplo, pasear por diversión, sacar al perro, o ir andando al trabajo	
NUNCA. Ir a la pregunta número 3	0
CASI NUNCA (1-2 días)	1
DE VEZ EN CUANDO (3-4 días)	2
CON FRECUENCIA (5-7 días)	3
2a. Por término medio, ¿cuánto tiempo camina al día?	
MENOS DE 1 HORA	1
MÁS DE 1 HORA PERO MENOS DE 2 HORAS	2
DE 2 A 4 HORAS	3
MÁS DE 4 HORAS	4
3. DEPORTE LIGERO	
En los últimos 7 días, ¿con qué frecuencia ha realizado actividades recreativas de intensidad leve, como jugar a la petanca o al golf, ir de pesca u otras actividades similares?	
NUNCA. Ir a la pregunta número 4	0
CASI NUNCA (1-2 días)	1
DE VEZ EN CUANDO (3-4 días)	2
CON FRECUENCIA (5-7 días)	3
3a. ¿Qué actividades ha realizado?	
3b. Por término medio, ¿cuántas horas dedica a estas actividades recreativas de esfuerzo leve?	
MENOS DE 1 HORA	1
MÁS DE 1 HORA PERO MENOS DE 2 HORAS	2
DE 2 A 4 HORAS	3
MÁS DE 4 HORAS	4
4. DEPORTE MODERADO	
En los últimos 7 días, ¿con qué frecuencia ha realizado actividades recreativas de intensidad moderada, como jugar un partido de tenis de dobles, practicar bailes de salón, cazar, patinar sobre hielo, jugar al béisbol u otras actividades similares?	
NUNCA. Ir a la pregunta número 5	0
CASI NUNCA (1-2 días)	1
DE VEZ EN CUANDO (3-4 días)	2
CON FRECUENCIA (5-7 días)	3
4a. ¿Qué actividades ha realizado?	
4b. Por término medio, ¿cuántas horas dedica a estas actividades recreativas de intensidad moderada?	
MENOS DE 1 HORA	1
MÁS DE 1 HORA PERO MENOS DE 2 HORAS	2
DE 2 A 4 HORAS	3
MÁS DE 4 HORAS	4

5. DEPORTE EXTENUANTE		
En los últimos 7 días, ¿con qué frecuencia ha realizado actividades recreativas de gran intensidad, como correr, nadar, montar en bicicleta, jugar un partido de tenis individual, practicar bailes aeróbicos, esquiar u otras actividades similares?		
NUNCA. Ir a la pregunta número 6		0
CASI NUNCA (1-2 días)		1
DE VEZ EN CUANDO (3-4 días)		2
CON FRECUENCIA (5-7 días)		3
5a. ¿Qué actividades ha realizado?		
5b. Por término medio, ¿cuántas horas dedica a estas actividades recreativas de gran esfuerzo?		
MENOS DE 1 HORA		1
MÁS DE 1 HORA PERO MENOS DE 2 HORAS		2
DE 2 A 4 HORAS		3
MÁS DE 4 HORAS		4
6. DEPORTE FUERZA MUSCULAR		
En los últimos 7 días, ¿con qué frecuencia ha realizado actividades físicas para aumentar el tono y la resistencia muscular, como levantar pesas o hacer flexiones?		
NUNCA. Ir a la pregunta número 7		0
CASI NUNCA (1-2 días)		1
DE VEZ EN CUANDO (3-4 días)		2
CON FRECUENCIA (5-7 días)		3
6a. ¿Qué actividades ha realizado?		
6b. Por término medio, ¿cuántas horas dedica a actividades para aumentar el tono y la resistencia muscular?		
MENOS DE 1 HORA		1
MÁS DE 1 HORA PERO MENOS DE 2 HORAS		2
DE 2 A 4 HORAS		3
MÁS DE 4 HORAS		4
7. TRABAJO DOMÉSTICO LIGERO		
En los últimos 7 días, ¿ha realizado tareas domésticas de intensidad leve, como sacar el polvo o lavar los platos?		
NO		1
SÍ		2
8. TRABAJO DOMÉSTICO PESADO		
En los últimos 7 días, ¿ha realizado tareas domésticas de intensidad considerable, como pasar la aspiradora, fregar el suelo, limpiar los cristales o recoger la leña?		
NO		1
SÍ		2
9. En los últimos 7 días, ¿ha realizado alguna de las siguientes actividades? SÍ o NO para cada apartado.		
9a. REPARACIONES DOMÉSTICAS	NO	1
Tareas en el hogar como pintar, empapelar o hacer reparaciones de electricidad, etc.	SÍ	2
9b. CUIDADO DE EXTERIORES	NO	1
Tareas en el patio o el jardín, como retirar la nieve, recoger las hojas, cortar leña.	SÍ	2
9c. JARDINERÍA	NO	1
	SÍ	2
9d. CUIDADO DE OTRA PERSONA como un niño, el cónyuge u otro adulto	NO	1
	SÍ	2
10. TRABAJO		
En los últimos 7 días, ¿ha realizado una actividad remunerada o voluntaria?		
NO. (Ya ha acabado el cuestionario)		1
SÍ		2
10a. ¿Cuántas horas a la semana dedica a dicha actividad?		
10b. ¿Cuál de las siguientes opciones describe con mayor exactitud el tipo de actividad física que realiza en su trabajo remunerado o voluntario?		
Sentado con leves movimientos de los brazos (Por ejemplo, tareas administrativas, de relojero, en una cadena de montaje, como conductor de autobús, etc.)		1
Sentado o de pie con pequeños paseos (Por ejemplo: cajero, administrativo, operario de maquinaria o herramientas ligeras, etc.)		2
Andando a la vez que manipula material de peso inferior a 25 kilos (Por ejemplo: cartero, camarero, obrero de la construcción, operario de maquinaria o herramientas pesadas, etc.)		3
Andando a la vez que manipula material de peso superior a 25 kilos. (Por ejemplo: leñador, albañil, trabajador de una granja, etc.)		4

PUNTUACIÓN PASE TOTAL: __

ESCALA VREM

¿Qué actividad física ha realizado durante su tiempo libre en el ÚLTIMO MES/SEMANA O MES/SEMANA HABITUAL?

Ir a comprar a pie: MIN/SEM 	Tipo de deporte/baile 1: MIN/DÍA DÍAS/MES MESES/AÑO
Limpiar la casa: MIN/SEM 	Tipo de deporte/baile 2: MIN/DÍA DÍAS/MES MESES/AÑO
Caminar: MIN/DÍA DÍAS/MES MESES/AÑO 	Tipo de deporte/baile 3: MIN/DÍA DÍAS/MES MESES/AÑO
Trabajar en el huerto: MIN/DÍA DÍAS/MES MESES/AÑO 	Total METS/14 días:
Subir escaleras: MIN/DÍA DÍAS/MES MESES/AÑO 	

ANEXO 4: ESCALAS DE EVALUACIÓN COGNITIVA

MOCA

- **Si nivel de educación <12 años:** AÑADIR 1 PUNTO AL TOTAL
- **Si tiene algún tipo de limitación funcional** (paresia, trastorno del lenguaje...) que impida la realización de algún ítem en concreto, no se puntuará "0" sino que ese ítem se restará de la puntuación total (que ya no será sobre 30, por tanto).
- **Punto de corte para deterioro cognitivo:** 24 – 25

VISUOESPACIAL / EJECUTIVA		Copiar el cubo		Dibujar un reloj (Once y diez) (3 puntos)		Puntos	
		☐ ☐ ☐ ☐ ☐		☐ ☐ ☐		___/5	
IDENTIFICACIÓN				☐ ☐ ☐		___/3	
MEMORIA	Lea la lista de palabras, el paciente debe repetirlas. Haga dos intentos. Recuérdese las 5 minutos más tarde.	ROSTRO	SEDA	IGLESIA	CLAVEL	ROJO	Sin puntos
	1er intento						
	2º intento						
ATENCIÓN	Lea la serie de números (1 número/seg.) El paciente debe repetirla. ☐ 2 1 8 5 4 El paciente debe repetirla a la inversa. ☐ 7 4 2						___/2
	Lea la serie de letras. El paciente debe dar un golpecito con la mano cada vez que se diga la letra A. No se asignan puntos si ≥ 2 errores.	☐ F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B					___/1
	Restar de 7 en 7 empezando desde 100. ☐ 93 ☐ 86 ☐ 79 ☐ 72 ☐ 65	4 o 5 sustracciones correctas: 3 puntos, 2 o 3 correctas: 2 puntos, 1 correcta: 1 punto, 0 correctas: 0 puntos.					___/3
LENGUAJE	Repetir: El gato se esconde bajo el sofá cuando los perros entran en la sala. ☐ Espero que él le entregue el mensaje una vez que ella se lo pida. ☐						___/2
	Fluidez del lenguaje. Decir el mayor número posible de palabras que comiencen por la letra "P" en 1 min. ☐ _____ (N ≥ 11 palabras)						___/1
ABSTRACCIÓN	Similitud entre p. ej. manzana-naranja = fruta ☐ tren-bicicleta ☐ reloj-regla						___/2
RECUERDO DIFERIDO	Debe acordarse de las palabras SIN PISTAS	ROSTRO	SEDA	IGLESIA	CLAVEL	ROJO	Puntos por recuerdos SIN PISTAS únicamente
		☐	☐	☐	☐	☐	
Optativo	Pista de categoría						
	Pista elección múltiple						
ORIENTACIÓN	☐ Día del mes (fecha) ☐ Mes ☐ Año ☐ Día de la semana ☐ Lugar ☐ Localidad						___/6
© Z. Nasreddine MD Versión 07 noviembre 2004 www.mocatest.org						Normal ≥ 26 / 30	TOTAL ___/30 Añadir 1 punto si tiene ≤ 12 años de estudios

IQCODE (VERSIÓN ABREVIADA)

Responda a cada ítem en base a la puntuación siguiente. En los últimos años, el paciente..

1.	Recordar cosas sobre familiares y amigos (aniversarios, cumpleaños, direcciones..)	1 2 3 4 5
2.	Recordar acontecimientos sucedidos recientemente	1 2 3 4 5
3.	Recordar conversaciones unos días más tarde	1 2 3 4 5
4.	Recordar su dirección y número de teléfono	1 2 3 4 5
5.	Recordar el día y mes actual	1 2 3 4 5
6.	Recordar en dónde se guardan habitualmente las cosas	1 2 3 4 5
7.	Saber en dónde se encuentra una cosa que se dejó descolocada	1 2 3 4 5
8.	Saber cómo funcionan los aparatos domésticos de la casa	1 2 3 4 5
9.	Aprender a manejar un aparatonuevo (lavadora, máquina de afeitar, etc.)	1 2 3 4 5
10.	Aprender cosas nuevas en general	1 2 3 4 5
11.	Entender una historia en un libro o en la televisión.	1 2 3 4 5
12.	Tomar decisiones en cuestiones cotidianas.	1 2 3 4 5
13.	Manejar dinero para la compra.	1 2 3 4 5
14.	Manejar los asuntos financieros (pensión, bancos).	1 2 3 4 5
15.	Resolver problemas aritméticos cotidianos (tiempos, cantidades, distancias..)	1 2 3 4 5
16.	Utilizar la inteligencia para comprender lo que sucede a su alrededor y su explicación	1 2 3 4 5
1 - Ha mejorado mucho 2 - Ha mejorado poco 3 - No ha cambiado apenas 4 - Ha empeorado un poco 5 - Ha empeorado mucho		Puntuación total

ANEXO 5: ESCALA DE RANKIN MODIFICADA (MRS)

6: FALLECIDO	
5: PACIENTE ENCAMADO y/o CON ATENCIÓN CONSTANTE	
Pregunta clave: ¿El paciente está encamado y/o requiere atención constante?	
Responda SÍ cuando: El paciente pasa la mayor parte del día en la cama (o sillón). El paciente está institucionalizado. <u>Cuando el paciente es trasladado a una silla de ruedas, es incapaz de desplazarse autónomamente con ella.</u> No puede permanecer solo en casa sin supervisión más de una hora. Si está solo, es incapaz de pedir ayuda telefónica o por teleasistencia.	☐ Sí (mRS = 5)
	☐ No
4: ASISTENCIA PARA CAMINAR	
Pregunta clave: ¿Es esencial la asistencia de otra persona para caminar?	
El paciente es incapaz de desplazarse autónomamente, lo que significa que siempre necesita a otra persona presente , para brindar ayuda física y/o supervisión. - Si el paciente necesita ayuda para trasladarse a una silla de ruedas, pero una vez en la misma, puede desplazarse autónomamente, responda SÍ - Si el paciente puede trasladarse a la silla de ruedas sin ayuda o supervisión y desplazarse autónomamente con ella, responda NO - Si el paciente requiere bastón o andador, pero no necesita a otra persona presente durante la deambulación, responda NO	☐ Sí (mRS = 4)
	☐ No
3: ASISTENCIA PARA EL DESEMPEÑO DE TAREAS PERSONALES	
Cuestión clave: Aunque fuera estrictamente necesario, el paciente NO podría vivir solo sin supervisión durante una semana.	
Otras preguntas dirigidas para el mRS 3: ¿Es absolutamente necesaria asistencia verbal o física o supervisión de otra persona para...: - ¿Preparar una comida sencilla (desayuno o entremés)? responda SÍ - ¿Encargarse de su ropa, recoger la mesa y realizar otros quehaceres domésticos básicos? responda SÍ - ¿Encargarse de los gastos de la casa? responda SÍ - ¿Usar su coche o el transporte público (llamar a un taxi, coger un autobús)? responda SÍ <u>Comprar un solo artículo (p.ej el pan)?</u> , responda SÍ	☐ Sí (mRS = 3)
	☐ No
2: TAREAS Y ACTIVIDADES DE RUTINA	
1. Trabajo: El ictus ha reducido de forma sustancial la capacidad del paciente para trabajar/estudiar o ha tenido que dejar de hacerlo.	☐ Sí (mRS = 2)
	☐ No
2. Responsabilidades familiares: El ictus ha afectado de forma sustancial la capacidad del paciente para hacerse cargo de su familia	☐ Sí (mRS = 2)
	☐ No
3. Actividades sociales y ocio: El ictus ha disminuido la frecuencia de las actividades de ocio dentro o fuera de casa a menos de la mitad (hobbies, deportes, salir al cine, salir a comer o a tomar un café, bricolaje, tejer, pintar...)	☐ Sí (mRS = 2)
	☐ No
1: SÍNTOMAS COMO CONSECUENCIA DEL ICTUS	
El paciente presenta algún síntoma/s a consecuencia del ictus aunque no interfiere en sus actividades previas (dificultad en leer/escribir/hablar, fallos menores de memoria, falta de concentración, enlentecimiento de movimientos o falta de coordinación, disfagia, alteración sensitiva etc)	☐ Sí (mRS = 1)
	☐ No
0: PACIENTE ASINTOMÁTICO	

ANEXO 6: ESCALA NIHSS

1A. Nivel de consciencia	
0	Normal: ojos abiertos espontáneamente
1	Estupor: abre ojos a la voz o al dolor
2	Coma superficial: abre ojos al dolor, respuesta no refleja (localiza)
3	Coma profundo: no abre ojos, respuesta ausente o refleja (decorticación, descerebración)
1B. Nivel de consciencia – orientación (Mes actual / Edad)	
0	Ambas correctas
1	Una correcta
2	Ninguna correcta
1C. Nivel de consciencia – órdenes (abrir y cerrar ojos / apretar mano)	
0	Obedece ambas
1	Obedece una
2	No obedece ninguna
2. Mirada horizontal	
0	Normal. Seguimiento voluntario
1	Paresia parcial: desviación ocular que corrige
2	Paresia total, versión ocular forzada
3. Campos visuales (confrontación por cuadrantes)	
0	Normal
1	Cuadrantanopsia
2	Hemianopsia
3	Ceguera
4. Parálisis facial	
0	Ninguna
1	Mínima
2	Parcial (inferior, tipo central)
3	Total (superior e inferior, tipo periférico)
5. Fuerza en miembros superiores (5A: derecho; 5B: izquierdo)	
0	Normal
1	Cae lentamente antes de 10 segundos
2	Esfuerzo contra gravedad
3	Movimiento a favor de gravedad
4	Ausencia de movimiento
6. Fuerza en miembros inferiores (6A: derecho; 6B: izquierdo)	
0	Normal
1	Cae lentamente antes de 5 segundos
2	Esfuerzo contra gravedad
3	Movimiento a favor de gravedad
4	Ausencia de movimiento
7. Ataxia de extremidades	
0	No hay ataxia o no es demostrable
1	Ataxia en una extremidad
2	Ataxia en dos extremidades
8. Sensibilidad	
0	Normal
1	Déficit leve
2	Déficit total, bilateral o coma
9. Lenguaje	
0	Normal
1	Afasia leve
2	Afasia grave
3	Afasia total, mutismo o coma
10. Disartria	
0	No disartria o no valorable
1	Disartria leve
2	Disartria grave
11. Negligencia/extinción	
0	Normal
1	Extinción sensitiva en una modalidad (visual o táctil)
2	Extinción sensitiva en más de una modalidad o heminegligencia (visual y táctil o negligencia espacial, anosognosia, asomatognosia)

ANEXO 7: TABLA CITOQUINAS/QUIMIOCIAS

CYTOKINE/CHEMOKINE	BASAL						1h						3 days					
	CONCENTRATION (pg/mL)						CONCENTRATION (pg/mL)						CONCENTRATION (pg/mL)					
	CTRL n-6	DIET n-6	PA n-6	PA/DIET n-6	CTRL n-6	DIET n-6	PA n-6	PA/DIET n-6	CTRL n-6	DIET n-6	PA n-6	PA/DIET n-6	CTRL n-6	DIET n-6	PA n-6	PA/DIET n-6	CTRL n-6	DIET n-6
G-CSF	165.4	26.6 **	4984	155.6	124.4	1451 *	5512	1201	132.6	1188 *	4656	94.2	132.6	1188 *	4656	94.2	132.6	1188 *
GM-CSF	263.3	91.19	124.4	113.3	194.2	6876	153.7	8783	128.6	6509	76.35	91.46	128.6	6509	76.35	91.46	128.6	6509
VEGF	65.5	54.71	4832	56.93	53.97	53.41	45.93	43.21	50.39	69.48	44.57	38.99	50.39	69.48	44.57	38.99	50.39	69.48
EOTAXIN	73.08	23.81 **	42.67	60.87	63.43	22.82	49.93	56.83	64.32	42.17	35.08	60.86	64.32	42.17	35.08	60.86	64.32	42.17
LEPTIN	28715	29481	21276	35791	31538	39356	22131	37117	31889	22375	9140	11878	31889	22375	9140	11878	31889	22375
MIP-1	24.78	4.966 **	11.22	4.718 **	17.03	8.506	10.86	4.4 **	15.28	6.052	4.3 **	5.1 *	15.28	6.052	4.3 **	5.1 *	15.28	6.052
MIP-2	242	115.3 *	1428	159.2	192.4	84.76	178	113.2	185.8	94.68 *	105	126.9	185.8	94.68 *	105	126.9	185.8	94.68 *
IL-1	694.4	61.01 **	6833 *	315.2	568.1	53.69	284.1	202	517.9	53.69 *	103.6	263	517.9	53.69 *	103.6	263	517.9	53.69 *
IL-1	36.44	11.81 *	1475 *	17.86	28.79	10.9	44.77	14.51	26.37	20.12	65.06	14.34	26.37	20.12	65.06	14.34	26.37	20.12
IL-2	64	26.18	25.98	25.98	43.36	26.38	32.77	26.38	27.36	26.38	26.18	26.18	27.36	26.38	26.18	26.18	27.36	26.38
IL-4	241.7	60.2 **	130	142.4	170.7	5167 **	1275	94.1	134.3	50.49 **	56.04 **	99.81	134.3	50.49 **	56.04 **	99.81	134.3	50.49 **
IL-5	214.8	86.78 ***	1417 **	99.21 ***	178.8	8103 **	1388	100.5 **	155.5	83.35 **	78.21 **	116.3	155.5	83.35 **	78.21 **	116.3	155.5	83.35 **
IL-6	3135	506.4 **	1197	5036	1978	282.6 *	1298	3148	1780	236.6 *	445.5	2684	1780	236.6 *	445.5	2684	1780	236.6 *
IL-10	78.48	34.79	5942	55.03	60.17	56.3	71.35	40.99	58.35	51.78	67.14	39.41	58.35	51.78	67.14	39.41	58.35	51.78
IL-12p70	639	168.9 ***	332.9 **	227.8 **	461.7	147 **	309.4	160.7 *	353.1	151 *	120.7 **	262.1	353.1	151 *	120.7 **	262.1	353.1	151 *
IL-13	242.6	3718 *	1121	190.4	190.2	2872	128.6	185.9	202.4	22.52 *	94.24	230.2	202.4	22.52 *	94.24	230.2	202.4	22.52 *
IL-17	162	275 **	7412 *	110.2	127.8	544.7	81.52	95.31	127.1	34.23 *	52.7	66.68	127.1	34.23 *	52.7	66.68	127.1	34.23 *
IL-18	153.2	46.22 **	74.65	76.12	122.8	75.98	100.7	57.05	92.67	143.2	54.15	56.91	92.67	143.2	54.15	56.91	92.67	143.2
IPN	7531	116.9 **	235.8 *	479.5	374.2	122.9 *	317.2	367.4	525.9	182.6	292.1	426.9	525.9	182.6	292.1	426.9	525.9	182.6
IP-10	264	172.1	283.4	215.8	219.5	215.8	233.5	195.4	211.4	250.6	215.2	188.9	211.4	250.6	215.2	188.9	211.4	250.6
TNF	44.86	17.53	26.21	26.73	37.43	14.63	31.25	21.4	25.18	12.2	17	20.26	25.18	12.2	17	20.26	25.18	12.2
EGF	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	1.482	10.45	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
MCP-1	1256	790.3	1186	867.3	1143	637.3 *	949.7	861.5	1009	973.9	794.3	836	1009	973.9	794.3	836	1009	973.9
GRO/KC	211	169.3	170.8	200.6	218.5	262.9	253.9	174.4	226.4	315	212.8	218.5	226.4	315	212.8	218.5	226.4	315
LIX	701.7	479.4	1476	942.2	729.3	293.8	128.3	714	862.9	469.9	313 **	659	862.9	469.9	313 **	659	862.9	469.9
RANTES	414.4	346.8	415.6	458.9	358.9	277.9	314.8	265.8	372.1	351.4	304.9	376.3	372.1	351.4	304.9	376.3	372.1	351.4
FRACTALKINE	370.9	30.85	25.51	31.86	38.43	47.27	38.22	371	47.9	59.38	40.79	30.38	47.9	59.38	40.79	30.38	47.9	59.38

CYTOKINE/CHEMOKINE	7 days				14 days				28 days			
	CONCENTRATION (pg/mL)				CONCENTRATION (pg/mL)				CONCENTRATION (pg/mL)			
	CTRL n-6	DIET n-6	PA n-6	PA/DIET n-6	CTRL n-6	DIET n-6	PA n-6	PA/DIET n-6	CTRL n-6	DIET n-6	PA n-6	PA/DIET n-6
G-CSF	8791	3311	2686	8181	1024	6099	7092	9756	6964	2124	594	2633
GM-CSF	1729	1576	1275	1141	1489	2151	1248	1058	3354	1298 *	94.47 *	66.7 **
VEGF	6475	5257	613	449	6156	4639	477	4432	5972	4443	3818	425
EOTAXIN	7147	4025	4782	4349	728	4372	5356	6418	5471	3771	41	4026
LEPTIN	30448	20242	20772	20588	40247	23375	22474	26916	29026	22139	15519 *	31374
MIP-1	2465	1693	5724 *	9005 *	1857	1521	9198	42 *	2165	1024	4402 *	571
MIP-2	1844	1452	1451	1102	1866	188	1427	1463	2397	1528	1288 *	138.2 *
IL-1	4458	7597	6482	7595	3274	2607	3501	4501	4026	141	6682 *	6482 *
IL-1	2904	2023	8649	1743	3453	2787	1271	2612	2969	1956	2273	1289
IL-2	1387	7333	2638 **	2638 **	3336	4658	3523	4253	3798	2598 *	2598 *	2638
IL-4	1545	9203	7298	8936	1999	1149	1229	1368	1943	113	9924	746 **
IL-5	168	1291	1042	1216	1586	1834	158	1291	2205	1458	1484	1236 *
IL-6	1616	8741	4945	1392	2489	9685	1935	1681	2521	5054	7837	2258
IL-10	7259	5939	4405	4053	5922	527	367	9147	5862	4677	3745	6774
IL-12p70	4899	3343	2171	2821	5291	431	4309	4911	5998	353	3034	2538
IL-13	1634	7498	5462	1116	2056	9341	1642	209	1428	595	4412 *	6642
IL-17	9753	7456	4927	6452	1515	922	1724	9536	111	5833	1084	442 *
IL-18	1982	2147	5762	3513 *	1157	9051	712	828	1201	7901	706	4933 *
IFN	5819	3137	201	2651	8099	3238	4555	5799	595	2455 *	2688 *	225 *
IP-10	179.3	167	3054 **	173	1666	1999	2215	187	1977	1486	1449	1528
TNF	3111	2451	1704	1129	2984	2786	1851	2573	3631	2405	198	1915
EGF	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
MCP-1	1073	931	743.4	766.5	988.3	1460	796.4	688.9	1092	863.6	758	7218
GRO/KC	226.5	230	232.8	210.2	210.4	227	240.9	368.8	266	202	236.8	312.8
LIX	396	5478	844.5	546.5	466	719.4	555.9	6461	1314	786.6	660.4	1014
RANTES	3322	3512	313	323.4	304.2	404.6	362.7	759.2	342.3	267.6	240	370.5
FRACTALKINE	7724	5772	4588	2949 *	5461	4089	3937	3304	4009	3606	2796	3994

ANEXO 8: CARACTERÍSTICAS BASALES EN FUNCIÓN DE LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

	Global (n=70)	Baja adherencia (n=33)	Alta adherencia (n=37)	P
I. Variables clínicas y analíticas				
Edad (media $\pm$ DE)	74.7 $\pm$ 10.7	74.9 $\pm$ 12.5	73.9 $\pm$ 8.4	0.56
Sexo, mujer (%)	28 (20)	14 (42.4)	14 (37.8)	0.69
Tabaquismo, activo y exfumador (%)	33 (48.6)	19 (57.6)	14 (40)	0.34
Alcohol (%)	5 (7.1)	1 (3)	4 (10.8)	0.36
Dislipemia (%)	40 (57.1)	21 (63.6)	19 (51.4)	0.30
HTA (%)	44 (62.9)	20 (60.6)	24 (64.9)	0.71
DM (%)	23 (32.9)	16 (48.5)	7 (18.9)	<0.01
FA, previa y dx tras el ictus (%)	46 (65.7)	21 (63.7)	25 (53.5)	0.94
Aterosclerosis: CI, AP o ictus previo (%)	18 (25.7)	11 (33.3)	7 (18.9)	0.17
Hiperuricemia (%)	7 (10.1)	3 (9.4)	4 (10.8)	0.58
Sd metabólico (%)	34 (48.6)	16 (48.5)	18 (48.6)	0.81
IMC, Me [rango IQ]	27.6 [25.2-30.1]	26.6 [24.7-28.9]	27.8 [24.2-30.6]	0.17
Obesidad (%)	19 (27.1)	6 (18.2)	13 (35.1)	0.11
Cintura abdominal, Me [rango IQ]	101 [93-112]	97.9 [87-107]	99 [93.7-111.2]	0.11
Desnutrición/riesgo (%)	10 (14.3)	6 (18.2)	4 (10.8)	0.49
Glucemia basal (mg/dl), Me [rango IQ]	109 [99.7-123.2]	111 [95-131]	105 [96.5-112.2]	0.07
Insulinemia (microU/ml), Me [rango IQ]	14.1 [8.7-21.8]	19 [9-23]	13.5 [9.6-17.5]	0.19
HbA1c, Me [rango IQ]	6 [6-6]	6 [6-7]	6 [5-6]	0.03
Colesterol LDL (mg/dl), Me [rango IQ]	84 [62-112]	84 [65-96]	99.5 [63.5-123.7]	0.45
Colesterol HDL (mg/dl), Me [rango IQ]	44 [35-56]	42 [32-52]	49 [39-59.5]	0.07
Triglicéridos (mg/dl), Me [rango IQ]	95 [75.5-133]	98 [80-132]	91.5 [74-138.5]	0.85
II. Características del ictus y neuroimagen				
ASPECTS, Me [rango IQ]	8 [7-9]	8 [7-9]	7.5 [6-9]	0.35
Oclusión arterial principal (%)				0.73
TICA	11 (15.7)	5 (15.2)	6 (16.2)	
M1	37 (52.9)	19 (57.6)	18 (48.6)	
M2	22 (31.4)	9 (27.3)	13 (35.1)	
Tándem extracraneal (%)	10 (14.2)	8 (24.2)	2 (5.4)	0.04
TOAST				0.19
Aterotrombótico	7 (10)	6 (18.2)	1 (2.7)	0.04
Cardioembólico	49 (70)	21 (63.6)	28 (75.7)	
Inhabitual	3 (4.3)	1 (3)	2 (5.4)	
Indeterminado	11 (15.7)	5 (15.2)	6 (16.2)	

**ANEXO 9: FRECUENCIAS DE CONSUMO DE ALIMENTOS (G/DÍA) EN
FUNCIÓN DE LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA**

	Global (n=70)	Baja adherencia (n=33)	Alta adherencia (n=37)	p
AOVE (g/día)	60 [30-60]	30 [30-60]	60 [60-60]	<0.01
Verdura (g/día)	200 [100-400]	200 [100-400]	400 [100-400]	0.02
Fruta (g/día)	300 [150-450]	300 [150-450]	300 [150-450]	0.78
Carnes rojas (g/día)	35.7 [8.9-53.6]	35.7 [8.9-62.5]	35.7 [178-53.6]	0.67
Mantequilla (g/día)	0 [0-1]	0 [0-1.3]	0 [0-1.3]	0.47
Bebidas carbonatadas	0 [0-14.3]	0 [0-14.2]	0 [0-71]	0.68
Vino	0 [0-32.1]	0 [0-3.5]	0 [0-100]	0.05
Legumbres	85.7 [57.1-114.3]	85.7 [57.1-85.7]	85.7 [57.1-114.3]	0.12
Pescado	35.7 [178-53.6]	35.7 [178-53.6]	35.7 [26.8-53.6]	0.36
Repostería comercial	7 [0-62.5]	50 [3.5-100]	0 [0-14.5]	<0.01
Frutos secos	2.1 [0-12.8]	0 [0-2.1]	8.6 [1-30]	<0.01
Carne pollo, pavo, conejo	35.7 [15.6-53.6]	178 [8.9-35.7]	35.7 [178-53.6]	<0.01
Sofritos (rac/día)	0.3 [0.1-0.3]	0.1 [0-0.3]	0.3 [0.2-0.6]	<0.01

ANEXO 10: CARACTERÍSTICAS BASALES EN FUNCIÓN DEL GRADO DE ACTIVIDAD FÍSICA PREVIA AL ICTUS

	Global (n=70)	Sedentarios/ Poco activos (n=27)	Activos/ Muy activos (n=43)	p
I. Variables clínicas y analíticas				
Edad (media $\pm$ DE)	74.7 $\pm$ 10.7	76.7 $\pm$ 9.1	73.5 $\pm$ 11.5	0.47
Sexo, mujer (%)	28 (20)	8 (29.6)	20 (46.5)	0.16
Tabaquismo, activo y exfumador (%)	33 (48.6)	14 (53.8)	19 (44.18)	0.16
Alcohol (%)	5 (7.1)	4 (14.8)	1 (2.3)	0.07
Dislipemia (%)	40 (57.1)	16 (59.3)	24 (55.8)	0.77
HTA (%)	44 (62.9)	20 (74.1)	24 (55.8)	0.71
DM (%)	23 (32.9)	12 (44.4)	11 (25.6)	0.10
FA, previa y dx tras el ictus (%)	46 (65.7)	18 (66.7)	28 (65.1)	0.87
Aterosclerosis: CI, AP o ictus previo (%)	18 (25.7)	8 (29.6)	10 (23.3)	0.55
Hiperuricemia (%)	7 (10.1)	3 (11.1)	4 (9.5)	0.57
Sd metabólico (%)	34 (48.6)	14 (53.8)	20 (50)	0.76
IMC, Me [rango IQ]	27.6 [25.2 - 30.1]	27.5 [24.2 - 30.5]	27.4 [24.5 - 29.6]	0.66
Obesidad (%)	19 (27.1)	8 (29.6)	11 (25.6)	0.71
Cintura abdominal, Me [rango IQ]	101 [93 - 112]	100 [92.5 - 112.5]	98 [92 - 106.7]	0.48
Desnutrición/riesgo (%)	10 (14.3)	7 (25.9)	3 (7)	0.03
Glucemia basal (mg/dl), Me [rango IQ]	109 [99.7 - 123.2]	107 [98 - 115.5]	109 [97.5 - 131]	0.55
Insulinemia (microU/ml), Me [rango IQ]	14.1 [8.7 - 21.8]	19 [9 - 23]	13.5 [9.6 - 17.5]	0.71
HbA1c, Me [rango IQ]	6 [6 - 6]	6 [5 - 6]	6 [6 - 6.5]	0.87
Colesterol LDL (mg/dl), Me [rango IQ]	84 [62 - 112]	80 [59 - 95.5]	87.5 [66.2 - 113]	0.78
Colesterol HDL (mg/dl), Me [rango IQ]	44 [35 - 56]	38 [31 - 48.5]	49.5 [39.2 - 61.2]	0.06
Triglicéridos (mg/dl), Me [rango IQ]	95 [75.5 - 133]	83 [72 - 127]	103 [81.2 - 139.5]	0.12
II. Características del ictus y neuroimagen				
ASPECTS, Me [rango IQ]	8 [7 - 9]	8 [7 - 9]	8 [7 - 9]	1
Oclusión arterial principal (%)				0.39
TICA	11 (15.7)	3 (11.1)	8 (18.6)	
M1	37 (52.9)	17 (63)	20 (46.5)	
M2	22 (31.4)	7 (25.9)	15 (34.9)	
Tándem extracraneal (%)	10 (14.2)	3 (11.1)	7 (16.3)	0.41
TOAST				0.40
Aterotrombótico	7 (10)	4 (14.8)	3 (7)	
Cardioembólico	49 (70)	19 (70.4)	30 (69.8)	
Inhabitual	3 (4.3)	0	3 (4.3)	
Indeterminado	11 (15.7)	4 (5.7)	7 (10)	

