

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Influencia del consumo de esteroides vegetales y su relación con
la enfermedad cardiovascular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ismael San Mauro Martín

Directores

Luis Collado Yurrita
M^a Ángeles Cuadrado Cenzual
M^a José Ciudad Cabañas

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Medicina



**INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ESTEROLES VEGETALES Y
SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

AUTOR

Ismael San Mauro Martín

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Medicina



**INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ESTEROLES VEGETALES Y
SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

AUTOR

Ismael San Mauro Martín

Bajo la dirección de los doctores

Luis Collado Yurrita

M^a Ángeles Cuadrado Cenual

Dña. M^a José Ciudad Cabañas

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ESTEROLES VEGETALES Y
SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA

AUTOR

Ismael San Mauro Martín

Vº Bueno del Director:

Vº Bueno del Director:

D. Luis Collado Yurrita

Dña. Mª Ángeles Cuadrado Cenual

Vº Bueno del Director:

Vº Bueno del Doctorando:

Dña. Mª José Ciudad Cabañas

D. Ismael San Mauro Martín



Luis Collado Yurrita, Director del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y profesor de Medicina, Odontología, Nutrición Humana y Dietética, **Dña. M^a José Ciudad Cabañas** profesor del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y **María Ángeles Cuadrado Cenzual**, del Departamento de análisis clínico del Hospital Universitario Clínica San Carlos de Madrid, profesora de Medicina en la Universidad Complutense de Madrid.

INFORMAN QUE: el alumno de nutrición humana y dietética, Máster en Nutrigenómica y Nutrición personalizada y Máster Oficial en Condicionantes Genéticos, ambientales y nutricionales en el crecimiento y el desarrollo ISMAEL SAN MAURO MARTÍN ha realizado, bajo su dirección y en el Departamento de Medicina y los Hospitales Clínico San Carlos y San Lorenzo del Escorial de la Comunidad de Madrid, un trabajo que lleva por título “**Influencia del consumo de esteroides vegetales y su relación con la enfermedad cardiovascular**” y autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe, en Madrid, Junio de 2016.

D. Luis Collado Yurrita

Dña. M^a Ángeles Cuadrado Cenzual

Dña. M^a José Ciudad Cabañas

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

No puedo empezar sin unas palabras para aquellas personas que han hecho, de una forma u otra, que este proyecto haya culminado. A las que estuvieron y a las que están, a todas ellas, ¡gracias!

Agradecer al Departamento de Medicina por acogerme. A mi directora, la Dra. M^a Ángeles Cuadrado, por “abrirme su casa”, y permitirme desde su Unidad del hospital poder dar los primeros pasos. A mi directora Dña. M^a José Ciudad Cabañas, por su apoyo en este proyecto. Y a mi Director, Luis Collado por estar siempre ahí, por sus consejos en todos los ámbitos. Por su confianza y apoyo. Ha sido un placer y un honor, contar contigo

Gracias a las dos unidades de los hospitales que acogieron los ensayos, a todo el equipo de Análisis clínicos del *Hospital Clínico San Carlos*, y endocrinología pediátrica del Centro de Espacialidades de San Lorenzo del Escorial. A Eva y Esperanza y especialmente a Javier Blumenfield, Beni. Gracias por enseñarme y compartir tus conocimientos. Me llevo un buen amigo del Escorial!

A *Central Lechera Asturiana*, por su apoyo y soporte, tanto económico, como institucional y logístico, especialmente a Marta y a Javier.

Agradecer a mis compañeros de carrera con los que comencé mi andadura en este mundo de la nutrición que tanto me apasiona, que compartieron esas clases y prácticas interminables.

A los investigadores colaboradores que participaron en el transcurso de las publicaciones. Gracias Elena por estar etapa, por tu inestimable ayuda, ¡que haría sin ti!

A mis amigos, por la comprensión y apoyo, por estar siempre ahí, por entender mis “no puedo quedar, no me da la vida”. Tengo la suerte de que seáis muchos, como para rellenar una hoja llena de nombres. Por el apoyo incondicional en esto y en todo. Por alegrarme cada momento desde hace años, mi segunda familia, os quiero.

A mis hermanos a los que admiro, de los que aprendí el modelo a seguir y el afán por la investigación. De los que siempre tuve un “si necesitas algo, solo dímelo”. Gracias por todo. Y por hacer crecer a la familia!

A mis padres por dárme todo. Por aguantar lo inaguantable, por apoyarme hasta el infinito y más allá. Nunca os lo podré agradecer lo suficiente. Os quiero muchísimo.

“Whether you think you can or you think you can't you're right”

Henry Fordt

ABREVIATURAS

- ACAT: Acilcoenzima colesterol aciltransferasa
- ApoA: Apolipoproteína A
- ApoA1: Apolipoproteína A-1
- ApoA2: Apolipoproteína A-2
- ApoB: Apolipoproteína B
- ApoC-I: Apolipoproteína C-1
- ApoC-II: Apolipoproteína C-2
- ApoE: Apolipoproteína E
- BIA: "Bioimpedancia eléctrica" (Bioelectrical Impedance Analysis)
- CETP: *Transferencia para esteres de colesterol*
- CI: Consentimiento Informado
- Ct: Colesterol total
- Dl: Decilitro
- DM: Diabetes Mellitus
- ECV: Enfermedad cardiovascular
- EV: Esteroles vegetales
- G: Gramos
- HC: Hipercolesterolemia
- HDLc: "Lipoproteínas de alta densidad" (High-density lipoprotein Cholesterol).
- HIP: Hoja de Información al Paciente
- HMG-CoA: Hidroxi-metil-glutaril Coenzima A
- HUCSCM: Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid
- HTA: Hipertensión arterial.
- IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia
- IMC: Índice de masa corporal
- LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa
- LDLc: "Lipoproteínas de baja densidad" (low-density lipoprotein Cholesterol).
- LPL: Lipoproteína Lipasa
- LRP: Proteína relacionada con el receptor de las LDL
- LH: Lipoproteína Hepática
- MCP-1: *Proteína-1 quimioatrayente de monocitos*

- MCSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos
- OMS: Organización mundial de la salud.
- PCR: Proteína C Reactiva
- rLDL: Receptor LDL
- SNP: "Polimorfismo de un único nucleótido" (Single-Nucleotide-Polymorphism)
- SRA: Receptor de las LDL oxidadas
- TG: Triglicéridos
- TRC: Transporte reverso del colesterol

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	15
2. INTRODUCCIÓN.....	23
2.1. Enfermedad Cardiovascular.....	25
2.1.1. Contexto global y en España.....	26
2.1.2. Factores de riesgo y medidas de actuación.....	27
2.1.2.1. Genéticos.....	28
2.1.2.2. Dietéticos.....	30
2.1.2.3. Ejercicio.....	33
2.1.2.4. Hábitos tóxicos.....	34
2.1.2.5. Obesidad, composición y grasa corporal.....	35
2.1.3. Hipercolesterolemia. Metabolismo lipídico. Placa ateroma.....	35
2.2. Esteroles vegetales.....	46
2.2.1. Estructura química.....	46
2.2.2. Fuente dietética de esteroles vegetales.	46
2.2.3. Esteroles vegetales para controlar el riesgo cardiovascular.	46
2.2.4. Mecanismos moleculares en el manejo del riesgo de ECV con EV	47
2.2.4.1. Metabolismo de los esteroles	47
2.2.5. Evidencia científica sobre la ingesta de esteroles vegetales y la ECV.....	51
2.3. Alimento funcionales y Regulación	52
2.3.1. Legislación de la industria alimentaria. Marco regulatorio.	53
2.3.1.1. EFSA y Claims aceptados.	53
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
4. MATERIAL Y MÉTODOS	59
4.1. Diseño de los ensayos.....	62
4.1.1. Diseño.....	62
4.1.2. Comité de bioética y autorizaciones.	64
4.1.3. Reclutamiento y Sujetos	65

4.1.4.	Material y equipos	66
4.1.5.	Datos y análisis estadístico.	68
5.	RESULTADOS (PUBLICACIONES)	71
6.	DISCUSIÓN	101
7.	CONCLUSION.....	115
8.	LIMITACIONES.....	119
9.	BIBLIOGRAFIA.....	123
10.	ANEXOS	147

RESUMEN

Introducción: La enfermedad cardiovascular responde a un conjunto de patologías que se deben a trastornos del corazón y los vasos sanguíneos. En España, suponen la primera causa de muerte y de hospitalización en la población, con cerca del 30 % de las muertes anuales. Aproximadamente el 20% de los adultos tiene el colesterol total ≥ 250 mg/dl. Por encima de 200 mg/dl se encuentran entre el 50% y el 69% de los adultos de edades medias. Dentro de los factores modificables y de riesgo, algunas medidas de actuación son los hábitos dietéticos, y la ingesta de esteroides vegetales. Estos son compuestos naturales de algunos productos vegetales, de estructura similar al colesterol y con mayor afinidad por la absorción del colesterol procedente de la dieta (vía exógena), así como de la vía endógena y de la vía para el transporte del colesterol reverso del colesterol (vía hepática). De esta forma, se protege la formación de la placa de ateroma, disminuyendo el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Objetivos: Analizar la efectividad de la ingesta de esteroides vegetales en el manejo del riesgo de enfermedad cardiovascular, mediante la reducción de la hipercolesterolemia en sujetos adultos. **Objetivos secundarios:** Analizar la reducción del colesterol total, del LDLc, HDLc y Tg, tras la ingesta de esteroides vegetales. Estudiar la relación entre el HDLc y la ApoA1.

Métodos: Se diseñó y desarrolló un doble ensayo clínico en dos hospitales de la Comunidad de Madrid. Ambos ensayos fueron diseñados bajo el mismo protocolo y desarrollados por el doctorando, incluyendo a un total de 54 sujetos, controlados, aleatorizados, doble ciego y cruzados. Durante 3 semanas, un grupo de sujetos ingirieron una cantidad de 700 ml de leche con una cantidad diaria de 2,24 gr de esteroides vegetales y, otro grupo con leche desnatada sin esteroides (placebo). Después de cada periodo de ingesta, de 3 semanas, tras un periodo de lavado y el análisis de las lipoproteínas sanguíneas, los sujetos cambiaron de grupo.

Resultados: Se comprobó la efectividad de la disminución del colesterol total, afectando especialmente al LDLc ($p < 0,05$), sin diferencias significativas en el HDLc ($p > 0,05$). Se encontró una correlación positiva ($p < 0,05$) entre el HDLc y la ApoA1.

Conclusión: La introducción de esteroides vegetales en la alimentación, puede suponer una vía efectiva y segura para el control leve de la hipercolesterolemia en adultos.

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular disease responds to a number of diseases that are due to disorders of the heart and blood vessels. In Spain, they represent the leading cause of death and hospitalization in the population, with about 30% of annual deaths. Approximately 20% of adults have total cholesterol ≥ 250 mg / dl. Above 200 mg / dl are between 50% and 69% of adults in middle age. Among the modifiable risk factors, some means of action are the dietary habits and intake of plant sterols. These natural compounds of certain plant products, similar to cholesterol and higher affinity for cholesterol absorption from the diet (exogenous pathway) structure and the endogenous pathway and the route for transportation of reverse cholesterol (liver) pathway. Thus, the formation of atheroma is protected, reducing the risk of cardiovascular disease.

AIM: Analyze the effectiveness of the intake of plant sterols in managing the risk of cardiovascular disease by reducing cholesterol in adult subjects. **Secondary objectives:** Analyze reducing total cholesterol, LDLc, HDLc and Tg, after ingestion of plant sterols. To study the relationship between HDLc and ApoA1.

Methods: Design and development is a double trial in two hospitals of the Community of Madrid. Both trials were designed under the same protocol and developed by the doctoral student, including a total of 54 subjects, including both clinical trials, controlled, aleatorizados, double-blind cross. For 3 weeks, an amount subjects ingested 700 ml of milk with a daily amount of 2.24 g of vegetable or without sterols skimmed milk (placebo) sterols. After each period of intake of 3 weeks, subjects switched groups, after a washout period, and the analysis of blood lipoproteins.

Results: The effectiveness of the decrease in total cholesterol was found, especially affecting LDLc ($p < 0.05$), no significant differences in HDLc ($p > 0.05$). A positive correlation ($p < 0.05$) between HDLc and ApoA1 was found.

Conclusion: The introduction of plant sterols in food can be an effective and safe way to control mild hypercholesterolemia in adults.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las enfermedades crónicas no transmisibles se han incrementado a la vez que aumentaba la población mundial y la esperanza de vida. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las muertes provenientes de estas enfermedades suponen la primera causa de muerte a nivel global. En concreto, fueron responsables del 68 % de las muertes totales en 2012, siendo el 40 % en personas menores de 70 años. Atendiendo a la enfermedad, las cardiovasculares representaron la primera causa de muerte, siendo responsables de 46,2 % de las defunciones mundiales, seguida de cáncer con un 21,7 %, enfermedades respiratorias, asma y pulmonares con un 10,7% y diabetes, con un 4 %. Estos cuatro grupos suman hasta el 82 % de las muertes globales de enfermedades crónicas no transmisibles, por lo que suponen el mayor foco de interés en salud pública, tanto en países desarrollados como subdesarrollados(1).

2.1 Enfermedad Cardiovascular

La enfermedad cardiovascular responde a un conjunto de patologías que se deben a trastornos del corazón y los vasos sanguíneos, periféricos(2):

- Fiebre reumática aguda.
- Cardiopatías reumáticas crónicas.
- Enfermedades hipertensivas incluyendo la eclampsia (hipertensión durante el embarazo).
- Cardiopatía isquémica (infarto de miocardio, angina de pecho).
- Enfermedad cardiopulmonar.
- Otras enfermedades del corazón (arritmias e insuficiencia cardíaca entre otras).
- Enfermedades cerebrovasculares (hemorragia, derrame, embolia, trombosis, apoplejía cerebral o ictus).
- Enfermedades de las arterias (arteriosclerosis, aneurisma, embolia y trombosis arteriales entre otras).
- Enfermedades de las venas (tromboflebitis).
- Malformaciones congénitas del sistema circulatorio - muerte súbita.

En Occidente, habitualmente encontramos arterioesclerosis, hipertensión, trombosis, insuficiencia cardiaca, cardiopatía isquémica y enfermedades cerebrovasculares.

2.1.1 Contexto global y en España

Como ya se ha indicado, en el contexto global se debe atender al gran problema de una enfermedad evitable en gran parte, imponiendo unas medidas de control que permitan alejarse de las cifras actuales(1):

La ECV es la causa número uno de muerte en el mundo (más personas mueren anualmente por ECV que por cualquier otra causa). Se estima que 17,5 millones de personas murieron a causa de enfermedad cardiovascular en 2012, lo que representa 31% de todas las muertes a nivel mundial. De estas muertes, se estima que 7,4 millones se debieron a la cardiopatía coronaria y 6,7 millones se debieron a un accidente cerebrovascular.

Pero no hay que obviar que más de tres cuartas partes de las muertes por ECV se producen en países de bajos y medianos ingresos, posiblemente porque las medidas sanitarias y farmacológicas de dichos países no son tan eficaces como los de países desarrollados y bajo economías fuertes. En estos últimos, se contraponen un mejor sistema sanitario y económico, pero, con unos peores hábitos de vida (alimentación, ejercicio, tóxicos, obesidad, etc), lo que contribuye a la alta tasa de estas enfermedades.

La prevención podría ser origen de la solución, abordando factores de riesgo de comportamiento, tales como el consumo de tabaco, dieta poco saludable, la obesidad, la inactividad física y el uso nocivo del alcohol.

Un estudio reciente en Europa(3), mostró cifras de la enfermedad cardiovascular alarmantes, donde sigue causando más del doble de muertes que la siguiente enfermedad que engrosa las cifras, el cáncer. Cabe mencionar un descenso en los últimos 5-10 años de la tasa de mortalidad y letalidad de las enfermedades del corazón y derrame cerebral, pero a un ritmo diferente según el país.

En **España**, la ECV supone la primera causa de muerte y hospitalización en la población española, con cerca del 30 % de las muertes anuales(4).

Aproximadamente el 20% de los adultos presenta el colesterol total por encima de 250 mg/dl. Por encima de 200 mg/dl se encuentran entre el 50% y el 69% de los adultos de edades medias. Donde se observa que uno de cada cuatro pacientes en las consultas de atención primaria está diagnosticado de dislipemia.

Además, un 35% de la población mayor de 18 años es hipertensa. Estas cifras se incrementan al 40-50% en edades medias y al 68% en los mayores de 60 años. El 65% de los hipertensos saben que lo son; de ellos, el 85% están en tratamiento, pero sólo el 25% logra controlar la presión arterial.

En 2004, las enfermedades cardiovasculares causaron en España 123.867 muertes [339 muertes cada día] (56.359 en varones y 67.508 en mujeres), lo que supone el 33% de todas las defunciones (29% en varones y 38% en mujeres)(5), y en 2013 117.484, es decir, prácticamente las mismas. Son cifras realmente alarmantes para España, ya que equivalen a una muerte cada poco más de 4 minutos atribuidas a esta patología(6).

2.1.2 Factores de riesgo y medidas de actuación

Debido al incremento de las enfermedades cardiovasculares como causa de mortalidad, poco a poco se han ido sucediendo reacciones de la comunidad científica y médica para prevenir y evitar dicha tendencia. En los años 80 se publicaron varios estudios sobre cientos de factores de riesgo relacionados con la enfermedad cardiovascular. Algunos autores, por su amplio análisis y factores sugeridos merecen especial mención, como *Hopkins PN et Al.*, 1988(7). Otros autores(8) agrupaban cohortes con varios cientos de miles de pacientes y biomarcadores más concretos, como el colesterol sérico y la presión arterial, los cuales cogieron rápidamente relevancia en el sector. Se empezó a reconocer que existían factores de riesgo modificables y, otros que en cambio, eran no modificables (género y edad, por ejemplo) y por lo tanto perdían interés en la prevención. Algunos de los factores modificables más relevantes fueron: hipercolesterolemia (HC), la hipertensión arterial (HTA), el tabaquismo, la diabetes mellitus (DM), el sobrepeso, el sedentarismo y el consumo excesivo de alcohol y la composición de la dieta.

Grandes estudios como el *Framingham Heart Study*(9), han sido claves en el conocimiento de la ECV, y después de 75 años aportando conocimiento al respecto, sigue contribuyendo con artículos recientes en revistas de máximo impacto(10).

Posteriormente aparecieron otras cohortes importantes(11) como el *Lyon Diet Heart Study*(12), donde también se observa una disminución de la morbimortalidad con modificaciones del perfil lipídico. Gracias a todo ello, aunque sin gran éxito, empezaron los grandes consorcios e informes sobre el tema. Uno de los más interesantes de la última década fue la guía clínica publicada en 2004 “*European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts)*”(13)

2.1.2.1 Genéticos

Desde la publicación del proyecto Genoma Humano a principios de siglo, el estudio de la genética y la genómica se ha desarrollado y ampliado su importancia en las enfermedades. Tradicionalmente se ha considerado el factor genético a través de la herencia, como un factor de riesgo, por ello se incluía en los algoritmos de uso clínico. Gracias a los grandes estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se empezaron a conocer variaciones en genes específicas, relacionadas con un incremento de ECV. Posteriormente comenzó a ser más eficiente secuenciar genomas gracias al avance de la tecnología y la llegada de la secuenciación masiva (NSG, por sus siglas en inglés “*Next Generation Sequencing*”). Algunos consorcios con resultados ya publicados son *Women's Genome Health Study* (con 25.000 sujetos)(14), *CARDIoGRAM* (con más de 190.000 sujetos)(15). Así pues, empezó a conocerse algunas regiones genéticas y enfermedad coronaria(16,17), ictus(18), hipertensión(19), grosor de la íntima y formación de la placa de ateroma(20).

Sin embargo, se sigue avanzando en como estas mutaciones se relacionan con la patogenia, y como otros componentes diferentes a mutaciones de un único núcleo (SNP, por sus siglas en inglés *single nucleotide polymorphism*), pueden ser relevantes en la enfermedad, como microARNs, *splicing*, elementos de regulación, etc(21).

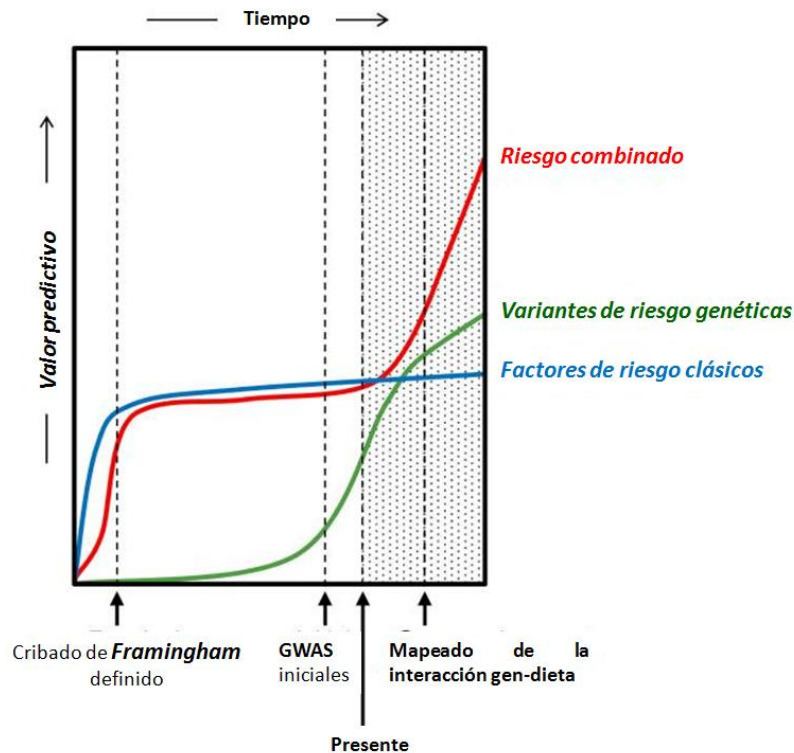


Figura 1. Tendencias futuras en la predicción del riesgo de ECV. La necesidad de predecir el riesgo de ECV es innegable. El Framingham Heart Study define un conjunto de factores de riesgo (representada por la línea azul), que ha sido el estándar de oro desde 1960. Adaptado de Lara-Pezzi E, et al. 2012(21)

Algunos estudios sobre los *locis* o conjunto de genes o grandes estudios del genoma, se centran en grandes poblaciones con el fin de fortalecer la evidencia de asociación y la replicación(22). Un estudio(23) de asociación genómica de más de 100.000 participantes en la investigación identificó 95 *locis* asociados con al menos uno de los tres lípidos sanguíneos: LDLc, HDLc y TG. Aunque cada variante individuo tenía sólo un efecto modesto, el efecto combinado de los 95 *locis* explicaban aproximadamente el 25% de la varianza genética en los niveles de LDL y de colesterol HDL. Del mismo modo, otros grandes meta-análisis de variantes genéticas (SNPs) que están asociados con la diabetes tipo 2(24) o con infarto de miocardio(17) sugieren que estas variantes, en conjunto, representan el 25% y 10%, respectivamente, de la variación hereditaria en la evolución de la enfermedad.

Dentro del *locus 9p21*(25) el *loci* asociado con genes de enfermedad arterial alberga genes que se consideran importantes en la variación de los lípidos sanguíneos,

incluyendo SORT1, PCSK9, HNF1A, MRAS, y LPA. La posición de otro SNP implica procesos inflamatorios, aumentando el riesgo de la aterosclerosis coronaria(26).

2.1.2.2 Dietéticos

En el caso de los factores ambientales, destaca la dieta, relacionada con ingesta de grasas, y más particularmente con su contenido en ácidos grasos saturados e insaturados. Hasta un 20% del colesterol plasmático está determinado por la dieta. Por ello esta adquiere especial relevancia en salud pública, tanto en forma de prevención primaria como secundaria. Así pues, desde el *Estudio Framingham*(9) al *INTERHEART study*(27), un inter-estudio en el que participaron 52 países para determinar los factores de riesgo asociados a la ECV y factores de vida modificables, han puesto en el punto de mira a la alimentación desde hace más de una década.

Algunos patrones completos de dieta saludable se han estudiado en relación con la enfermedad cardiovascular. Uno de los más relevantes, es el del consorcio de ONTARGET y TRANSCEND con más de 35.000 personas y 40 países colaborando, y avalando en 2012 (28) que los buenos hábitos alimentarios podían ser un gran recurso para mejorar la salud de la población, disminuyendo el riesgo de la enfermedad cardiovascular y la diabetes tipo 2 en mayores de 55 años.

La alimentación tradicional española, basada en la Dieta Mediterránea (DM), está siendo un foco de atención a nivel internacional, gracias a los sucesivos estudios publicados en las revistas de máximo impacto del *Estudio PREDIMED* (por sus siglas: *Prevención-con-Dieta-Mediterránea*) (29),

Atendiendo a los nutrientes, son varios los estudios que han relacionado distintos componentes específicos de los alimentos con la ECV.

MACRONUTRIENTES:

Los hidratos de carbono, recomendados por las Sociedades Científicas y entidades más relevantes como el macronutriente de ingesta mayoritario en una dieta equilibrada, que han supuesto un beneficio en la ECV. Esto se ha observado principalmente,

cuando el cómputo en la dieta de los hidratos de carbono, provenía principalmente de frutas, verduras, cereales integrales, grano entero, semillas y legumbres(30).

Los lípidos han sido a su vez ampliamente estudiados, pero de forma muy dinámica en cuanto al foco de preocupación de ingesta de este nutriente. Tradicionalmente se apostaba por la relación entre “más grasa → más Kcal → peor ECV → restricción en las recomendaciones de su ingesta”. Posteriormente, el aumento del conocimiento en el perfil y la elongación de los ácidos grasos, y su relación con la ECV (apareciendo trabajos en la literatura sobre grasas saturadas (SFA, por sus siglas en inglés), grasas *trans* y colesterol dietario como perjudiciales y poli-insaturadas (PUFAS, por sus siglas en inglés) o mono-insaturadas (MUFAS, por sus siglas en inglés) como beneficiosas para la ECV).

Poco a poco, algunos estudios sugerían que la ingesta de ácidos grasos, podía llegar a suponer la predicción de enfermedad coronaria en América(31). Sin embargo, a la ya asentada evidencia y aceptación por la comunidad científica de que los PUFAS mejoran la ECV (tanto en la prevención como en el tratamiento primario)(32), recientemente han aparecido grandes estudios, meta-análisis, que ponían en duda dicha evidencia(33). Este estudio de 2014, tiene gran relevancia por la amplitud de 600.000 casos de más 72 estudios donde, concluyen los autores, que no existe evidencia clara ni con la ingesta de omega3- o PUFAS ni con la de grasas saturadas como perjudiciales. Una revisión de *Cochrane* de 2015(34), estudió la relación de la ingesta de PUFAS como medida de prevención de la ECV en atención primaria, tampoco encontró evidencia en los hallazgos. Si bien es cierto, otros autores han ido más allá, con una visión más global, incluyendo el análisis combinado de grasas PUFAS y SFA, o el reemplazo de unas grasas por las otras, cambiando así la recomendación de ingesta en porcentaje con respecto a la ingesta calórica total(35); O la combinación de SFA y carbohidratos, especialmente refinados. Donde abogan por una especial atención al posible riesgo de ECV al disminuir los SFA inversamente proporcional al aumento de carbohidratos(36,37).

En cuanto a nutrientes minoritarios y “no nutrientes”, merece la atención el estudio de la fibra dietética, que cuenta con un importante reconocimiento científico, dosis-respuesta, tanto en su forma soluble como insoluble. Especialmente se ha relacionado la ingesta de fibra procedente de frutas, verduras y cereales con la función

cardiovascular(38). Esto ha sido recientemente publicado en el meta-análisis de 80 ensayos con casi 700.000 personas(39).

Los fitoquímicos, compuestos bioactivos de los alimentos de tamaño minúsculo, han supuesto un nuevo horizonte en el entendimiento de la ingesta de algunos alimentos y su prevención o mejora de la ECV. Por ello, algunos autores recomiendan la ingesta diaria de estos, como herramienta en el manejo de la ECV(40).

MICRONUTRIENTES:

Algunos micronutrientes, minerales y vitaminas, también han sido estudiados de forma independiente en su relación con la ECV o algunos de sus factores de riesgo.

Uno de los más clásicos desde los estudios como *Framingham*(9), es el sodio (la sal común, como condimento alimentario para potenciar el sabor), relacionada con la presión arterial y que supone una posible reducción del riesgo de HTA en la medida en que se reduzca, donde está considerada como una prioridad de salud pública en la actualidad(41).

A favor de su ingesta en la reducción de la ECV tendríamos el selenio(42) y magnesio(43,44), aunque este ha sido cuestionado recientemente(45). El calcio se ha estudiado, pero aun parece no existir evidencia suficiente(46)

Por otro lado, el colesterol de la dieta ingerido de forma natural por la composición de algunos alimentos, estuvo tradicionalmente ligado a mayor ECV, en lo que parecía obvio-más ingesta de colesterol en la dieta → mayor concentración de colesterol total y LDLc. Sin embargo, debido a la regulación del colesterol ingerido y el producido por el cuerpo, pronto se empezó a estudiar de forma aislada, y actualmente contamos con importantes revisiones sistemáticas sobre el tema. Una de las de mayor impacto y relevancia, es la publicada en la prestigiosa revista *American Journal of Clinical Nutrition* en 2015(47), con más de 300.000 sujetos, y concluye que no hay evidencia de relación entre la ingesta dietética de colesterol y la enfermedad cardiovascular.

Atendiendo a la ingesta de alimentos, en lugar de a los nutrientes, podemos agrupar los numerosos estudios que apuntan a estos componentes de la dieta, como una medida clínica en el manejo de la ECV. Así pues, el consumo de frutas y verduras(48,49,50); cereales integrales y la fibra procedente de estos (51,52); cereales

legumbres(53); y los lácteos(54), son algunos de los alimentos descritos en la literatura con efecto beneficioso para la ECV. Aunque en el caso de los lácteos, los autores concluían que eran necesarios nuevos estudios que evaluaran de una forma más específica los distintos tipos de lácteos en función de su contenido en grasas y especialmente grasas saturadas, como un posible sesgo y diferencias en los resultados. Para ello, otra publicación de 2013, ya contrastaba dicha hipótesis, concluyendo que no existía dicha relación(55). Otros alimentos también se han reportado como beneficiosos: pescado azul(56); frutos secos(57); aceite de oliva(58), como está evidenciado en el proyecto *PREDIMED*.

Desde hace décadas, el consumo de alcohol, cerveza y vino, ha estado ligado a su inversa relación con la ECV(27,59), aunque no aclaraban específicamente cual era el “consumo moderado” propio, ni el rango de seguridad, ni mención a otras enfermedades o problemas asociados al consumo (hígado, neuronal, etc) ni los mecanismos. Otros autores(60), en estudios más específicos, una única enfermedad (HTA) y solo en mujeres, concluyen a favor de la ingesta moderada. Recientemente, autores españoles(61) han introducido en el estudio asociativo del posible beneficio de la ingesta moderada de alcohol en forma de vino y cerveza, a los polifenoles (fitoquímicos) como elementos determinantes de este beneficio.

Incluso las especias culinarias han sido estudiadas en la relación con la ECV. Tanto las especias indias(62), como el ajo(63) o la cúrcuma(64), son algunas de las más estudiadas, aunque por ahora las investigaciones solo mencionan una modesta mejora en la ECV.

Entre los hábitos dietéticos, destinados a prevenir la hipercolesterolemia, el uso de esteroides vegetales se ha evidenciado científicamente como componentes capaces de modular el colesterol de los humanos. Es por ello, que se le ha dedicado un apartado específico (ver apartado 2.2)

2.1.2.3 Ejercicio

Dentro del *Estudio Framingham*, la actividad física fue uno de los factores estudiados de gran interés, por su relación con la ECV(65). La actividad física reduce

considerablemente el riesgo de padecer infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares porque:

- Ayuda al cuerpo a quemar grasas y azúcares, y a mantener el peso adecuado.
- Reduce la tensión arterial.
- Aumenta la concentración de oxígeno en el cuerpo.
- Disminuye el estrés.
- Fortalece el músculo cardíaco y los huesos.
- Mejora la circulación sanguínea y el tono muscular.

Todo ello ha contribuido a que con los años apareciesen cientos de publicaciones, que han sucumbido ante la evidencia en forma de meta-análisis sobre el tema. Como es el publicado en 2014(66), que no encontró relación entre el ejercicio físico y la fibrilación articular, por lo que los autores concluyen con el potencial beneficio, sin perjuicio, de la práctica del ejercicio para la salud. Otro grupo el mismo año, estudió el beneficio del ejercicio aeróbico para la rigidez arterial(67). Aunque esto no se vio en sujetos pre-hipertensos en relación a la presión arterial sistólica(68). También en la prevención de la diabetes(69) o la inactividad física (sedentarismo) como un incremento del 14,3 % de la incidencia de ECV y un incremento del 17,9 % aproximadamente en la mortalidad por ECV ha sido reportado(70).

2.1.2.4 Hábitos tóxicos

El tabaco, la ingesta de fármacos y drogas, está relacionado con la ECV, como se puso de manifiesto en los años 60 con el *Estudio Framingham*: El humo del tabaco contiene numerosas sustancias que dañan los pulmones, los vasos sanguíneos y el corazón. Esas sustancias ocupan en la sangre el lugar del oxígeno que el corazón y el cerebro necesitan para funcionar con normalidad. El consumo de tabaco aumenta de forma considerable la probabilidad de padecer un infarto de miocardio o un accidente cerebrovascular(71).

El uso de ciertos medicamentos: algunos anticonceptivos y terapias hormonales incrementan el riesgo de cardiopatías(72,73,74).

2.1.2.5 Obesidad, composición y grasa corporal

El exceso de peso, medido con el índice de masa corporal, relación entre el peso y la altura al cuadrado, y el exceso de grasa, especialmente la grasa abdominal, se ha relacionado desde la década de los 60(75), hasta la actualidad, como un factor de riesgo relevante. Así lo recoge uno de los últimos estudios de mayor impacto, con más de 1 millón de sujetos(76).

2.1.3Hipercolesterolemia. Metabolismo lipídico. Placa ateroma.

La hipercolesterolemia (HC), es uno de los principales factores de riesgo con mayor trascendencia en el desarrollo de las ECV(77), no sólo por su elevada prevalencia, sino también por su deficiente control, además de ser uno de los mejores predictores(78). El aumento de las concentraciones séricas de LDLc, se ha reportado como el principal factor de riesgo en la enfermedad cardiovascular. Algunos estudios sugieren que por cada 1% de reducción de las concentraciones del colesterol total, se consigue un 2% de reducción de riesgo cardiovascular(79).

Sin embargo, gracias a los mecanismos de regulación y homeostasis, el colesterol se mantiene ampliamente constante, equilibrando la síntesis endógena del esteroide con la absorción intestinal y con la secreción biliar de ácidos biliares y colesterol. Además, los ácidos biliares son eficientemente captados y una parte del colesterol biliar también es reabsorbido en el intestino. Así, el balance global del colesterol depende de las ingesta (dieta y síntesis) y pérdida (eliminación fecal)(80).

Dentro de las hipercolesterolemias, se encuentran distintos fenotipos, afectados por distintos mecanismos(81,82,83). Según los datos del *Estudio ENRICA*(80), el 50% de la población presentarían hipercolesterolemia en nuestro país.

El **metabolismo lipídico y de las lipoproteínas** circulantes se regula a través de varios mecanismos en los humanos expuestos a continuación:(84):

Las grasas o lípidos son diferentes componentes químicos que se pueden extraer mediante solventes orgánicos de las plantas, los animales y distintos organismos microbianos. Son compuestos insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos como el éter, cloroformo, hexano, benceno o metanol. Tienen funciones metabólicas

esenciales y son importantes como elementos estructurales. Se pueden clasificar desde distintos puntos de vista, teniendo en cuenta su presencia en los alimentos grasos, así como su función nutritiva.

1) Según la composición química:

- Triacilgliceroles o triglicéridos.
- Fosfolípidos y lípidos compuestos.
- Colesterol y otros esteroides.

2) Según sus propiedades físicas:

- Grasas neutras: ésteres de ácidos grasos con glicerol (monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos) y colesterol.
- Grasas anfifílicas: fosfolípidos y glicolípidos, por su capacidad para orientarse en la interfase de dos capas no miscibles, como las membranas celulares y la capa externa de las lipoproteínas.

3) Según su función:

- Grasas de almacenamiento (triglicéridos, fundamentalmente).
- Grasas estructurales (fosfolípidos, glicolípidos y colesterol) que forman parte de la estructura de las membranas celulares y abundan en ciertos órganos, como el cerebro.

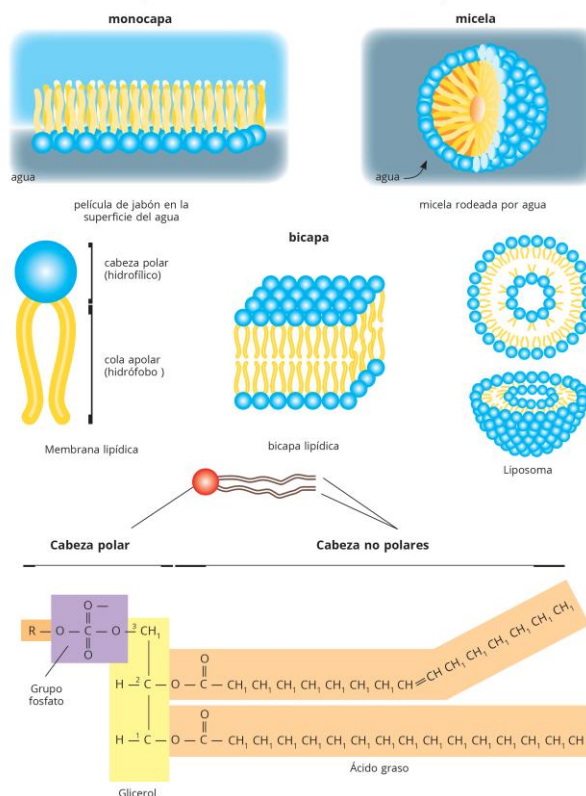


Figura 2. Estructura de los fosfolípidos. (Ros E, 2015)

Los **acilgliceroles** son ésteres de ácidos grasos, que en número de uno, dos o tres se adhieren al esqueleto del glicerol para producir mono, di y tri-acilglicerol o triglicérido, respectivamente. Los triacilgliceroles son los más abundantes en los alimentos. La naturaleza y la localización de los ácidos grasos sobre la molécula de glicerol determinan su respuesta biológica.

Desde el punto de vista de la alimentación, los **triglicéridos** constituyen el principal componente de la grasa ingerida, equivalente al 98 %; el 2 % restante está constituido por fosfolípidos, colesterol y lípidos complejos. Los triglicéridos están formados por la unión del glicerol con tres ácidos grasos.

Los **esteroles** y **ésteres de esteroles** pertenecen a un largo subgrupo de esteroides, que están representados básicamente por el colesterol en los animales y los esteroles vegetales o fitoesteroles en las plantas (sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.).

El **colesterol** es un lípido de estructura distinta a los demás. Químicamente es un derivado del ciclopentano-perhidro-fenantreno. El grupo OH del carbono 3 le permite formar ésteres con los ácidos grasos. El colesterol no es un nutriente esencial porque se puede sintetizar en las células de animales a partir del acetato. La síntesis aporta al organismo unas tres veces más colesterol que el procedente de la dieta.

Cada uno de los lípidos tiene diferentes funciones como el mantenimiento de la estructura de la membrana celular (colesterol, fosfolípidos), la síntesis de hormonas esteroideas (colesterol), y el metabolismo energético (triglicéridos y ácidos grasos). Debido a la insolubilidad de los lípidos en un medio acuoso, y para facilitar su transporte en el plasma sanguíneo, se asocian con proteínas y forman unas estructuras que se conocen con el nombre de lipoproteínas.

Lipoproteínas(85,86):

Las lipoproteínas constan de un núcleo hidrofóbico formado por triacilgliceroles y ésteres de colesterol, rodeado de una envoltura organizada en una monocapa y formada por lípidos polares (fosfolípidos y colesterol libre) y por proteínas. Las proteínas que constituyen las lipoproteínas reciben el nombre de apoproteínas y cumplen una función estructural, solubilizando los lípidos, y además regulan la ruta metabólica de las diferentes lipoproteínas al servir de cofactores enzimáticos y por

interaccionar y ser reconocidas por receptores específicos localizados en las membranas celulares.

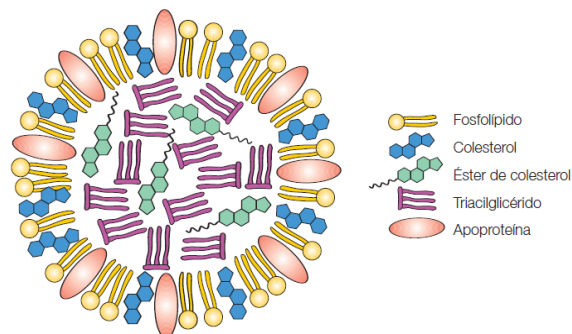


Figura 3. Estructura de las lipoproteínas. (Palou A, 2005)

Las lipoproteínas plasmáticas se clasifican normalmente en cinco subclases principales en base a sus densidades: los quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Algunas subclases de lipoproteínas pueden ser divididas por la densidad de las partículas, o el tamaño, la carga eléctrica, o el contenido de apolipoproteína.

	Quilomicrones	VLDL	LDL	HDL
Densidad (g/ml)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,063	1,062-1,21
Diámetro (nm)	>70	30-90	18-22	5-12
Lípidos (%)	98	92	78	50
Triglicéridos (%)	86	55	6	4
Fosfolípidos (%)	7	18	22	22
Colesterol libre (%)	2	7	8	4
Colesterol éster (%)	3	12	42	20
Proteínas (%)	2	8	22	50
	A-IV B-48 C-II, C-III E	B-100 C-I, C-II C-III E	B-100	A-I, A-II, A-IV C-I, C-II C-III D, E

Tabla 1. Características de las lipoproteínas (Palou A, 2005)

Metabolismo de las lipoproteínas(87,85)

Existen tres vías para el transporte de las lipoproteínas en el organismo:

- a) **Vía exógena:** transporta los lípidos de la dieta desde el intestino a sus diferentes destinos metabólicos en diversos tejidos. Los ácidos grasos, colesterol y

fosfolípidos que provienen del intestino son ensamblados en los QM que contienen la apolipoproteína (apo) B-48 sintetizada en el intestino; esta es una apoproteína B más corta que la B-100 de origen hepático. Los QM además contienen apo A-I, A-II y A-IV y son vertidos desde el intestino a la linfa para alcanzar luego el torrente sanguíneo. En la circulación son hidrolizados por el sistema de la lipoproteína lipasa (LPL) del endotelio vascular. Los QM a medida que circulan van perdiendo triglicéridos y van haciéndose más pequeños y densos, enriqueciéndose más en colesterol, transformándose en QM remanentes. Adquieren a su vez desde las HDL, apo C-II que es el activador de la LPL y apo E, que es imprescindible para la unión a receptores hepáticos que no reconocen a la apo B48 al no contener la región de señalización del receptor. Estas partículas son retiradas de la circulación por el hígado utilizando los receptores para LDL y, en menor proporción, por un sistema de receptores distinto denominados LRP-1 (*LDL receptor-related protein*) el que actúa en conjunto con el protoglicano de superficie celular. Casi todos los triglicéridos que son transportados por los QM son utilizados en los tejidos extrahepáticos, mientras que casi todo el colesterol es entregado al hígado. Una pequeña proporción de los remanentes de QM son extraídos por tejidos periféricos. Es decir, de esta manera, los quilomicrones se transforman en otros remanentes. Una vez en los hepatocitos, y por la acción de las enzimas hidrolíticas lisosómicas, se libera el colesterol que transportan. Parte del colesterol que la célula no utiliza es excretado por la vía hepatobiliar, bien sea como ácidos biliares o como colesterol *per se*, que puede a su vez ser reabsorbido por el intestino, reiniciándose el ciclo.

- b) Vía endógena:** es un sistema mediado por apo B-100 de síntesis hepática que forma parte de la estructura de las VLDL, IDL y LDL. Esta vía se inicia en el hígado donde primero se ensamblan y luego se secretan las VLDL. La síntesis hepática de estas lipoproteínas aumenta con la ingestión de grasa e hidratos de carbono. Las VLDL transportan triglicéridos hacia los tejidos periféricos (tejido adiposo y músculo), y colesterol hacia las glándulas suprarrenales y membranas plasmáticas. El colesterol es transportado en las VLDL como colesterol esterificado y colesterol libre. Las VLDL provenientes del hígado al entrar en la circulación intercambian con

las HDL apo C-I, apo C-II activador de la LPL, apo C-III inhibidor de la LPL y apo E que modula la unión de las VLDL con receptores en la superficie celular. En la circulación, las VLDL son hidrolizadas por la LPL en la superficie endotelial de diversos tejidos, perdiendo triglicéridos y se convierten en partículas más pequeñas denominadas remanentes. Una proporción de ellas es captada por el hígado, otros tejidos y el resto entra en la llamada cascada impolítica de las lipoproteínas VLDL-IDL-LDL en el compartimento plasmático, todas estas lipoproteínas comparten la presencia de apo B-100 en su estructura, ligando para el receptor de apo B/E hepático. La LPL y la lipasa hepática (LH) dan cuenta del núcleo cargado de triglicéridos de estas partículas remanentes, que se transforman en IDL, al quedar cargadas con apo B-100 y apo E. El receptor hepático que reconoce a las IDL es el receptor para LDL, llamado también receptor apo B/apo E. La apo E cumple un papel modulador para la unión de las lipoproteínas que la transportan con el receptor apo B/apoE. La presencia de apo E es muy importante para el reconocimiento de la partícula IDL por el receptor hepático para apo B/apo E que permite incorporarla en el hígado y proseguir el metabolismo. Una proporción de IDL en el plasma sigue perdiendo triglicéridos y toman el curso hacia LDL las que a su vez, son aclaradas por el sistema de receptores hepáticos para LDL en su mayor parte y las otras son procesadas por otros pasos en los cuales incluso no median receptores. Las LDL constituyen los principales transportadores del colesterol plasmático hacia los tejidos. Sin embargo, el 75% de la captación de las LDL ocurre en el hígado, el resto en las suprarrenales y tejido adiposo. Para que el proceso se realice, es esencial la presencia de apo B-100 y de receptores para su reconocimiento. Una vez en el interior de la célula la partícula es desarmada en sus componentes proteicos y lipídicos, el colesterol libre en exceso, es esterificado de nuevo por la acil-CoA-colesterol aciltransferasa (ACAT) para el almacenamiento intracelular.

- c) **Vía para el transporte del colesterol desde la periferia al hígado** (vía reversa): es un sistema mediado por apo A-I, contenido en las HDL, utilizado en el transporte del colesterol desde la periferia hacia el hígado. Este sistema esta interconectado con la vía exógena y endógena del transporte de lípidos. Sirve de reservorio

circulante para apoproteínas: apo C-I, apo C-II y apo E. Las partículas HDL derivan de precursores complejos aportados por el hígado e intestino. La vía se inicia cuando las HDL nacientes, provenientes del hígado o intestino delgado incorporan colesterol libre desde las membranas celulares. En este proceso la *lecitin-colesterol-acil-transferasa* esterifica el colesterol libre con ácidos grasos provenientes de la posición C-2 de la lecitina que son transferidos al C-3-OH del colesterol libre. Al incorporar colesterol la partícula HDL se transforma de discoidal, en esférica, dando lugar a las HDL₂, que luego se transforman en HDL₃ y vuelve nuevamente al hígado donde es incorporada mediante receptores específicos para apo A-I. Los macrófagos también, vía receptores, incorporan a las HDL y estas captan colesterol y apo E en el interior de ellos. La presencia de apo E en las HDL facilita posteriormente la captación por los receptores hepáticos y su catabolismo. La función principal de las HDL es el intercambio de colesterol libre y su esterificación. Al captar las HDL el colesterol de las membranas celulares, reducen el colesterol almacenado dentro de las células al momento que este se desplaza para reemplazar el colesterol retirado de las membranas. El colesterol esterificado de las HDL a su vez puede ser transferido a las LDL y VLDL mediante la acción de la enzima asociada, denominada *Proteína de Transferencia para Esteres de Colesterol* (CETP). La ventaja de este paso es permitir mediante un doble mecanismo de receptores para LDL y HDL devolver colesterol al hígado. Esta vía de transporte reverso de colesterol es un mecanismo importante en la prevención de la aterogénesis.

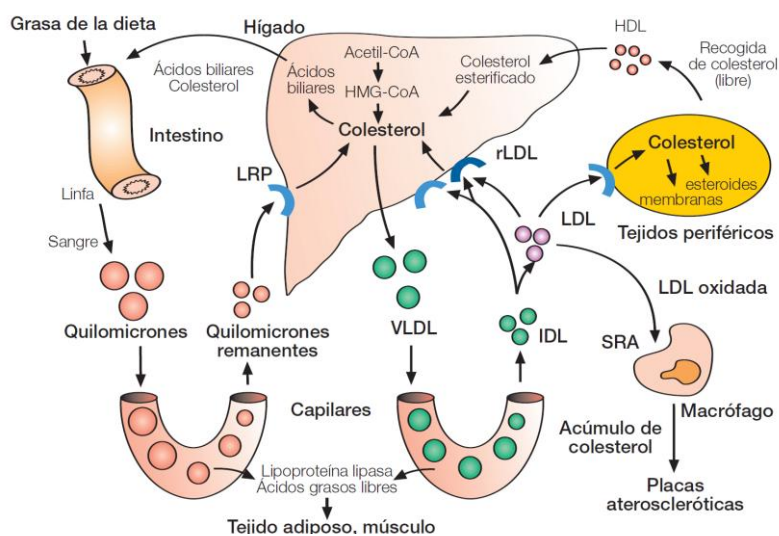


Figura 4. Transporte de lipoproteínas. (Palou A, 2005).

La placa de ateroma:

Los vasos arteriales, con la excepción de los capilares, están compuestos por tres capas bien definidas: íntima, media y adventicia(88). Dichas capas están delimitadas por otras concéntricas de elastina, conocidas como lámina elástica interna (que separa la íntima de la media) y lámina elástica externa (que separa la media de la adventicia).

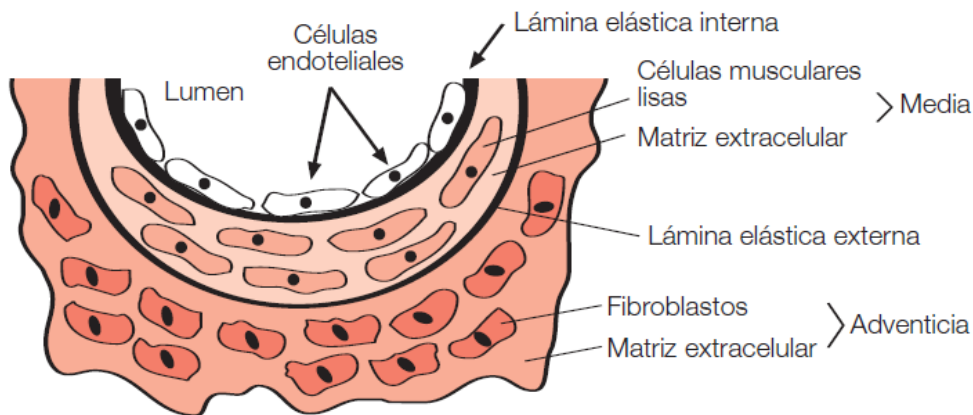


Figura 5. Corte transversal de una arteria normal (Keaney, JF, 2000)

- En la parte luminal, encontramos inmediatamente la capa íntima, constituida por una monocapa de células endoteliales establecida sobre una matriz extracelular y bordeada por la lámina elástica interna. El grosor de la matriz extracelular y elastina es más prominente en las arterias de medio y gran calibre. Las células endoteliales constituyen una barrera dinámica entre la superficie luminal del vaso y el estroma de la pared arterial y regulan un amplio espectro de funciones de la pared arterial, incluyendo la trombosis, el tono vascular y el tráfico de leucocitos dentro de la pared arterial.
- En la capa intermedia encontramos la capa media de la pared vascular, que está compuesta por células musculares lisas organizadas en una o varias capas, dependiendo del tamaño de la arteria. Dichas células están embebidas en una matriz extracelular formada principalmente por fibras elásticas y colágeno.
- En la capa más externa de la pared vascular, encontramos la adventicia. Su grosor depende del tipo y localización del vaso. Esta capa está formada por una matriz de elastina, células musculares lisas, fibroblastos y colágeno, y está relacionada con la estabilidad y conexión de los vasos sanguíneos a los tejidos.

La enfermedad aterosclerótica afecta principalmente a las arterias de calibre mediano, como las coronarias, carótidas, renales, basilares, cerebrales, ilíacas, femorales y también la aorta.

Procesos implicados en el desarrollo de la lesión aterosclerótica(89):

La enfermedad de la aterosclerosis, tradicionalmente hace referencia al acúmulo de material lipídico, principalmente colesterol y ésteres de colesterol, en la pared arterial, constituyendo las denominadas placas de ateroma. El mecanismo por el cual se forman las placas ateroscleróticas ha sido objeto de muchos estudios, y aun sigue en debate, aunque comienzan a aceptarse por válidas algunas hipótesis.

Se han establecido tres etapas en el desarrollo de la aterosclerosis: lesión temprana (estrías grasas), lesión intermedia (placas fibrosas) y lesión madura (necrótica).

- Las lesiones tempranas se caracterizan por áreas nodulares de deposición lipídica denominadas morfológicamente “estrías grasas”. Estas áreas representan macrófagos repletos de lípidos y células musculares lisas en zonas de la capa íntima.

- Las lesiones intermedias consisten, como su nombre indican, en la formación de lesiones intermedias caracterizadas por placas fibrosas, en forma de cúpula y cubiertas por una capa fibromuscular denominada “caparazón”. Dicha capa está constituida por una matriz extracelular, células musculares lisas y por colágeno. Pueden formarse inicialmente en áreas de las arterias coronarias, aorta abdominal y arterias carótidas, sobre todo durante la tercera hasta la cuarta década de la vida.

- Las lesiones maduras se caracterizan por áreas fibrosas calcificadas con ulceración visible. Este tipo de lesiones y su progresión gradual, así como otras alteraciones funcionales de la pared arterial, se han asociado con lesiones en los tejidos distales, como el infarto de miocardio. Parece aceptado que los primeros eventos, conducen a la formación de las estrías grasas. A continuación, se incrementan las concentraciones plasmáticas de LDL que conduce a un aumento de la adherencia de los monocitos circulantes a las células endoteliales de la pared arterial y a una mayor entrada de LDL en la capa íntima. Una vez en el interior, las LDL pueden experimentar un proceso de oxidación(90). Dichas LDL, incluso sólo mínimamente oxidadas, pueden incrementar la adherencia y penetración de los monocitos, en parte estimulando la liberación de la

proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) por las células endoteliales. Las LDL oxidadas también estimulan la liberación del factor estimulador de colonias de macrófagos (MCSF), que induce la proliferación y diferenciación de los monocitos en un fenotipo celular de macrófago, incluida la mayor expresión de receptores SRA. Las LDL completamente oxidadas tienen por ellas mismas capacidad quimotáctica sobre los monocitos, y son evidentemente uno de los principales ligandos de los SRA y otros receptores en la pared arterial del macrófago que contribuyen a la formación de las células espumosas.

Una vez comenzada la iniciación, se produce una fragmentación de la membrana elástica interna y la migración de las células musculares lisas de la capa media a la íntima. Las células musculares lisas de la pared arterial proliferan, producen componentes de la matriz conectiva y también acumulan colesterol. Estas células no suelen expresar el SRA, pero puede inducirse, lo que contribuiría a la formación de células espumosas. Es destacable que la lesión inicial (estría grasa), aun siendo clínicamente silenciosa por ella misma, es la precursora de lesiones más complejas que causan estenosis y limitan el flujo sanguíneo(91).

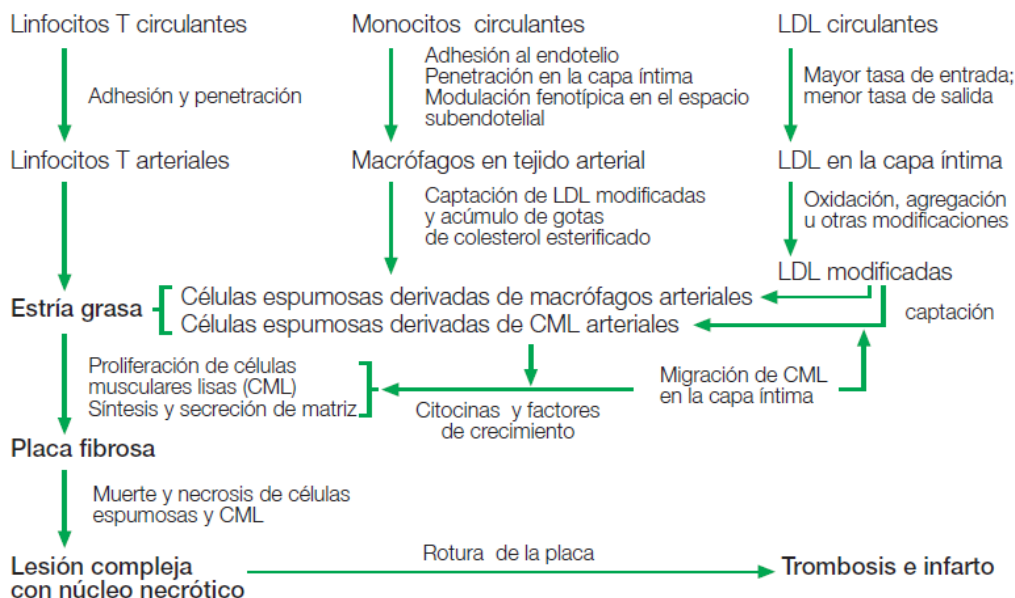


Figura 6. Secuencia de eventos en la aterosclerosis (Palou A, 2005)

Las lesiones ateroscleróticas pueden permanecer durante toda la vida sin producir ningún síntoma en el paciente, o pueden activarse y causar las consecuencias fatales

de la ECV. La activación de la lesión se inicia por rotura de la placa aterosclerótica, de manera que el contenido de la placa se expone a la superficie luminal de la arteria(92). La exposición de los componentes de la sangre a las actividades procoagulantes del interior de la placa puede conducir a la respuesta trombótica y precipitar el evento vascular(88). Las lesiones son principalmente fibrosas, aunque pueden causar estenosis, no suele coincidir con el sitio de trombosis. Parece que la inflamación y la agregación de citocinas, promueve la necrosis de células espumosas y de células musculares lisas, produciendo un progresivo acúmulo de lípidos en el espacio extracelular, acompañado de una debilitación de la capa fibrosa, que determinan en conjunto que la placa sea más sensible a la rotura.

Algunas hipótesis(93,94) se basan en la retención de lipoproteínas por la matriz de tejido conectivo. Las características físicas y químicas de las lipoproteínas plasmáticas pueden explicar por qué el colesterol transportado en las LDL promueve la aterosclerosis, mientras que el colesterol transportado en las HDL no se asocia con ello.

2.2 Esteroles vegetales

Los esteroles vegetales (EV) son componentes bioactivos con funciones similares a la del colesterol en mamíferos. Son alcaloides esteroidales que difieren del colesterol en la cadena lateral. Las principales fuentes alimenticias de EV son aceites vegetales, margarinas, pan, cereales, frutas, hortalizas y frutos secos(95).

2.2.1 Estructura química

Los EV mayoritarios son los fitoesteroles, que constituyen el 95% del total de estos compuestos, siendo el 80% β -sitosterol y el 15% restante campesterol y estigmasterol, fundamentalmente(96).

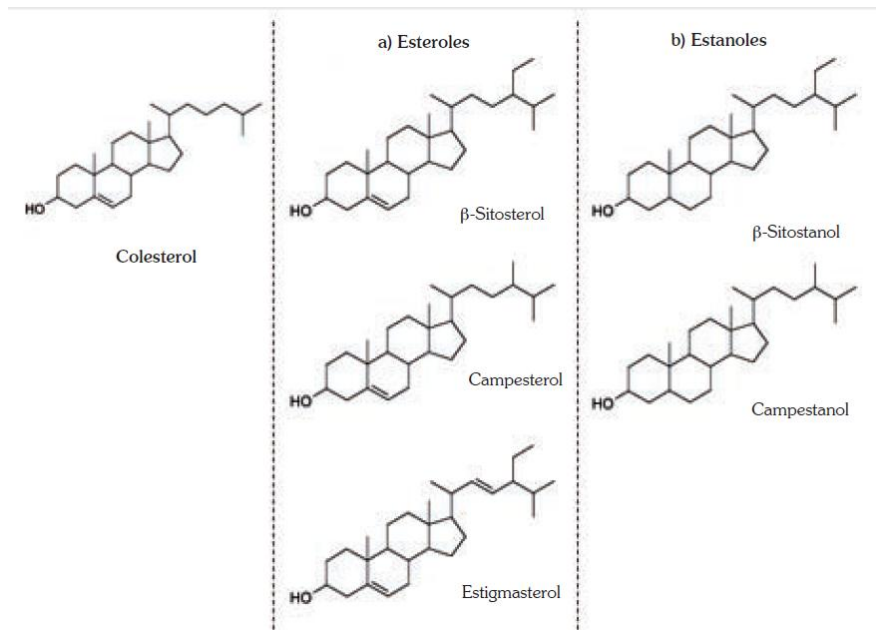


Figura 7. Estructura del colesterol y esteroides vegetales comunes (Palou A, 2005)

2.2.2. Fuente dietética de esteroides vegetales.

Los EV no pueden ser sintetizados por los organismos animales, por lo que son obtenidos a través de la dieta, principalmente por el consumo de aceites, margarinas, cereales y derivados, legumbres, hortalizas, frutas y frutos secos. La dieta habitual occidental solo contiene 150-450 mg diarios de fitoesteroides, los cuales no producen reducciones apreciables de colesterol, aportando la mayor proporción de la fracción insaponificable de grasas(97,98).

2.2.3. Esteroides vegetales para controlar el riesgo cardiovascular.

Hace 10 años, quedaba reflejada la posibilidad terapéutica, y utilidad en salud pública, de los esteroides vegetales en una de las guías más relevantes hasta la fecha(83). Con el avance de la literatura científica, los EV se han ido conociendo por reducir el nivel de las LDLc en suero sin modificar el de las lipoproteínas de alta densidad (HDLc) o triglicéridos (TG)(99,100). El consumo diario de alimentos enriquecidos con fitoesteroides se utiliza ampliamente como una opción terapéutica para reducir el nivel de LDLc en plasma y, por tanto, el riesgo de la enfermedad aterosclerótica(99).

2.2.4. Mecanismos moleculares en el manejo del riesgo de ECV con EV

En cuanto al mecanismo de acción, los EV afectan a la absorción intestinal de colesterol, a su síntesis, y a los sistemas de eliminación(101). Al introducir esteroides vegetales a la dieta, la absorción del colesterol en el intestino disminuye entre un 20 y un 80 %. Como respuesta a este descenso el hígado desarrolla mecanismos de compensación destinados a aumentar la síntesis de receptores de LDLc. El resultado final es la disminución del LDLc y del Ct entre un 8 y un 15 %(102). A pesar de que su estructura química es similar, los esteroides vegetales y el colesterol difieren ampliamente en lo que respecta a su absorción intestinal(103).

2.2.4.1. Metabolismo de los esteroides

Una de las funciones claves de los esteroides vegetales es su inhibición de la absorción intestinal de colesterol, tanto procedente de la dieta, como del colesterol endógeno recirculante procedente de la bilis, que puede ser parcialmente reabsorbido en el intestino siendo un pilar clave en la recaptación. Los esteroides vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden desplazarlo de las micelas de absorción, produciéndose una disminución de la incorporación del colesterol en las micelas(104). Otro mecanismo propuesto(105), es la reducción de la tasa de esterificación del colesterol en el enterocito, mediando la actividad de la ACAT. De esta forma se reduciría la cantidad de colesterol exportado a la sangre en forma de quilomicrones. Además, se ha propuesto un tercer mecanismo, en el que la absorción del colesterol en el intestino en función a su solubilidad, podría igualmente cambiar en presencia de los EV y con ello, reducir su absorción(106).

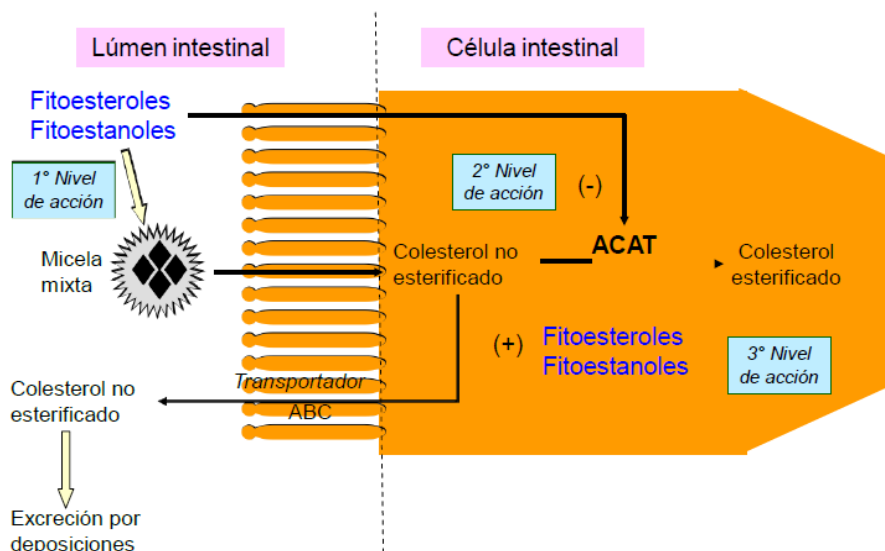


Figura 8. Mecanismo bioquímico del efecto hipocolesterolemiante de los esteroides (Valenzuela B, 2004).

2.2.4.1.1. Absorción

Como ya hemos dicho, la estructura de los EV es similar al colesterol, sin embargo, difieren marcadamente en lo que respecta a su absorción intestinal. La absorción intestinal de los EV es mínima (0,4-3,5%) y los estanoles aún menor (0,02-0,3%). La explicación a esta baja absorción puede ser la baja afinidad de los esteroides vegetales por el proceso de esterificación, incorporándose a los quilomicrones los esteroides y estanoles esterificados(108,109). La tasa de absorción cambia también por la longitud de la cadena lateral y, en los EV, puede ser algo mayor por la presencia del doble enlace en posición 5(110). Finalmente, otro factor que puede afectar a la menor tasa de absorción de los esteroides vegetales, es el funcionamiento de los transportadores de eflujo de esteroides del intestino, los transportadores ABC. Estos transportadores intestinales eliminan colesterol y sistosterol para evitar su absorción y acumulación, aunque su funcionamiento es mucho más eficiente en el caso del sitosterol, devolviendo gran parte de este esteroide presente en el enterocito de nuevo al intestino para su eliminación(111). De hecho, las mutaciones o SNPs que codifican para los transportadores ABCG5 o ABCG8 pueden desencadenar la aparición de fitosterolemia, enfermedad poco frecuente caracterizada porque los pacientes presentan una tasa muy elevada de absorción de esteroides vegetales(112).

2.2.4.1.2 Transporte

Los EV que llegan a la circulación sanguínea se esterifican en el plasma y se transportan al hígado mediante el mecanismo de transporte reverso del colesterol(113), siendo este punto, clave en la bioactividad propuesta por los autores(114):

Definición de biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad:

- Biodisponibilidad: proceso clave de la eficiencia nutricional. A partir de la ingesta total de alimentos, una cantidad inferior es asimilada y utilizada para el almacenamiento y las funciones metabólicas.
- Bioaccesibilidad: conjunto de procesos que tienen lugar durante la digestión gastrointestinal para transformar los nutrientes en componentes potencialmente activos; Absorción/asimilación a través de células intestinales; Metabolismo pre-sistémico.
- Bioactividad: transporte y asimilación por el tejido diana; Metabolismo o biotransformación y respuesta fisiológica.

2.2.4.1.3. Función

Aunque ya han sido descritos los mecanismos a través de los cuales los EV cumplen la función relacionada con la ECV y la reducción de la hipercolesterolemia, cabe reconocer, que la función individual aun sigue siendo un tema de discusión entre investigadores. Así pues, se han descrito que existen diversos factores que van a condicionar la efectividad y funcionalidad de los EV frente al colesterol. Estos factores fueron publicados en 2006 con el análisis de 45 estudios(115).

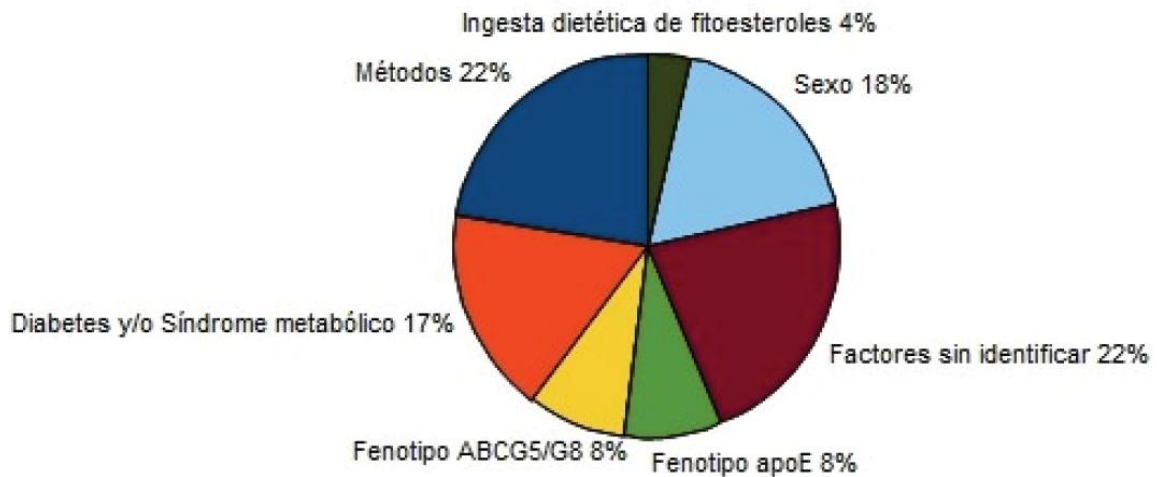


Figura 9. Impacto de los factores sobre la relación fitoesteroles-colesterol (*Chan YM, 2006*)

También otros autores han descrito la variabilidad de la respuesta a un tratamiento dietético con EV. Desde esta perspectiva se puede clasificar en modelo predictivo de hipo-responderes, normo-responderes o hiper-responderes, en función de si el efecto de los EV frente a la HC es bajo, normal o exagerado con respecto a lo descrito en la bibliografía, respectivamente(116).

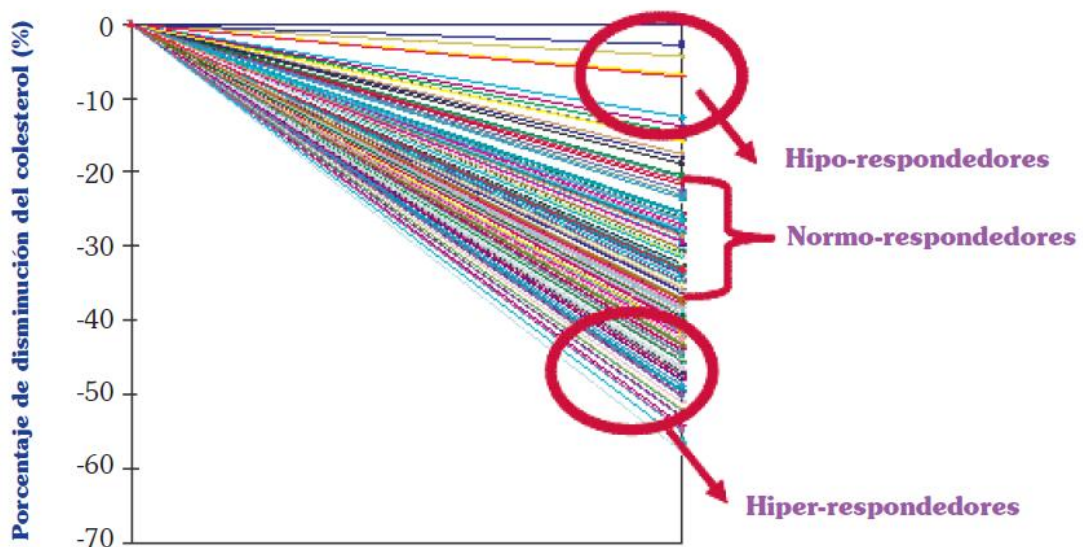


Figura 10. Ejemplo del efecto de la variabilidad de la respuesta a la dieta en la disminución del % de colesterol plasmático de 100 individuos sometidos a la misma dieta durante el mismo periodo (*Corella D, 2007*).

2.2.4.1.4. Excreción.

La eliminación de los EV se realiza mediante las heces, según su baja tasa de absorción intestinal como ya se ha visto anteriormente. Los EV que sí son absorbidos, son rápidamente eliminados debido a la excreción del hígado. Los fitosteroles son capaces de ser metabolizados en el hígado en ácidos biliares, del hígado(117). Además, los transportadores ABC intestinales, son muy eficientes en el caso del sitosterol, devolviendo gran parte de este esteroles presente en el enterocito de nuevo al intestino para su eliminación(111).

2.2.5. Evidencia científica sobre la ingesta de esteroides vegetales y la ECV

Existen multitud de estudios que han revisado la literatura de forma analítica y basados en la máxima evidencia, meta-análisis de ensayos clínicos. Todos concluyen con el beneficio y eficacia de los efectos de los EV en el manejo de la HC(118,119,120,121,122,123,124,125,126).

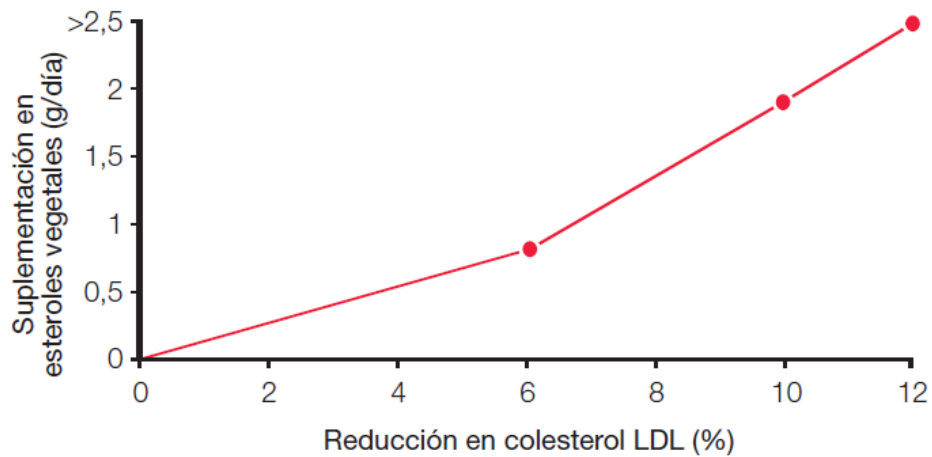


Figura 11. Reducción de las concentraciones de LDLc en función de la ingesta diaria de EV (Palou A, 2005)

2.3 Alimentos funcionales y Regulación

En España, el primer Reglamento que regula la comercialización de alimentos enriquecidos en EV, es la legislación europea de “nuevos alimentos” (Reglamento 1997/258/CE del Parlamento Europeo y del Consejo). En este, se regulan alimentos e ingredientes tales como: a) alimentos transgénicos, b) alimentos e ingredientes que poseen una estructura molecular nueva, c) alimentos procedentes de microorganismos, hongos y algas, d) procedentes de animales y plantas en cuya reproducción se empleen métodos no tradicionales, e) los obtenidos con nuevos procesos de producción, que impliquen cambios significativos en la composición o estructura de los alimentos o ingredientes que afecten su valor nutricional, metabolismo o las concentraciones de sustancias no deseables. Atendiendo a ello, todos aquellos alimentos enriquecidos en EV, se encuentran incluidos como “nuevos alimentos”.

Se debe añadir, que para poder comercializar un nuevo alimento o ingrediente alimentario se debe cumplir: a) no debe suponer ningún riesgo para el consumidor, b) no debe inducir a error al consumidor y c) no debe diferir de otros alimentos o ingredientes alimentarios a los que vaya a sustituir con el fin de que su consumo normal no implique desventajas para el consumidor desde el punto de vista de la nutrición(127).

Los lácteos, consumidos desde hace miles de años(128), y desde la revolución industrial, es uno de los sectores que más ha crecido y que más ha evolucionado adaptándose a las nuevas necesidades del usuario. Estos han innovando con una gama de alimentos funcionales de origen lácteo, especialmente la leche, con gran variedad y posición en el mercado. Así aparecen leches parcial y totalmente desgrasadas (leche desnatada y semidesnatada), y son uno de los alimentos procesados mayormente elegidos para vehicular los EV en forma de productos lácteos (margarinas, leche, yogur...)(127).

2.3.1 Legislación de la industria alimentaria. Marco regulatorio.

A lo largo de los años, se han publicado y legislado distintas Decisiones Europeas en las que se autoriza el enriquecimiento en EV en distintos alimentos, en el contexto de los “nuevos alimentos” (Reglamento 1997/258/CE). En cuanto al marco regulatorio de los esteroides vegetales, se ha ido legislando acorde a las investigaciones y a la innovación de la industria alimentaria. Esta regulación supone la aceptación legal, de un reclamo o alegación nutricional o de salud (*claim*, en inglés) que la industria alimentaria puede usar comercialmente.

Las principales fuentes de EV para el enriquecimiento de alimentos y como suplementos dietéticos son los aceites vegetales y el destilado de “tall oil”, principalmente de soja, maíz, girasol, colza y germen de trigo(129). El Reglamento, también recoge que los aceites vegetales crudos deben ser procesados con el fin de eliminar impurezas (130).

2.3.1.1 EFSA y Claims aceptados.

Recientemente, se ha establecido una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos, distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo, y la salud de los niños (Reglamento nº 2009/983/CE, 2012/432/CE) en las que se indica que los fitoesteroides y fitoestanoles contribuyen a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo. Los expertos de la *European Food Safety Authority* (EFSA) confirman que el colesterol en sangre puede reducirse en un promedio de 7 a 10,5% si una persona consume de 1,5 a 2,4 g de EV/día. Este efecto ha sido observado generalmente dentro de las primeras 2-3 semanas desde el inicio de la ingesta. Los estudios a medio y largo plazo, de hasta 85 semanas, muestran que el efecto podría sostenerse durante todo ese período(131).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Para el desarrollo de este trabajo se planteó una hipótesis inicial y principal:

¿Es efectivo el uso de esteroides vegetales vehiculizados en leche, para la reducción del colesterol plasmático y como medida de control del principal factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular?

Con esta premisa se plantearon los objetivos buscados a alcanzar:

OBJETIVO PRINCIPAL

Analizar la efectividad de la ingesta de esteroides vegetales en el manejo del riesgo de enfermedad cardiovascular, mediante la reducción de la hipercolesterolemia en sujetos adultos.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- ✓ Analizar la posible diferencia del colesterol total, del LDLc y del HDLc, tras la ingesta de esteroides vegetales.
- ✓ Analizar la la posible diferencia de triglicéridos tras la ingesta de de esteroides vegetales.
- ✓ Profundizar en el estudio y relación de la ApoA en la eficacia del tratamiento con esteroides vegetales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

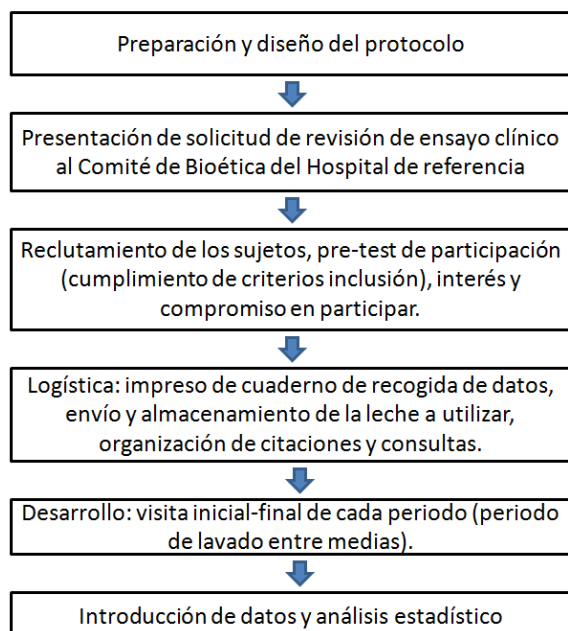
4. MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto estuvo dividido en 2 ensayos clínicos, desarrollados en 2 años consecutivos (2013-2015) en la Comunidad de Madrid.

El primero, se desarrolló en el Hospital Universitario San Carlos de Madrid. El segundo se realizó en el Hospital de San Lorenzo del Escorial con una muestra mayor, replicando el protocolo del primero.

Los dos proyectos contaron con una estructura y planificación similar, que siguió el siguiente esquema:

Figura 1. Esquema de los estudios llevados a cabo:



Todo el desarrollo de los ensayos fue realizado íntegramente por el mismo investigador, unificando el criterio y disminuyendo el sesgo de interpretaciones inter-investigadores y ayudantes.

4.1. Diseño de los ensayos

4.1.1. Diseño

Los ensayos llevados a cabo, tuvieron el siguiente diseño experimental: Ensayo clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego y cruzado. Este diseño representa el de mayor validez y evidencia científica, por integrar y considerar los elementos que merman el azar como factor interviniente en los resultados obtenidos. Al ser cruzado, y participar todos los sujetos en ambos grupos, es también el más justo desde el punto de vista ético, puesto que todos los sujetos del estudio se benefician del posible efecto positivo del tratamiento (disminución del LDLc y del riesgo cardiovascular); y su mayor ventaja especialmente, es evitar las posibles diferencias inter-sujetos entre ambos grupos que pueden existir a nivel de metabolismo y genético, ya descritos en la literatura científica en el campo del metabolismo lipídico(132), y que se desconocen al comenzar un ensayo clínico doble ciego no cruzado. El metabolismo de cada individuo es único y dependiente de muchos factores incontrolables, pero al realizarlo de forma cruzada, cada sujeto actúa como su propio control, y las diferencias en el metabolismo inter-individual se reducen hasta casi eliminarse.

Previo al comienzo del estudio, se contactó desde el Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid con una empresa láctea como colaboradora del proyecto, promotora económica y envío del producto del estudio, las leches con esteroides y las leches placebo, sin esteroides. La empresa colaboradora, con la que se inició una relación contractual y la creación de una Cátedra Universitaria, "*Cátedra UCM-CLAS para la investigación y la formación para la salud*" fue *Corporación Alimentaria Peñasanta S.A. (CAPSA)*.

CAPSA se encargó de la fabricación de los productos a suministrar a los sujetos participantes. Para ello, se envasaron las leches en envases de 1 litro de capacidad totalmente en blanco, en ciego, con la única diferencia en el color del tapón.

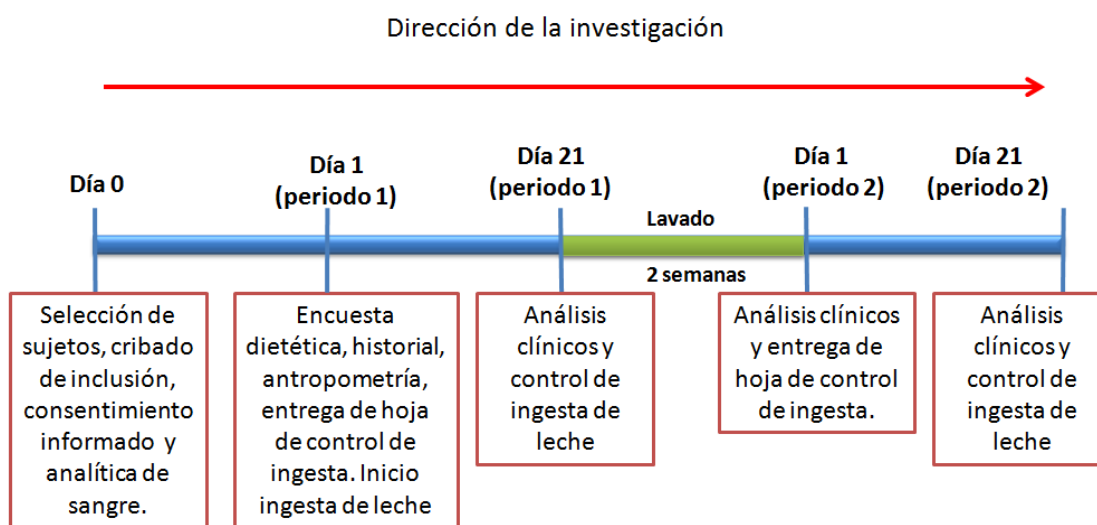
En cada ensayo se establecieron 2 grupos de estudio:

- 1) Grupo de estudio: leche desnatada con esteroides.
- 2) Grupo control (placebo): leche desnatada.

La leche de estudio era la fabricada y comercializada por CAPSA bajo la denominación “Naturcol”, y el placebo, la leche desnatada de CAPSA, ambas comercializadas y bajo la legalidad y estándares de calidad durante la totalidad del estudio.

CAPSA recomienda la ingesta de Naturcol diariamente para la reducción del colesterol LDL plasmático, en base a la legislación vigente. Es un alimento funcional que contiene una cantidad de 2,24 g en 2 vasos de 350 ml, dosis recomendada por CAPSA de ingesta diaria, es decir 700 ml al día. Debido a la gran cantidad de litros de leche y su consecuente almacenamiento, se realizaron diferentes envíos para cada uno de los estudios. El cegamiento se ocultó a los investigadores hasta finalizar cada estudio. CAPSA, además proporcionó los vasos, facilitados a los sujetos, en los cuales se incluía la medida exacta a la que tenían que llegar, la cantidad de ml diarios, para facilitar su comodidad y cumplimiento.

Figura 2. Esquema del flujo la investigación y estructura:



Como se observa en la figura 2, cada sujeto estuvo en los dos grupos (placebo y esteroides) en 2 periodos diferentes, que cambiaron tras un tiempo de “lavado” de 2 semanas (sin la ingesta de ninguna dieta especial ni suplementos con fitoesteroides). Por lo tanto, desde el inicio hasta el final, cada sujeto permaneció al menos 2 meses en el ensayo, 3 semanas del primer periodo, 2 semanas de lavado y 3 semanas en el segundo periodo.

Teniendo en cuenta el ciclo de metabolismo completo de los esteroides en el cuerpo humano-proceso "LADME" (liberación, absorción, digestión, metabolismo y excreción)-no es superior a 2 días(117), la duración del periodo de lavado se consideró de acuerdo a otros trabajos previos. En ellos, la duración de protocolos similares en ingesta de esteroides y manejo del colesterol en ensayos doble ciego-cruzados fue de 0 semanas (133,134), 2 semanas(135,136,137), 3 semanas(138), 4 o más semanas(139,140). Por lo que se estableció un mínimo de 2 semanas para el lavado.

La asignación en cada grupo para establecer el orden en el cual empezar, fue completamente aleatoria. Dicha aleatorización se realizó mediante tablas numéricas aleatorias generadas informáticamente, y cumpliendo un riguroso proceso de ocultación de la secuencia de aleatorización.

4.1.2. Comité de bioética y autorizaciones.

Todo el estudio, cumplió la normativa vigente española de ensayos clínicos. Por ello, previamente al inicio, se presentaron 2 solicitudes con la memoria del proyecto a los dos hospitales, donde se realizaron los estudios, Hospital Clínico San Carlos y Hospital Puerta de Hierro (como comité de bioética responsable del área de San Lorenzo del Escorial), ver Anexo 1.

Además, se partió de la voluntariedad de participación de los sujetos que conformaron la muestra. Para ello se les reclutó en la consulta, mediante diferentes canales de difusión, entre los sanitarios de los hospitales. Mediante la *Hoja de Información al Paciente* (HIP) (anexo 2) y una entrevista personal, se les informó de las características del estudio (objetivos, métodos, duración, consecuencias positivas y negativas, etc), y tras resolverles cualquier duda, en el caso de que las hubiera, se procedía a firmar la *Hoja de Consentimiento Informado* (CI) (anexo 3). Además, se les informaba de la posibilidad de renunciar a la participación en cualquier momento sin ningún inconveniente para ellos, con motivo o sin motivo aparente, para tomar esa decisión, para lo cual debían rellenar y firmar una hoja de Revocación de CI.

Ambos sub-estudios siguieron los principios éticos reconocidos por la *Declaración de Helsinki*, las recomendaciones de la buena práctica clínica, la actual legislación española que regula la investigación clínica en humanos, protección de datos

personales y bioéticos (Decreto Real 561/1993 sobre ensayos clínicos y 14/2007, 3 Julio para la investigación biomédica).

4.1.3. Reclutamiento y Sujetos

Tamaño muestral:

Para el estudio 1, que se realizó en el Hospital San Carlos de Madrid, se reclutó a los propios trabajadores del hospital, a través de difusión interna y del *Servicio de Salud Laboral del Hospital*.

Para el estudio 2, que se realizó en el Hospital de San Lorenzo del Escorial, los participantes fueron reclutados en las consultas de medicina interna y endocrinología, y los propios sanitarios del centro.

Se realizó el cálculo del tamaño muestral teniendo en cuenta el colesterol total como biomarcador principal, para el cálculo muestral, según las fórmulas estándar para dicha finalidad. Se calculó para una diferencia $\pm 15\%$ del Ct, teniendo en cuenta una desviación estándar de 35 mg/dl, para un intervalo de confianza del 95% y una potencia del 90%, y una tasa de pérdida del 10%

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- ✓ Hombre y mujer
- ✓ Edad 18-50 años
- ✓ Ct > 200 mg/dl y/o TG > 150 mg/dl

Criterios de exclusión:

- ✓ Ct < 200 mg/dl y/o TG < 150 mg/dl
- ✓ Patología cardíaca (Ictus, infarto miocardio, angina de pecho, etc)
- ✓ Intolerancia a la lactosa
- ✓ Alérgicos a la proteína de leche de vaca
- ✓ Alérgicos a esteroides vegetales
- ✓ Tratamiento farmacológico para el control del colesterol o triglicéridos: fibratos, estatinas, etc.

4.1.4. Material y equipos

Variables y factores de estudio:

Las variables de estudio se incluyeron en un único cuestionario diseñado a medida, *Ad Hoc*, en el que se recogían los aspectos más importantes para estudiar y contrastar, una vez obtenidos los resultados clínicos (ver anexo 4).

Las variables de estudio de forma global fueron: género, edad, historial clínico y farmacológico, la composición corporal, calidad de sueño (141), hábitos de salud (142), hábitos tóxicos como tabaco y alcohol, hábito intestinal, frecuencia de consumo de alimentos (143) y actividad física (144).

Además, se tuvieron en cuenta **factores de confusión** con una tabla de afinidad al cumplimiento de la ingesta, (>95% para aquellos sujetos que se considerarían como válidos para el ensayo, y no se les excluyera por “cumplimiento del tratamiento dietético”). Así como un registro de frecuencias de consumo de alimentos, para controlar la ingesta que pueden influir en el metabolismo del colesterol a la alza y a la baja (alimentos ricos en fibra dietética, omega 3; o altos en grasas *trans* o saturadas); y control sobre la no modificación de sus hábitos basales durante el ensayo. Es decir, que no iniciasen una dieta, o un plan de entrenamiento, o los terminasen, sino que fuesen estables a sus hábitos. Todo ello, teniendo en cuenta lo descrito en los apartados anteriores (factores dietéticos, factores de composición corporal, consumo de tóxicos, y teniendo en cuenta los factores influyentes en metabolismo de lipoproteínas, previamente descrito según algunos autores)(145).

Antropometría y estudio de la composición corporal:

A cada sujeto se le midió: peso, talla, perímetro de la cintura, IMC, % de grasa, % de grasa visceral, masa libre de grasa (kg) y % de agua.

El peso, el IMC y la composición corporal se determinaron a través de una bioimpedancia eléctrica, tetrapolar, multifrecuencia (20 y 100 kHz), InBody Modelo 230 para el estudio en el Hospital de el Escorial, y; monofrecuencia (50 KHz) modelo TANITA BP601 para el estudio en el Hospital Clínico San Carlos.

Para la medición se siguió el protocolo habitual estándar, las recomendaciones del fabricante y el protocolo estándar(146). Para el perímetro de cintura se usó una cinta métrica flexible, no elástica, metálica y de anchura inferior a 0,1mm-150cm, y la medición según el establecido por la OMS para el perímetro de la cintura. (147)

Peso

El peso corporal, expresado en kilogramos, se midió mediante una báscula digital de uso clínico (0,1 kg de precisión), con la persona posicionada de espaldas al visor, descalza, con el mínimo de prendas puestas (pantalón y camiseta), talones juntos, mirada hacia delante y postura corporal recta.

Talla

La medición de la altura, expresada en metros, se realizó mediante un tallímetro de precisión milimétrica (rango 80 cm - 200 cm), con la persona posicionada de espaldas al mismo, descalza, en posición erecta, con los talones, las nalgas, pantorrillas y la parte media superior de la espalda en contacto con el eje vertical del estadiómetro, los brazos extendidos, paralelos al cuerpo, los pies unidos por los talones formando un ángulo de 45º y la cabeza colocada siguiendo el plano horizontal de Frankfurt. En el momento de la lectura, el individuo debió mirar al frente y hacer una inspiración profunda a fin de compensar el acortamiento de los discos intervertebrales.

Índice de masa corporal

El IMC, se obtuvo mediante la relación entre el peso corporal (kg) y la altura (m) al cuadrado del individuo: $\text{peso}/(\text{altura})^2$ (148).

Análisis clínicos

Los marcadores analíticos fueron: perfil lipídico (CT, HDL-c, LDL-c, TG), hematología (recuento de series blanca y roja), glucosa e insulina, proteína C reactiva. En el caso del estudio 1, se realizó además la determinación de apolipoproteínas (ApoA).

El método de extracción de la muestra fue el establecido por el protocolo del Hospital Clínico San Carlos y Hospital del Escorial, respectivamente, de donde se han obtenido los resultados de los pacientes.

METODO DETERMINACION PARAMETROS ANALITICOS:

- HEMATOLOGÍA: Hematología LH750® (Beckman Coulter)

Para la determinación de la Hemoglobina, Hematocrito y plaquetas se utiliza El equipo LH® 750. Se trata de un analizador multiparamétrico selectivo discreto que permite realizar el recuento y medición del tamaño de los leucocitos, hematíes y plaquetas

BIOQUÍMICA. Olympus® 5400 (IZASA):

El equipo Olympus®, (5400), es un analizador multiparamétrico selectivo discreto. Los parámetros se analizaron mediante espectrofotometría.

- BIOQUÍMICA ESPECÍFICA. Dimension Vista® 1500 (Siemens Healthcare Diagnostics)

Mediante técnica de inmunoensayos homogéneos de gran sensibilidad tanto no competitivos de tipo “sándwich” como competitivos.

La extracción de muestras para las pruebas analíticas se llevaron a cabo por personal sanitario, tras 12 horas de ayuno, en la Unidad de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid y del Hospital del Escorial y el Centro de Especialidades San Carlos de San Lorenzo del Escorial, siguiendo el protocolo estándar(149,150, 151).

La obtención de muestras sanguíneas se realizó por venopunción utilizando un sistema de extracción con vacío. Se utilizaron tubos secos de 5 ml, no conteniendo ningún anticoagulante para las determinaciones bioquímicas.

Los tubos secos destinados a las determinaciones bioquímicas se centrifugaron a 2000 g durante 15 minutos, a 4°C, para separar el suero, procesándose las muestras para bioquímica en el día.

4.1.5. Datos y análisis estadístico

Para el análisis de los datos, se utilizó el paquete estadístico SPSS 21.0. En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de los datos socio-demográficos, antropométricos y de los valores lipídicos basales y finales bajo la ingesta de Naturcol y placebo. También se estudió la normalidad de los valores lipídicos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La eficacia de la intervención se comprobó, mediante la comparación de las diferencias (final-basal) de las ingestas de la leche con EV y placebo, aplicándose para ello la prueba *T de Student* para muestras relacionadas, o la prueba de rangos con signo de

Wilcoxon en función del cumplimiento del supuesto de normalidad de los incrementos lipídicos. Se calculó el tamaño del efecto como el cociente de la diferencia de medias con la desviación típica basal, o leche con EV, en su caso. El nivel de significación aplicado fue del 5%.

5.RESULTADOS

PUBLICACIÓN 1

“MANEJO DEL RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR CON LECHE ENRIQUECIDA EN ESTEROLES EN POBLACIÓN JOVEN ADULTA. ENSAYO CLÍNICO CONTROLADO ALETORIZADO Y CRUZADO”

“Risk management of cardiovascular disease through milk enriched with sterols in a young-adult population. Crossover, Randomized, Controlled, clinical trial”

- **Autores:** Ismael San Mauro Martín, Luis Collado Yurrita, María José Ciudad Cabañas María Ángeles Cuadrado Cenzual, Marta Hernández Cabria, María Elisa Calle Purón

- **Afiliación:** San Mauro-Martín I¹, Collado-Yurrita L¹, Ciudad-Cabañas MJ¹ Cuadrado-Cenzual MA² Calle-Purón ME³ Hernández-Cabria M⁴

¹Departamento de Medicina (Universidad Complutense de Madrid)

²Unidad de Análisis clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid.

³Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública (Universidad Complutense de Madrid)

⁴Departamento de Nutrición (Corporación Alimentaria Peñasanta S.A).

Año: 2014

Revista: Nutrición Hospitalaria.



Original/Otros

Manejo del riesgo de enfermedad cardiovascular con leche enriquecida en esteroides en población joven adulta; ensayo clínico controlado aleatorizado y cruzado

Ismael San Mauro Martín¹, Luis Collado Yurrita¹, María José Ciudad Cabañas¹, María Ángeles Cuadrado Cenzual², Marta Hernández Cabria⁴ y María Elisa Calle Purón³

¹Departamento de Medicina (Universidad Complutense de Madrid). ²Unidad de Análisis clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid. ³Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública (Universidad Complutense de Madrid). ⁴Departamento de Nutrición (Corporación Alimentaria Peñasanta S.A). España.

Resumen

Introducción: La hipercolesterolemia es uno de los factores de riesgo relevantes en la enfermedad cardiovascular, siendo el uso de esteroides vegetales una de las estrategias con mayor evidencia.

Objetivos: Determinar la eficacia de una leche enriquecida en fitoesteroides para la disminución de marcadores de enfermedad cardiovascular en población joven adulta.

Métodos: Ensayo clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego y cruzado. Los esteroides (2,24 g diarios) fueron ingeridos a través de una leche comercial, administrada en dos fases de 3 semanas respectivamente y separadas por un período de lavado de 2 semanas, para aquellos sujetos durante la fase de "leche de estudio", y la misma cantidad de leche desnatada, sin esteroides, para el placebo. Al inicio y al final de cada fase se realizaron extracciones de sangre. Se recopilaron datos antropométricos, hábitos de salud y marcadores analíticos sanguíneos: perfil lipídico, hematológico, inflamación, etc.

Resultados: Diecinueve personas culminaron el estudio de con una edad media de 34,68 años ($\pm 6,91$). La diferencia entre los marcadores basales y finales para el colesterol-LDL, el Colesterol total y Triglicéridos fueron de 19,47 ($\pm 29,10$) mg/dl, 24,47 ($\pm 30,68$) mg/dl, 14,36 ($\pm 44,16$) mg/dl, respectivamente. Sin cambios considerables en las fracciones de colesterol-HDL. Existen diferencias significativas, entre el placebo y la leche con esteroides para colesterol-LDL ($p=0,009$) y Colesterol total ($p=0,003$).

Conclusiones: Los esteroides vegetales suministrados en un alimento de consumo habitual, como la leche, pueden ser una estrategia terapéutica no farmacológica de la hipercolesterolemia y, por ello, una herramienta en la prevención del riesgo cardiovascular a nivel global.

(Nutr Hosp. 2014;30:945-951)

DOI:10.3305/nh.2014.30.4.7654

Palabras clave: Colesterol, riesgo cardiovascular, esteroides vegetales, Lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Correspondencia: Ismael San Mauro Martín.
Departamento de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.
Plaza de Ramón y Cajal s/n. 28030. Madrid.
E-mail: ismael.sanmauro@pdi.ucm.es

Recibido: 1-VI-2014.
Aceptado: 23-VII-2014.

RISK MANAGEMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASE THROUGH MILK ENRICHED WITH STEROLS IN A YOUNG-ADULT POPULATION; RANDOMIZED CONTROLLED CLINICAL TRIAL

Abstract

Introduction: Hypercholesterolemia is one of the most relevant risk factors in cardiovascular disease, where use of plant sterols one strategy evident.

Aim: To determine the effectiveness of a rich in phytosterols for reducing markers of cardiovascular disease in young adult population milk.

Methods: A randomized, clinical controlled trial, double-blind crossover study. Sterols (2.24 g per day) were ingested through commercial milk, with two phases and three weeks respectively separated by a washout period of 2 weeks, for those subjects during the "milk of study", and the same amount of skim milk, sterols, for placebo. At the beginning and end of each phase blood draws were performed. Lipid profile, hematology, inflammation, etc; anthropometric data, health habits and blood laboratory markers were collected.

Results: Nineteen people completed the study of 34.68 years (± 6.91). Difference between baseline and final scores were 19.47 (± 29.10) mg/dl, 24.47 (± 30.68) mg/dl, 14.36 (± 44.16) mg/dl for LDL-cholesterol, total Cholesterol and Triglycerides, respectively. Without considerable changes in HDLc. There are significant differences between placebo and milk with sterols for LDL ($p=0.009$) and total Cholesterol ($p=0.003$).

Conclusions: Sterols supplied in a functional food, such as milk, can be a strategy for non-pharmacological treatment of hypercholesterolemia and therefore a tool for cardiovascular risk reduction globally.

(Nutr Hosp. 2014;30:945-951)

DOI:10.3305/nh.2014.30.4.7654

Key words: Cholesterol, cardiovascular risk, plant sterols, Low density lipoproteins (LDL).

Abreviaturas

- Ct: colesterol total
Dl: decilitro
G: gramos
HDLc: "lipoproteínas de alta densidad" (High-density lipoprotein Cholesterol).
LDLc: "lipoproteínas de baja densidad" (low-density lipoprotein Cholesterol).
TG: Triglicéridos

Introducción

La enfermedad cardiovascular (ECV) es un concepto que integra al conjunto de patologías, cuyas causas o etiologías están imbricadas con trastornos relacionados con la formación y desarrollo de procesos ateroscleróticos en la pared vascular, tanto del corazón como del cerebro y del resto de los vasos sanguíneos periféricos. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de fallecimiento en la Unión Europea.

En 1981 Hopkins y Williams publicaron una lista de 246 factores de riesgo cardiovascular, pero podemos afirmar sin miedo a equivocarnos que los principales factores de riesgo de la ECV se engloban en dos grandes grupos: por un lado los denominados factores de riesgo cardiovascular (FRCV) modificables, es decir aquellos que pueden ser corregidos o eliminados cuando realizamos cambios en nuestro estilo de vida y entre los que destacamos por su importancia la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial (HTA), el tabaquismo, la diabetes mellitus, el sobrepeso, el sedentarismo y el consumo excesivo de alcohol siendo a su vez los hábitos dietéticos y la composición de la dieta, un condicionante de la presencia de muchos de estos factores; por otro lado, los denominados FRCV no modificables que son propios de la persona y que siempre existirán y no es posible eliminarlos. Y dentro de estos destacaremos la edad y el sexo

Estudios como el *Framingham Heart Study* ya relevaron hace años la relación entre la hipercolesterolemia, además de otros factores, correlacionada con la enfermedad cardiovascular, analizándose y revisándose en la literatura a lo largo de los años¹. En el *Lyon Diet Heart Study*, también se observó una disminución de la morbilidad de un 70 % con modificaciones del perfil lipídico².

Por lo que se refiere a nuestro país, según los últimos datos del Instituto Nacional de Estadística del año 2011³, la enfermedad cardiovascular sigue siendo la primera causa de ingreso hospitalario y muerte en España.

Son muchos los factores de riesgo implicados en el desarrollo de ECV, de todos ellos, la hipercolesterolemia (HC), es uno de los que tienen mayor trascendencia en el desarrollo de las mismas, no sólo por su elevada prevalencia sino también por su deficiente control. El aumento de las concentraciones séricas de LDLc se ha reportado como el principal factor de riesgo en la enfermedad cardiovascular.

Algunos estudios sugieren que por cada 1% de reducción de las concentraciones del colesterol total, se consigue un 2% de reducción de riesgo cardiovascular⁴.

Dentro de las hipercolesterolemias, encontramos distintos fenotipos, afectados por distintos mecanismos^{5,6,7}. Según los datos del estudio ENRICA⁸, el 50% de la población presentarían hipercolesterolemia en nuestro país.

La homeostasis del colesterol se mantiene, equilibrando la síntesis endógena del esteroide con la absorción intestinal y con la secreción biliar de ácidos biliares y colesterol. Sin embargo, puesto que los ácidos biliares, son eficientemente reabsorbidos y una parte del colesterol biliar también es reabsorbido en el intestino, el balance global del colesterol depende de las ingestas (dieta y síntesis) y pérdidas (eliminación fecal)⁹. En cuanto a la absorción del colesterol en el intestino, cabe destacar que existe una gran variabilidad interindividual en la eficiencia, oscilando entre un 20 % y un 80 %¹⁰. Esta variabilidad se ve afectada por otros factores como la adaptación de los mecanismos de compensación, los factores ambientales y los genéticos^{11, 12, 13}.

En el caso de los factores ambientales, podemos destacar la dieta, relacionada con ingesta de grasas, y más particularmente con su contenido en ácidos grasos saturados e insaturados. Hasta un 20% del colesterol plasmático está determinado por la dieta. Por ello adquiere especial relevancia en salud pública la dieta, tanto en forma de prevención primaria como secundaria.

De entre los hábitos dietéticos, destinados a prevenir la hipercolesterolemia, el uso de esteroles vegetales se ha evidenciado científicamente como componentes capaces de modular el colesterol de los humanos.

Cuando se expresa la HC, se recomiendan unas pautas generales a todos los fenotipos, entre las que se encuentran normalizar el peso, ejercicio, reducir el consumo de grasas trans, grasas saturadas y colesterol, así como el aumento de ácidos grasos insaturados, fibra y fitoesteroles. Todo ello mejorará las fracciones lipídicas^{14,7}.

La dieta habitual occidental solo contiene 150-450 mg diarios de fitoesteroles, los cuales no producen reducciones apreciables de colesterol^{15,16}. Estos esteroles vegetales tienen una estructura similar al colesterol, formando una parte importante de la fisiología de las membranas celulares¹⁷. Hace ya más de 10 años, quedaba reflejada la posibilidad terapéutica y utilidad en Salud Pública de los esteroles vegetales en una de las guías más relevantes hasta la fecha⁷.

Al introducir esteroles vegetales a la dieta, la absorción del colesterol en el intestino disminuye entre un 20 y un 80 %. Como respuesta a este descenso respuesta el hígado desarrolla mecanismos de compensación destinados a aumentar la síntesis de receptores de LDLc. El resultado final es la disminución del LDLc y del Ct entre un 8 y un 15 %, sin afectar a las fracciones de HDLc¹⁸.

En cuanto al mecanismo de acción afectan a la absorción intestinal de colesterol, a su síntesis, y a los sistemas de eliminación¹⁹.

A pesar de que su estructura química es similar, los esteroles vegetales y el colesterol difieren marcadamente

en lo que respecta a su absorción intestinal. Así, los esteroles de plantas se absorben poco en el intestino (0,4%-3,5%).

El efecto más estudiado de los esteroles vegetales es su inhibición de la absorción intestinal de colesterol, tanto procedente de la dieta (unos 300 mg/día) como colesterol endógeno recirculante procedente de la bilis (unos 1000 mg/día), que puede ser parcialmente reabsorbido en el intestino siendo, de hecho, la principal forma de recaptación²⁰. Los esteroles vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden desplazarlo de las micelas de absorción²¹, habiéndose demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que de esta manera se produce una disminución, por competición, de la incorporación del colesterol en las micelas^{22,23}.

Además, los esteroles vegetales podrían reducir la tasa de esterificación del colesterol en el enterocito (afectando a la actividad de la ACAT)²⁴ y, consecuentemente, de esta forma se reduciría la cantidad de colesterol exportado a la sangre en forma de quilomicrones. También se ha sugerido que el colesterol en el intestino, que ya de por sí es poco soluble, es precipitado y por tanto no absorbible o menos absorbible en presencia de esteroles vegetales²⁵.

Objetivos

Determinar la eficacia de una leche enriquecida en fitosteroles para la disminución de marcadores de enfermedad cardiovascular en población joven adulta.

Material y métodos

Se diseñó un ensayo clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego y cruzado. La muestra fue reclutada desde el Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid (HUCSCM), tras ser aprobado el estudio por su comité de bioética. Previamente los participantes recibieron instrucciones sobre la finalidad del estudio y firmaron un consentimiento informado. Los esteroles fueron ingeridos, a través de la leche comercial "Naturcol" (suministrado por la empresa *Corporación Alimentaria Peñasanta S.A.*), en el mercado durante todo el estudio. El diseño del estudio fue cruzado, contando con dos fases de tres semanas respectivamente y separadas por un periodo de lavado de 2 semanas. Al inicio y al final de cada fase se realizaron las extracciones de sangre. Durante un periodo de 3 semanas los sujetos ingirieron un tipo de leche, tomando diariamente 2 vasos. Cada vaso fue estandarizado para una capacidad volumétrica de 350 ml, administrando en ellos una cantidad de 2.24 g de esteroles vegetales diarios, para aquellos sujetos durante la fase de "leche de estudio", y la misma cantidad de leche desnatada, sin esteroles, para el placebo. Las leches fueron envasadas en blanco sin conocer ni sujetos ni investigadores el tipo de leche, diferenciadas únicamente por el color del tapón. La asignación de grupos fue aleatoria, usando tablas de aleatorización por números.

Tamaño muestral

Se calculó la muestra de participantes para una diferencia $\pm 15\%$ del colesterol total, teniendo en cuenta una desviación estándar de 35 mg/dl, para un intervalo de confianza del 95 % y una potencia del 80 %.

Criterios de inclusión y exclusión

- Criterios de inclusión: Hombre y mujer, Edad 18-45 años, Ct > 200 mg/dl y/o TG > 150 mg/dl.
- Criterios de exclusión: Ct < 200 mg/dl Patología cardiaca (Ictus, infarto miocardio, angina de pecho, etc), Intolerancia a la lactosa, alérgicos a la proteína de leche de vaca, alérgicos a esteroles vegetales, tratamiento farmacológico para el control del colesterol o triglicéridos: fibratos, estatinas, etc. Obesidad (IMC > 30).

Análisis clínicos

La extracción de muestras para las pruebas analíticas se llevaron a cabo por personal sanitario, tras 12 horas de ayuno, en la Unidad de Análisis Clínicos del HUCSCM se siguió la metodología estandarizada^{26,27,28}.

Variables y factores de estudio

Para el proyecto se ha diseñado un cuestionario *Ad Hoc*. Todos los cuestionarios y el estudio antropométrico fueron realizados por un único investigador, entrenado, homogeneizando y estandarizando previamente unos criterios de uniformidad y metodología a seguir. Las variables de estudio se establecieron para alcanzar los objetivos planteados. Género, edad, historial clínico y farmacológico, calidad de sueño, hábitos de salud, hábitos tóxicos como tabaco y alcohol, hábito intestinal, frecuencia de consumo de alimentos y actividad física. Además se midió el peso, la talla, perímetro de la cintura, el índice de masa corporal (IMC), el % de grasa, % de grasa visceral, la masa libre de grasa (kg) y, el % de agua de cada participante. El peso, el IMC y la composición corporal, se determinaron a través de una bioimpedancia eléctrica (BIA), tetrapolar, monofrecuencia (50 kHz), TANITA Modelo BP-601. Para la medición en composición mediante BIA se siguió el protocolo habitual estándar.

Los marcadores analíticos fueron: perfil lipídico (colesterol total, HDLc, LDLc, TG, Hematología (recuento de series blanca y roja), glucosa e insulina, PCR.

Además, se tuvieron en cuenta factores de confusión. Con una tabla de afinidad al cumplimiento de la ingesta (>95 %), y con un Score para controlar la ingesta de alimentos que pueden influir en el metabolismo del colesterol a la alza y a la baja; y control sobre la no modificación de los hábitos basales durante el ensayo.

Para el análisis de los datos se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 21.0. En primer lugar se ha realizado un análisis descriptivo de los datos sociodemográficos, antropométricos y de los valores lipídicos basales y finales bajo la ingesta de Naturcol y placebo. También se estudió la normalidad de los valores lipídicos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para analizar la eficacia de las ingestas de Naturcol y placebo se calculó la diferencia en los valores lipídicos antes y después de la ingesta, aplicándose también la prueba t de Student para muestras relacionadas o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon en función del cumplimiento del supuesto de normalidad de las variables dependientes. La eficacia de la intervención se ha comprobado mediante la comparación de las diferencias (final-basal) de las ingestas de Naturcol y placebo, aplicándose para ello la prueba t de Student para muestras relacionadas o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon en función del cumplimiento del supuesto de normalidad de los incrementos lipídicos. Se ha calculado el tamaño del efecto como el cociente de la diferencia de medias con la desviación típica basal o Naturcol en su caso. Con el fin de estudiar si el efecto de la ingesta de Naturcol o placebo interactúa con el género, se ha aplicado la prueba F para la interacción del ANOVA de un diseño de medidas parcialmente repetidas con el factor género. El nivel de significación aplicado ha sido del 5%.

Este estudio siguió los principios éticos reconocidos por la Declaración de Helsinki, las recomendaciones de la buena práctica clínica, la actual legislación española que regula la investigación clínica en humanos, protección de datos personales y bioéticos (Decreto Real 561/1993 sobre ensayos clínicos y 14/2007, 3 Julio para la investigación biomédica).

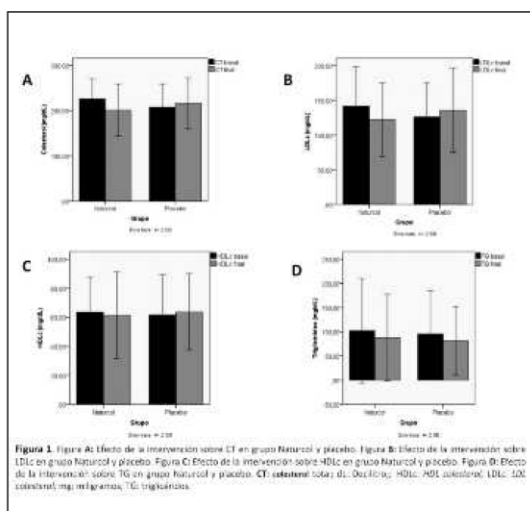


Fig. 1.—Valores basales y finales de los marcadores durante el tratamiento y el placebo.

Resultados

De los 27 participantes iniciales, 4 fueron excluidos por incumplimiento del tratamiento o de la metodología empleada, y 4 no completaron el ensayo por lo que no se pudieron incluir en los resultados finales. Diecinueve personas culminaron el estudio, 11 Mujeres y 8 hombres, con una edad de 34,68 años ($\pm 6,91$). Se comprobó la normalidad de las variables y que no presentaban diferencias significativas entre edad, peso, talla y la antropometría. Las características descriptivas de los sujetos se refleja en la tabla I.

Tras la ingesta de las dos fases, observamos diferencias significativas entre la leche con esteroides y la leche placebo (Figura 1). En la tabla II, se representan los valores de los marcadores en el momento inicial y final de cada periodo.

Teniendo en cuenta la fase de 3 semanas de ingesta de la leche con esteroides, la diferencia entre los marcadores basales y finales son de 19,47 ($\pm 29,10$) mg/dl, 24,47 ($\pm 30,68$) mg/dl, 14,36 ($\pm 44,16$) mg/dl, para el LDLc, el Ct y TG respectivamente, lo que supone una reducción del 13,8 ($\pm 18,70$) %, el 10,9 ($\pm 12,88$) % y 7,04 ($\pm 35,77$) % para LDLc, Ct y TG, respectivamente (Tabla III). Sin sufrir cambios considerables en las fracciones de HDLc, 2,15 ($\pm 8,11$) mg/dl para Naturcol, y un aumento de 2 ($\pm 4,1$) mg/dl en el placebo (3,2%) que no es relevante, pues también se produce a expensas de un aumento en la fracción de LDLc en 9,6 ($\pm 22,8$) mg/dl.

El género no interactúa significativamente con la ingesta de Naturcol en ninguno de los índices lipídicos observados, lo que indica que el efecto de la intervención es similar en hombres y mujeres (tabla IV). Sin embargo, se ha observado una interacción significativa del género con el grupo placebo en los valores de CT y LDLc (tabla IV). En este grupo se ha producido un aumento del CT y LDLc en los hombres, mientras que dichos valores se han mantenido estables en el grupo de mujeres.

Relación de los valores basales con la eficacia de la ingesta: En la siguiente tabla (Tabla V) se encuentran las correlaciones de Pearson para estudiar la asociación entre los valores basales de CT, LDLc, HDLc y TG con la

	N(%) / M (Sd)
Género (hombre)	8 (42,1)
Edad (años)	34,7 (6,9)
Peso (Kg)	68,7 (11,8)
Talla (m)	1,7 (0,1)
IMC	23,3 (3,2)

Datos descriptivos de la muestra referentes a género, edad y antropometría básica. Expresados en valores absolutos y su porcentaje entre paréntesis o en media y su desviación estándar entre paréntesis. IMC: Índice de masa corporal; Kg: kilogramos; M: Media; N: número de muestra; Sd: desviación estándar.

Tabla II
Comparación de los valores basales y finales en los grupos Naturcol y placebo

	Naturcol		Test (d)	p	Placebo		Test (d)	p
	Basal M(Sd)	Final M(Sd)			Basal M(Sd)	Final M(Sd)		
CT _{mg/dL}	225,6 (22,0)	201,1 (28,8)	-3,48 ^a (1,11)	,003	207,6 (25,6)	215,9 (28,3)	1,63 ^a (0,32)	,121
LDLc _{mg/dL}	141,6 (28,2)	122,1 (26,6)	-2,92 ^a (0,69)		126,0 (24,8)	135,6 (30,0)	1,83 ^a (0,39)	
HDLc _{mg/dL}	63,6 (12,0)	61,4 (14,9)	-1,16 ^a (0,18)	,261	61,7 (13,8)	63,7 (13,2)	2,11 ^a (0,14)	,049
TG _{mg/dL}	102,2 (54,2)	87,8 (44,8)	-1,59 ^b (0,27)	,112	95,5 (44,8)	81,2 (35,5)	-207 ^b (0,32)	,038

Marcadores del estudio basales y finales en los grupos Naturcol y placebo, expresados como media y desviación estándar, con la significación (p) en cada caso. d: tamaño del efecto de Cohen. ^aPrueba t de Student; ^bPrueba de rangos con signo de Wilcoxon. CT: colesterol total; dL: Decilitro; HDLc: *HDL colesterol*, LDLc: *LDL colesterol*, M: media; mg: miligramos; p: significación (estadístico); Sd: desviación estándar; TG: triglicéridos.

Tabla III
Comparación de la eficacia de la intervención (Δ : basal-final)

	Naturcol	Placebo	Test (d)	p
	M(Sd)	M(Sd)		
Δ CT _{mg/dL}	24,5 (30,7)	-8,3(22,3)	3,73 ^a (1,07)	,002
Δ LDLc _{mg/dL}	19,5 (29,1)	-9,6(22,8)	3,42 ^a (1,00)	,003
Δ HDLc _{mg/dL}	2,2(8,1)	2,0(4,1)	194 ^b (0,52)	,052
Δ TG _{mg/dL}	14,4 (44,2)	1413(26/8)	0,00 ^b (0,00)	1,000

Comparación de la eficacia de la intervención, medido a través de la diferencia entre el basal y el final (Δ : basal-final), expresados como media y desviación estándar, con la significación (p) en cada caso. d: tamaño del efecto de Cohen. ^aPrueba t(18) de Student; ^bPrueba de rangos con signo de Wilcoxon. Δ CT: diferencia colesterol total; Δ HDLc: diferencia *HDL colesterol*, Δ LDLc: diferencia *LDL colesterol*, Δ TG: diferencia triglicéridos; dL: Decilitro; M: media; mg: miligramos; p: significación (estadístico); Sd: desviación estándar.

Tabla IV
Interacción del género con la intervención.

	Hombre (n = 8)		Mujer (n = 11)		F(1,17)	p
	Basal M (Sd)	Final M (Sd)	Basal M (Sd)	Final M (Sd)		
Naturcol						
CT _{mg/dL}	237,4 (7,1)	211,4 (10,0)	217,0 (6,0)	193,6 (8,5)	0,03	,859
LDLc _{mg/dL}	157,9 (8,8)	136,1 (8,6)	129,7 (7,5)	111,9 (7,3)	0,08	,778
HDLc _{mg/dL}	54,8 (3,4)	53,3 (4,7)	70,0 (2,9)	67P4(4,0)	0,09	,773
TG	123,8 (18,5)	109,8 (14,7)	86,5 (15,8)	71,8 (12,6)	0,00	,976
Placebo						
CT _{mg/dL}	214,1 (9,1)	236,0 (8,1)	202,9 (7,7)	201,4 (6,9)	6,77	,019
LDLc _{mg/dL}	135,6 (8,5)	161,0 (7,4)	119,1 (7,3)	117P2(6,3)	9,90	,006
HDLc _{mg/dL}	54,4 (4,4)	57,1 (4,3)	67,0 (3,8)	68,5 (3,7)	0,44	,516
TG	111,8 (15,5)	89,6 (12,6)	83,6 (13,2)	75,1 (10,8)	1,20	,289

Interacción de cada marcador estudiado durante la intervención según género, expresados como media y desviación estándar, con la significación (p) en cada caso. CT: colesterol total; dL: Decilitro; HDLc: *HDL colesterol*, LDLc: *LDL colesterol*, M: media; mg: miligramos; p: significación (estadístico); Sd: desviación estándar; TG: triglicéridos.

disminución de dichos valores en el post test debida a la ingesta. Se observa que los valores basales de CT, LDLc y TG se encuentran directamente relacionados con la disminución de estos valores tras la ingesta, lo que indica una mayor eficacia de la intervención para los pacientes con valores basales más elevados. Sin embargo, no se ha podido observar dicha relación para HDLc, cuyos valores basales son independientes de la eficacia de la ingesta.

Discusión

Revisada la literatura científica de los últimos años observamos que hay importantes estudios valorando la evidencia sobre el beneficio del consumo de esteroides vegetales sobre los marcadores del riesgo cardiovascular, como ya concluía un metaanálisis de más de 40 ensayos clínicos²⁹.

Rocha M et Al, 2011, han estudiado ampliamente el tema. En su revisión expone como la mayoría de los estudios consiguen una reducción de entre un 8-14 % de reducción de LDLc, siendo las mejores dosis entre 2 y 2,5g, sin encontrar mayor beneficio superando esta dosis, siendo necesario al menos una dosis de 0,8-1 g/día, para que se obtenga una mínima y leve reducción de LDLc³¹. Por ello, FDA y EFSA, recomiendan no superar dosis de 3g/día, ya que no presenta ninguna ventaja. Tan solo se recomienda el control de la ingesta de esteroides vegetales a personas que padecen sitosterolemia, una enfermedad rara cuyos individuos acumulan grandes dosis de fitosterol en sangre y tejidos³².

En su revisión *Rocha et Al, 2011* ponen de manifiesto que parte de la variabilidad de los resultados se debe entre otros motivos al uso de distintos esteroides, a los distintos tiempos de ingesta, distintos niveles basales de colesterol, a la existencia o no de control de dieta complementaria y cambios de hábitos durante el ensayo, a la matriz usada, el momento de ingesta y a la dosis de administrada. Esta variabilidad va desde 5 al 25 % de descenso de LDLc²⁹.

Tabla V
Correlación entre los valores basales y la eficacia de la intervención (diferencia entre los marcadores)

	CT_dif	LDL1_dif	HDLc1_dif	TG_dif
CT1	0,483	0,487	0,035	0,063
p	0,002	0,002	0,834	0,708
LDLc1		0,492	0,098	-0,184
p		0,002	0,559	0,268
HDLc1			0,082	0,074
p			0,625	0,658
TG1				0,597
p				0,000

Correlación entre los valores basales y la eficacia de la intervención, para cada marcador y representado sobre la diferencia entre basal y final.

Por lo que se refiere a la matriz alimentaria vehiculante de los esteroides vegetales ésta ha ido variando para comprobar su eficacia, siendo algunas de las más usadas las margarinas, el yogur, la leche, los cereales y sus derivados, salsas, mahonesa, chocolate, aceite, zumo de naranja, magdalenas, zumos vegetales, quesos y hasta snacks³⁰.

Clifton PM, 2004, que analizó las diferencias en el uso de los esteroides en distintas matrices, concluyen que la matriz del alimento donde se incluyen pueden ser determinantes en los resultados. En las matrices en las que mejor efecto en la reducción del LDLc se obtiene, es por orden: la leche, el yogur, el pan y los cereales.

Un estudio³⁴ de diseño similar al nuestro, con 19 sujetos y 2 periodos de administración de esteroides, uno de 15 días y otro de 30 días, obtuvo una disminución parecida, en ambos periodos, de los niveles de LDLc iniciales y finales, obteniéndose unas reducciones de un 9,61 % y un 6,69 % respectivamente. Estos resultados son similares al nuestro.

En otro estudio³⁵, tras un periodo inicial de 3 meses con una dieta estándar saludable, los sujetos fueron divididos en dos grupos de intervención: un grupo de dieta y un grupo con suplemento de esteroides (2 g/día), encontrándose en dicho estudio que en el grupo con suplementos de esteroides se evidenció una disminución significativa en el Ct (6,4%), y LDLc (9,9%).

En cuanto al número de tomas de la dosis diaria de esteroides vegetales, inicialmente la mayoría de ellos dividían la dosis en 3 tomas. Actualmente los productos funcionales incluyen una dosis única de 2 g/día, por lo que parte de los ensayos más recientes arrojan eficacia en este formato. Otros trabajos³⁶, han basado el objetivo del mismo en comparar la eficacia dependiente de la dosis, concluyendo que una dosis única era igual de eficaz que 3 a lo largo del día.

Al igual que otros autores^{37,38}, hemos analizado si la eficacia de los esteroides es dependiente de los niveles basales de los sujetos, encontrando mayor descenso de LDLc cuanto mayor es el nivel basal al inicio del tratamiento.

Conclusión

En base a los resultados, se puede afirmar que una dosis diaria de 2,24 g de esteroides vegetales suministrados en leche, pueden representar una estrategia terapéutica, no farmacológica, de control y manejo de la hipercolesterolemia y, una herramienta para la reducción del riesgo cardiovascular.

Agradecimientos

A CAPSA por su colaboración. A la Unidad de Análisis Clínicos del HUCSCM. Al Departamento de Medicina, UCM.

Bibliografía

1. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Gar-side DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA*. 2003 Aug 20;290(7):891-7.
2. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamel-le N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999 Feb 16;99(6):779-85.
3. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte. Año 2011. (Disponible en: <http://www.ine.es/prensa/np767.pdf>)
4. Collins TC, Jones PH. Statin therapy: is the percent reduction or the attained low-density lipoprotein cholesterol level more important? *Curr Atheroscler Rep*. 2007 Jan;9(1):10-7.
5. Civeira F; International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2004 Mar;173(1):55-68.
6. Genest J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J Inherit Metab Dis*. 2003;26(2-3):267-87.
7. Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) 2002 (Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/>)
8. ENRICA: Guallar-Castillón P, Gil-Montero M, León-Muñoz LM, Graciani A, Bayán-Bravo A, Taboada JM, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Magnitude and management of hypercholesterolemia in the adult population of Spain, 2008-2010: The ENRICA Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012 Jun;65(6):551-8.
9. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*. 1993 Oct;34(10):1637-59.
10. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res*. 1999 Feb;40(2):302-8
11. Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2000 Aug;151(2):357-79.
12. Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res*. 2002 Mar;43(3):486-94.
13. Ye SQ, Kwiterovich PO Jr. Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol. *Am J Clin Nutr*. 2000 Nov;72(5 Suppl):1275S-1284S.
14. Yu-Poth S, Zhao G, Etherton T, Naglak M, Jonnalagadda S, Kris-Etherton PM. Effects of the National Cholesterol Education Program's Step I and Step II dietary intervention programs on cardiovascular disease risk factors: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 1999 Apr;69(4):632-46.
15. Ostlund RE Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:533-49
16. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res*. 2002 Nov;41(6):457-500
17. Malinowski J, Gehret M. Phytosterols for dyslipidemia. *Am J Health Syst Pharm* July 15, 2010;67:1165-1173
18. Miettinen TA. Cholesterol absorption inhibition: a strategy for cholesterol-lowering therapy. *Int J Clin Pract*. 2001; 55:710-6.
19. Ntanos, FY, Duchateau, GS. A healthy diet rich in carotenoids is effective in maintaining normal blood carotenoid levels during the daily use of plant sterolenriched spreads. *Int J Vitam Nutr Res* 2002; 72: 32-39.
20. Codex Alimentarius 1991. Second Edition. Codex General Guidelines on Claims. (CAC/GL 1-1979, rev 1-1991). Geneva. WHO.
21. Scientific-Committee-on-Food. Opinion on applications for approval of a variety of plant sterol-enriched foods. Opinion adopted by the Scientific Committee on Food on 5 March, 2003. H http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out174_en.pdf. 2003a.
22. Scientific Committee on Food. Opinion on an application from ADM for approval of plant sterol-enriched foods. Opinion adopted by the Scientific Committee on Food on 4 April, 2003. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out192_en.pdf. 2003b.
23. Scientific Committee on Food. Opinion on an application from MultiBene for approval of plant sterol-enriched foods. Opinion adopted by the Scientific Committee on Food on 4 April, 2003. available online at: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out191_en.pdf. 2003c.
24. Weststrate, JA, Ayeshe, R, Bauer-Plank, C, Drewitt, PN. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 1063-1071.
25. Turnbull, D, Whittaker, MH, Frankos, VH, Jonker, D. 13-week oral toxicity study with stanol esters in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 29(2 Pt 1): 216-226.
26. Sugiyuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, Miyauchi K. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem*. 1995 May;41(5):717-23.
27. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem*. 1973 May;19(5):476-82.
28. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974 Apr;20(4):470-5
29. Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R; Stresa Workshop Participants. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc*. 2003 Aug;78(8):965-78
30. Rocha M, Banuls C, Bellod L, Jover A, Victor VM, Hernandez-Mijares A. A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Curr Pharm Des*. 2011 Dec 1;17(36):4061-75.
31. Sudhop T, Gottwald BM and von Bergmann K. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism*. 2002; 51:1519-21.
32. Berge KE. Sitosterolemia: a gateway to new knowledge about cholesterol metabolism. *Ann Med*. 2003;35(7):502-11.
33. Clifton PM, Noakes M, Sullivan D, Erichsen N, Ross D, Anni-son G, Fassoulakis A, Cehun M, Nestel P. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *Eur J Clin Nutr*. 2004 Mar;58(3):503-9.
34. Gonçalves S, Maria AV, Silva AS, Martins-Silva J, Saldanha C. Phytosterols in milk as a depressor of plasma cholesterol levels: experimental evidence with hypercholesterolemic Portuguese subjects. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;35(1-2):251-5.
35. Bañuls C, Martínez-Triguero ML, López-Ruiz A, Morillas C, Lacomba R, Víctor VM, Rocha M, Hernández-Mijares A. Evaluation of cardiovascular risk and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic subjects on a standard healthy diet including low-fat milk enriched with plant sterols. *J Nutr Biochem*. 2010 Sep;21(9):881-6.
36. Plat J, van Onselen RN, van Heugten M, et al. Effects on serum lipids, lipoproteins, and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr*. 2000; 54:671-7.
37. Abumweis SS, Barake R, Jones PJ. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res*. 2008;52.
38. Naumann E, Plat J, Kester AD, Mensink RP. The baseline serum lipoprotein profile is related to plant stanol induced changes in serum lipoprotein cholesterol and triacylglycerol concentrations. *J Am Coll Nutr*. 2008 Feb;27(1):117-26.

PUBLICACIÓN 2

"ROLE OF APOA1 ON HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN: AN INTERVENTION WITH PLANT STEROLS IN PATIENTS WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA"

- **Authors:** Ismael San Mauro Martín, Luis Collado Yurrita, María Ángeles Cuadrado Cenzual, María José Ciudad Cabañas, Paula Mendive Dubourdieu.

- **Authors and affiliation:** San Mauro-Martín I^{1,3*}, Collado-Yurrita L¹, Cuadrado-Cenzual MA², Ciudad-Cabañas MJ¹, Mendive-Dubourdieu MP³.

¹Medicine Department, Complutense's University of Madrid

²Clinical Analysis Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid.

³Research Centers in Nutrition and Health (CINUSA Group)

Año: 2015

Revista: Nutrición Hospitalaria.



Original/Otros

Role of ApoA1 on High-Density Lipoprotein: an intervention with plant sterols in patients with hypercholesterolemia

Ismael San Mauro Martín^{1,3}, Luis Collado Yurrita¹, María Ángeles Cuadrado Cenzual²,
María José Ciudad Cabañas¹ and Paula Mendive Dubourdieu³.

¹Medicine Department, Complutense's University of Madrid. ²Clinical Analysis Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid. ³Research Centers in Nutrition and Health (CINUSA Group). Spain.

Abstract

Background: Numerous studies have shown an inverse association between cholesterol's concentration associated with High-Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C) and cardiovascular risk. The present study intends to investigate the possible relation between Apolipoprotein A (ApoA1) and HDL-C as a new strategy to reduce cardiovascular risk.

Aim: was to determine the effect of ApoA1 in cholesterol's metabolism through its influence on HDL-C in young adult population.

Methods: One clinical trial, controlled, randomized, double-blind, providing a commercial milk, "Naturcol", with sterols for 3 weeks (n = 19) and placebo (n = 16). A questionnaire *Ad Hoc* was designed and a complete anthropometric study was made. SPSS 21.0 was used to analyse the data.

Results: Significant differences were observed between sterol milk and placebo in a single marker, Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C). A linear dispersion of data between HDL-C and ApoA1 was found, both at the beginning and end of the intervention (Person Correlation = 0.846 and 0.903, respectively). High dependency measures by linear regression ($R^2 = 0.715$ and 0.816 , respectively) were observed.

Conclusion: A significant relation between HDL-C and ApoA1 was proven. Taking into account the importance that HDL-C levels seem to have on cardiovascular health, ApoA1 is presented as an important clinical marker to improve heart function as well as to reduce cardiovascular risk.

(*Nutr Hosp.* 2015;31:494-499)

DOI:10.3305/nh.2015.31.1.8147

Key words: ApoA1. Cholesterol. Cardiovascular risk. Plant sterols. High-density lipoproteins (HDL-C).

PAPEL DE APOA1 EN LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD: UNA INTERVENCIÓN CON ESTEROLES VEGETALES EN PACIENTES CON HIPERCOLESTEROLEMIA

Resumen

Antecedentes: Numerosos estudios han demostrado una asociación inversa entre la concentración de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad de colesterol (HDL-c) y el riesgo cardiovascular. El presente estudio investigó la posible relación entre la apolipoproteína A (ApoA1) y el HDL-C como una nueva estrategia para reducir el riesgo cardiovascular.

Objetivo: determinar el efecto de ApoA1 en el metabolismo del colesterol a través de su influencia sobre el HDL-c en la población adulta joven.

Métodos: ensayo clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego, proporcionando una leche comercial con esteroles, "Naturcol", durante 3 semanas (n = 19) y placebo (n = 16). Se diseñó un cuestionario *Ad Hoc* y se realizó un estudio antropométrico completo. Se utilizó el programa SPSS 21.0 para analizar los datos estadísticos.

Resultados: Se observaron diferencias significativas entre la leche de esteroles y el placebo únicamente en un solo marcador, en las lipoproteínas de baja densidad de colesterol (LDL-c). Se encontró una dispersión lineal de datos entre HDL-C y ApoA1, tanto al principio y al final de la intervención (correlación de Person = 0,846 y 0,903, respectivamente). Se observó alta dependencia en la regresión lineal ($R^2 = 0,715$ y $0,816$, respectivamente).

Conclusión: Una relación significativa entre el HDL-c y ApoA1 fue comprobada. Teniendo en cuenta la importancia que los niveles de HDL-c parecen tener en la salud cardiovascular, la ApoA1 se presenta como un importante marcador clínico para mejorar la función del corazón, así como para reducir el riesgo cardiovascular.

(*Nutr Hosp.* 2015;31:494-499)

DOI:10.3305/nh.2015.31.1.8147

Palabras claves: ApoA1. Colesterol. Riesgo cardiovascular. Esteroles vegetales. Lipoproteínas de alta densidad (HDL-c).

Correspondence: Ismael San Mauro Martín.
Medicine's Department (Complutense University of Madrid).
Plaza de Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid (Spain).
E-mail: research@grupocinusa.com

Recibido: 30-IX-2014.

Aceptado: 3-XI-2014.

Abbreviations

ApoA: Apolipoprotein A.
ApoA1: Apolipoprotein A-1.
ApoB: Apolipoprotein B.
BIA: Bioelectrical Impedance Analysis.
TC: Total Cholesterol.
DL: Decilitre.
CVD: Cardiovascular Disease.
G: Grams.
HC: Hypercholesterolemia.
HDL-C: High-Density Lipoprotein Cholesterol.
HUCSCM: *Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid*.
BMI: Body Mass Index.
LCAT: Lecithin-Cholesterol Acyltransferase.
LDL-C: Low-Density Lipoprotein Cholesterol.
CRP: C-Reactive Protein.
TAG: Triacylglycerol(s).
ACS: Acute Coronary Syndrome.
SNP: Single-Nucleotide-Polymorphism.

Introduction

Cardiovascular Disease (CVD) of atherothrombotic aetiology is the first cause of death in the occidental World¹. Although Spain has a lower CVD incidence than northern European countries, we should consider that hospitalization as a consequence of Acute Coronary Syndrome (ACS) increases annually in 1.5%, approaching the European figures².

There are several risk factors associated with the development of CVD, among which Hypercholesterolemia (HC) is one of the most relevant; not only because of its high prevalence but also because of its deficient control in general population, which have already been diagnosed with the disease. The increase of Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C) seric concentrations has been reported as the main risk factor in a CVD. Some studies suggest that for the reduction of 1% of the concentration of total cholesterol, a reduction of 2% on cardiovascular risk could be obtained³.

However, it should be remained that, among HC, several phenotypes are found, affected by different mechanisms in the regulation, manipulation and relevancy of cardiovascular risk^{4,5,6}. The relation between cardiovascular events and high concentrations of cholesterol, associated to LDL-C is clearly established after numerous clinical tests and reviews based on the evidence of their results. In addition, an increasing number of studies have proven an inverse relation between cholesterol's concentration associated to High-Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C) and cardiovascular risk. Thus, it is justified to focus on HDL-C as a new additional strategy to reduce cardiovascular risk, as well as on the interest of the mechanisms implied⁷.

Therefore, the decision of intervention on the lipid metabolism to prevent CVD is based on the analytic levels of plasmatic cholesterol and its fractions, though some workgroups recommend changing the focus towards apolipoproteins⁸.

Apolipoproteins are the parts of lipoproteins that contain proteins and are generally combined with lipids. Apolipoprotein A-1 (ApoA1) is associated with HDL-C while Apolipoprotein B (ApoB) is associated with LDL-C, having opposite functions⁹.

Apolipoprotein A (ApoA) is formed by other subclasses, ApoA1, ApoA2, and others, which synthetize in the liver and intestine. They are transferred actively towards and from HDL-C, VLDL-C and chylomicrons. Their main function is to activate Lecithin-Cholesterol Acyltransferase (LCAT), which esterificates free cholesterol on HDL and, peripherally, transfers it from the interior of the cell to its membrane, therefore activating ApoA1 receptors with the intervention of cholesterol's transporters ABCA1¹⁰. Some authors even suggest the determination of useful ApoA1 on patients' diagnosis with a genetic defect of low production of HDL-C, though the benefits of associating low concentrations of ApoA1 to cardiac risk, instead of measuring HDL-C, are not still clear. There are prospective studies on the predicative value of ApoA1 which have not shown higher advantages on HDL-C, as well as not having standardized determination methods yet¹¹.

The present study intends to prove the possible relation between ApoA1 and HDL-C in a double-blind study, based in an intervention with vegetal sterols, analysing, at the beginning and end of this study, the variations of fractions of blood cholesterol in relation to ApoA1.

Objective

The aim of the study was establish the effect of ApoA1 in cholesterol's metabolism through its influence on HDL-C in a young adult population.

Materials and methods

Double-blind, controlled, randomized, clinical test with participants recruited from *Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid (HUCSCM)*, after the approval of the Bioethic's Committee of this hospital (code: C.I. 12/233). Previous to the beginning of the test, the participants were given instructions about the aim of the study and signed an informed consent form. Sterols were mixed in commercial milk "Naturacol" (supplied by *Corporación Alimentaria Peñasanta S.A.*), available in the market during the period of this study. During three weeks, the participants received either the treatment or the placebo, ingesting 2 glasses of milk every day. The glasses were standardised to a

volumetric capacity of 350 ml, administering in each of them a daily capacity of 2.24 g of vegetal sterols for patients receiving the treatment (included in the "milk study" phase). The same quantity of non-sterol, skimmed milk was given to patients receiving the placebo. The milk was blinded, bottled in white, without the knowledge of both participants and investigators, only differing on the colour of the cap. The assignment of the groups was arbitrary, using randomization-by-number charts.

Inclusion and exclusion criteria

- *Inclusion criteria:* Men and women; aged 18-50, Total Cholesterol (TC) > 200 mg/dl.
- *Exclusion criteria:* TC < 200 mg/dl; cardiac pathology (ictus, myocardial infarction, angina pectoris, etc.); lactose intolerance; allergy to cow milk's proteins; allergy to vegetal sterols; pharmacologic treatment to cholesterol or triacylglycerol/triglycerides (TAG) (fibrates, statins, etc.); obesity - Body Mass Index (BMI) > 30.

Clinical analysis

Sample extractions for analytical tests were conducted by healthcare personnel in *Unidad de Análisis Clínicos del HUCSCM*, following the standardized methodology. The test were done after the participants had fasted for 12 hours^{12,13,14}.

Study factors and variables

For this project an *Ad Hoc* questionnaire was designed. All surveys, as well as the anthropometric study, were made by a single investigator. The variables of study were established to reach the outlined targets: gender, age, clinical and pharmacological history, quality of sleep, health habits, toxic habits (such as tobacco and alcohol), intestinal habits, food consumption frequency and physical activity. In addition, it was measured the weight, height, waist perimeter, BMI, grease percentage, visceral grease percentage, grease-free mass (kg) and water percentage in each participant. Weight, BMI and corporal composition were established with a tetra-polar, mono-frequency (50 kHz), Bioelectrical Impedance Analysis (BIA): TANITA BP-601 Model. For the composition's measurement with BIA, the usual standard protocol was used. Analytic markers were: ApoA1, Lipoprotein A, lipid profile (TC, HDL-C, LDL-C and TAG), haematology (white and red series' count), glucose, insulin and C-Reactive Protein (CRP).

Besides this, confounding factors were also considered, using an affinity chart for the ingestion's compliance (>95 %), a own elaboration score to mo-

nitor food's ingestion that could influence, upwards or downwards, cholesterol's metabolism and controlling the non-modification of initial habits during the test.

Statistical Analysis

For data analysis, *IBM's SPSS 21.0* statistic's programme was used. Firstly, a descriptive analysis of socio-demographic, anthropometric and of initial and final lipid levels under the ingestion of "Naturcol" and the placebo was undertaken. Normality of lipid levels was also measured using *Shapiro-Wilk Test*. To measure the efficiency of the ingestion of "Naturcol" and the placebo, the difference of lipid levels before and after the ingestion was calculated, also employing *Student's T-Test* for related samples or *Wilcoxon Signed-Rank Test*, according to the compliance of the "assumption of normality" of the independent variables. The size of the effect was calculated as the quotient of the average's difference with the initial standard deviation for "Naturcol". In order to study if the effect of the ingestion of "Naturcol" or the placebo interacts with the gender, F-Test for ANOVA's interaction of a design of partially repeated measures with the gender factor was used. The level of statistical's significance applied was 5%. As for studying the relation between ApoA1 and HDL-C, as well as with other markers, *Pearson Product-Moment Correlation Coefficient* was applied and, afterwards, a linear regression was used to discover the degree of dependence between both parameters.

This study followed the ethical principles recognised by the Declaration of Helsinki, the recommendations of good clinical practice, the actual Spanish legislation which regulates clinical investigation on humans, personal and bioethics data protection (Spanish Law: *Decreto Real 561/1993 sobre ensayos clínicos y 14/2007, 3 Julio para la investigación biomédica*).

Results

The test started with 43 participants. Four of them were excluded due to non-compliance of the treatment or the used methodology; and other 4 participants did not complete the research, therefore their results were not included the final report. 35 participants finished this study - 19 women and 16 men (age 36,3 (±6,9)). 19 of them were in the study group with sterols and 16 of them in the control-group, which received the placebo. The normality of the variables was proved and significant differences due to age, weight, height and anthropometry were not found. The descriptive characteristics of the participants are shown in table I.

After finalizing the treatment, significant differences were observed between the values of milk with sterol and placebo milk, in only one single marker: LDL-C (Table II).

Table I

Descriptive data of the sample in reference to gender, age and basic anthropometry. Expressed in absolute values and its percentage, in brackets, or in average values and its standard deviation, in brackets

	N (%) / M (Sd)
Gender (Male)	16 (45,7)
Age (Years)	36,3 (6,9)
Weight (Kg)	69,4 (11,9)
Height (m)	1,7 (0,9)
BMI	23,9 (3,4)

Table II

Comparison of the intervention's efficiency, measured through the difference between initial and final values (Δ : initial-final), expressed as average and standard deviation, with its significance (p) in each case

	Naturcol M (Sd)	Placebo M (Sd)	P
Δ LDLc _{mg/dL}	15,9 (29,54)	-11,1 (19,2)	0,004
Δ HDLc _{mg/dL}	2,3 (8,1)	-1,0 (3,0)	0,14
Δ ApoA I _{mg/dL}	5,5 (12,6)	-1,9 (15,8)	0,13
Δ Lipoprotein A _{mg/dL}	-3,9 (8,7)	-1,1 (4,5)	0,24

A linear data dispersion was found between HDL-C and ApoA1, both among the initial and final values of the intervention (Pearson Correlation: 0,846 and 0,903, respectively), obtaining a high dependence; values of linear regression ($R^2 = 0,715$ and 0,81, respectively).

This dependence could not be proven or it was too low, between LDL-C and ApoA1 (R^2 de 0,131), and the initial-final values of HDL-C and ApoA1 (R^2 de 0,27).

Discussion

On one hand, several studies have shown that there is an inverse relation between HDL-C and ECV levels. It is estimated that, for an increase of 1 mg/dl of HDL-C, the risk of myocardial infarction or even death could be reduced in approximately 3%¹⁵, which would positively influence cardiovascular health. This result is of a great relevance to consider against LDL-C where, as we stated previously, a decrease of 1% would mean a reduction of 2% on cardiovascular risk³.

This way, as it has already been suggested in literature, a good therapeutic target would be to maintain, upwards HDL-C levels. Regarding this, ApoA1 seems to cause a special relevance and interest in the scientific community. Our data shows a high dependence of HDL-C, that is not modified after the intervention ($p=0,13$) as there is not a significant modification of HDL-C ($p=0,14$). Similar data was observed by *Collins M, et al. 2007*¹⁶, in an intervention with 84 participants, divided in 4 groups (exercise and sterols, sterols, exercise and control), without acknowledging any changes after the intervention, neither in ApoA1, Apolipoprotein B (ApoB), ghrelin and the growth hormone. Nevertheless, a correlation between ApoA1 and HDL-C was observed ($r=0,33$, $p=0,01$). In another study, *Sialvera Tf, et al 2007*, administering up to 4 g of sterol to a sample of 108 participants (double-blind), reached a decrease of LDL-C higher than 20%. No differences were seen on HDL-C and ApoA1 levels¹⁷.

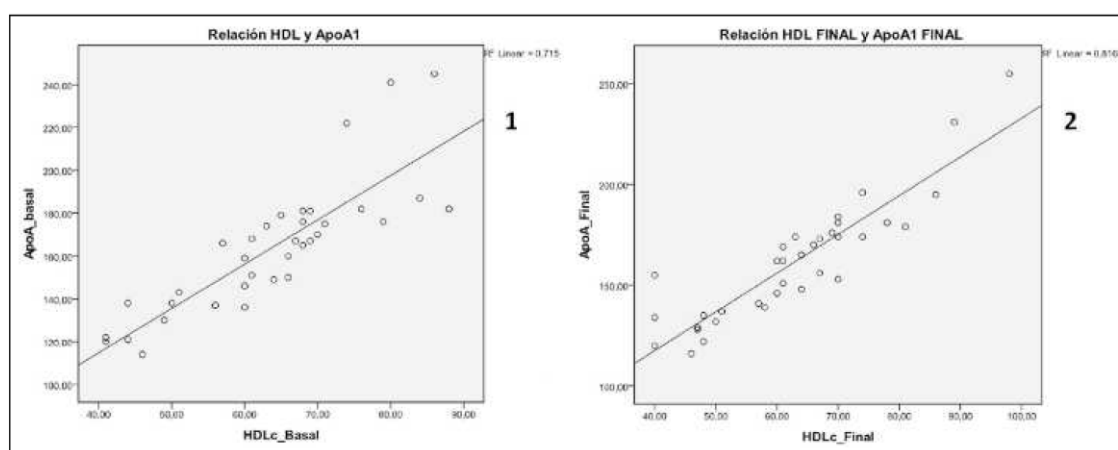


Fig. 1.— Pearson Correlation between initial HDL-C and initial ApoA1 (Figure 1.1); and between final HDL-C and final ApoA1 (Figure 1.2).

Other authors¹⁸, following the hypothetical influence of HDL-C and ApoA as indicators to estimate the individual risk of CD, undertook a test with 15 obese participants that undertook physical exercise. A significant reduction on TAG, ApoA1 and ApoB levels was achieved, though not in LDL-C or HDL-C levels, which they justify stating that only a part of HDL-C particles participate in the reverse transportation of cholesterol. And though the majority believes that an adequate increase of physical activity produces an increase on HDL-C concentrations (and probably also on ApoA1 levels)¹⁹, more thorough studies have not found positive and consistent results based, for example, on physical exercise, like Kelly et al, 2011²⁰ meta-analysis, which concludes with the improvement of TC, LDL-C and TAG levels, but not with an increase of HDL-C levels, neither with significant differences in this marker.

On another hand, besides the values recollected and measured in blood, there is still a lack of data relating apolipoproteins (ApoB, ApoA1) and LDL-C and HDL-C, with the charge of the atherosclerotic plaque and the presence of a nucleus rich in lipids, as a high-risk plaque marker²¹.

It is increasingly evident that a functional HDL-C is a more desirable target that the simple increase of the levels of HDL-C cholesterol, due to its well-known anti-atherogenic function in its capacity to promote the transportation of inverse cholesterol from peripheral cells²². At this point, the functionality of ApoA1 could play a relevant role, being an important motor of therapeutic target to improve cardiac function and decrease, therefore, cardiovascular risk.

This scientific interest is motivating the research of new molecules and medicines capable of changing lipids and lipoproteins' fractions as, for example, fenofibrate²³, nevirapine²⁴, niacin^{25,26}, statin or hormonal therapy²⁷, with different results.

These discrepancies, besides the different methodological circumstances in studies and populations with important basic differences, could be due to, partially, the possible variability and functionality that host different genetic mutations (SNPs, Single-Nucleotide-Polymorphism). Gomez P, et al 2010²⁸, published that different polymorphisms in ApoA1 and ApoA4, meant a different response on LDL-C after an intervention with different diets, relating some disease's phenotypes with the genotype of the patient.

Conclusion

We have proven an important relation between HDL-C and ApoA1. Considering the relevance that HDL-C levels have on cardiovascular health, ApoA1 appears as a clinical marker of interest, related to its correct functionality and concentration. More studies should be undertaken in order to delve into this line of investigation, contributing with more clear evidences.

Acknowledgements

To *Corporación Alimentaria Peñasanta S.A.* for their collaboration in this study. To *Unidad de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid*, and to *Departamento de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid*.

Conflict of interest

There weren't any conflict of interest with none of authors.

References

- Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M (2013) Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *Eur Heart J*. 34 (39):3028-34.
- Instituto Nacional de Estadística (accessed may 2014). Defunciones según la Causa de Muerte. <http://www.ine.es/prensa/np767.pdf>.
- Collins TC, Jones PH (2007) Statin therapy: is the percent reduction or the attained low-density lipoprotein cholesterol level more important? *Curr Atheroscler Rep* 9 (1):10-7.
- Civeira F (2004) International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 173(1):55-68.
- Genest J (2003) Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J Inherit Metab Dis* 26(2-3):267-87.
- National Heart, Lung, and Blood Institute (accessed may 2014). Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol>.
- Badimón J, Santos-Gallego C, Badimón L (2010) Importancia del colesterol HDL en la aterotrombosis. ¿De dónde venimos? ¿Hacia dónde vamos? *Rev Esp Cardiol* 63(2):20-35
- McQueen MJ, Hawken S, Wang X, Ounpuu S, Sniderman A, Probstfield J et al for the INTERHEART study investigators (2008) Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. *Lancet* 372: 224-233.
- RADIM diagnostics (accessed june 2014). <http://www.radim.com/UserFiles/File/Metodiche/spagnolo/NPP14.pdf>.
- Pontificia Universidad Católica de Chile (accessed june 2014). <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/integradotercero/apfisiopsist/nutricion/NutricionPDF/Metabolismo.pdf>.
- Infobioquímica. (accessed may 2014). Interpretación de la Información Bioquímica. <http://www.infobioquimica.com/wrapper/CDInterpretacion/te/bc/088.htm>.
- Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, Miyauchi K (1995) Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem* 41(5):717-23.
- Bucolo G, David H (1973) Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19 (5):476-82.
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20(4):470-5.
- Berrogui H, Momo C, Khalil A (2012) Healthy benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases. *J Lipid Res* (6): 524-533.
- Collins M, Varady KA, Jones PJ (2007) Modulation of apolipoprotein A1 and B, adiponectin, ghrelin, and growth hormone concentrations by plant sterols and exercise in previously sedentary humans. *Can J Physiol Pharmacol* 85(9): 903-10.

17. Sialvera TE, Pounis GD, Koutelidakis AE, Richter DJ, Yfanti G, Kapsokefalou M et al. (2012) Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22 (10): 843-8.
18. Králová I, Suchánek P, Kovář J, Poledne R (2009). Life Style Change and Reverse Cholesterol Transport in Obese Women *Physiol* 58 (Suppl 1): S33-38.
19. Olson EJ1, Pearce GL, Jones NP, Sprecher DL (2012) Lipid effects of peroxisome proliferator-activated receptor- δ agonist GW501516 in subjects with low high-density lipoprotein cholesterol: characteristics of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32 (9): 2289-94.
20. Kelley GA, Kelley KS, Roberts S, Haskell W 2011. Efficacy of aerobic exercise and prudent diet for improving selected lipids and lipoproteins in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Medicine* 9: 74.
21. Virani SS, Catellier DJ, Pompeii LA, Nambi V, Hoogeveen RC, Wasserman BA et al. (2011) Relation of Cholesterol and Lipoprotein Parameters with Carotid Artery Plaque Characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRIS Study. *NIH-PA* 219 (2): 596-602.
22. Berroguí H, Momo C, Khalil A (2012) Health benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases. *J Lipid*; 6: 524-533.
23. Taskinen MR, Sullivan DR, Ehnholm C, Whiting M, Zannino D, Simes RJ, Keech AC, Barter PJ. FIELD study investigators (2009) Relationships of HDL cholesterol, ApoA-I, and ApoA-II with homocysteine and creatinine in patients with type 2 diabetes treated with fenofibrate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (6): 950-5.
24. Franssen R, Sankatsing RR, Hassink E, Hutten B, Ackermans MT, Brinkman K et al. (2009) Nevirapine increases high-density lipoprotein cholesterol concentration by stimulation of apolipoprotein A-I production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (9): 1336-41.
25. Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Barrett PH, Buchsbaum A, Nyaku M, Horvath KV et al. (2008) Extended-release niacin alters the metabolism of plasma apolipoprotein (Apo) A-I and ApoB-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (9): 1672-8.
26. Pang J, Chan DC, Hamilton SJ, Tenneti VS, Watts GF, Barrett PH (2014) Effect of niacin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in statin-treated patients with type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34 (2):427-32.
27. Cerda A, Issa MH, Genvigir FD, Rohde CB, Cavalli SA, Bertolami MC et al. (2013) Atorvastatin and hormone therapy influence expression of ABCA1, APOA1 and SCARB1 in mononuclear cells from hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 138:403-9.
28. Gomez P, Perez-Martinez P, Marin C, Camargo A, Yubero-Serrano EM, Garcia-Rios A et al. (2010) APOA1 and APOA4 gene polymorphisms influence the effects of dietary fat on LDL particle size and oxidation in healthy young adults. *J Nutr* 140 (4): 773-8.

PUBLICACIÓN 3

EFFECTO DE ESTEROLES VEGETALES EN LA REDUCCIÓN DEL COLESTEROL PLASMÁTICO:

ENSAYO CLÍNICO, CONTROLADO, ALEATORIZADO, CRUZADO, DOBLE CIEGO.

Effect of plant sterols in reducing plasma cholesterol: crossover double-blind randomized clinical trial.

- **Autores:** Ismael San Mauro-Martín^{1,6}, Luis Collado-Yurrita¹, Javier Andrés Blumenfeld-Olivares², María Ángeles Cuadrado-Cenzual³, María Elisa Calle-Purón⁴, Marta Hernández-Cabria⁵, Elena Garicano-Vilar⁶, Eva Pérez-Arruche², Esperanza Arce-Delgado², María José Ciudad-Cabañas¹.

- **Afiliación:**

¹Departamento de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

²Hospital Universitario El Escorial. Madrid, España.

³Unidad de Análisis clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid. Madrid, España.

⁴Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

⁵Departamento de Nutrición. Corporación Alimentaria Peñasanta S.A. Asturias, España.

⁶Centros de Investigación en Nutrición y Salud S.L. Madrid, España.

Año: 2016 (ACEPTADO) → DOI: 10.3305/nutr+hosp.vi.9920

Revista: Nutrición Hospitalaria.



Trabajo Original

Otros

Efecto de esteroides vegetales en la reducción del colesterol plasmático: ensayo clínico, controlado, aleatorizado, cruzado y doble ciego

Effect of plant sterols in reducing plasma cholesterol: crossover double-blind randomized clinical trial

Ismael San Mauro-Martín^{1,6}, Luis Collado-Yurrita¹, Javier Andrés Blumenfeld-Olivares², María Ángeles Cuadrado-Cenzual³, María Elisa Calle-Purón⁴, Marta Hernández-Cabria⁵, Elena Garicano-Vilar⁶, Eva Pérez-Arruche², Esperanza Arce-Delgado² y María José Ciudad-Cabañas¹

¹Departamento de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. ²Hospital Universitario El Escorial. Madrid. ³Unidad de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid. ⁴Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. ⁵Departamento de Nutrición. Corporación Alimentaria Peñasanta S.A. Asturias. ⁶Centros de Investigación en Nutrición y Salud S.L. Madrid

Resumen

Introducción: la hipercolesterolemia es uno de los principales factores de riesgo en la enfermedad cardiovascular. Los esteroides vegetales se han postulado como agentes reguladores y beneficiosos para el control de esta.

Objetivo: analizar el efecto de los esteroides vegetales añadidos en una leche en la reducción del colesterol plasmático en adultos jóvenes.

Métodos: ensayo clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego y cruzado. Los esteroides (2,24 g diarios) fueron administrados en dos tomas de 350 ml de una leche comercial desnatada, durante dos periodos de 3 semanas, separados por una "fase de lavado" de 2 semanas, en el grupo experimental. Al grupo control se le administró la misma cantidad de leche desnatada, sin esteroides. Tanto al inicio como al final de cada periodo de intervención se extrajeron muestras sanguíneas. Se analizaron la composición corporal, hábitos de salud y los siguientes marcadores sanguíneos: perfil lipídico, hematológico, inflamación, etc.

Resultados: se incluyeron 54 personas en el estudio con una edad media de 38,8 ± 7,3 años. La diferencia porcentual entre los marcadores basales y finales para el colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL, triglicéridos y colesterol no-HDL fueron del 9,73%, 12,5%, 1,9%, 3,15% y 13,2%, respectivamente. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el grupo control, para todos los marcadores analizados excepto para los triglicéridos.

Conclusión: los esteroides vegetales suministrados en un alimento de consumo habitual, como la leche, pueden ser una estrategia terapéutica no farmacológica para el control de la hipercolesterolemia de alto interés sanitario.

Palabras clave:

Colesterol. Riesgo cardiovascular. Esteroides vegetales. Lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Abstract

Introduction: Hypercholesterolemia is one of the most relevant risk factors in cardiovascular disease, and plant sterols have been postulated as beneficial regulator agents for the control of the disease.

Objective: Analyze the effect of added plant sterols in milk in reducing plasma cholesterol in young adults.

Methods: A randomized, clinical controlled trial, double-blind crossover study. Sterols (2.24 g per day) were administered in two doses of 350 ml of commercial skimmed milk, during two phases of three weeks respectively separated by a washout period of 2 weeks, in the experimental group. The same amount of skimmed milk was administered to the control group, but with no sterols. At the beginning and end of each phase blood draws were performed. Anthropometric data and health habits were analyzed and the following blood laboratory markers: lipid profile, hematology, inflammation, etc. were collected.

Results: Fifty four people were included in the study with an average age of 38.8 ± 7.3 years. Differences between baseline and final scores percentage were 9.73 %, 12.5 %, 1.9 %, 3.15 % and 13.2 % for total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides and No HDL-cholesterol, respectively. Statistically significant differences were found between the experimental group and the control group for all biomarkers analyzed except for triglycerides.

Conclusion: Plant sterols supplied in commonly consumed food, such as milk, may be a non- pharmacological therapeutic strategy of hypercholesterolemia with high health interest.

Key words:

Cholesterol. Cardiovascular risk. Plant sterols. Low density lipoproteins (LDL).

Recibido: 16/09/2015
Aceptado: 27/10/2015

San Mauro-Martín I, Collado-Yurrita L, Blumenfeld-Olivares LA, Cuadrado-Cenzual MA, Calle-Purón ME, Hernández-Cabria M, Garicano-Vilar E, Pérez-Arruche E, Arce-Delgado E, Ciudad-Cabañas MJ. Efecto de esteroides vegetales en la reducción del colesterol plasmático: ensayo clínico, controlado, aleatorizado, cruzado y doble ciego. Nutr Hosp 2016;33:000-000

Correspondencia:

Ismael San Mauro Martín. Departamento de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal s/n. 28030 Madrid
e-mail: ismamm@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un concepto genérico que agrupa patologías que afectan al corazón y al sistema vascular (1).

Actualmente las ECV son la principal causa de fallecimiento en el mundo, representando el 30% de todas las muertes (2), también en España (3).

La prevención y el manejo de la placa de ateroma, producido por el aumento de las concentraciones séricas de lipoproteínas de baja densidad de colesterol (LDL-c), se ha referido como uno de los principales factores de riesgo (4), y el uso de esteroides vegetales (EV) se ha postulado como una de las posibles estrategias de prevención (4-6).

Los EV son componentes bioactivos con funciones similares a la del colesterol en mamíferos. Son alcaloides esteroideos que difieren del colesterol en la cadena lateral. Las principales fuentes alimenticias de EV son aceites vegetales, margarinas, pan, cereales, frutas, hortalizas y frutos secos (7). Los más abundantes son el sitosterol y el campesterol, que representan un 80% de la ingesta de EV (8).

Los fitosteroides son conocidos por reducir el nivel de las LDL-c en suero sin modificar el de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-c) o triglicéridos (TG) (9,10). El consumo diario de alimentos enriquecidos con fitosteroides se utiliza ampliamente como una opción terapéutica para reducir el nivel de LDL-c en plasma y, por tanto, el riesgo de la enfermedad aterosclerótica (9).

Los expertos de la European Food Safety Authority (EFSA) confirman que el colesterol en sangre puede reducirse en un promedio de 7 a 10,5% si una persona consume de 1,5 a 2,4 g de EV/día; efecto observado generalmente dentro de las primeras 2-3 semanas. Los estudios a medio y largo plazo, de hasta 85 semanas, muestran que el efecto podría sostenerse durante todo ese período (11).

El efecto reductor de los EV sobre los niveles de colesterolemia se cree que ocurre, al menos en parte, por un mecanismo de competencia entre el colesterol biliar y el de la dieta, en las micelas mixtas (9). Esta competencia reduce la absorción intestinal entre un 20 y un 80% (4).

En las células del intestino, los EV se incorporan a las micelas mixtas. En la membrana del borde en cepillo, los esteroides se liberan de las micelas y se transportan dentro de la célula a través del transportador Niemann-Pick C1-like1. Una vez absorbidos, se metabolizan de diferentes maneras. La mayor parte de los EV sin colesterol internalizado retornan al lumen intestinal a través del ABCG5/ABCG8. Sin embargo, una proporción significativa del colesterol internalizado se somete a esterificación. El colesterol esterificado, junto con cantidades más pequeñas de EV sin colesterol esterificado, se incorporan a los quilomicrones emergentes que entran en el sistema linfático y en la circulación (8). Los alimentos con cantidades adicionales de EV causan una inhibición significativa de la absorción de colesterol, probablemente a través de la interrupción de la etapa de solubilización intraluminal (9,12).

Algunos metaanálisis (13-17) sostienen cómo el consumo de EV en alimentos enriquecidos reduce eficazmente las concentraciones en plasma de LDL-c y colesterol total (CT), manteniendo además los niveles de HDL-c.

OBJETIVO

Analizar el efecto de los esteroides vegetales añadidos en una leche en la reducción del colesterol plasmático en adultos jóvenes.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO

Ensayo clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego y cruzado, realizado en dos hospitales de la Comunidad de Madrid, Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid y el Hospital del Escorial de Madrid. Previo al inicio, fue presentado y aprobado por sus respectivos comités de bioética. Antes del estudio, los participantes recibieron la información sobre la finalidad del mismo y firmaron el consentimiento informado. Se realizaron dos fases de tres semanas cada una, separadas por un periodo de lavado de 2 semanas, pasando cada participante por ambas fases. Al inicio y al final de cada fase se realizaron extracciones de sangre. Durante un periodo de 3 semanas los sujetos ingirieron 2 vasos diarios de leche de 350 ml, administrando en ellos una cantidad de 2,24 g de EV diarios, para aquellos sujetos en el grupo experimental; y la misma cantidad de leche desnatada sin EV, al grupo control. Los EV fueron ingeridos con la leche comercial Naturcol (suministrada por la empresa Corporación Alimentaria Peñasanta S.A.), disponible en el mercado durante todo el estudio. Las leches fueron envasadas en blanco sin conocer ni sujetos ni investigadores el tipo de leche, diferenciadas únicamente por el color del tapón. Se usaron tablas de aleatorización por números para la asignación de grupos.

Los criterios de inclusión fueron: hombre y mujer, edad 18-50 años, CT > 200 mg/dl y/o TG > 150 mg/dl. Los criterios de exclusión: CT < 200 mg/dl, patología cardíaca (ictus, infarto de miocardio, angina de pecho), intolerancia a la lactosa, alergia a la proteína de leche de vaca, alergia a EV, obesidad (índice de masa corporal [IMC] > 30) o tratamiento farmacológico para el control del colesterol o TG: fibratos, estatinas, etc.

TAMAÑO MUESTRAL

El cálculo de los participantes se hizo para una diferencia \pm 15% del CT, teniendo en cuenta una desviación estándar de 35 mg/dl, para un intervalo de confianza del 95% y una potencia del 90%, y una tasa de pérdida del 10%.

ANÁLISIS CLÍNICOS

La extracción de muestras para las pruebas analíticas se llevaron a cabo por personal sanitario, tras 12 horas de ayuno, en la Unidad de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid y del Hospital del Escorial y el Centro de Especialidades San Carlos de San Lorenzo del Escorial, siguiendo el protocolo estándar (18-20).

VARIABLES Y FACTORES DE ESTUDIO

Los cuestionarios y el estudio antropométrico fueron realizados por un único investigador, entrenado, estandarizando previamente unos criterios de uniformidad y metodología a seguir. Las variables de estudio se incluyeron en un cuestionario *ad hoc*: género, edad, historial clínico y farmacológico, calidad de sueño, hábitos de salud, hábitos tóxicos como tabaco y alcohol, hábito intestinal, frecuencia de consumo de alimentos y actividad física. Además se midió el peso, la talla, perímetro de la cintura, IMC, % de grasa, % de grasa visceral, masa libre de grasa (kg) y % de agua. El peso, el IMC y la composición corporal se determinaron a través de una bioimpedancia eléctrica, tetrapolar, multifrecuencia (20 y 100 kHz), InBody Modelo 230. Para la medición se siguió el protocolo habitual estándar y las recomendaciones del fabricante. Para el perímetro de cintura se usó una cinta métrica flexible, no elástica, metálica y de anchura inferior a 0,1 mm-150 cm.

Los marcadores analíticos fueron: perfil lipídico (CT, HDL-c, LDL-c, TG, hematología [recuento de series blanca y roja]), glucosa e insulina, proteína C reactiva.

Además, se tuvieron en cuenta factores de confusión con una tabla de afinidad al cumplimiento de la ingesta (> 95%), y con un registro de frecuencias de consumo de alimentos para controlar la ingesta de alimentos que pueden influir en el metabolismo del colesterol al alza y a la baja; y control sobre la no modificación de los hábitos basales durante el ensayo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS 21.0. En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de los datos sociodemográficos, antropométricos y de los valores lipídicos basales y finales bajo la ingesta de Naturcol y placebo. También se estudió la normalidad de los valores lipídicos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para analizar la eficacia de las ingestas de Naturcol y placebo se calculó la diferencia en los valores lipídicos antes y después de la ingesta, aplicándose la prueba T de Student para muestras relacionadas o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon en función del cumplimiento del supuesto de normalidad de las variables dependientes. La eficacia de la intervención se ha comprobado mediante la comparación de las diferencias (final-basal) de las ingestas de la leche con EV y placebo, aplicándose para ello la prueba T de Student para muestras relacionadas o la prueba de rangos con signo de Wilcoxon

en función del cumplimiento del supuesto de normalidad de los incrementos lipídicos. Se calculó el tamaño del efecto como el cociente de la diferencia de medias con la desviación típica basal o leche con EV en su caso. El nivel de significación aplicado fue del 5%.

Este estudio siguió los principios éticos reconocidos por la Declaración de Helsinki, las recomendaciones de la buena práctica clínica, la actual legislación española que regula la investigación clínica en humanos, protección de datos personales y bioéticos (Decreto Real 561/1993 sobre ensayos clínicos y 14/2007, 3 Julio para la investigación biomédica).

RESULTADOS

De los 59 participantes iniciales, 3 fueron excluidos por incumplimiento del tratamiento o de la metodología empleada, y 2 no completaron el ensayo, por lo que no se pudieron incluir en los resultados finales. Finalmente, 54 personas culminaron el estudio, 30 mujeres y 24 hombres, con una edad media de 38,8 (\pm 7,3) años. Se comprobó la normalidad de las variables y que no presentaban diferencias significativas entre edad, peso, talla, género e IMC. Las características descriptivas de los sujetos se refleja en la tabla I.

Tras la ingesta de las dos fases, observamos diferencias significativas entre la leche con EV y la leche placebo (Fig. 1). En la tabla II se representan los valores de los marcadores en el momento inicial y final de cada periodo.

Teniendo en cuenta la fase de 3 semanas de ingesta de la leche con EV, la diferencia entre los marcadores basales y finales son de 23,7 \pm 23,04 mg/dl, 21,7 \pm 22,84 mg/dl, 1,4 \pm 10,07 mg/dl, 6,8 \pm 54,07 mg/dl y 23,9 \pm 22,43 para el CT, el LDL-c, el HDL-c, los TG y el colesterol no HDL, respectivamente. Esto supone una reducción del 9,73%, 12,5%, 3,15% y 13,2% para el CT, LDL-c, TG y colesterol no HDL, respectivamente (Tabla III). Sin sufrir cambios considerables en las fracciones de HDL-c, 1,4

Tabla I. Estadísticos descriptivos de la muestra

	Hombres (n = 24) M (\pm DE)	Mujeres (n = 30) M (\pm DE)
Edad (años)	38,8 (7,3)	
Peso (kg)	76,8 (11,5)	61,5 (7,7)
Talla (m)	1,76 (0,5)	1,64 (0,7)
IMC	24,7 (3,3)	22,8 (2,6)
Grasa total (%)	20,5 (6,4)	29,7 (6,2)
Grasa visceral (kg)	7,8 (4,4)	6,5 (4,3)
Músculo (kg)	40,9 (13,4)	29,4 (10,9)

Las medias (M), con su desviación estándar (DE), de las variables antropométricas según el género. Muestra, peso, talla, IMC, grasa total, grasa visceral y músculo.

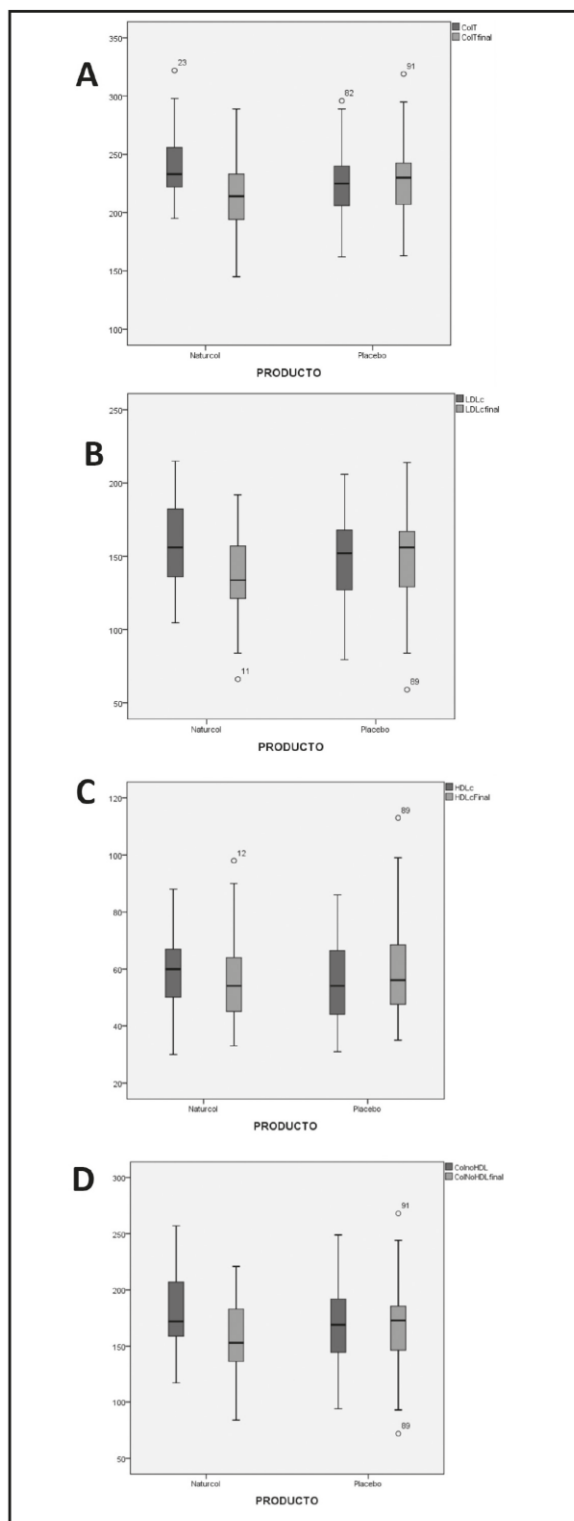


Figura 1.

Diferencias entre la medida inicial, en azul, y la final, en verde, para CT (A), LDL-c (B), HDL-c (C), y colesterol no HDL (D) entre el tratamiento con Naturcol (leche con EV) y placebo.

Tabla II. Comparación de los valores basales y finales de los grupos Naturcol y placebo

	Naturcol		Placebo	
	Basal M (DE)	Final M (DE)	Basal M (DE)	Final M (DE)
CT mg/dL	236,8 (26,6)	213,6 (28,6)	225,9 (31,6)	228,6 (31,4)
LDL-c mg/dL	158,8 (29,2)	137,1 (26,6)	148,2 (31,4)	148,5 (32,6)
HDL-c mg/dL	57,9 (13,9)	56,5 (14,6)	56,2 (14,2)	59,1 (16,4)
TG mg/dL	99,4 (43,9)	92,6 (39,2)	98,6 (45,3)	97,8 (47,1)
Colesterol no HDL	179,5 (31,4)	155,6 (32,0)	168,7 (34,9)	168,9 (39,1)

Las medias (M), con su desviación estándar (DE), de las variables CT, LDL-c, HDL-c, TG, CT no HDL, expresadas en miligramos por decilitro, para la leche con EV y el placebo.

Tabla III. Diferencias en el porcentaje de reducción de cada marcador durante el tratamiento

	Tratamiento		p ANOVA
	Naturcol % (DE)	Placebo % (DE)	
Colesterol total	9,73 (9,7)	-1,46 (10,8)	< 0,001
LDL-c	12,5 (13,5)	-1,88 (18,09)	< 0,001
HDL-c	1,9 (8,2)	-3,4 (9,97)	0,02
TG	3,15 (29,3)	-0,613 (31,0)	0,547
Colesterol no HDL	13,2 (12,5)	-0,56 (16,59)	< 0,001

Las medias del porcentaje (%), con su desviación estándar (DE), de las diferencias (inicial-final), de las variables CT, LDL-c, HDL-c, TG, colesterol no HDL, para la leche con EV y el placebo.

± 10,07 mg/dl para Naturcol, y un aumento de 3,9 mg/dl en el placebo (3,4%).

Los TG no siguieron una distribución normal y, por tanto, para comparar las medias de los grupos de tratamiento durante el estudio se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para 2 muestras relacionadas. Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencia estadísticamente significativa entre los rangos de la variable TG al inicio y al final del estudio en cualquiera de los dos grupos de tratamiento. Tampoco hubo diferencias significativas entre los rangos de cada grupo de tratamiento al inicio y al final del estudio. Por tanto, el tratamiento con EV no produjo una reducción en los niveles de TG significativamente diferente con respecto al grupo placebo.

Se desarrolló un diseño cruzado, por lo que al tratarse de los mismos sujetos, no se deberían encontrar diferencias significativas entre las medias basales de los dos grupos de tratamiento si el periodo de lavado ha sido lo suficientemente largo como para partir de unas condiciones basales, en la segunda fase del

estudio, similares a las condiciones del inicio del estudio. Esto es debido a que las diferencias entre sujetos hiporrespondedores, normorrespondedores e hiperrespondedores, desaparecen. Sin embargo, se realizó la prueba T de Student para muestras relacionadas y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los resultados de colesterol total de los dos grupos al inicio del estudio. Lo mismo sucedió con LDL-c y colesterol no-HDL. Por tanto, se debe investigar si estas diferencias se deben al efecto de arrastre del tratamiento asignado en la primera fase.

DISCUSIÓN

Revisada la literatura científica de los últimos años, observamos que hay importantes estudios valorando el beneficio del consumo de EV sobre los marcadores del riesgo cardiovascular, como ya concluía un metaanálisis de más de 40 ensayos clínicos (21).

Rocha M y cols. (2011) (22) exponen cómo la mayoría de los estudios consiguen una reducción del 8-14% de LDL-c, siendo las mejores dosis entre 2 y 2,5 g, sin encontrarse mayor beneficio al superar estas dosis, siendo necesario al menos 0,8-1 g/día para que se obtenga una mínima reducción de LDL-c. Por ello, la Food and Drug Administration y la European Food Safety Authority (EFSA) recomiendan no superar dosis de 3 g/día, ya que dosis superiores no presentan ninguna ventaja. Tan solo se recomienda el control de la ingesta de EV a personas que padecen sitosterolemia (23). Parte de la variabilidad de los resultados se debe entre otros motivos al uso de distintos esteroles, a los distintos tiempos de ingesta, distintos niveles basales de colesterol, a la existencia o no de control de dieta complementaria y a cambios de hábitos durante el ensayo, a la matriz usada, el momento de ingesta y a la dosis administrada. Esta variabilidad va desde el 5 al 25% de descenso de LDL-c (22).

Actualmente los productos funcionales incluyen una dosis única de 2 g/día, por lo que parte de los ensayos más recientes arrojan eficacia en este formato. Otros trabajos (24) han basado su objetivo en comparar la eficacia dependiente de la dosis, concluyendo que una dosis única era igual de eficaz que 3 dosis/día.

Los alimentos enriquecidos en EV poseen un efecto reductor del LDL-c bien documentado (25), además de una reducción eficaz de las concentraciones de CT, y un aumento de las concentraciones de EV en plasma (26).

Clifton PM y cols. (2004) (27), que analizaron las diferencias del uso de los EV en distintas matrices, concluyeron que la matriz del alimento donde se incluyen puede ser determinante en los resultados. Así, los niveles de CT y LDL-c en suero se redujeron significativamente por el consumo de alimentos enriquecidos en fitoesteroles: con leche (8,7 y 15,9%, respectivamente) y con yogur (5,6 y 8,6%, respectivamente). Los niveles de LDL-c en suero disminuyeron significativamente un 6,5% con el pan y un 5,4% con el cereal. Ambos fueron significativamente menos eficaces que la leche enriquecida con EV ($p < 0,001$). Las matrices en las que se obtiene mejor efecto en la reducción del LDL-c, por orden, son: la leche, el yogur, el pan y los cereales.

San Mauro Martín I y cols. (2014) (6) determinaron la eficacia de una leche enriquecida en fitoesteroles (2,24 g/día) para la disminución de marcadores de ECV, en un diseño clínico, doble ciego y cruzado de 2 fases de intervención de 3 semanas respectivamente y separadas por un periodo de lavado de 2 semanas. Las diferencias entre los marcadores basales y finales para el LDL-c, CT y TG fueron de $19,47 \pm 29,10$ mg/dl ($p = 0,009$), $24,47 \pm 30,68$ mg/dl ($p = 0,003$), respectivamente.

Casas-Agustench P y cols. (2012) (28) examinaron los efectos de la leche desnatada (LD) con EV (0,1% de grasa láctea) y la leche semidesnatada (LS) con grasa vegetal (GV) (0,1% de grasa láctea más 1,5% de grasa vegetal) sobre los lípidos y los esteroles séricos en individuos hipercolesterolémicos. Cuarenta y tres sujetos con LDL-c $> 1,300$ mg/l fueron asignados aleatoriamente a 3 periodos de tratamiento (control LD, LD-EV y LS-GV), de 4 semanas, con 500 ml de leche con o sin 3-4 g de ésteres de EV (2 g de EV libres). Comparado con el control, el LDL-c se redujo en un 8 y 7,4% ($p < 0,015$, ambos) en los periodos de LD-EV y LS-GV, respectivamente. El ratio de latosterol:colesterol sérico aumentó un 11-25%, mientras que los ratios sitosterol:colesterol y campesterol:colesterol aumentaron un 70-120% con ambas leches fortificadas.

Sin embargo, la eficacia relativa de los EV como suplementos (cápsulas), en comparación con otras formas dietéticas, todavía necesita ser determinada. El análisis detallado de Amir Shaghghi y cols. (2013) (25) no mostró diferencias significativas entre el efecto reductor del LDL-c de los suplementos de EV (-12 mg/dl; 95% IC -0,39 a -0,24; $p < 0,0001$) vs. los alimentos enriquecidos con EV (-12 mg/dl; 95% IC -0,35 a -0,27; $p < 0,0001$). Pero el consumo de suplementos sí disminuyó las concentraciones de LDL-c en 12 mg/dl (IC del 95%: -0,39 a -0,23; $p < 0,000$) en comparación con el placebo.

Un estudio (29) de diseño y resultados similares al nuestro, con 19 sujetos y 2 periodos de administración de EV, de 15 y 30 días, obtuvo una disminución parecida, en ambos periodos, de los niveles de LDL-c iniciales y finales, obteniéndose unas reducciones de un 9,61% y un 6,69%, respectivamente. En otro estudio (30) con un grupo de dieta y un grupo con suplemento de EV (2 g/día) se evidenció en este último una disminución significativa en el CT (6,4%) y LDL-c (9,9%).

Al igual que otros autores (31,32), hemos analizado si la eficacia de los EV es dependiente de los niveles basales de los sujetos, encontrando mayor descenso de LDL-c cuanto mayor es el nivel basal al inicio del tratamiento.

En el metaanálisis de Ras RT y cols. (2014) (33) se incluyeron 124 estudios. Se administraron EV y estanoles vegetales en 129 y 59 estratos, respectivamente; los restantes utilizaron una mezcla de ambos. La dosis media de fitoesteroles fue de 2,1 g/día. La toma de 0,6 a 3,3 g/día de fitoesteroles redujo gradualmente, en promedio, un 6-12% las concentraciones de LDL-c. Cuando se analizaron por separado los EV y estanoles vegetales se observaron relaciones claras y comparables dosis-respuesta.

Musa-Veloso K y cols. (2011) (34) observaron que las reducciones máximas de LDL-c por los EV (16,4%) y el éster de estanol vegetal (17,1%) fueron significativamente mayores que las reduc-

ciones máximas de LDL-c obtenidas por los EV (8,3%) y el éster de esteroles vegetal (8,4%).

Hasta hace poco se creía que los EV tenían poco o ningún impacto sobre TG en sangre. Sin embargo, los estudios realizados individualmente carecían posiblemente del poder estadístico para detectar las modestas disminuciones de TG. Nuestros resultados no exponen diferencias significativas al respecto. Sin embargo, un análisis en profundidad sobre el tema es el de los doce ensayos aleatorios controlados, analizados por Demonty I y cols. (2013) (35).

Con respecto al posible efecto de arrastre y el posible efecto de comienzo en el grupo control o en el de estudio, se tuvo en cuenta que el proceso de metabolismo, excreción y, por tanto, funcionalidad del esteroles en el humano no es superior a 2 días (36); además de implantar un sistema de lavado de 2 semanas, acorde con otras experiencias similares con buenos resultados (6,37,38).

CONCLUSIÓN

Según los resultados, se puede afirmar que una dosis diaria de 2,24 g de EV suministrados en leche, pueden representar una estrategia terapéutica, no farmacológica, de control y manejo de la hipercolesterolemia.

AGRADECIMIENTOS

A CAPSA por su colaboración. A la Unidad de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid. Al Departamento de Medicina, UCM, al Hospital el Escorial y centro de especialidades San Carlos del Escorial. A Microcaya S.A.

RESPONSABILIDADES ÉTICAS

Este estudio siguió los principios éticos reconocidos por la Declaración de Helsinki (revisado Hong-Kong en Septiembre, 1989 y en Edimburgo, Escocia en 2000), las recomendaciones de la buena práctica clínica EEC (documento 111/3976/88, Julio 1990), la actual legislación española que regula la investigación clínica y biomédica en humanos, protección de datos personales y bioéticos (Decreto Real 561/1993 sobre ensayos clínicos y 14/2007, 3 Julio para la investigación biomédica).

BIBLIOGRAFÍA

- World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Actualizado: enero de 2015. Citado 10 marzo 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
- World Health Organization. Global status report on non communicable diseases. Geneva; 2010. Citado 10 marzo 2015. Disponible en: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf
- De Oya M. Colesterol-HDL y mortalidad cardiovascular en España. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51:988-90.
- San Mauro Martín I, Collado Yurrita L, Ciudad Cabañas MJ, Cuadrado Cenzual MA, Hernández Cabría M, Calle Purón ME. Manejo del riesgo de enfermedad cardiovascular con leche enriquecida en esteroles en población joven adulta; ensayo clínico controlado aleatorizado y cruzado. *Nutr Hosp* 2014;30(4):945-51.
- National Institutes of Health. 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). 2002. Available at: <http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/resources/heart/atp3full.pdf>
- Alonso Karlezi RA, Mata Pariente N, Mata López P. Control de las hiperlipemias en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol Supl* 2006;6(G):24-35.
- Peñalvo JL, Oliva B, Sotos-Prieto M, Uzhova I, Moreno-Franco B, León-Latre M, et al. La mayor adherencia a un patrón de dieta mediterránea se asocia a una mejora del perfil lipídico plasmático: la cohorte del *Aragon Health Workers Study*. *Rev Esp Cardiol* 2015;68:290-7.
- Gylling H, Plat J, Turley S, Ginsberg HN, Ellegård L, Jessup W, et al. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2014;232(2):346-60.
- Matthan NR, Zhu L, Pencina M, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Sex-specific differences in the predictive value of cholesterol homeostasis markers and 10-year cardiovascular disease event rate in Framingham offspring study participants. *J Am Heart Assoc* 2013;2(1):e005066.
- Rocha M, Banuls C, Bellod L, Jover A, Victor VM, Hernandez-Mijares A. A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Curr Pharm Des* 2011;17(36):4061-75.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to plant sterols and plant stanols and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 549, 550, 567, 713, 1234, 1235, 1466, 1634, 1984, 2909, 3140), and maintenance of normal prostate size and normal urination (ID 714, 1467, 1635) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2010;8(10):1813.
- Ros E. Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Rev Esp Cardiol Supl* 2006;6(G):52-62.
- Ras RT, Hiemstra H, Lin Y, Vermeer MA, Duchateau GS, Trautwein EA. Consumption of plant sterol-enriched foods and effects on plasma plant sterol concentrations—a meta-analysis of randomized controlled studies. *Atherosclerosis* 2013;230(2):336-46.
- Ras RT, Geleijnse JM, Trautwein EA. LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Br J Nutr* 2014;112(2):214-9.
- Genser B, Silbernagel G, De Backer G, Bruckert E, Carmena R, Chapman MJ, et al. Plant sterols and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 2012;33(4):444-51.
- Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Meijer L, Zock PL, Geleijnse JM, et al. The effect of plant sterols on serum triglyceride concentrations is dependent on baseline concentrations: a pooled analysis of 12 randomised controlled trials. *Eur J Nutr* 2013;52(1):153-60.
- San Mauro Martín I, Collado Yurrita L, Cuadrado Cenzual MA, Ciudad Cabañas MJ, Mendive Dubourdiou P. Role of ApoA1 on High-Density Lipoprotein: an intervention with plant sterols in patients with hypercholesterolemia. *Nutr Hosp* 2015;31(1):494-9.
- Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem* 1995;41(5):717-23.
- Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973;19(5):476-82.
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20(4):470-5.
- Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R. Stresa Workshop Participants. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 2003;78(8):965-78.
- Rocha M, Banuls C, Bellod L, Jover A, Victor VM, Hernandez-Mijares A. A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Curr Pharm Des* 2011;17(36):4061-75.
- Berge KE. Sitosterolemia: a gateway to new knowledge about cholesterol metabolism. *Ann Med* 2003;35(7):502-11.
- Plat J, van Onselen RN, van Heugten M, Mensink RP. Effects on serum lipids, lipoproteins, and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:671-7.
- Amir Shaghghi M, Abumweis SS, Jones PJ. Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols/stanols provided in capsule and tablet formats: results of a systematic review and meta-analysis. *J Acad Nutr Diet* 2013;113(11):1494-503.

26. Ras RT, Hiemstra H, Lin Y, Vermeer MA, Duchateau GS, Trautwein EA. Consumption of plant sterol-enriched foods and effects on plasma plant sterol concentrations--a meta-analysis of randomized controlled studies. *Atherosclerosis* 2013;230(2):336-46.
27. Clifton PM, Noakes M, Sullivan D, Erichsen N, Ross D, Annison G, et al. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *Eur J Clin Nutr* 2004;58(3):503-9.
28. Casas-Agustench P, Serra M, Perez-Heras A, Cofan M, Pinto X, Trautwein EA, et al. Effects of plant sterol esters in skimmed milk and vegetable-fat-enriched milk on serum lipids and non-cholesterol sterols in hypercholesterolaemic subjects: a randomised, placebo-controlled, crossover study. *British Journal of Nutrition* 2012;107:1766-75.
29. Gonçalves S, Maria AV, Silva AS, Martins-Silva J, Saldanha C. Phytosterols in milk as a depressor of plasma cholesterol levels: experimental evidence with hypercholesterolemic Portuguese subjects. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;35(1-2):251-5.
30. Bañuls C, Martínez-Triguero ML, López-Ruiz A, Morillas C, Lacomba R, Víctor VM, et al. Evaluation of cardiovascular risk and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic subjects on a standard healthy diet including low-fat milk enriched with plant sterols. *J Nutr Biochem* 2010;21(9):881-6.
31. Abumweis SS, Barake R, Jones PJ. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res* 2008;52.
32. Naumann E, Plat J, Kester AD, Mensink RP. The baseline serum lipoprotein profile is related to plant stanol induced changes in serum lipoprotein cholesterol and triacylglycerol concentrations. *J Am Coll Nutr* 2008;27(1):117-26.
33. Ras RT, Geleijnse JM, Trautwein EA. LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Br J Nutr* 2014;112(2):214-9.
34. Musa-Veloso K, Poon TH, Elliot JA, Chung C. A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85(1):9-28.
35. Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Meijer L, Zock PL, Geleijnse JM, et al. The effect of plant sterols on serum triglyceride concentrations is dependent on baseline concentrations: a pooled analysis of 12 randomised controlled trials. *Eur J Nutr* 2013;52(1):153-60.
36. Ling WH, Jones PJ. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 1995;57(3):195-206.
37. Casas-Agustench P, Serra M, Pérez-Heras A, Cofán M, Pinto X, Trautwein EA, et al. Effects of plant sterol esters in skimmed milk and vegetable-fat-enriched milk on serum lipids and non-cholesterol sterols in hypercholesterolaemic subjects: a randomised, placebo-controlled, crossover study. *Br J Nutr* 2012;107(12):1766-75.
38. Cleghorn CL, Skeaff CM, Mann J, Chisholm A. Plant sterol-enriched spread enhances the cholesterol-lowering potential of a fat-reduced diet. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(1):170-6.

6.DISCUSIÓN

Resulta relevante profundizar en el avance del manejo de la ECV y de los factores de riesgo asociados a ella en nuestro país, debido a las cifras alarmantes que sufrimos y a una población cada vez más envejecida. La alimentación y otros hábitos modificables como el ejercicio, sedentarismo o tabaquismo, se han evidenciado como claves en esta lucha(152).

Dentro de los hábitos alimenticios de los que ya se han descrito anteriormente, con efecto en la modulación a la alza o a la baja del colesterol en todas sus formas, algunos autores, no han estudiado el efecto aislado de un nutriente, si no, distintas concentraciones y combinaciones de estas grasas (PUFAS, SFA y MUFAS), frente a la respuesta posprandial de una comida en las lipoproteínas LDL y TG(153). Sin embargo, últimamente se pone en duda el efecto perjudicial que tradicionalmente se le atribuye a los SFA. Algunos estudios recientes, han señalado una correlación inversa entre el consumo de SFA contenidos en los lácteos y las ECV, posiblemente debida a su contenido en el ácido graso palmitoleico, que permite un aumento de los niveles de colesterol HDL y una disminución de los triglicéridos y menor proteína C reactiva, menor resistencia a la insulina y menor incidencia de Diabetes Mellitus tipo II, con poco efecto neto en la razón colesterol total/colesterol HDL(154). Así pues, en un meta-análisis y revisión sistemática de 2015, no observaron una relación entre los SFA y mayor mortalidad, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del corazón, accidente cerebrovascular isquémico, o diabetes tipo 2, aunque aclaran que la evidencia es heterogénea, con limitaciones metodológicas. Por su parte, las grasas trans sí se asociaron a estas enfermedades(154).

Los lácteos, utilizados en este proyecto como vehiculizadores de los esteroides, también han sido estudiados en relación a la ECV. En una reciente revisión se ha evidenciado la asociación positiva del consumo de leche y productos lácteos, con la disminución del riesgo de hipertensión y ECV, apuntando al perfil lipídico, a las fracciones de elementos minerales – como magnesio o potasio, pero sobre todo calcio– y de algunas glucoproteínas –a través de péptidos bioactivos(156-157). También otro grupo de investigadores, relacionaron el score de ECV de el *Estudio Framingham* con la ingesta

de lácteos, observando una protección, especialmente en hombres mayores de 60 años(158).

El hígado y el intestino son los principales reguladores del metabolismo del colesterol. La vía de absorción del colesterol, presenta oportunidades clínicas para la suplementación dietética con agentes que atenúen dicha absorción, entre los que destacan los fitoesteroles/fitoestanoles(159). Por tanto, los esteroides vegetales, ampliamente estudiados, son un componente interesante desde el punto de vista de la prevención, y del tratamiento dietético en hipercolesterolemias leves, y complementarias a terapias farmacológicas en hipercolesterolemias moderadas y graves, salvo que existan contraindicaciones por la farmacopea. Aunque también han sido recientemente reportados como un posible riesgo para la salud, de un número reducido, personas con una alteración en la absorción de los esteroides(160), o debido a otros factores e interacciones, como publicó el grupo de *Weingärtner O et al*, en 2009(161). Esta relación, entre el aumento de las concentraciones de esteroides vegetales con el riesgo cardiovascular, podría estar relacionado con la formación de oxifitosteroides (productos de oxidación de esteroides vegetales). Sin embargo, la pregunta sigue siendo, si el aumento de los oxifitosteroides, es debido a la absorción o la formación endógena(162).

La relación entre la síntesis de colesterol y la absorción de colesterol parece ser recíproca; altos sintetizadores son generalmente bajos absorbedores, mientras que los bajos sintetizadores son generalmente altos absorbedores(163). Basándose en resultados anteriores, se podría hipotetizar que la baja síntesis de colesterol y la alta absorción de colesterol, se asocian con un efecto mayor en la reducción del colesterol tras la ingesta de EV(164). Los individuos con alta eficiencia de absorción de colesterol podrían hiperabsorber EV y mostrar grandes elevaciones en las concentraciones de plasma después de la ingesta. Por otro lado, en los individuos con bajos EV en plasma, podría haber mayor margen para aumentarlos después de su ingesta(164).

Ras et al. (164), llevaron a cabo un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo, de grupos paralelos en el que se puede observar una hipótesis similar. Hombres y mujeres (n = 240) hipercolesterolémicos, consumieron margarina baja en grasa con o sin EV (3 g/día) durante 12 semanas después de 4 semanas del período de

adaptación. En el grupo de EV, las concentraciones de EV en plasma aumentaron en las primeras 4 semanas de intervención en un 69% (IC del 95%: 58; 82) a partir de 7,2 mmol/L y en un 28% (IC del 95%: 19; 39) a partir de 11,4 mol/L, respectivamente, y permaneció estable durante las 8 semanas siguientes. El incremento de EV en plasma en el grupo placebo, no fue significativamente diferente entre altos y bajos sintetizadores de colesterol ($p > 0,05$). Entre los altos y bajos absorbedores de colesterol, no se observaron diferencias significativas, excepto por la suma de colesterol-estandarizado de cuatro importantes EV en plasma (sitosterol, campesterol, brasicasterol y estigmasterol), que mostraron un mayor incremento en los bajos absorbedores (78,3% (IC del 95%: 51,7; 109,5)) en comparación con los altos absorbedores (40,8% (IC del 95%: 19,9; 65,5)).

Se requieren más estudios para evaluar la variabilidad interindividual y sus bases genéticas, para poder identificar a aquellos sujetos que son grandes respondedores y poco respondedores, así como a los hiper-absorbedores de los normo- o hipo-absorbedores de esteroides vegetales(159).

EFEECTO DE LA INGESTA DE ESTEROLES EN EL Ct y LDLc

La comparación entre diferentes tipos de suplementación –isoflavonas, ácidos grasos omega-3 y fitoesteroides- revela que solamente los fitoesteroides (esteroides y estanoles) alcanzan, según algunos autores, una mayor reducción de los niveles de Ct y LDLc(165). Pero la comparabilidad entre los esteroides y estanoles vegetales, en cuanto a su potencial para reducir el colesterol, se encuentra todavía en debate. Un reciente meta-análisis(166) de catorce estudios, comparó la eficacia en la reducción del LDLc de los esteroides vegetales con la de estanoles vegetales en dosis que variaban de 0,6 a 3,3 g PS/día. Siete brazos del estudio, mostraron un efecto no significativamente mayor de la reducción de LDLc de los esteroides vegetales frente a los estanoles vegetales, mientras que ocho brazos del estudio, mostraron un efecto relativamente mayor para los estanoles vegetales que para los esteroides vegetales. En general, se concluyó que los esteroides y estanoles vegetales, no tienen distintos efectos estadística o clínicamente relevantes sobre los lípidos sanguíneos. Para consumos superiores (> 4 g/día de PS), algunos estudios individuales, indican un efecto reductor mayor del LDLc

con estanoles vegetales(167-168), que con esteroides de plantas(169). Sin embargo, los estudios de dosis altas son escasos y están dispersos en una amplia gama de dosis (5,8-9 g/día PS).

Los esteroides vegetales, inhiben la absorción intestinal de colesterol(170) a través de varios hipotéticos mecanismos, tales como la competencia con el colesterol para la solubilización en las micelas mixtas de la dieta, la interferencia con los procesos de transporte mediada de la absorción de colesterol y la estimulación de la excreción de colesterol a través del intestino(171).

Como los esteroides vegetales actúan principalmente mediante la inhibición de la absorción intestinal, la absorción de otros compuestos solubles en grasa, tales como los carotenoides, los tocoferoles y los retinoides, podría verse posiblemente comprometida(172). La inhibición de la absorción de colesterol con ésteres de estanol vegetal, por otra parte, no afectaría a la concentración de proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), la cual regula el metabolismo del LDLc mediante la captación de receptores de LDL para la degradación(173).

La primera descripción de la utilización de alimentos enriquecidos con fitoesteroides es del año 1977. Mediante una preparación comercial derivada del aceite de soja enriquecido con fitoesteroides (3 g/día), observaron una disminución significativa del LDLc(174). En 1986, se comunicó la primera evidencia de la utilización de estanoles vegetales para reducir el colesterol en plasma(175). Demostraron que un aceite de girasol suplementado con ésteres de sitoestanol a una dosis de 1,5 g/día reducía el LDLc en un 15% en adultos hipercolesterolémicos. Actualmente, los productos enriquecidos con esteroides o estanoles utilizan las formas esterificadas debido al aumento de su solubilidad, hecho que permite su incorporación a alimentos tales como leche y yogures, entre otros(159). De hecho, los productos a base de grasa (para untar, mayonesa, aderezos para ensaladas, leche y yogur), tanto los que tiene bajo como alto contenido en grasa, dan como resultado el efecto más beneficioso en la reducción de LDLc(176).

Uno de los meta-análisis más relevantes hasta la fecha, publicado en 2014, estudió el efecto de los esteroides y los estanoles de 124 estudios. En el cual, una dosis media de 2,1 g/día redujo un 6-12 % las concentraciones de LDLc en una relación clara de dosis-respuesta(177).

Por ejemplo, un estudio similar al realizado por nuestro grupo, (doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo) es el de *Sun et al.* (178), 59 pacientes (19 varones, con edad media de $60,28 \pm 6,98$ años) con hipercolesterolemia primaria (LDLc en ayunas entre 3,4 y 6,0 mmol/L), fueron divididos aleatoriamente en dos grupos –el grupo de tratamiento (2,5 g de esteres de esteroles vegetales al día, n=30) y el grupo placebo (n=29). El LDLc del grupo de tratamiento se redujo significativamente desde el inicio un -17,7% ($P < 0,05$) en la semana 3 y -19,9% ($P < 0,05$) en la semana 6 de estudio; mientras que en el grupo placebo, se redujo -15,57% ($P < 0,05$) y -12,17% ($P < 0,05$) en la semana 3 y en la semana 6, respectivamente. El Ct también se redujo, en el grupo de tratamiento, un -6,03% ($P > 0,05$) en la semana 3 y un -13,8% ($P < 0,05$) en la semana 6. La leche enriquecida en esteroles vegetales no afectó al nivel de HDLc en plasma ni al nivel de TG, en ninguna de las semanas. Después de la normalización con el grupo placebo, el grupo de tratamiento mostró una reducción significativa del LDLc (7,69%) y del Ct (8%) después de 6 semanas.

En general, parece aceptado actualmente, que la ingesta de 2-2,5 g/día de esteroles vegetales (muy por encima de la ingesta habitual de 200-400 mg/día(159)) reducen, en un modelo dosis-respuesta, entre 6 y 12 % el colesterol total, especialmente de las lipoproteínas LDLc, y sin afectar a la fracción del HDLc de forma significativa. Asumiendo una media de un 10 %(179), que ya permiten incluir como alegación de salud en Europa y América(131).

Si bien es cierto, la eficacia en la disminución del colesterol sanguíneo en la literatura es muy amplia, donde grandes meta-análisis observan una variabilidad del 5 al 25 % de media(180). Sin embargo, el efecto dosis-respuesta se ve limitado por defecto: ingestas de 0,8-1 g/día(181); así como por exceso: donde cantidades superiores a 3 g no han demostrado mayor eficacia, y sí podría existir posibles efectos negativos sobre la absorción de vitaminas liposolubles, el riesgo de cáncer y el posible aumento de la ECV, debido al incremento en las concentraciones de esteroles circulantes(182), por lo que se recomienda no superarlas(183). Así concluyen todos los estudios incluidos en un meta-análisis anteriormente citado(177), que con una dosis creciente de EV, el efecto reductor del LDLc aumenta, pero que este efecto se estrecha en dosis de 2 a 3 g/día.

La inhibición de la absorción de colesterol intestinal, producido por la ingesta de esteroides vegetales, se produce rápidamente y el máximo efecto en la reducción de LDLc para la dosis de esteroides vegetales administrada se produce, por lo general, dentro de las 2-3 semanas tras su ingesta y se mantiene estable si el consumo es regular(164). Sin embargo, estudios de investigación a largo plazo (hasta 85 semanas) han demostrado que los esteroides vegetales en plasma, no aumentan más con la ingesta sostenida de esteroides(184). También se ha visto, que el consumo de esteroides vegetales después o durante la comida principal, es significativamente más eficaz que después de un ayuno(185).

Otro posible factor en la diferencia, se ha postulado por la frecuencia en la dispensación de los esteroides, aunque por ahora, parece no existir pruebas suficientes(186). Todavía no queda claro cómo explicar, la igualdad de eficacia en la reducción del LDLc tras el consumo de una bebida diaria que contenga 2,5 g de esteroides o estanoles vegetales, en comparación con la misma cantidad de fitoesteroides divididos a lo largo del día(187). Algunos sugieren, que el producto debe consumirse individualmente junto a una comida, con el fin de favorecer la secreción de ácidos biliares y, por tanto, la acción de los fitoesteroides; mientras otros sugieren que las múltiples tomas diarias, tienen un efecto ligeramente mayor, que una única ingesta diaria. Un pequeño número de estudios, sugieren que la ingestión de fitoesteroides debe ser entre comidas; mientras que otro número importante de estudios, no especifica el momento de ingestión(176).

Un posible mayor efecto, cuanto mayor sea el colesterol basal circulante, parece otra de las hipótesis que en nuestros resultados pudimos observar, en el momento previo al tratamiento dietético, tal y como se había descrito en la literatura(188,189). Los alimentos con esteroides vegetales añadidos, son útiles en las personas con niveles altos de colesterol, y están especialmente indicados en aquellas con riesgo cardiovascular global intermedio o bajo y cifras de colesterol elevadas, pero que no precisen acciones farmacológicas(159).

El ratio latosterol-colesterol, un marcador sustituto de la síntesis de colesterol endógeno, podría servir como un predictor *a priori* de la reducción de Ct y LDLc circulante en respuesta al consumo de esteroides vegetales; y por tanto tener un uso en

la identificación de respondedores y no respondedores a la terapia con esteroides vegetales(190).

Las distintas respuestas interindividuales a los esteroides vegetales, indican un determinante potencial genético de capacidad de respuesta. En particular, el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) dentro de los genes que codifican como CYP7A1 y ApoE, así como posiblemente otros genes incluyendo ABCG5 y ABCG8, existen como predictores de si los niveles de LDLc disminuirán o incluso aumentarán tras la administración de esteroides vegetales(191). Existe una asociación dual de la isoforma APOE y CYP7A1-rs3808607 con la respuesta del LDLc tras el consumo de esteroides. La asociación del CYP7A1 rs3808607 con la reducción de LDLc y el consumo de esteroides vegetales demuestra un efecto alelico, con falta de respuesta en los portadores T/T y una respuesta incrementada con cada alelo G(192). También relacionado con aspectos genéticos, en el estudio de *Myrie et al.*(193), se observó como la eficiencia de absorción de colesterol se redujo ($P = 0,01$) un 22% y un 17% y la tasa de síntesis aumentó ($P = 0,04$) un ~20% y un 24% en el grupo de pacientes heterocigotos fitoesterolemicos y en el grupo control, respectivamente, en respuesta al consumo de EV.

Pero no sólo existen partículas grandes, boyantes de LDLc. Hay un segundo subtipo reconocido, el LDLc pequeño y denso. En comparación con el LDLc, del que se ha hablado anteriormente, las subclases de LDL pequeñas y densas se han presentado como más aterogénicas como resultado de su prolongada vida media en el plasma, su baja afinidad de unión con los receptores de LDL, su mayor grado de penetración de la pared arterial y su menor resistencia al estrés oxidativo. Los individuos con predominio de LDLc pequeño y denso exhiben un riesgo triple de infarto de miocardio. El consumo diario de 2 g de esteroides vegetales en los pacientes con dislipidemia, tiene también un efecto beneficioso, no solo en los niveles totales de LDLc, sino también en sus partículas más pequeñas, densas y aterogénicas(194).

Otro estudio(195), ha optado por identificar con precisión y cuantificar el efecto reductor de los esteroides/estanoles vegetales del LDLc como suplementos, en contraste con los enfoques basados en los alimentos. El análisis, no mostró diferencias significativas entre la acción reductora del LDLc de los EV en suplementos (-12 mg / dL

[-0,31 mmol / L]; IC del 95% -0,39 a -0,24; P <0,0001) frente a alimentos enriquecidos con EV (-12 mg / dl [-0,31 mmol / L], IC 95% -0,35 a -0,27; p <0,0001).

EFFECTO DE LA INGESTA DE ESTEROLES SOBRE LOS TRIGLICÉRIDOS.

Una posible ventaja de los alimentos enriquecidos con esteroides vegetales y/o esteroides de estanol, frente a los medicamentos dirigidos a un solo blanco, es que dichos compuestos dietéticos, actúan sobre múltiples objetivos, puesto que no solo reducen las concentraciones de LDLc en plasma, sino también las concentraciones de TG en sujetos con concentraciones elevadas de los mismos; especialmente en sujetos con síndrome metabólico. En teoría, varios mecanismos podrían estar implicados sobre dichos efectos, ya sea actuando sobre el mejor aclaramiento de la circulación o sobre la disminución de la aparición de los TG en la circulación. Esto significa que los posibles mecanismos podrían estar relacionados con: 1) el aumento de actividad de la lipoproteína lipasa, 2) el aumento de la captación de lipoproteínas ricas en TG (quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad, o sus restos, 3) el cambio de actividad de la proteína de transferencia de esteroides de colesterol (CETP), 4) la reducción de la absorción intestinal de grasas o, 5) la reducción de la producción hepática de VLDL (187).

No obstante, existe un debate científico no resuelto, sobre la eficacia de la ingesta de EV para reducir estos ácidos grasos en el plasma. Algunos investigadores, consideran que los EV no tienen un efecto suficiente sobre TG en plasma, destacando otros factores de la dieta como más relevantes en su control(196). Este fue el caso de *McKenney et al.* (197), quienes en su estudio a doble ciego, cruzado, controlado con placebo y aleatorizado en pacientes con hipercolesterolemia, no observaron reducciones significativas en los niveles de lípidos plasmáticos al analizar los triglicéridos y el HDLc. Otros investigadores, sí que han encontrado una disminución significativa. Los datos disponibles, indican que después de la suplementación con fitoesteroides a dosis de 1,5 a 2 g/día se reducen los niveles de triglicéridos entre un 6 y un 20% sin un efecto significativo sobre el HDLc(198). Algunos meta-análisis así lo corroboran, con reducciones de un 6 % con ingestas de 1,6-2,5 g de EV y del 4% en aquellos individuos con un consumo de 2 g/día de estanoles, además de una relación

dosis-dependiente de la concentración basal de TG(199), y un 19 % con la ingesta de 4 g/día(200). Por lo tanto, se puede estimar que una disminución del 10% en los TG podría reducir el riesgo de ECV un 4-5%, independientemente de los cambios en el LDLc(201).

Como ya se ha expuesto, en nuestros ensayos, no se obtuvo una reducción significativa de los TG plasmáticos.

RELACIÓN DE LA APOA CON EL HDLc

Uno de los focos de actuación en el manejo del riesgo cardiovascular, se está centrando en el aumento de las HDLc, por su nivel en la regulación del colesterol plasmático.

Recientemente, se ha establecido que las HDLc están constituidas por una población heterogénea de partículas, identificándose al menos dos principales subpoblaciones, una que contiene apoA-I y apoA-II, denominada LpA-I:A-II y otra que contiene apoA-I pero no apoA-II, denominada LpA-I(202).

Se ha relacionado un aumento de 1 mg/dl del HDLc, con una disminución de hasta un 3 % de infarto(203). Es por ello, que las apolipoproteínas mayoritarias que lo conforman, adquieren un gran interés.

La apolipoproteína A-I (Apo A-I), es la principal proteína estructural de las HDLc y está directamente involucrada en el transporte reverso de colesterol. En contraste, la apolipoproteína B (Apo B), es la proteína estructural de las lipoproteínas aterogénicas (VLDL, IDL y LDL) que transportan colesterol hacia los tejidos periféricos; cada partícula de estas lipoproteínas contiene una molécula de Apo B, por lo que el nivel en sangre de esta apolipoproteína se corresponde con el número total de partículas aterogénicas del plasma(204).

La ApoA-I se ha vinculado estrechamente a la cantidad de HDLc(205), como hemos observado en nuestros resultados, con una correlación entre ambos parámetros que también han observado otros autores(206). A pesar de que aun no está claro el mecanismo, parece aceptado que ni el ejercicio ni los esteroides vegetales interfieren directamente en las ApoA-I(207). Es por ello que algunos autores, han sugerido que no todas las HDLc participan en la función del transporte reverso del colesterol, pudiendo

conformarse con proporciones diferentes en las ApoA-I, ApoA-II y ApoB(208). En esta línea, se estudia si un aumento de la Apo B y el ratio Apo B/Apo A-I, además de una disminución de la Apo A-I son importantes predictores de ECV, demostrando ser aún más relevante que la concentración de lípidos en sí(209). La ApoB sí parece modificarse con la ingesta de esteroides, reduciendo el ratio ApoB/ApoA-I(210,211). Estas variaciones podrían deberse a SNPs de los genes de las ApoA-I y ApoB(212), pues el estudio de la secuencia genética de la ApoA ha arrojado algo de luz(213). De esta forma, se han agrupado directamente algunas mutaciones con la predisposición a distintas ECV. Obseándose una respuesta en el metabolismo de los lípidos diferente, según el patrón dietético(214), o estudiando el efecto de los componentes de algunos extractos de alimentos, en la modulación a la alza de la ApoA-I(215).

Un aspecto importante a destacar, es el hallazgo de niveles significativamente menores de lipopartículas LpA-I, acompañado de mayores niveles de lipopartículas LpA-I:A-II, en los pacientes coronarios respecto a los sujetos controles, aún cuando la concentración de apoA-I total fuera casi la misma en los dos grupos. Este nivel menor de partículas LpA-I, se correlacionó inversamente con el porcentaje de estenosis; en cambio, las partículas LpA-I:A-II mostraron una correlación positiva con el grado de estenosis(202). Estos resultados, concuerdan en parte con lo reportado por otros autores(216), quienes encontraron menores concentraciones de LpA-I, pero iguales concentraciones de LpA-I:A-II en pacientes con enfermedad coronaria, en relación a un grupo control. En otro estudio, realizado con un grupo de pacientes previo a bypass coronario, se demostró que tanto las concentraciones de LpA-I como de LpA-I:A-II fueron más bajas en los pacientes que en los sujetos controles(217). Trabajos más recientes, comparan las concentraciones de LpA-I en tres regiones distintas con diferentes tasas de mortalidad por infarto al miocardio, demostrando que la concentración de LpA-I fue menor en aquella población con más alta mortalidad por infarto(218). En el estudio de *Calvo et al.* (202), se demostró que la concentración del HDLc no sería un buen indicador de riesgo de patología cardiovascular, en cambio, las subpoblaciones de HDL, LpA-I y LpAI:A-II demostraron ser útiles para la evaluación del riesgo relativo. Es así como, sujetos con concentraciones de LpA-I por debajo de los niveles de corte presentan un incremento de 2,5 veces en el riesgo relativo de presentar patología coronaria. En sujetos con concentraciones de LpA-I:A-II sobre los

niveles de corte, el riesgo es 3 veces superior. Todos estos antecedentes, demuestran la existencia de una alteración en los niveles de partículas LpA-I y LpA-I:A-II asociados a enfermedad coronaria, y sugieren fuertemente que la determinación de estas partículas sería una prueba más eficiente que el HDLc para la detección de individuos con riesgo de desarrollar esta enfermedad.

Diferentes investigaciones, han encontrado una gran correlación entre los niveles de los lípidos plasmáticos y las concentraciones de Apo B y Apo A-I(219-220). Tales evidencias coinciden en una disminución significativa a Apo A-I y aumento de la Apo B y rApo B/Apo A-I entre los individuos con hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o HDLc baja, resultados que se esperaban, dado que la Apo B constituye un resumen de todas las partículas aterogénicas Apo B dependientes mientras que la Apo A-I refleja la vía ateroprotectora del metabolismo lipídico al participar activamente en la depuración del colesterol de los tejidos (204).

La reducción de la rHDLc/Apo A-I, se interpreta como un descenso de la eficiencia del transporte reverso del colesterol (TRC) desde los tejidos extrahepáticos, lo cual se refleja en la circulación con partículas de HDL pobres en colesterol esterificado(221). La rHDLc/Apo A-I disminuye significativamente en los individuos mayores de 56 años de edad, dada la disminución de la capacidad de las HDL de los individuos mayores para promover dicho transporte. De igual manera, los participantes con hipertrigliceridemia, muestran una rHDLc/Apo A-I promedio significativamente más baja que aquellos normotriglicéridémicos. El aumento de los triglicéridos se acompaña de una disminución del tamaño de las partículas de HDL, por fallas en la maduración de esta lipoproteína y con ello de la eficacia del TRC(222).

Al secuenciar las conocidas mutaciones naturales en el modelo monomérico de longitud completa de la apoA-I, da una idea del desarrollo de la aterosclerosis a través de la alteración del haz de hélices N-terminal o de la supresión del dominio C-terminal de unión a lípidos. El análisis de secuencias de la apoA-I, sugiere que la alpha-hélice anfipática es el diseño estructural de la apolipoproteína intercambiable. La estructura y función del dominio de apoA-I libre de lípidos son los siguientes: el dominio N-terminal [1-184] forma un haz de hélice, mientras que el dominio C-terminal [185-243] carece en su mayoría de estructura definida y es responsable de iniciar la unión, agregación de lípidos y también está implicado en el eflujo de colesterol. Los primeros 43 residuos

de apoA-I son esenciales para estabilizar la estructura libre de lípidos. Además, la estructura cristalina del dominio C-terminal truncado de la apoA-I, sugiere un mecanismo monómero-dímero mediado a través de la reorganización y dimerización de la hélice-5 durante la formación de HDLc(223).

Algunos autores, han estudiado el efecto dietético en estas apolipoproteínas. En concreto, la ingesta de pan de centeno enriquecido con 2 g/día de esteroides vegetales durante 2 semanas redujo significativamente el Ct y LDLc en suero, la apoB/apoA1 y los ratios de Ct/HDLc un 5,1%, 8,1%, 8,3% y 7,2%, respectivamente, de los sujetos en el estudio de *Soderholm et al.* (224)

Con relación a los niveles de LPA, un único estudio enfocado en valorar los cambios en las concentraciones LPA antes y después de la suplementación con fitoesteroides, sugiere que los fitoesteroides no influyen en las concentraciones de esta partícula(225).

7.CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) La ingesta de 2,24 g de EV suministrados en leche de forma diaria durante 3 semanas, ayudan en el control y manejo de la hipercolesterolemia disminuyendo el colesterol sanguíneo LDLc. La diferencia entre los marcadores basales y finales fueron de $23,7 \pm 23,04$ mg/dl, $21,7 \pm 22,84$ mg/dl, y $23,9 \pm 22,43$ para el CT, el LDL-c, y el colesterol no HDL, respectivamente. Esto supuso una reducción en porcentaje del 9,73%, 12,5%, y 13,2% para el CT, LDL-c, y Colesterol no HDL ($p < 0,001$). Sin sufrir cambios considerables en las fracciones de HDL-c, $1,4 \pm 10,07$ mg/dl para los consumidores en la fase de la leche con esteroides (1,9%), diferencia entre basal y final. Aunque si se encontraron, entre el tratamiento con esteroides y placebo, ya que en el tratamiento del placebo, se incrementó levemente (3,4mg/dl) el HDLc, suponiendo una diferencia entre placebo y esteroides significativa de $p = 0,02$.
- 2) En cuanto a los triglicéridos, las diferencias observadas entre la ingesta de leche con esteroides frente al placebo, no fueron significativas ($p = 0,547$), aunque si se observó una modesta reducción de los TG de $6,8 \pm 54,07$ mg/dl, un 3,15%, entre el basal y el final.
- 3) Se pudo comprobar una relación importante entre el HDLc y ApoA1. Lo cual sucedió tanto en la medida basal como en la final del tratamiento con esteroides vegetales, correlación de Person = 0,846 y 0,903, respectivamente. Observándose una alta dependencia en la regresión lineal ($R^2 = 0,715$ y 0,816, respectivamente). Surgiendo a la ApoA1 como un buen indicador para mejorar el HDLc y con él, una posible modulación del riesgo cardiovascular.
- 4) En base a los resultados, se puede afirmar que una dosis diaria de 2,24 g de esteroides vegetales suministrados en leche, pueden representar una estrategia terapéutica, no farmacológica, de control y manejo de la hipercolesterolemia.

8.LIMITACIONES

LIMITACIONES

Los ensayos clínicos se diseñaron a medida para evitar la mayor parte de sesgos posibles, pero se deben tener en cuenta las siguientes limitaciones que pudiesen perturbar los resultados, como ocurre en otros estudios:

- No hubo un periodo de adaptación a la dieta, ni una dieta homogénea para evitar sesgos, aunque se tuvieron en cuenta los alimentos ingeridos como se describió en la metodología, no se pudo estandarizar a toda la muestra por igual. Además, de existir sujetos con un colesterol basal con un rango amplio.
- Las bioimpedancias usadas fueron 2 diferentes, y a pesar de cumplir con las recomendaciones que cada fabricante establece, especialmente al realizar la medición en ayunas, y la primera hora de la mañana para los análisis de sangre, eran las más propias. Estos equipos miden agua corporal, extrapolando después las proporciones de otros compartimentos, por lo que una variación en la hidratación, puede indicar resultados diferentes de grasas y músculo.
- El periodo de lavado pudo ser insuficiente en los sujetos que empezaron el tratamiento por la leche con esteroides de forma aleatoria, a pesar de haber replicado otros protocolos y la bibliografía al respecto, que indicaba que no deberíamos haber tenido ese efecto de arrastre. Además, no todos los sujetos hicieron exactamente 2 semanas, sino 2 semanas mínimo, pero algunos tuvieron un periodo de descanso superior, según disponibilidad de las siguientes citas. Aun así, se tomaron muestras al inicio y al final de cada periodo de tratamiento, midiendo la efectividad según la diferencia entre ambos (basal-final).

10.BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Global Status Report on noncommunicable diseases 2014. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1
2. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
3. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J.* 2014;7;35(42):2950-9
4. Villar Álvarez F, Banegas Banegas JR, Donado Campos JM, Rodríguez Artalejo F. Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA). Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras 2007. Disponible en: <http://www.searteriosclerosis.org>
5. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte Año 2006. Disponible en: <http://www.ine.es>
6. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte Año 2015. Disponible en: <http://www.ine.es>
7. Hopkins PN, Williams RR, Kuida H, Stults BM, Hunt SC, Barlow GK, Ash KO. Family history as an independent risk factor for incident coronary artery disease in a high-risk cohort in Utah. *Am J Cardiol.* 1988, 1;62(10 Pt 1):703-7.
8. Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet.* 1986, 25;2(8513):933-6.
9. Dawber Tr, Meadors Gf, Moore Fe Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health.* 1951 ;41(3):279-81.
10. Pursnani A, Massaro JM, Hoffmann U. Predicted vs Observed Clinical Event Risk for Cardiovascular Disease-Reply. *JAMA.* 2015, 17;314(19):2082-3.
11. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA.* 2003, 20;290(7):891-7.
12. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after

myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999 16;99(6):779-85.

13. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Et Al; European Society of Cardiology. American Heart Association. American College of Cardiology. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Atherosclerosis*. 2004;173(2):381-91.

14. Ridker PM, Chasman DI, Zee RY, Parker A, Rose L, Cook NR, Buring JE; Women's Genome Health Study Working Group. Rationale, design, and methodology of the Women's Genome Health Study: a genome-wide association study of more than 25,000 initially healthy american women. *Clin Chem*. 2008 ;54(2):249-55

15. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. CARDIoGRAMplusC4D Consortium. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2013;45(1):25-33.

16. Erdmann J, Willenborg C, Nahrstaedt J, Preuss M, König IR, Baumert J, et al. Genome-wide association study identifies a new locus for coronary artery disease on chromosome 10p11.23. *Eur Heart J*. 2011;32(2):158-68.

17. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011, 6;43(4):333-8.

18. Lökvist H, Sjögren M, Höglund P, Engström G, Jern C, Olsson S, et al. Are 25 SNPs from the CARDIoGRAM study associated with ischaemic stroke? *Eur J Neurol*. 2013 Sep;20(9):1284-91.

19. Wain LV, Verwoert GC, O'Reilly PF, Shi G, Johnson T, Johnson AD, et al. Genome-wide association study identifies six new loci influencing pulse pressure and mean arterial pressure. *Nat Genet*. 2011, 11;43(10):1005-11.

20. Bis JC, Kavousi M, Franceschini N, Isaacs A, Abecasis GR, Schminke U, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE consortium identifies common variants associated with carotid intima media thickness and plaque. *Nat Genet*. 2011, 11;43(10):940-7.

21. Lara-Pezzi E, Dopazo A, Manzanares M. Understanding cardiovascular disease: a journey through the genome (and what we found there). *Dis Model Mech.* 2012 ;5(4):434-43.
22. O'Donnell CJ, Nabel EG. Genomics of cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2011, 1;365(22):2098-109.
23. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010;466:707-713
24. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet* 2010;42:579-589
25. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;316:1488-1491
26. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007;316:1491-1493
27. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004, 11-17;364(9438):937-52.
28. Dehghan M, Mente A, Teo KK, Gao P, Sleight P, Dagenais G, et Al; Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global End Point Trial (ONTARGET)/Telmisartan Randomized Assessment Study in ACEI Intolerant Subjects With Cardiovascular Disease (TRANSCEND) Trial Investigators. Relationship between healthy diet and risk of cardiovascular disease among patients on drug therapies for secondary prevention: a prospective cohort study of 31 546 high-risk individuals from 40 countries. *Circulation.* 2012, 4;126 (23): 2705-12.
29. Krone W, Nitschmann S. [Mediterranean diet for primary prevention of cardiovascular diseases : Prevención-con-Dieta-Mediterránea (PREDIMED) Study]. *Internist (Berl).* 2014 ;55(5):607-8.
30. Mann J. Dietary carbohydrate: relationship to cardiovascular disease and disorders of carbohydrate metabolism. *Eur J Clin Nutr.* 2007 ;61 Suppl 1:S100-11.

31. Xu J, Eilat-Adar S, Loria C, Goldbourt U, Howard BV, Fabsitz RR, Zephier EM, Mattil C, Lee ET. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease: the Strong Heart Study. *Am J Clin Nutr.* 2006 ;84(4):894-902.
32. Calder PC. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond).* 2004 ;107(1):1-11.
33. Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, Crowe F, Ward HA, Johnson L, Franco OH, Butterworth AS, Forouhi NG, Thompson SG, Khaw KT, Mozaffarian D, Danesh J, Di Angelantonio E. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2014, 18;160(6):398-406.
34. Al-Khudairy L, Hartley L, Clar C, Flowers N, Hooper L, Rees K. Omega 6 fatty acids for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015, 16;11:CD011094.
35. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. *Curr Atheroscler Rep.* 2010 ;12(6):384-90.
36. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2010 Mar;91(3):502-9.
37. DiNicolantonio JJ, Lucan SC, O'Keefe JH. The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2015 , 14.
38. Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMA.* 1996, 14;275(6):447-51.
39. Wu Y, Qian Y, Pan Y, Li P, Yang J, Ye X, Xu G. Association between dietary fiber intake and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *Clin Nutr.* 2015;34(4):603-11.
40. Vasanthi HR, ShriShriMal N, Das DK. Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease. *Curr Med Chem.* 2012;19(14):2242-51.
41. Morrison AC, Ness RB. Sodium intake and cardiovascular disease. *Annu Rev Public Health.* 2011;32:71-90.

42. Zhang X, Liu C, Guo J, Song Y. Selenium status and cardiovascular diseases: meta-analysis of prospective observational studies and randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr.* 2015, 20.
43. Champagne CM. Magnesium in hypertension, cardiovascular disease, metabolic syndrome, and other conditions: a review. *Nutr Clin Pract.* 2008
44. Mathers TW, Beckstrand RL. Oral magnesium supplementation in adults with coronary heart disease or coronary heart disease risk. *J Am Acad Nurse Pract.* 2009;21(12):651-7.
45. Khan AM, Sullivan L, McCabe E, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. Lack of association between serum magnesium and the risks of hypertension and cardiovascular disease. *Am Heart J.* 2010;160(4):715-20.
46. Wang X, Chen H, Ouyang Y, Liu J, Zhao G, Bao W, Yan M. Dietary calcium intake and mortality risk from cardiovascular disease and all causes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC Med.* 2014, 25;12:158
47. Berger S, Raman G, Vishwanathan R, Jacques PF, Johnson EJ. Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2015 ;102(2):276-94.
48. Wang X, Ouyang Y, Liu J, Zhu M, Zhao G, Bao W, Hu FB. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ.* 2014,29;349:g4490.
49. Zhan J, Liu YJ, Cai LB, Xu FR, Xie T, He QQ. Fruit and Vegetable Consumption and Risk of Cardiovascular Disease: a Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015, 26:0
50. Lissa EM, Ferns GA. Dietary Fruits and Vegetables and Cardiovascular Diseases Risk. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015, 20:0.
51. Huang T, Xu M, Lee A, Cho S, Qi L. Consumption of whole grains and cereal fiber and total and cause-specific mortality: prospective analysis of 367,442 individuals. *BMC Med.* 2015, 24;13:59.
52. Bernstein AM, Titgemeier B, Kirkpatrick K, Golubic M, Roizen MF. Major cereal grain fibers and psyllium in relation to cardiovascular health. *Nutrients.* 2013, 29;5(5):1471-87.

53. Flight I, Clifton P. Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr.* 2006 ;60(10):1145-59.
54. Rice BH. Dairy and Cardiovascular Disease: A Review of Recent Observational Research. *Curr Nutr Rep.* 2014,15;3:130-138.
55. Kratz M, Baars T, Guyenet S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *Eur J Nutr.* 2013;52(1):1-24.
56. Raatz SK, Silverstein JT, Jahns L, Picklo MJ. Issues of fish consumption for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrients.* 2013, 28;5(4):1081-97.
57. Luo C, Zhang Y, Ding Y, Shan Z, Chen S, Yu M, Hu FB, Liu L. Nut consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2014;100(1):256-69.
58. Martínez-González MA, Dominguez LJ, Delgado-Rodríguez M. Olive oil consumption and risk of CHD and/or stroke: a meta-analysis of case-control, cohort and intervention studies. *Br J Nutr.* 2014,28;112(2):248-59.
59. De Gaetano G, Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB. A meta-analysis of studies on wine and beer and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32(5-6):353-5.
60. Bos S, Grobbee DE, Boer JM, Verschuren WM, Beulens JW. Alcohol consumption and risk of cardiovascular disease among hypertensive women. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2010 ;17(1):119-26.
61. Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients.* 2012;4(7):759-81.
62. Vasanthi HR, Parameswari RP. Indian spices for healthy heart - an overview. *Curr Cardiol Rev.* 2010;6(4):274-9. *J Nutr.* 2006;136(3 Suppl):736S-740S.
63. Ahman K, Lowe GM. Garlic and cardiovascular disease: a critical review. *J Nutr.* 2006 ;136(3 Suppl):736S-740S.
64. Mirzabeigi P, Mohammadpour AH, Salarifar M, Gholami K, Mojtahedzadeh M, Javadi MR. The Effect of Curcumin on some of Traditional and Non-traditional Cardiovascular Risk Factors: A Pilot Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Iran J Pharm Res.* 2015 Spring;14(2):479-86.

65. Kannel WB. Habitual level of physical activity and risk of coronary heart disease: the Framingham study. *Can Med Assoc J.* 1967, 25;96(12):811-2.
66. Kwok CS, Anderson SG, Myint PK, Mamas MA, Loke YK. Physical activity and incidence of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2014;15;177(2):467-76.
67. Ashor AW, Lara J, Siervo M, Celis-Morales C, Mathers JC. Effects of exercise modalities on arterial stiffness and wave reflection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2014, 15;9(10):e110034.
68. Montero D, Roche E, Martinez-Rodriguez A. The impact of aerobic exercise training on arterial stiffness in pre- and hypertensive subjects: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2014;15;173(3):361-8.
69. Merlotti C, Morabito A, Pontiroli AE. Prevention of type 2 diabetes; a systematic review and meta-analysis of different intervention strategies. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16(8):719-27.
70. Biswas A, Oh PI, Faulkner GE, Bajaj RR, Silver MA, Mitchell MS, Alter DA. Sedentary time and its association with risk for disease incidence, mortality, and hospitalization in adults: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2015, 20;162(2):123-32.
71. Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM. Cigarette smoking and risk of coronary heart disease. Epidemiologic clues to pathogenesis. The Framingham Study. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1968;28:9-20.
72. Lacovelli R, Verri E, Cossu Rocca M, Aurilio G, Cullurà D, De Cobelli O, Nolè F. The incidence and relative risk of cardiovascular toxicity in patients treated with new hormonal agents for castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer.* 2015;51(14):1970-7.
73. Braire-Bourrel M, Augey F, Doutre MS. [drugs-induced urticaria and angioedema]. *Rev Prat.* 2015;65(7):972-6.
74. Tam-Slob MC, Lambalk CB, van de Ree MA. Contraceptive and hormonal treatment options for women with history of venous thromboembolism. *BMJ.* 2015, 8;351:h4847.
75. Kannel WB, LeBauer EJ, Dawber TR, McNamara PM. Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham study. *Circulation.* 1967;35(4):734-44.

76. Wang ZJ, Zhou YJ, Galper BZ, Gao F, Yeh RW, Mauri L. Association of body mass index with mortality and cardiovascular events for patients with coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Heart*. 2015;101(20):1631-8.
77. Kannel Wb, Dawber Tr, Friedman Gd, Glennon We, Mcnamara Pm. Risk factors in coronary heart disease. An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease; the FRAMINGHAM STUDY. *Ann Intern Med*. 1964 ;61:888-99
78. Thomas HE Jr, Kannel WB, Dawber TR, McNamara PM. Cholesterol-phospholipid ratio in the prediction of coronary heart disease. The Framingham study. *N Engl J Med*. 1966, 31;274(13):701-5.
79. Collins TC, Jones PH. Statin therapy: is the percent reduction or the attained low-density lipoprotein cholesterol level more important? *Curr Atheroscler Rep*. 2007;9(1):10-7.
80. ENRICA: Guallar-Castillón P, Gil-Montero M, León-Muñoz LM, Graciani A, Bayán-Bravo A, Taboada JM, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Magnitude and management of hypercholesterolemia in the adult population of Spain, 2008-2010: The ENRICA Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(6):551-8.
81. Civeira F; International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2004;173(1):55-68.
82. Genest J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J Inherit Metab Dis*. 2003;26(2-3):267-87.
83. Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) 2002 (Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/>)
84. Ros E. Coordinador. 2015. Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta. FESNAD. Disponible en: http://www.fesnad.org/resources/files/Publicaciones/Consenso_sobre_las_grasas_y_aceites_2015.pdf
85. Palou A, Pico C, Bonet ML, Oliver P, Serra F, Rodríguez AM, Ribot J. 2005. El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación. Barcelona: Instituto Flora; Barcelona.

86. Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* 1986;128:3-41
87. Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. 2000. *Biochemistry.* San Francisco, CA:Addison Wesley Longman, Inc.
88. Keaney, JF, Jr. Atherosclerosis: From lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 2000; 21: 99-166.
89. Llorente, V, Badimón, L. Cellular and molecular bases of cholesterol accumulation in the vascular wall and its contribution to the progression of atherosclerotic lesion. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51: 633-641.
90. Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963-20966.
91. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.
92. Davies, MJ. Anatomic features in victims of sudden coronary death. Coronary artery pathology. *Circulation* 1992; 85(Suppl. 1): I19-24.
93. Williams, KJ, Tabas, I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 551-561.
94. Williams, KJ, Tabas, I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 471-474.
95. Peñalvo JL, Oliva B, Sotos-Prieto M, Uzhova I, Moreno-Franco B, León-Latre M et al. La mayor adherencia a un patrón de dieta mediterránea se asocia a una mejora del perfil lipídico plasmático: la cohorte del *Aragon Health Workers Study*. *Rev Esp Cardiol.* 2015; 68:290-7.
96. Gylling H, Plat J, Turley S, Ginsberg HN, Ellegård L, Jessup W et al. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2014; 232(2):346-60.
97. Ostlund RE Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:533-49
98. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res.* 2002;41(6):457-500
99. Matthan NR, Zhu L, Pencina M, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Sex-specific differences in the predictive value of cholesterol homeostasis markers and

- 10-year cardiovascular disease event rate in Framingham offspring study participants. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(1): e005066.
100. Rocha M, Banuls C, Bellod L, Jover A, Victor VM, Hernandez-Mijares A. A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(36):4061-75.
101. Ntanios, FY, Duchateau, GS. A healthy diet rich in carotenoids is effective in maintaining normal blood carotenoid levels during the daily use of plant sterolenriched spreads. *Int J Vitam Nutr Res* 2002; 72: 32-39.
102. Miettinen TA. Cholesterol absorption inhibition: a strategy for cholesterol-lowering therapy. *Int J Clin Pract.* 2001; 55:710–6.
103. Malinowski J, Gehret M. Phytosterols for dyslipidemia. *Am J Health Syst Pharm* 15, 2010.67:1165-1173
104. Scientific-Committee-on-Food. Opinion on applications for approval of a variety of plant sterol-enriched foods. Opinion adopted by the Scientific Committee on Food on 5 March, 2003. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out174_en.pdf. 2003a.
105. Weststrate, JA, Ayyesh, R, Bauer-Plank, C, Drewitt, PN. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 1063-1071.
106. Turnbull, D, Whittaker, MH, Frankos, VH, Jonker, D. 13-week oral toxicity study with stanol esters in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 29(2 Pt 1): 216-226.
107. Valenzuela B, Ronco M. Fitoesteroles y Fitoestanoles: aliados naturales para la proteccion de la salud cardiovascular. *Rev chil nutr* 2004.31: 161-169.
108. Ostlund RE, Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 533-49.
109. Wlodarek D. [The mechanisms of blood LDL-cholesterol lowering by phytosterols-a review]. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2007; 58: 47-51.
110. Bhattacharyya AK. Uptake and esterification of plant sterols by rat small intestine. *Am J Physiol* 1981; 240: G50-5.
111. Duan LP, Wang HH, Wang DQ. Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice. *J Lipid Res* 2004; 45: 1312-23.

112. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000; 290: 1771-5.
113. Robins S, Fasulo J. High density lipoprotein, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *J Clin Invest* 1997. 99: 380-384.
114. Fernández-García, E., Carvajal-Lerida, I., Pérez-Gálvez, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 2009, 29, 751-760.
115. Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J, Jones PJ. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev.* 2006;64(9):385-402.
116. Corella D. Genomica nutricional. *Alim Nutri Salud.* 2007. Vol.14 N°4, pp.89-101
117. Ling WH, Jones PJ. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.* 1995;57(3):195-206.
118. Talati R, Sobieraj DM, Makanji SS, Phung OJ, Coleman CI. The comparative efficacy of plant sterols and stanols on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(5):719-26.
119. Mannu GS, Zaman MJ, Gupta A, Rehman HU, Myint PK. Evidence of lifestyle modification in the management of hypercholesterolemia. *Curr Cardiol Rev.* 2013,1;9(1):2-14.
120. Genser B, Silbernagel G, De Backer G, Bruckert E, Carmena R, Chapman MJ, Deanfield J, et Al. Plant sterols and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J.* 2012;33(4):444-51
121. Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Meijer L, Zock PL, Geleijnse JM, Trautwein EA. The effect of plant sterols on serum triglyceride concentrations is dependent on baseline concentrations: a pooled analysis of 12 randomised controlled trials. *Eur J Nutr.* 2013;52(1):153-60
122. Musa-Veloso K, Poon TH, Elliot JA, Chung C. A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2011;85(1):9-28.

- 123.Scholle JM, Baker WL, Talati R, Coleman CI. The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Nutr.* 2009;28(5):517-24.
- 124.Talati R, Sobieraj DM, Makanji SS, Phung OJ, Coleman CI. The comparative efficacy of plant sterols and stanols on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(5):719-26.
- 125.Wu T, Fu J, Yang Y, Zhang L, Han J. The effects of phytosterols/ stanols on blood lipid profiles: a systematic review with meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2009;18(2):179-86
- 126.Niittynen LH, Jauhiainen TA, Poussa TA, Korpela R. Effects of yoghurt enriched with free plant sterols on the levels of serum lipids and plant sterols in moderately hypercholesterolaemic subjects on a high-fat diet. *Int J Food Sci Nutr.* 2008;59(5):357-67.
- 127.Decisión 2004/334/CE de la Comisión de 31 de marzo de 2004 con arreglo al Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* L105, 43-45.
- 128.Olalde I, Schroeder H, Sandoval-Velasco M, Vinner L, Lobón I, Ramirez O, et Al. A Common Genetic Origin for Early Farmers from Mediterranean Cardial and Central European LBK Cultures. *Mol Biol Evol.* 2015;32(12):3132-42.
- 129.Kamal-Edin, A., Moazzami, A. Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering ingredients in functional foods. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 2009., 1, 1-14.
- 130.Fernandes, P., Cabral, J.M.S. Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technol.*, 2007. 98, 2335-2350
- 131.EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to plant sterols and plant stanols and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 549, 550, 567, 713, 1234, 1235, 1466, 1634, 1984, 2909, 3140), and maintenance of normal prostate size and normal urination (ID 714, 1467, 1635) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal.* 2010; 8(10):1813.
- 132.Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ausman LM, Ordovas JM, Clevidence BA, Judd JT, et al. Individual variability in lipoprotein cholesterol response to National Cholesterol Education Program Step 2 diets. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 823-30.

133. Casas-Agustench P, Serra M, Pérez-Heras A, Cofán M, Pintó X, Trautwein EA, Ros E. Effects of plant sterol esters in skimmed milk and vegetable-fat-enriched milk on serum lipids and non-cholesterol sterols in hypercholesterolaemic subjects: a randomised, placebo-controlled, crossover study. *Br J Nutr.* 2012;107(12):1766-75.
134. Cleghorn CL, Skeaff CM, Mann J, Chisholm A. Plant sterol-enriched spread enhances the cholesterol-lowering potential of a fat-reduced diet. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57(1):170-6.
135. Stalenhoef AF, Hectors M, Demacker PN. Effect of plant sterol-enriched margarine on plasma lipids and sterols in subjects heterozygous for phytosterolaemia. *J Intern Med.* 2001 ;249(2):163-6.
136. Acuff RV, Cai DJ, Dong ZP, Bell D. The lipid lowering effect of plant sterol ester capsules in hypercholesterolemic subjects. *Lipids Health Dis.* 2007, 9;6:11.
137. AbuMweis SS, Vanstone CA, Ebine N, Kassis A, Ausman LM, Jones PJ, Lichtenstein AH. Intake of a single morning dose of standard and novel plant sterol preparations for 4 weeks does not dramatically affect plasma lipid concentrations in humans. *J Nutr.* 2006;136(4):1012-6.
138. Mussner MJ, Parhofer KG, Von Bergmann K, Schwandt P, Broedl U, Otto C. Effects of phytosterol ester-enriched margarine on plasma lipoproteins in mild to moderate hypercholesterolemia are related to basal cholesterol and fat intake. *Metabolism.* 2002 ;51(2):189-94.
139. Kwiterovich O, Shirley C, Donna G. Virgil, Amy Schweitzer, Arnold D, Kratz E. Response of obligate heterozygotes for phytosterolemia to a low-fat diet and to a plant sterol ester dietary challenge Peter. *J Lipid Res.* . 2003;44(6):1143-1155.
140. Lau VW, Journoud M, Jones PJ. Plant sterols are efficacious in lowering plasma LDL and non-HDL cholesterol in hypercholesterolemic type 2 diabetic and nondiabetic persons. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(6):1351-8.
141. Encuesta Nacional de Salud. (2011). Disponible en <http://www.msps.es>.
142. Lugo, A., García, G., Gómez, R. (2006). Confiabilidad del cuestionario de calidad de vida en salud SF-36 en Medellín, Colombia. *Rev de la Facultad Nacional de Salud Pública*, 24(2), 37-50.

143. Jiménez LG, Martín-Moreno JM. Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario. In: *Nutrición y Salud Pública – Métodos, bases científicas y aplicaciones*, ed. LI Serra, J Aranceta, pp. 120-125 España: MASSON, 2006.
144. Ruiz Comellas A, Pera G, Baena Díez JM, Mundet Tudurí X, Alzamora Sas T, Elosua R, et Al. [Validation of a Spanish Short Version of the Minnesota Leisure Time physical Activity Questionnaire (VREM)]. *Rev Esp Salud Publica*. 2012;86(5):495-508.
145. Wojczynski MK, Glasser SP, Oberman A, Kabagambe EK, Hopkins PN, Tsai MY, et Al. High-fat meal effect on LDL, HDL, and VLDL particle size and number in the Genetics of Lipid-Lowering Drugs and Diet Network (GOLDN): an interventional study. *Lipids Health Dis*. 2011,18;10:181.
146. Portao, J, Bescós R, Irurtia A, Cacciatori E, Vallejo L. Valoración de la grasa corporal en jóvenes físicamente activos: antropometría vs bioimpedancia. *Nutr Hosp*. 2009 Sep-Oct;24(5):529-34
147. WHO. Waist circumference and waist-hip ratio: World Health Organization; 2008. Disponible en:
http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_report_waistcircumference_and_waisthip_ratio/en/
148. Durnin JVGA, Fidanza F. Evaluation of nutritional status. *Bibl Nutr Dieta* 1985; 35: 20-30.
149. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem*. 1995; 41(5):717-23.
150. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem*. 1973; 19(5):476-82.
151. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974; 20(4):470-5.
152. Darling KW, Ackerman SL, Hiatt RH, Lee SS, Shim JK. Enacting the molecular imperative: How gene-environment interaction research links bodies and environments in the post-genomic age. *Soc Sci Med*. 2016, 9;155:51-60.
153. Callow J, Summers LK, Bradshaw H, Frayn KN. Changes in LDL particle composition after the consumption of meals containing different amounts and types of fat. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(2):345-50.

154. Durán Agüero S, Torres García J, Sanhueza Catalán J. Consumo de queso y lácteos y enfermedades crónicas asociadas a obesidad, ¿amigo o enemigo? *Nutr Hosp.* 2015; 32(1):61-68.
155. De Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T, Uleryk E, et Al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ.* 2015; 11;351:h3978.
156. Rice BH. Dairy and Cardiovascular Disease: A Review of Recent Observational Research. *Curr Nutr Rep.* 2014; 15(3):130-138.
157. Juárez Iglesias M, de la Fuente Layos MÁ, Fontecha Alonso J. The nutrients of the milk on cardiovascular health. *Nutr Hosp.* 2015; 31(2):26-32.
158. Joo NS, Yang SW, Park SJ, Choi SJ, Song BC, Yeum KJ. Milk Consumption and Framingham Risk Score: Analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey Data (2008-2011). *Yonsei Med J.* 2016; 57(1):197-202.
159. Merino J, Masana L, Guijarro C, Ascaso J, Lagares M, Civeira F. Recommendations for clinical use of food enriched phytosterols/phytosterols handling hypercholesterolemia. *Clin Investig Arterioscler.* 2014; 26(3):147-58.
160. Calpe-Berdiel L, Méndez-González J, Blanco-Vaca F, Carles Escolà-Gil J. Increased plasma levels of plant sterols and atherosclerosis: a controversial issue. *Curr Atheroscler Rep.* 2009; 11(5):391-8.
161. Weingärtner O, Böhm M, Laufs U. Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *Eur Heart J.* 2009; 30(4):404-9.
162. Baumgartner S, Mensink RP, Konings M, Schött HF, Friedrichs S, Husche C, Lütjohann D, Plat J. Postprandial plasma oxyphytosterol concentrations after consumption of plant sterol or stanol enriched mixed meals in healthy subjects. *Steroids.* 2015; 99(Pt B):281-6.
163. Santosa S, Varady KA, AbuMweis S, Jones PJ. Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Sci.* 2007; 80:505e14.
164. Ras RT, Koppenol WP, Garczarek U, Otten-Hofman A, Fuchs D, Wagner F, Trautwein EA. Increases in plasma plant sterols stabilize within four weeks of plant

sterol intake and are independent of cholesterol metabolism. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2015; 1-8.

165.Otero-Raviña F, Grigorian-Shamagian L, Blanco Rodríguez R, Gómez Vázquez JL, Fernández Villaverde JM, González-Juanatey JR. Changes in lipid profile after regular intake of canned fish. The influence of addition of isoflavones, omega-3 fatty acids and fitosterols. *Med Clin (Barc)*. 2007; 129(3):81-5.

166.Talati R, Sobieraj DM, Makanji SS, et al. The comparative efficacy of plant sterols and stanols on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *J Am Diet Assoc*. 2010; 110, 719-726.

167.Mensink RP, de Jong A, Lutjohann D, et al. Plant stanols dose-dependently decrease LDL-cholesterol concentrations, but not cholesterol-standardized fat-soluble antioxidant concentrations, at intakes up to 9 g/d. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92:24–33.

168.Gylling H, Hallikainen M, Nissinen MJ, et al. Very high plant stanol intake and serum plant stanols and non-cholesterol sterols. *Eur J Nutr*. 2010; 49:111–117.

169.Davidson MH, Maki KC, Umporowicz DM, et al. Safety and tolerability of esterified phytosterols administered in reduced-fat spread and salad dressing to healthy adult men and women. *J Am Coll Nutr*. 2001; 20:307–319.

170.Nguyen TT. The cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *J. Nutr*. 1999; 129:2109–2112.

171.de Smet E, Mensink RP, Plat J. Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: suggested mechanisms from past to present. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56:1058e72.

172.Ramprasath VR, Jenkins DJA, Lamarche B, Kendall CWC, Faulkner D, Cermakova L, et al. Consumption of a dietary portfolio of cholesterol lowering foods improves blood lipids without affecting concentrations of fat soluble compounds. *Nutrition Journal*. 2014; 13:101.

173.Simonen P, Stenman UH, Gylling H. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 concentration is not increased by plant stanol ester consumption in normo- to moderately hypercholesterolaemic non-obese subjects. The BLOOD FLOW intervention study. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 129(5):439-46.

174. Lees AM, Mok HY, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: Clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis*. 1977; 28:325-38.
175. Heinemann T, Leiss O, von Bergmann K. Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1986; 61:219-23.
176. Castellanos-Jankiewicz A, Del Bosque-Plata L, Tejero ME. Combined effect of plant sterols and dietary fiber for the treatment of hypercholesterolemia. *Plant Foods Hum Nutr*. 2014; 69(2):93-100.
177. Ras RT, Geleijnse JM, Trautwein EA. LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Br J Nutr*. 2014; 112(2):214-9.
178. Sun J, Xu D, Xie H, Wang Y, Chen M, Chang X, et al. Low fat milk powder containing esterified plant sterols improves the blood lipid profile of adults with hypercholesterolemia. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2014; 42(7):588-92.
179. Calvo Romero JM, Lima Rodriguez EM. "Natural" treatments of hypercholesterolemia. *Rev Clin Esp*. 2006; 206(10):504-6.
180. Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R; Stresa Workshop Participants. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78(8):965-78.
181. Sudhop T, Gottwald BM and von Bergmann K. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism*. 2002; 51:1519–21.
182. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific opinion on the safety of stigmasterol-rich plant sterols as food additive. *EFSA J*. 2012; 10:2659.
183. Berge KE. Sitosterolemia: a gateway to new knowledge about cholesterol metabolism. *Ann Med*. 2003;35(7):502-11.
184. Hendriks HF, Brink EJ, Meijer GW, Princen HM, Ntanos FY. Safety of long-term consumption of plant sterol esters-enriched spread. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57:681e92.
185. Langella C, Naviglio D, Marino M, Gallo M. Study of the effects of a diet supplemented with active components on lipid and glycemic profiles. *Nutrition*. 2015; 31(1):180-6.

186. Plat J, van Onselen RN, van Heugten M, et al. Effects on serum lipids, lipoproteins, and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54:671–7.
187. Plat J, Baumgartner S, Mensink RP. Mechanisms Underlying the Health Benefits of Plant Sterol and Stanol Ester Consumption. *J AOAC Int.* 2015; 98(3):697-700.
188. Abumweis SS, Barake R, Jones PJ. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res.* 2008; 52.
189. Naumann E, Plat J, Kester AD, Mensink RP. The baseline serum lipoprotein profile is related to plant stanol induced changes in serum lipoprotein cholesterol and triacylglycerol concentrations. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(1):117-26.
190. Mackay DS, Gebauer SK, Eck PK, Baer DJ, Jones PJ. Lathosterol-to-cholesterol ratio in serum predicts cholesterol-lowering response to plant sterol consumption in a dual-center, randomized, single-blind placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2015; 101(3):432-9.
191. Jones PJ. Inter-individual Variability in Response to Plant Sterol and Stanol Consumption. *J AOAC Int.* 2015; 98(3):724-8.
192. Mackay DS, Eck PK, Gebauer SK, Baer DJ, Jones PJ. CYP7A1-rs3808607 and APOE isoform associate with LDL cholesterol lowering after plant sterol consumption in a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2015; 102(4):951-7.
193. Myrie SB, Mymin D, Triggs-Raine B, Jones PJ. Serum lipids, plant sterols, and cholesterol kinetic responses to plant sterol supplementation in phytosterolemia heterozygotes and control individuals. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(4):837-44.
194. Garoufi A, Vorre S, Soldatou A, Tsentidis C, Kossiva L, Drakatos A, et al. Plant sterols-enriched diet decreases small, dense LDL-cholesterol levels in children with hypercholesterolemia: a prospective study. *Ital J Pediatr.* 2014; 40: 42.
195. Amir Shaghghi M, Abumweis SS, Jones PJ. Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols/stanols provided in capsule and tablet formats: results of a systematic review and meta-analysis. *J Acad Nutr Diet.* 2013; 113(11):1494-503.
196. Derdemezis CS, Filippatos TD, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Review article: effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2010; 15(2):120-34.

197. McKenny JM, Jenks BH, Shneyvas E, Brooks JR, Shenoy SF, Cook CM, et al. A softgel dietary supplement containing esterified plant sterols and stanols improves the blood lipid profile of adults with primary hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled replication study. *J Acad Nutr Diet*. 2014; 114(2):244-9.
198. Sialvera TE, Pounis GD, Koutelidakis AE, Richter DJ, Yfanti G, Kapsokefalou M, et al. Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012; 22:843-8.
199. Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Meijer L, Zock PL, Geleijnse JM, Trautwein EA. The effect of plant sterols on serum triglyceride concentrations is dependent on baseline concentrations: a pooled analysis of 12 randomised controlled trials. *Eur J Nutr*. 2013 ;52(1):153-60.
200. Sialvera TE, Pounis GD, Koutelidakis AE, Richter DJ, Yfanti G, Kapsokefalou M, Goumas G, Chiotinis N, Diamantopoulos E, Zampelas A. Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(10):843-8.
201. Ras RT, Demonty I, Zebregs YE, Quadt JF, Olsson J, Trautwein EA. Low Doses of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid From Fish Oil Dose-Dependently Decrease Serum Triglyceride Concentrations in the Presence of Plant Sterols in Hypercholesterolemic Men and Women^{1,2,3}. *J Nutr*. 2014; 144(10):1564-1570.
202. Calvo C, Olmos A, Ulloa N, Bustos A, Toledo L, Duran D, et al. *Lipoprotein particles LpA-I, LpA-I: A-II and LpB in patients with coronary artery disease*. *Rev Med Chile*. 2000; 128(1):9-16.
203. Berroguí H, Momo C, Khalil A (2012) Healthy benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases. *J Lipid Res* (6); 524-533.
204. Ruiz N, Castillo V, Colina F, Espinoza M, Leal U, Gonzalez JC. Cardiovascular risk factors and apolipoprotein profile in a group of adults treated in a public health center in Carabobo state, Venezuela. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011; 28(2):247-55.
205. Fernández V, Morales LM, Molero-Conejo E, Casanova A, Campos G, Raleigh X, et al. Levels of apoproteins B, A1 and CIII as markers for cardiovascular risk in lean and obese adolescents. *Invest Clin*. 2004; 45(1):29-42.

206. Collins M, Varady KA, Jones PJ (2007) Modulation of apolipoprotein A1 and B, adiponectin, ghrelin, and growth hormone concentrations by plant sterols and exercise in previously sedentary humans. *Can J Physiol Pharmacol* 85(9): 903-10.
207. Sialvera TE, Pounis GD, Koutelidakis AE, Richter DJ, Yfanti G, Kapsokefalou M et al. (2012) Phytosterols supplementation decreases plasma small and dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22 (10): 843-8.
208. Olson EJ1, Pearce GL, Jones NP, Sprecher DL (2012) Lipid effects of peroxisome proliferator-activated receptor- δ agonist GW501516 in subjects with low high-density lipoprotein cholesterol: characteristics of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32 (9): 2289-94.
209. Colgan HA, Floyd S, Noone EJ, Gibney MJ, Roche HM. Increased intake of fruit and vegetables and a low-fat diet, with and without low-fat plant sterolenriched spread consumption: effects on plasma lipoprotein and carotenoid metabolism. *J Hum Nutr Diet* 2004. 17: 561-569.
210. Madsen MB, Jensen AM, Schmidt EB. The effect of a combination of plant sterol-enriched foods in mildly hypercholesterolemic subjects. *Clin Nutr.* 2007; 26:792-798.
211. AbuMweis SS, Vanstone CA, Ebine N, Kassis A, Ausman LM, Jones PJ, Lichtenstein AH. Intake of a single morning dose of standard and novel plant sterol preparations for 4 weeks does not dramatically affect plasma lipid concentrations in humans. *J Nutr.* 2006; 136: 1012-1016.
212. Gomez P, Perez-Martinez P, Marin C, Camargo A, Yubero-Serrano EM, Garcia-Rios A et al. (2010) APOA1 and APOA4 gene polymorphisms influence the effects of dietary fat on LDL particle size and oxidation in healthy young adults. *J Nutr.* 140(4): 773-8.
213. Helgadottir A, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Holm H, Patel RS, Gudnason T, et al. Apolipoprotein(a) genetic sequence variants associated with systemic atherosclerosis and coronary atherosclerotic burden but not with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol.* 2012,21;60(8):722-9.
214. Hosseini-Esfahani F, Mirmiran P, Daneshpour MS, Mehrabi Y, Hedayati M, Soheilian-Khorzoghi M, Azizi F. Dietary patterns interact with APOA1/APOC3 polymorphisms to alter the risk of the metabolic syndrome: the Tehran Lipid and Glucose Study. *Br J Nutr.* 2015, 28;113(4):644-53.

- 215.Lee S, Joo H, Kim CT, Kim IH, Kim Y. High hydrostatic pressure extract of garlic increases the HDL cholesterol level via up-regulation of apolipoprotein A-I gene expression in rats fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis.* 2012; 19;11:77.
- 216.Puchois P, kandoussi A, Fievet P, Fourier JL, Bertrand M, Koren E, Fruchart JC. Apolipoprotein a-i containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 1987; 68: 35-40.
- 217.Coste-Burel M, Mainard F, Chivot L, Auget JL, Madec Y. Study of lipoprotein particles LpAI and LpAI:AI in patients before coronary bypass surgery. *Clin Chem.* 1990; 36: 1889-91.
- 218.Fruchart JC, Aihlaud G. Apolipoprotein A-containing lipoprotein particles: physiological role, quantification, and clinical significance. *Clin Chem.* 1992; 38: 793-7.
- 219.Riediger ND, Bruce SG, Young TK. Cardiovascular risk according to plasma apolipoprotein and lipid profiles in a Canadian First Nation. *Prev Chronic Dis.* 2011; 8(1):A05.
- 220.Krittayaphong R, Chotinaiwatarakul C, Kangkagate C, Bhuripanyo K, Mahanonda N. The association of apolipoprotein B and low density lipoprotein with cardiovascular risk factors in the Thai population. *J Med Assoc Thai.* 2006; 89(5):S1-7.
- 221.Espondaburu OR. Hipertrigliceridemia: influencia sobre parámetros que estiman el transporte reverso del colesterol. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2006; 40(2):165-72.
- 222.Tian L, Xu Y, Fu M, Peng T, Liu Y, Long S. The impact of plasma triglyceride and apolipoproteins concentrations on high-density lipoprotein subclasses distribution. *Lipids Health Dis.* 2011; 10:17.
- 223.Meï X, Atkinson D. Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure: Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res.* 2015; 46(5):351-60.
- 224.Söderholm PP, Alfthan G, Koskela AH, Adlercreutz H, Tikkanen MJ. The effect of high-fiber rye bread enriched with nonesterified plant sterols on major serum lipids and apolipoproteins in normocholesterolemic individuals. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012; 22(7):575-82.
- 225.Plat J, Mensink RP. Vegetable oil based versus wood based stanol ester mixtures: Effects on serum lipids and hemostatic factors in non-hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis.* 2000; 148:101-12.

ANEXOS

ANEXO 1. CONFIRMACIÓN APROBACIÓN POR EL CEIC ENSAYOS 1 Y 2



**Informe Dictamen Protocolo Favorable
EECC con Medicamento – Unicéntrico/Local**

C.P. - N.E. - - - C.I. 12/233

13 de junio de 2012

CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dra. Mar García Arenillas
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión correspondiente al acta 6.1/12 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

Título: *"Uso de leches enriquecidas con fitoesteroles como estrategia de reducción de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en población joven adulta"*

Código Interno: 12/233

Promotor: Cátedra Extraordinaria UCM-CLAS de Investigación y Formación en Nutrición y Educación para la Salud.

Investigador: Dr. Luis Rodolfo Collado Yurrita

2º. Considera que:

- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

4º. Este CEIC acepta que dicho ensayo sea realizado en:

CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dr. Luis Rodolfo Collado Yurrita
Departamento de Nutrición y Educación para la Salud. Facultad de
Medicina. *Universidad Complutense de Madrid*

Lo que firmo en Madrid, a 13 de junio de 2012

Dra. Mar García Arenillas
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

**D^a. ROCÍO LAYUNTA, SECRETARIA DEL COMITÉ ETICO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE
HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID**

CERTIFICA

Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado:

**“ESTUDIO SOBRE EL CONSUMO DE LECHE ENRIQUECIDAS CON
FITOESTEROLES Y LA REDUCCIÓN DE FACTORES DE RIESGO DE
ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN POBLACIÓN JOVEN ADULTA.”**

del que es Investigador Principal el Dr. Javier Andrés Blumenfeld Olivares,
Servicio de Pediatría. Hospital El Escorial, considerando que su planteamiento
global es aceptable desde el punto de vista metodológico y ético. Acta nº 301.

En Majadahonda, a 24 de julio de 2014



**Hospital Universitario
Puerta de Hierro
Majadahonda**
SaludMadrid
Comunidad de Madrid
Comité Ético de Investigación
Clínica

Fdo.: D^a. Rocío Layunta
Secretaria del CEIC

ANEXO 2: HOJA INFORMACIÓN AL PACIENTE (HIP)



Cátedra Extraordinaria UCM - CLAS
de formación e investigación en
nutrición y educación para la salud



TITULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “Uso de leches enriquecidas con Fitoesteroles como estrategia de reducción de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en población joven-adulta”

Introducción.

El uso de esteroides vegetales se ha evidenciado científicamente como componentes que modulan el colesterol, disminuyendo el riesgo de enfermedad cardiovascular.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El objetivo principal es determinar mediante el análisis de resultados del estudio el uso de una leche enriquecida en fitoesteroides para la disminución de marcadores de ECV (colesterol y triglicéridos) en población joven adulta.

¿Quién puede participar en el estudio?

La participación, va destinada a todos aquellos voluntarios, hombres o mujeres de edad comprendida entre 18 y 45 años. Los voluntarios se clasificarán en función de sus hábitos de consumo de leche del estudio, en dos posibles grupos.

¿En qué consistirá participar en el estudio?

El estudio consiste en hacer una evaluación de la variación en el perfil lipídico y riesgo cardiovascular, tras la ingesta durante un tiempo controlado de leche enriquecida en esteroides vegetales.

¿Cuáles son los riesgos potenciales de su participación en este estudio?

La participación en el estudio no entraña riesgo alguno.

¿Cuáles son los beneficios de su participación?

El estudio, podrá proporcionar evidencias de los posibles efectos beneficiosos para la salud del consumo de leches enriquecidas con esteroides vegetales. A nivel particular, los voluntarios que lo deseen, obtendrán como beneficio un informe con el resultado de los análisis que se les realicen y de los resultados del estudio.

¿Se mantendrá la confidencialidad de su participación en este estudio?

En todo momento se mantendrá la confidencialidad de sus datos y siempre respetando la ley de protección de datos vigente en España (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre). Los

resultados del estudio podrán ser publicados, pero no se hará referencia a su nombre ni tampoco se le identificará y los datos referenciados no permitirán remontar hasta Ud.

¿Quién ha revisado el estudio?

El estudio ha sido revisado por representantes del Hospital Universitario Clínico San Carlos.

Contacto para información adicional

Si tiene cualquier problema, dudas o cualquier pregunta acerca de este estudio, debe contactar con:

Dr. Luis Collado Yrrutia ó Ismael San Mauro Martín

Cátedra UCM-CLAS.

Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040. Madrid

TF: 913941263 (Luis); 617765976 (Ismael).

e-mail: lcollado@med.ucm.es ; ismael.sanmauro@pdi.ucm.es

ANEXO 3. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación médica

Título del estudio: "Uso de Leches enriquecidas con Fitoesteroles como estrategia de reducción de Factores de Riesgo de enfermedad cardiovascular en población joven-adulta"

Investigador _____

Sede donde se realizará el estudio: Madrid

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación científica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender todas las características del mismo. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno ni recibirá retribución económica por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Los objetivos del mismo son: la valoración del consumo de una leche comercializada y disponible en el mercado español, enriquecida con fitoesteroles como mecanismo para la reducción de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en población joven adulta. Y tendrá una duración de 6 semanas con un periodo de lavado (interrupción), de un mes.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____, con DNI _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o Representante legal

Fecha

A COMPLETAR POR EL INVESTIGADOR RESPONSABLE:

He explicado al Sr(a).-_____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador/colaborador

Fecha

CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del protocolo: "Uso de Leches enriquecidas con Fitoesteroles como estrategia de reducción de Factores de Riesgo de enfermedad cardiovascular en población joven adulta"

Equipo

Investigador _____

Sede donde se realizará el estudio: Madrid

Nombre del participante: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea el paciente)

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

Firma del participante

Fecha

ANEXO 4. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Código del participante: _____/2014 Sexo: V M fecha de nacimiento: ___/___/___

ENFERMEDADES Y SITUACIÓN DE SALUD

¿Padece o ha padecido alguna enfermedad en el último año?

PATOLOGIA	¿La ha padecido en el último año?	¿Está tomando medicación por este problema?

¿Padece alguna otra enfermedad crónica? indique cual: _____

¿Consumo algún medicamento además de los anteriores? _____

En el momento actual, ¿sigue usted alguna dieta o régimen especial? __ Sí __ No

En Caso afirmativo indique cual _____

¿Cuál es su hábito intestinal? _1 vez cada 3-4 días __1 vez cada 2 días __1-2 vez al día __> 2 veces al día

¿Cuál de las siguientes formas describe mejor su consumo de tabaco?

_Fumo diariamente _Fumo pero no diariamente _No fumo, pero he fumado _Nunca he fumado

El día que fuma, ¿Cuántos cigarrillos consume por término medio ese día?

____ Cigarrillos/día de diario ____ Cigarrillos/día de fin de semana

¿Durante cuánto tiempo ha fumado? __ Años ¿A qué edad comenzó a fumar? __ Años

¿Cuánto tiempo (años) hace que no fuma? _____

ANTROPOMETRÍA: Talla: __ m. Peso: __ Kg. Grasa total: __, Grasa V.: __; Músculo: __, G metabólico : __

INFORMACIÓN DIETÉTICA:

Alimento	Ingesta a la semana/día y cantidad que toma
Frutas	
Verduras (ensalada y cocinada)	
Cereales integrales: pan, pasta, arroz, cereales de desayuno	
Legumbres	
Pescado azul	
Frutos secos	
Embutidos (Tipo _____)	
Dulces, pastelería y bollería industrial (tipo _____)	
Queso <input type="checkbox"/> Curado <input type="checkbox"/> Semicurado	
Postres lácteos no yogur (natillas, petit suis, flanes, mousses...)	
Aperitivos (patatas fritas, snacks, etc.)	

Comida Rápida	
Suplemento 1: _____	
Suplemento 2: _____	

Consumo de alimentos que pueden interferir en los niveles de colesterol por el contenido en fibra, grasas PUFAS o MUFAS, o con alto contenido en grasas saturadas, colesterol y trans.

¿Cuántas comidas realiza a lo largo del día? _____

RECUERDO DE 24 HORAS CODIGO: _____/2014 FECHA ____/____/____

ALIMENTOS Y SUPLEMENTOS CONSUMIDOS						
LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO
DESAYUNO	ALIMENTOS (ingredientes del menú)					Cantidad (g) o tamaño
Hora de inicio:						
Hora de finalización:						
Lugar:						
MEDIA MAÑANA						
Hora de inicio:						
Hora de finalización:						
COMIDA						
Hora de inicio:						
Hora de finalización:						
Lugar:						
MERIENDA	ALIMENTOS Y SUPLEMENTOS (ingredientes del menú)					Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Hora de inicio:						
Hora de finalización:						
Lugar:						
Menú:						
CENA						
Hora de inicio:						
Hora de finalización:						
Lugar:						
Este día ha sido diferente a un día habitual en su vida: Sí 0 No 0						

ANEXO 5. CONTROL DE CONSUMO DE LA LECHE DURANTE EL ESTUDIO.

Hoja de recogida de consumo de leche. (Marcar el recuadro con una "X" AL TOMARLO)

PRIMER PERIODO SEMANAS 1-3*

<u>DIAS</u>	<u>VASO LECHE 1</u>	<u>VASO LECHE 2</u>
<u>1</u>		
<u>2</u>		
<u>3</u>		
<u>4</u>		
<u>5</u>		
<u>6</u>		
<u>7</u>		
<u>8</u>		
<u>9</u>		
<u>10</u>		
<u>11</u>		
<u>12</u>		
<u>13</u>		
<u>14</u>		
<u>15</u>		
<u>16</u>		
<u>17</u>		
<u>18</u>		
<u>19</u>		
<u>20</u>		
<u>21</u>		

NOTA: INDICAR LA RAZON POR LA QUE NO LO TOMÓ, EN SU CASO

**Se entregaron hojas de control para el periodo 1 y el periodo dos.*

ANEXO 6. Copyright de las editoriales de las revistas donde fueron publicados los artículos



GRUPO AULA MÉDICA, S. L.
Empresa editora de la revista

NUTRICION HOSPITALARIA

Factor de impacto: 1,040 JCR

Órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición Enteral y Parenteral

Órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición

Órgano oficial de la Federación Latino Americana de Nutrición Enteral y Parenteral

Órgano oficial de la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética

CERTIFICA que el artículo 7564

Manejo del riesgo de enfermedad cardiovascular con leche enriquecida en esteroles en población joven adulta; ensayo clínico controlado aleatorizado y cruzado

AUTORES:

Ismael San Mauro Martín¹, Luis Collado Yurrita¹, María José Ciudad Cabañas¹, María Ángeles Cuadrado Cenjual², Marta Hernández Cabria⁴ y María Elisa Calle Purón³

¹ Departamento de Medicina (Universidad Complutense de Madrid). ² Unidad de Análisis clínicos. Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid. ³ Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública (Universidad Complutense de Madrid). ⁴ Departamento de Nutrición (Corporación Alimentaria Peñasanta S.A). España.

Ha sido aceptado y publicado en

Nutr Hosp v30 n4

Nutr Hosp. ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ S.V.R. 318
Depósito Legal: M-34.850-1982

Para que así conste, expido el certificado en Madrid a 21 de marzo de 2016

Fdo: José Antonio Ruiz – Director



GRUPO AULA MÉDICA, S. L.
Empresa editora de la revista

NUTRICION HOSPITALARIA

Factor de impacto: 1,040 JCR

Órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición Enteral y Parenteral
Órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición
Órgano oficial de la Federación Latino Americana de Nutrición Enteral y Parenteral
Órgano oficial de la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética

CERTIFICA que el artículo 8147

Role of ApoA1 on High-Density Lipoprotein: an intervention with plant sterols in patients with hypercholesterolemia

AUTORES:

Ismael San Mauro Martín^{1,3}, Luis Collado Yurrita¹, María Ángeles Cuadrado Cenzuál², María José Ciudad Cabañas¹ and Paula Mendive Dubourdiou³

¹ Medicine Department, Complutense's University of Madrid.

² Clinical Analysis Unit, Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid.

³ Research Centers in Nutrition and Health (CINUSA Group). Spain.

Ha sido aceptado y publicado en

Nutr Hosp v31 n1

Nutr Hosp. ISSN 0212-1611 • CODEN NUH0EQ S.V.R. 318
Depósito Legal: M-34.850-1982

Para que así conste, expido el certificado en Madrid a 21 de marzo de 2016

Fdo: José Antonio Ruiz – Director

Nutrición Hospitalaria

ARÁN Ediciones, S. L. certifica que Ismael San Mauro-Martín, Luis Collado-Yurrita, Javier Andrés Blumenfeld-Olivares, María Ángeles Cuadrado-Cenzual, María Elisa Calle-Purón, Marta Hernández-Cabria, Elena Garicano-Vilar, Eva Pérez-Arruche, Esperanza Arce-Delgado y María José Ciudad-Cabañas son autores del artículo *“Efecto de esteroides vegetales en la reducción del colesterol plasmático: ensayo clínico, controlado, aleatorizado, cruzado, doble ciego”* (Ref. 9920). Este artículo ha sido aceptado con fecha 27 de octubre de 2015 y está a la espera de publicación en la revista **Nutrición Hospitalaria**.

Y para que así conste donde proceda, se firma el presente en Madrid, a 18 de marzo de 2016,



ARÁN Ediciones S.L.
CIF: B-28/863199
Calle No. 17B, 28006 Madrid

Departamento Editorial
Nutrición Hospitalaria