

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



**EFECTO DEL CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS
EN LA TRIGLICERIDEMIA DIURNA EN POBLACIÓN
GENERAL Y EN LOS MARCADORES PLASMÁTICOS DE
INFLAMACIÓN Y DE OXIDACIÓN EN POBLACIÓN
JOVEN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ana Torres do Rego

Bajo la dirección de los doctores

Luis Antonio Álvarez-Sala Walther
Victoria Cachofeiro Ramos
Jesús Millán Núñez-Cortés

Madrid, 2013



Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

Tesis Doctoral

**EFECTO DEL CONSUMO DE BEBIDAS
ALCOHÓLICAS EN LA TRIGLICERIDEMIA
DIURNA EN POBLACIÓN GENERAL Y EN
LOS MARCADORES PLASMÁTICOS DE
INFLAMACIÓN Y DE OXIDACIÓN EN
POBLACIÓN JOVEN SANA**

Departamento de Medicina

Doctorando: Ana Torres do Rego

Directores de la tesis:

Prof. D. Luis A. Alvarez - Sala Walther

Prof. D^a. Victoria Cachofeiro Ramos

Prof. D. Jesús Millán Núñez-Cortés

Madrid , 2013

Quiero expresar un profundo agradecimiento a todos lo que han hecho posible que mi estancia en Sint Frantciscus Gasthuis de Rotterdam haya sido una gran experiencia tanto personal como profesional. A Marisa Nieto, Pilar Oubiña y Vicente Lahera por su inestimable colaboración en el laboratorio. y en el diseño del estudio. A mi familia y especialmente a mi tío, Juan do Rego por su cooperación en las ilustraciones y su apoyo incondicional. Y por supuesto a mis directores de tesis Luis A. Alvarez-Sala, primer consejero y alentador de la idea de esta tesis, a Victoria Cachofeiro y Jesús Millán por sus atenciones, ánimos y correcciones que han sido de extraordinaria eficacia y ayuda.

I would like to express my deepest gratitude to all who have made my stay in Sint Franciscus Gasthuis Rotterdam possible, being a great experience both personal and professional. My sincere appreciation to Marisa Nieto, Pilar Oubiña and Vicente Lahera for his invaluable assistance in the laboratory and study design. Special thanks to my uncle, Juan do Rego for their cooperation in the illustrations and support.

I would like to extend my deepest gratitude to my thesis directors Luis A. Alvarez-Sala, first counselor and supportive of the idea of this thesis, Victoria Cachofeiro and Jesús Millan for their attention, encouragement and corrections that have been extraordinarily effective and helpful.

Índice

1. Abstract.....	11
2. Summary	13
3. Introducción	27
3.1. El proceso aterosclerótico.....	28
3.1.1 Papel aterogénico de las VLDL y de los triglicéridos.....	35
3.2. Marcadores de inflamación y aterosclerosis.....	37
3.2.1. La proteína C reactiva (PCR)	37
3.2.2. La interleucina-6 (IL-6).....	43
3.2.3. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).....	46
3.2.4. La fosfolipasa A2 secretora (PLA ₂ s).....	49
3.3. Oxidación, capacidad antioxidante y aterosclerosis	51
3.3.1 Polifenoles y antioxidación	55
3.4. Papel del consumo de una dieta rica en grasas	58
3.4.1. Sobre el proceso aterosclerótico y la enfermedad cardiovascular.....	58
3.4.2. Sobre los factores proinflamatorios.	61
3.4.3. Sobre la capacidad antioxidante.....	64
3.5. Efecto del consumo de alcohol	65
3.5.1. Sobre la enfermedad cardiovascular	65
3.5.2. Efecto del consumo de alcohol sobre el perfil lipídico	68
3.5.3. Efecto del consumo de alcohol sobre los factores proinflamatorios	71
3.5.4. Efecto del consumo de alcohol sobre la capacidad antioxidante ..	73

4a Hipótesis y objetivos del estudio.....	77
4a.1 Hipótesis del estudio.....	78
4a.2 Objetivos del estudio.....	78
4b Hypothesis and objectives of the study	80
4b.1. Hypothesis of the study	81
4b.2. Objectives of the study.....	81
5. Material y métodos	83
5.1. Estudio observacional en población general	84
5.1.1. Población del estudio	84
5.1.2. Determinaciones analíticas	84
5.1.3. Auto-medidas capilares de triglicéridos	85
5.1.4. Ingesta de alcohol y grasas	86
5.1.5. Análisis estadístico.....	86
5.2. Ensayo clínico en voluntarios sanos.....	87
5.2.1. Población del estudio.....	87
5.2.2. Diseño del estudio.....	88
5.2.3. Determinación de parámetros del perfil lipídico	90
5.2.4. Determinación de IL-6, PCR us, y TNF- α	91
5.2.5. Determinación de fosfolipasa A ₂ secretora (PLA ₂ s)	91
5.2.6. Determinación de lipoperóxidos.....	91
5.2.7. Determinación de la capacidad antioxidante total (CAT).....	92
5.2.8. Cuantificación de fenoles de las diferentes bebidas alcohólicas .	93
5.2.9. Análisis estadístico.....	93
6. Resultados.....	95
6.1. Estudio observacional en población general	96

6.1.1. Características generales	96
6.1.2. Efectos del consumo de alcohol sobre la trigliceridemia basal y variación diurna	97
6.1.3. Asociación entre el consumo de alcohol y las concentraciones de PCRus.....	102
6.2. Ensayo clínico en voluntarios sanos.....	104
6.2.1. Efecto del consumo mantenido de una dieta rica en grasas y distintas bebidas alcohólicas sobre el perfil lipídico basal.....	104
6.2.2. Efecto del consumo crónico de una dieta rica en grasas y diferentes bebidas alcohólicas sobre los factores proinflamatorios.....	106
6.2.2.1. Efecto sobre las concentraciones de TNF α	106
6.2.2.2 Efecto sobre las concentraciones de IL-6.....	108
6.2.2.3. Efecto sobre las concentraciones de PCR ultrasensible	110
6.2.2.4. Efecto sobre las concentraciones de fosfolipasa A2 plasmática (PLA ₂ s).....	112
6.2.3. Efecto del consumo crónico de una dieta rica en grasas y diferentes bebidas alcohólicas sobre los marcadores de oxidación .	114
6.2.3.1. Efecto sobre las concentraciones de la peroxidación lipídica.....	114
6.2.3.2. Efecto sobre las concentraciones de la capacidad antioxidante total (CAT).	116
7a. Discusión	124
7a.1. Efecto del consumo de alcohol sobre la trigliceridemia diurna.....	125
7a.2. Efecto del consumo de alcohol sobre las concentraciones de PCRus y la	

trigliceridemia diurna	128
7a.3. Efecto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas después de una dieta rica en grasa sobre el perfil lipídico.....	130
7a.4. Efecto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas después de una dieta rica en grasa sobre los factores proinflamatorios.....	132
7a.5. Efecto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas después de una dieta rica en grasa sobre la capacidad antioxidante	137
7a.6. Limitaciones del estudio en voluntarios sanos.....	140
7b.Discussion	142
7b.1. Effect of alcohol consumption on diurnal triglyceridemia.....	143
7b.2. Effect of alcohol consumption on concentrations of usCRP and diurnal triglyceridemia.....	146
7b.3. Effect of consumption of different alcoholic beverages after a fat enriched diet on lipid profile.	147
7b.4. Effect of different alcoholic beverages intake after a fat enriched diet on inflammatory factors.....	149
7b.5. Effect of different alcoholic beverages intake after a fat enriched diet on antioxidant capacity.....	154
7b.6. Limitations of the study developed in healthy volunteers.....	156
8a. Conclusiones	158
8b. Conclusions	161
9. Bibliografía	164

Abreviaturas

ABC-Tgc : Área bajo la curva de trigliceridemia capilar diurna

ApoA1 : Apolipoproteína A1

ApoB : Apolipoproteína B

ApoB48 : Apolipoproteína B48

ApoB100 : Apolipoproteína B100

ARNm : Ácido ribonucleico mensajero

CAT : Capacidad antioxidante total

CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol

Col HDL : Colesterol de lipoproteínas de alta densidad

Col LDL : Colesterol de lipoproteínas de baja densidad

CT : Colesterol total

Col VLDL : Colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad

Δ ABC-Tgc : Diferencia del área bajo la curva de trigliceridemia capilar diurna

DM : Diabetes mellitus

Enf. CV : Enfermedad cardiovascular.

HDL : Lipoproteína de alta densidad

IMC : Índice de masa corporal

IL-6 : Interleuquina 6

LDL : Lipoproteína de baja densidad

Lp(a) : Lipoproteína a

LPL : Lipoproteinlipasa

LPO : Lipoperoxidación

PCRus : Proteína C reactiva ultrasensible

PLA₂s : Fosfolipasa A2 secretora

TG : Triglicéridos

TGc : Trigliceridemia capilar

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

VLDL : Lipoproteinas de muy baja densidad

List of abbreviations

ApoAI : Apolipoprotein AI

AUC-cTg : Area under the curve of capillary triglyceridemia

BMI : body mass index

CETP: Cholesteryl ester transfer protein

cTG : capillary triglyceridemia

Δ AUC-cTg: Incremental area under the curve of capillary triglyceridemia

DM : Diabetes mellitus

HDL : High density lipoprotein

IL-6 : Interleukin 6

LDL : Low density lipoprotein

Lp(a) : Lipoprotein a

LPL : Lipoprotein lipase

LPO : Lipid peroxidation

sPLA₂: Secretory phospholipase A2.

TAC : Total antioxidant capacity.

TC : Total cholesterol

TNF- α : Tumoral necrosis factor alpha

TG : Triglycerides

usPCR : Ultrasensitive protein C reactive

VLDL : Very low density lipoprotein

1. Abstract

Introduction. Different alcohol beverages have not the same effect on triglyceridemia, inflammation and oxidative stress but this results are controversial and scanty in some aspects. Our objective was to examine the effect of alcohol intake in diurnal triglyceridemia in general population in a free-living situation and its association to usCRP concentrations. Also, we analyse the effect of different alcohol beverages after a fat enriched diet on lipid profile, inflammatory factors and oxidative stress in healthy people in a controlled situation.

Material and methods. During 3 days, 273 volunteers measured their own cTG concentrations on six fixed time-points daily and recorded their alcohol intake. The impact of daily alcohol intake (none, low <10g/day; moderate 10-30 g/day; high >30g/day) on cTG was analyzed and stratified for gender. usCRP measurements were collected from 80 subjects from this cohort. Secondly, we have performed a cross-over design in five different weeks. 16 healthy young volunteers received the same oral fat-enriched diet (1486 kcal/m²) and 16 g/m² of alcohol. In each week the alcoholic beverage was different (red wine, vodka, brandy ,rum). In the control phase, the caloric intake of alcohol was replaced with sugar and water. We measured the levels of serum lipids, usCRP, TNF- α , sPLA₂, LPO and TAC.

Results. Fasting cTG were similar between the alcohol groups in males. In females fasting cTG were lowest in those with low and moderate alcohol intake and higher in women with high alcohol intake ($p < 0.05$). The mean diurnal triglyceridemia (Δ cTG-AUC), was lower in males with low alcohol intake compared to males with no, moderate or high alcohol intake, when adjusted for age, smoking and BMI ($p < 0.05$). No significant differences were found in females. High alcohol intake was associated to higher usCRP concentrations in females but not in males. usCRP concentrations were associated to alcohol intake and fasting TG in females after adjustment for age, smoking and BMI. Red wine intake was associated with decreased mean change of concentrations of usCRP, TNF α and IL-6 induced by fat enriched diet ($p < 0,05$) nevertheless sPLA₂ concentrations were not modified significantly. After red wine intake and a fat enriched diet, total antioxidant capacity was increased compared to control period, rum, brandy and vodka intake ($p < 0,05$).

Conclusions. Gender differences were found in the relation between alcohol intake and fasting and diurnal triglyceridemia. Low alcohol intake was associated with decreased diurnal triglyceridemia in males but not in females after adjustment for age, BMI and smoking in a free-living situation. usCRP has been associated to alcohol intake and fasting TG in females. Moderate red wine intake and not other alcoholic drinks decreased proinflammatory factors and increased total antioxidant capacity in spite of a fat enriched diet intake in healthy young volunteers.

2. Summary

Introduction

Atherosclerosis is considered a chronic local micro-inflammatory process in the subintimal space of arteries due to the deposit of oxidised LDL particles, where inflammatory factors and oxidative stress play a role¹. Dietary composition is involved in atherogenesis, not only by modifying cholesterol levels, but also modifying the pro-oxidant/anti-oxidant and pro-inflammatory/anti-inflammatory profile. Moderate red wine intake has been related to this effect which was known as “the French Paradox”² due to the increase in HDL cholesterol and the benefits on haemostatic factors³. In fact, since the French paradox was reported, many studies have demonstrated that moderate alcohol intake has a cardioprotective effect³. The association between alcohol and TG is complex and does not always fit a simple linear association since a J-shaped association between alcohol intake and TG has recently been described^{4,5}. This reported J-shaped association is similar to the J-shaped association between alcohol intake and cardiovascular risk⁶⁻¹⁰. However, epidemiologic evidence is inconsistent on the effects of low-to moderate alcohol consumption on TG concentrations^{3,9,11-14}. In contrast, high alcohol intake has been consistently related to elevated TG^{12,15}. Increased alcohol-mediated free fatty acid oxidation in the postprandial state may exaggerate postprandial triglyceridemia while fasting TG are within normal ranges¹⁶. The effect of alcohol consumption on diurnal triglyceridemia has not yet been studied and data on the impact of alcohol on both fasting and non-fasting TG in an uncontrolled real life situation is limited.

Moreover, the relation between alcoholic beverages intake, inflammation and triglycerides is controversial. CRP is one of the main inflammation markers, due to its ability of being a cardiovascular and atherosclerosis risk marker^{9,17}. Many studies have showed an association between fasting TG and CRP¹⁸⁻²⁰ as well as a J-shaped

association between alcohol intake and CRP²¹. However the association between postprandial triglyceridemia and CRP depend on alcohol intake has not been studied previously.

The association between alcohol intake and inflammation could be justified by an ethanol-dependent effect²². In fact, light to moderate alcohol intake is associated to lesser concentrations of inflammatory factors, as IL-6, usCRP and TNF α ²³⁻²⁵, although the role of new markers of inflammation, as sPLA₂, is not well known. Nevertheless, some prospective studies have shown that the results are better for the consumption of red wine than beer or other alcoholic drinks^{26,27}. Concerning the oxidative damage, data are controversial. Intervention studies showed that moderate alcohol consumption was linked to increase free radicals and lipoperoxidation^{28,29} but on the other hand moderate alcohol consumption decreased DNA oxidation markers³⁰ and increased antioxidant capacity³¹.

Polyphenols, which are abundant in red wine, are thought to stimulate the prevention of atherosclerosis, and a regular moderate intake of wine has been shown to decrease the concentration of proinflammatory³² and lipid peroxidation markers^{33,34} and to increase antioxidant capacity³⁵. But this effect appears only in an oxidative environment³⁶, such as the postprandial state.

It seemed the effect of different alcohol beverages on inflammation and oxidation differed depend on the polyphenols concentrations, but data on inflammatory and oxidative factors in one experimental study is scarce.

In a previous study from our group, moderate intake of vodka but not red wine, together with a fat-rich diet has been shown to activate NF-kB in circulating monocytes in healthy people in an acute model³⁷. If the same intake is maintained for 5 days together with a fat-enriched usual diet, red wine -but not vodka nor brandy- decreases

expression of NF-kB in circulating monocytes. To a lesser extent, rum, which has a moderate level of polyphenols, decreases MCP-1³⁸.

Objectives

The general objectives of this study were :

1. To know the impact of consumption of different amounts of alcohol on daytime triglyceridemia (measured as capillary triglyceridemia) in an uncontrolled situation in the general population.
2. To establish if there is any association between the consumption of different amounts of alcohol and the concentration of usCRP, fasting TG concentrations and diurnal triglyceridemia in uncontrolled situation in the general population.
3. To know the effect of different polyphenols concentrated beverages in similar dietetic conditions we compare the effect of different alcohol beverages (red wine, rum, brandy or vodka intake) together a fat diet on inflammatory factors (usCRP, TNF- α , IL-6, sPLA₂), lipid peroxidation (LPO), antioxidant capacity (TAC) and its relation in healthy people after a five days period.

Material and methods

The thesis employed a designed in two stages. First of all an observational study was designed. During 3 days, volunteers measured their own capillary triglyceride (cTG) concentrations on six fixed time-points daily and recorded their alcohol intake. Subjects were healthy volunteers or patients with hyperlipidemia or a known medical history of CVD, type 2 diabetes mellitus (T2DM) participating in several clinical studies with the same protocol, aimed to investigate factors influencing

postprandial lipemia³⁹⁻⁴⁴. Males and females were aged 18-80 years. Exclusion criteria were the presence of renal, liver or thyroid disease. Subjects using lipid lowering drugs were investigated after withdrawal of these drugs during 4 weeks. Clinical, biochemical characteristics and usCRP concentrations were measured at inclusion. Self-measurements of cTG were performed with a TG-testing device (Accutrend GCT®, Roche Diagnostics, Germany). Dietary fat and alcohol intake on the days of cTG measurements were recorded in a diary. The impact of daily alcohol intake (none, low <10g/day; moderate 10-30 g/day; high >30g/day) on cTG was analyzed and stratified for gender. The study was approved by the Local Medical Ethical Committee of the UMC Utrecht. The study protocol has been registered at Clinicaltrials.gov NCT01786421.

Secondly, we have performed a cross-over design in five different weeks. Sixteen healthy young volunteers received the same oral fat-enriched diet (1487 kcal/m² with 654 kcal/m² (44%) as fat. The distribution of fat was 22% saturated, 12% monounsaturated, and 10% polyunsaturated) in these 5 weeks, in addition to a daily total amount of 16 g/m² of alcohol. In each week the alcoholic beverage was different (red wine, vodka, brandy or rum). Total phenols, expressed as gallic acid equivalents, were determined using the Folin-Ciocalteu reagent as previously described⁴⁵. In the 5th week, the caloric intake of alcohol was replaced with sugar and water (control group). Fasting blood samples were drawn the 1st and the 5th day of each week of study. We measured the levels of serum lipids, usCRP, TNF- α (tissue necrosis factor- α), sPLA₂ (secretory phospholipase A2), lipid peroxidation (-LPO-), and total antioxidant capacity (-TAC-). The study was approved by the Local Medical Ethical Committee of the HGU Gregorio Marañón.

All statistical analyses were performed using PASW statistics version 18.0. The

cTG-AUC and Δ cTG-AUC were calculated with PRISM version 3.0 (Graph Pad Software, San Diego). Statistical significance was set at $P < 0.05$ (two tailed).

Results

Observational study in general population

In the observational study, 273 subjects were included (139 males and 134 females). Compared to males, females had significantly higher apo AI and HDL-C ($p < 0.001$) and significantly lower fasting plasma TG, LDL-C and apo B ($p < 0.05$). Alcohol consumption was significantly higher in males compared to females ($p < 0.001$).

Concerning the anthropometric variables, females with low alcohol intake had a lower BMI compared to females without alcohol intake ($p < 0.05$) and lower fasting plasma TG compared to females without alcohol intake ($p < 0.05$) or high alcohol intake ($p < 0.05$). Females with high alcohol intake were more frequently smokers compared to females with less alcohol consumption ($p < 0.05$). Males with high alcohol intake were significantly older compared to males who did not consume alcohol ($p < 0.05$). As in females, males with high alcohol consumption were more frequently smokers compared to males with lower amounts of alcohol intake ($p < 0.05$). No differences were found in fasting plasma TG between males with different amounts of alcohol consumption. Dietary fat intake was similar between alcohol groups in both females and males.

No significant differences were found in fasting cTG and cTG-AUC within the different groups between the three individual measurement days. Females showed a more horizontal pattern in diurnal triglyceridemia, whereas males showed a more pronounced diurnal cTG increase. Fasting cTG were significantly different between the alcohol groups in females (p for trend < 0.05) and this was also the case for cTG levels

before lunch (p for trend < 0.001). Females with low or moderate alcohol intake tended to have lower cTG levels compared to non-drinkers and females with high alcohol intake in the fasting state or before lunch. In males cTG were similar between the groups from fasting until before dinner but differed significantly between the alcohol groups after dinner (p for trend < 0.001) and at bedtime (p for trend < 0.001). In males, low alcohol intake was associated with decreased TG, whereas moderate and high alcohol intake were associated with increased cTG after dinner and at bedtime.

In males and females no significant differences were found for the cTG-AUC and Δ cTG-AUC between no, low, moderate and high alcohol intake in univariate analysis. After adjustment for age, smoking and BMI, males with low alcohol intake had a significantly lower Δ cTG-AUC (274.58 ± 168.29 mg.h/dl ; $n=27$) compared to males with no (628.87 ± 159.43 mg.h/dl; $n=34$), moderate (575.73 ± 159.43 mg.h/dl; $n= 54$) or high alcohol intake (646.59 ± 194.86 mg.h/dl; $n=24$) (adjusted $p < 0.05$). The absence of significant differences in the cTG-AUC and Δ cTG-AUC between the different alcohol groups in females remained after adjustment for age, smoking and BMI.

High alcohol intake was associated to higher usCRP concentrations compared to no, low and moderate intake in females ($p < 0,01$) but not in males. No association was found between usCRP and diurnal triglyceridemia in females, neither males. usCRP concentrations were associated to alcohol intake and fasting TG in females after adjustment for age, smoking habits and BMI.

Cross-sectional study in healthy volunteers

The adherence to protocol was completed. Anthropometric parameters and weight were constant along the study. No differences were found in lipid profile after intervention.

The fat-enriched diet led to increased plasma usCRP when comparing basal values with 5th day values (0.81 ± 0.86 and 1.22 ± 1.26 mg/dl, respectively ; $p < 0.05$). A trend was observed toward increased plasma concentrations of TNF α , IL-6 and sPLA₂ as a result of the diet but no significant differences were found.

The oral fat enriched diet caused an increase in plasma concentrations of lipid peroxidation ($58,29 \pm 0,88$ and $48,12 \pm 0,66$ respectively $p < 0.05$ and a decrease in plasma concentrations of total antioxidant capacity ($13,84 \pm 0,18$ and $17,94 \pm 0,15$; $p < 0,05$) at 5 days.

No differences were observed on usCRP when comparing baseline values and values after intake of different alcoholic drinks at 5th day.

Red wine intake decreased plasma levels of IL-6 from 5.41 ± 3.75 to 4.53 ± 3.40 pg/ml, ($p < 0.05$). Plasma concentrations of TNF α and IL-6 tended to increase but no significant differences were achieved after rum, brandy, and vodka intake. No statistical significance was found for any alcohol beverage on sPLA₂ concentrations.

TNF α , IL-6, and usCRP decreased significantly after red wine intake, compared with an oral fat diet without ethanol beverages ($28.95 \pm 9.7\%$ and $55.23 \pm 33.8\%$ respectively— $p = 0,016$; $-15.40 \pm 14.28\%$ and $16.74 \pm 11.11\%$ respectively $p < 0.05$; $-9.40 \pm 14.06\%$ and $38.00 \pm 20.66\%$ respectively, $p < 0.05$), whereas after rum, brandy and vodka intake there were no differences. No changes were found in circulating concentrations of sPLA₂ after the fat enriched diet, neither alcoholic beverages.

The amounts of total polyphenols in the studied alcoholic beverages, expressed as equivalents of gallic acid, were the following: 2660 mg/L red wine, 357 mg/L rum, and 89 mg/L brandy. Vodka is the only beverage without polyphenolic compounds.

The administration of different alcohol beverages along with a fat enriched diet did not modify the baseline concentrations of lipid peroxidation. It seemed vodka intake

was superior to rum intake in increasing lipid peroxidation ($p=0.05$). A positive correlation was found between usCRP and LPO concentrations after red wine intake ($R= 0.57$; $p=0.042$).

Total antioxidant capacity increased after red wine intake compared to controls and rum, vodka or brandy intake (p for trend= 0.024). No differences were found between rum, brandy and vodka. TAC showed a negative correlation with TNF α after red wine intake ($R= -0,51$; $p= 0.044$) and with IL6 after rum intake ($R= -0,57$; $p= 0,026$).

Discussion

Since non-fasting TG independently predict the risk for cardiovascular disease and are potentially an even better predictor than fasting TG^{7,10,46}, it is important to investigate the impact of lifestyle factors like alcohol consumption on non-fasting TG in a free living situation. Our study suggests that low alcohol intake is associated with a decrease in diurnal triglyceridemia in males, especially after dinner and at bedtime. Whereas low-to moderate alcohol intake was associated with lower cTG at fasting and before lunch in females. However, overall the results suggest that alcohol does not seem to contribute significantly to diurnal triglyceridemia in our free living study population. Our results are in line with a recent meta-analysis and other studies on alcohol consumption, suggesting that small-to moderate alcohol consumption does have a slight TG lowering effect^{4,5} or no major impact on TG concentrations¹¹⁻¹⁴.

In contrast, metabolic studies have shown that alcohol contributes to alterations in TG metabolism contributing to increased TG. Alcohol have been shown to stimulate the secretion of very low density lipoproteins, to reduce lipoprotein lipase activity, to stimulate adipose tissue lipolysis resulting in elevated hepatic delivery of free fatty acids and to impair the oxidation of fatty acids in the mitochondria^{16,47-49}. The literature is consistent regarding high alcohol intake and increased TG^{9,50}. Increased

postprandial TG after dinner after three weeks of high alcohol intake (40g of alcohol daily) have also been described ⁵¹. These results are comparable with our observations, because a trend for increased cTG in males with moderate and high alcohol intake was observed after dinner and at bedtime. A similar pattern was observed in females with high alcohol intake, but the group was too small (N=5) to reach statistical significance. It seems likely that alcohol consumption caused the elevated cTG since alcohol is most often consumed around dinner ⁴³.

Possible explanations for our observed differences between males and females may be related to the activity of alcohol-metabolizing enzymes ⁵² and the effects of estrogens on TG metabolism ⁵³. However, it should be noted that only 5 women in our study reported high alcohol consumption above 30g/day. Women usually drink less alcohol than men ⁴ and women tend to underreport their alcohol intake compared to men ⁵⁴. This should be considered a potential information bias in our study. However, the number of females included in the other groups was sufficient.

Concerning the association between diurnal triglyceridemia and usCRP there was not any correlation. Marked gender differences were found, in fact usCRP was related to fasting TG and alcohol intake in women, but no in men. These results are similar to those obtained in a sub-analysis of the Women's Health Study where they found that women with hypertriglyceridemia had higher CRP levels than those with normal fasting plasma ⁵⁵. Therefore in our study high alcohol intake has been associated to higher usCRP concentrations in females. In an epidemiological study coming from the cohort who participated in the Pravastatin/ Inflammation CRP Evaluation Study, moderate alcohol consumption was associated with lower concentrations of CRP and lower plasma TG concentrations in both men and women, but this study did not find any difference between high and moderate consumption

group⁵⁶, differences that were found in our study.

Theoretically, it is possible that a bias was introduced and that some of the subjects altered their drinking habits during the study despite the fact that we asked all participants to adhere to their regular diet and drinking habits. Another limitation of the present study is the possibility of inaccuracy in the self-reported amount of alcohol intake, due to the fact that we used questionnaires and diaries⁵⁴. However, all answered questionnaires were evaluated individually, which may have improved the validity. Furthermore, subjects were in a free living, non-controlled situation with different drinking habits and meals which could all affect lipoprotein metabolism differently^{38,57}. The majority of subjects consumed wine and beer and therefore our results can not be extrapolated to other beverages. The impact of different beverages on TG metabolism and usCRP concentrations remains uncertain, but there is some evidence that red wine increases TG less^{4,58} and decreases usCRP³² compared to other type of alcoholic drinks. Moreover, it was not possible to analyse the effect of different drinking patterns on diurnal triglyceridemia with our observational study design.

It seems alcohol has different antiatherogenic effects depending on the plasma oxidative status and the type of alcohol beverage³⁶. This is the main reason to develop the cross-sectional study. The present study suggests that a fat enriched diet, causes a prooxidative environment, increasing lipid peroxidation and decreasing total antioxidant capacity. In this prooxidative environment, red wine intake but not other alcoholic beverages modifies the increase caused by the fat diet on IL-6, TNF α , usCRP and shows a relation between usCRP and LPO concentrations. Also, the total antioxidant capacity increases after red wine intake despite an oral fat diet, supporting the antioxidant properties of this beverage against other with lower polyphenol

concentration.

Previous studies have found an association between a high fat meal intake and inflammatory markers⁵⁹ and postprandial plasma lipid peroxidation^{60,61}. Our study demonstrates that this effect persists after a fat enriched diet for 5 days, although no change in lipid profile has been found, which it could be explain due to short time of study³⁸.

It is not clear whether the impact of alcoholic drinks on proinflammatory factors differs with the type of drink. Cohort studies showed an association between moderate alcohol consumption and lower concentrations of IL-6, TNF α and a U shape distribution of concentrations of usCRP related to alcohol intake^{23,24,62}. In contrast a meta-analysis did not find any association between moderate alcohol consumption and proinflammatory factors, neither although they stratified the sample according to the type of alcoholic beverage¹¹. Intervention studies in healthy volunteers have shown that those drinks with a greater concentration of polyphenols, such red wine, decrease the levels of these factors^{63,64}. In our study, inflammatory factors as usCRP, IL-6 and TNF α were significantly decreased by red wine intake in accordance with these studies. No changes were found on sPLA₂ after a fat enriched meal neither after different beverages. It could be explained by the absence of changes in lipid profile after the intervention. In a previous study it was found a correlation between lipid concentrations and Lp-PPA2⁶⁵, which could justify it.

Concerning the oxidative stress it seems red wine phenolics plays a role in the protection of LDL against oxidative damages *in vitro*⁶⁶ and *in vivo*⁶⁷. LPO decreased after red wine intake when it was compared to gin⁶⁸. Similar results were found by Krnic et al⁶⁹, where they showed that red wine but not vodka intake decreased the postprandial oxidative stress. However some studies done in healthy volunteers have

shown oxidizability of lipids was not affected by red wine intake^{70,71}, similar findings were seen in our results although we have found a trend to increase LPO by vodka intake compared to brandy, which could be explained by the absence of polyphenols in vodka and LPO showed a weak positive correlation with usCRP after red wine intake, which prove the link between inflammation and oxidation.

Antioxidant capacity of Mediterranean diet has been widely demonstrated⁷². Several studies have shown that a moderate red wine intake could be related to low cardiovascular risk despite fat rich meals, as it occurs in the French diet⁷³. Previous studies have reported red wine intake is able to increase antioxidant capacity in the postprandial state^{74,75} although it exists controversial data. In fact other studies did not observe any change in a postprandial state⁷⁶ neither in a chronic model⁷⁷ nor an increase in lipid oxidation⁷⁸. In a chronic model of (alcohol or red wine) consumption Micallef et al⁷⁹, had similar results as they found that red wine intake promoted an antioxidant effect in two weeks. Our study demonstrate fat enriched diet decreases total antioxidant capacity. Therefore red wine intake plus a fat enriched diet compared to other beverages, is able to increase antioxidant capacity, probably due to its high phenolic concentrations, only after 4 days of consume and in the fasting state.

It should be noted the small population of our study limited the power of the data. Further cohort studies should be design for it. Therefore, it is important to remind alcohol intake has a J shape curve over cardiovascular risk and mortality. In fact, high alcohol intake has a deleterious effect on cardiovascular diseases and mortality⁸⁰.

Conclusion

Low intake of alcohol was associated with decreased diurnal triglyceridemia in males, which was most pronounced during the evening. In contrast to males, low

alcohol intake in females was associated with decreased TG in the fasting state and before lunch. High alcohol intake seems to contribute to increased TG during the evening. usCRP is associated to fasting TG and alcohol intake in females but not in males.

Our study contributes to amplify the knowledge about the beneficial effects of moderate red wine intake compared to other beverages, with different amounts of polyphenols, on proinflammatory factors and antioxidant capacity after a proatherogenic meal, finding a relation between the inflammatory and oxidant status but no clear benefit is found on sPLA₂ neither in decreasing lipid peroxidation.

3. Introducción

La enfermedad cardiovascular constituye una de las principales causas de mortalidad en Europa. En España es la primera causa de muerte así como de estancia hospitalaria, siendo uno de los principales motivos del gasto sanitario actual ⁸¹. Todas las medidas preventivas relacionadas con los cambios de vida incluyendo patrones de alimentación son motivo de gran interés, no sólo ya científico, sino social también, por lo que puede suponer de ahorro en episodios cardiovasculares y en gasto farmacéutico, la adopción de medidas que suponen simplemente cambiar o añadir determinados alimentos o bebidas, lo que explica el interés de esta tesis.

3.1. El proceso aterosclerótico

Hoy se entiende la aterosclerosis como una enfermedad inflamatoria crónica⁸². El origen se encuentra en una alteración funcional del endotelio vascular que permite que las lipoproteínas junto con los macrófagos y los monocitos se acumulen en la subíntima⁸³.

Las lipoproteínas circulantes, en concreto las lipoproteínas de baja densidad ⁸⁴ atraviesan el endotelio por las regiones donde exista una leve alteración de la función endotelial, las zonas de flujo lento (flexuras y acodaduras arteriales). Esa disfunción endotelial facilita la entrada y depósito de forma pasiva de las LDL en el espacio subendotelial, que vuelven a salir después. El equilibrio entre el flujo de entrada y de salida se ve alterado si hay exceso de LDL, si esas LDL han sido previamente modificadas por oxidación o por glicosilación, o bien si el endotelio está alterado por situaciones patológicas. Esas LDL, bien porque ya entraron con modificaciones o porque permanecen más tiempo de lo fisiológicamente posible y se oxidan, alteran sus características físico-químicas y empiezan a ser reconocidas como

cuerpos extraños, provocando una “reacción a cuerpo extraño” lo que supone importantes cambios en la fisiología subendotelial⁸⁵.

En condiciones normales el endotelio se encarga de la regulación de las relaciones entre la pared vascular y el torrente sanguíneo, incluyendo entre otras funciones la de evitar la adhesión leucocitaria⁸⁶. La hipertensión, la obesidad, la hipercolesterolemia, la resistencia a la insulina, la diabetes, el tabaquismo y la ingesta de una dieta rica en grasas constituyen un estímulo pro-inflamatorio que altera esta función.⁸⁶

La disfunción endotelial implica una alteración de las funciones que ejerce el endotelio sobre la función vascular y que se caracteriza por la pérdida de su acción de barrera selectiva para macromoléculas, un aumento a la adhesión de leucocitos, un tono vasoconstrictor, un aumento de la proliferación de células musculares lisas y fibroblastos, así como a la agregación plaquetaria y a la formación de trombos⁸⁷.

La disfunción endotelial se basa en una menor disponibilidad del óxido nítrico. Esto puede suceder por dos mecanismos diferentes:

- la disminución de su síntesis y/o
- el aumento en su degradación por los aniones superóxido, dando lugar a peroxinitritos.

Generalmente, las lesiones ateroscleróticas aparecen en la bifurcaciones arteriales, zonas con flujo turbulento. Este flujo disminuye la síntesis del óxido nítrico⁸⁸. El déficit de óxido nítrico origina una mayor adhesión de los monocitos al endotelio, ya que aumenta la expresión de selectinas E y P y de moléculas de adhesión (VCAM 1 e ICAM 1) en la membrana de la célula endotelial⁸⁹. Los monocitos atraviesan la pared endotelial atraídas por la expresión de moléculas quimiotácticas como la MCP-1

(monocyte chemotactic protein type 1). Esta proteína se produce en respuesta a lipoproteínas modificadas, encargándose de la migración y diapédesis de los monocitos y linfocitos T adheridos a la pared ⁹⁰.

La migración subendotelial, se induce por la presencia de quimiocinas en la íntima, la MCP-1 entre otras. En los pasados 20 años se han identificado numerosas sustancias que inducen la quimiotaxis de los monocitos: como las LDL oxidadas o con otras modificaciones como la glicosilación, citoquinas como la MCP-1, la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis de tumoral (TNF- α), el colágeno degradado y las elastinas⁹¹. Según estudios realizados en ratones, parece que no todos los monocitos migran, sino que sólo son seleccionados aquellos subtipos de monocitos con capacidad pro-inflamatoria⁹².

En el espacio subintimal, los monocitos se diferencian y se transforman en macrófagos, acción favorecida por el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) que interacciona con el receptor del monocito CCR2, TNF- α , etc.. y posteriormente, si se mantiene el estímulo proinflamatorio, se convertirán en células espumosas. El M-CSF y otras citoquinas estimulan la expresión de receptores para LDL oxidadas, como el CD 36 y el SR-A (scavenger receptor A) en la superficie del macrófago. Esto favorece la captación de LDL modificadas, de forma que aumenta la concentración de lípidos en el citoplasma de los macrófagos, dándoles la aparición de células espumosas⁹³.

Los macrófagos proliferan en la íntima, manteniendo y amplificando la respuesta inflamatoria por su capacidad de síntesis de numerosos factores de crecimiento, citoquinas e incluso enzimas capaces de destruir la matriz extracelular como las metaloproteinasas y el factor tisular⁹⁴. Dentro de las citoquinas y factores sintetizados destacan los CD 40 y CD40 ligando, el TNF- α , la interleuquina 1beta (IL-

1 β) y la interleuquina 6 (IL-6). Estas citoquinas y la proteína C reactiva (PCR) aumentan la expresión de la molécula de adhesión vascular (VCAM), la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), y la MCP-1 en la célula endotelial, favoreciendo la entrada de LDL y monocitos al subendotelio y la producción de aniones superóxido, perpetuando así la disfunción endotelial.

Como resultado de la migración de los monocitos, se produce una estimulación de fibras musculares lisas de la media y una migración de miocitos hacia el espacio subendotelial, donde adquieren capacidad fagocitaria de LDL modificadas y modifican su fenotipo de contráctil a secretor de proteínas de matriz extracelular, aumentando la expresión de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformador beta (TGF β) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)⁸⁷.

Todos estas moléculas se encuentran controladas por el factor de transcripción nuclear NF-KB constituyendo una de las principales señales intracelulares. Las LDL oxidadas, las citocinas y la angiotensina II estimulan su activación, favoreciendo la expresión de otras citoquinas, moléculas de adhesión, moléculas quimiotácticas, metaloproteinasas y factores trombóticos⁹⁵.

Todo este proceso deriva en la formación de la placa de ateroma. Las células espumosas acaban muriendo, liberando su contenido lipídico al espacio intersticial subintimal, donde se va acumulando. En éste siguen llegando LDL que se modifican o ya vienen modificadas, dando pie a nuevas estimulaciones de citoquinas, nuevas llegadas de monocitos que van fagocitando esas LDL y transformándose en células espumosas que se acaban rompiendo, aumentando el acúmulo sobre todo de colesterol, que no puede ser degradado, y liberando al espacio subendotelial su contenido en enzimas hidrolíticas (metaloproteasas, elastasas, colagenasas) que van

dañando la estructura subendotelial. El ciclo se va repitiendo, de modo que el espacio subendotelial a nivel local va cargándose cada más de colesterol y detritus celulares que van reduciendo progresivamente la luz del vaso, dando pie a síntomas de isquemia.

Desde el punto de vista funcional, y con una base morfológica, se han diferenciado clásicamente dos tipos de placa, la estable y la inestable, dependiendo de la composición de la misma y no del grado de estenosis del vaso. La estable (Figura 1A) está formada por un núcleo lipídico de tamaño variable, generalmente pequeño, pero con una cubierta fibromuscular, formada por células musculares lisas, y matriz extracelular. Este tipo de placa no suele dar síntomas pues su lenta evolución permite el desarrollo de colaterales.

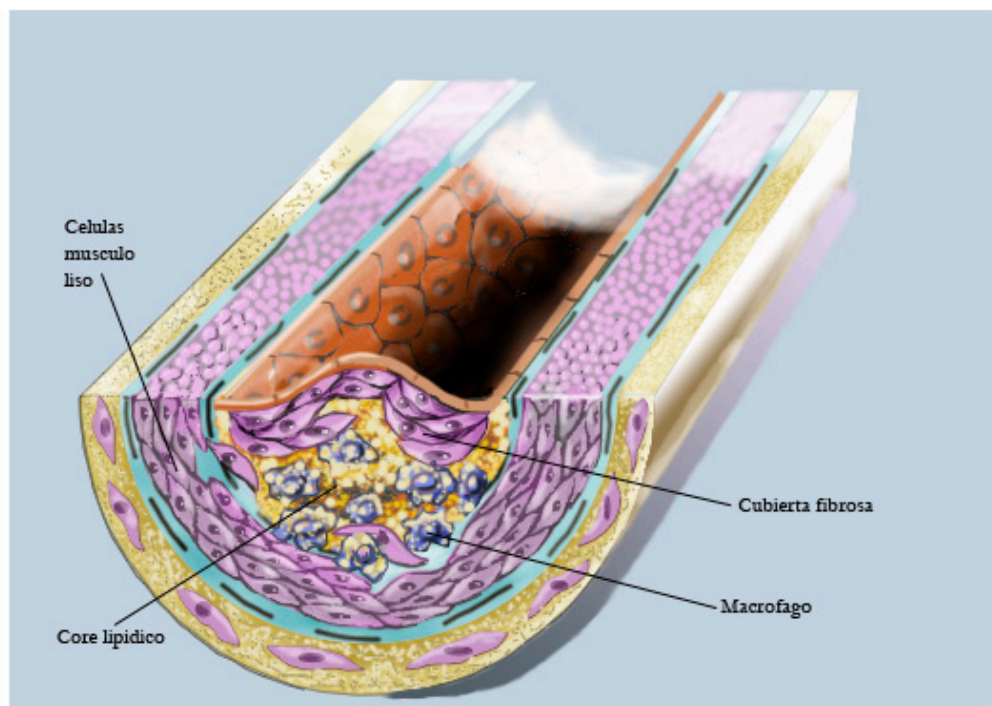


Figura 1A. Placa estable. Adaptado de Ross et al. N Engl J Med 1999;340:115-126.

La inestable o “vulnerable” (Figura 1B), sin embargo, presenta un núcleo lipídico blando, con gran cantidad de factores proinflamatorios y con una delgada capa fibromuscular, lo que favorece que la placa presente fisuras o incluso se rompa, facilitando la brusca formación de un trombo sobre dicha fisura o rotura que puede ocluir la luz vascular sin que haya habido tiempo para el desarrollo de colaterales. Se considera placa vulnerable aquella con un grosor de capa fibrosa inferior a 65 micras, con un core lipídico mayor del 40% de la placa y con un contenido del core lipídico predominante de ésteres de colesterol. Estos son más blandos que otros derivados del colesterol, lo que favorece una menor estabilidad y la ruptura de la placa. Otra de las características de estas placas es el predominio de células espumosas, linfocitos T y macrófagos, lo que favorece un ambiente proinflamatorio⁹⁶.

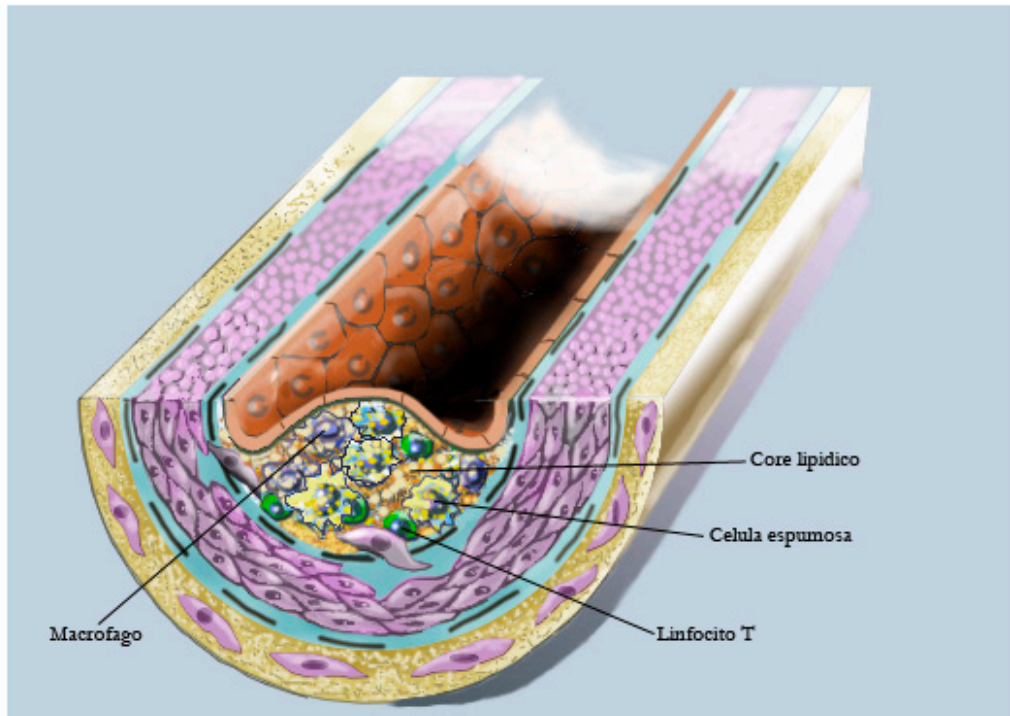


Figura 1B. Placa inestable. Adaptado de Ross et al. N Engl J Med 1999;340:115-126.

El proceso de ruptura o fisura de la placa ateromatosa ocurre porque la placa estable “reblandece su estructura” por lisis de su urdimbre de fibras elásticas y colágenas. Eso facilita que las fuerzas de cizallamiento y el bamboleo de la pared provocados por los cambios de diámetro en relación con la variación de presión arterial rasguen la capa endotelial. La razón fisiopatológica de ese “reblandecimiento” es la síntesis y liberación desmesurada de metaloproteasas por los macrófagos y linfocitos T acumulados. Las metaloproteasas van destruyendo las fibras colágenas y elásticas de la capa fibromuscular que cubre la placa, favoreciendo su ruptura. Las citocinas, como el TNF- α , la IL-1 y el factor estimulante de colonias de monocitos-granulocitos (MG-CSF), que se encuentran en el *core* lipídico también juegan un papel importante ya que se encargan de la regulación de las metaloproteasas⁹¹.

Se debe tener en cuenta el papel de los linfocitos T. Generalmente el subtipo predominante son los CD4+, que reconocen antígenos presentados por el complejo de histocompatibilidad tipo II. En humanos, los linfocitos T presentes suelen ser reactivos a antígenos relacionados con la patogenia de la aterosclerosis, principalmente relacionados con las LDL oxidadas. Las citoquinas presentes en la placa de ateroma promueven una respuesta T helper 1, induciendo la diferenciación a células T helper efectoras.⁹⁷ Estas células amplifican la inflamación local, produciendo IFN-gamma y CD40 ligando (CD 40L).⁹⁸ El CD-40L que se encuentra en los linfocitos se une al CD-40 expresado en la superficie de los macrófagos, induciendo la síntesis de metaloproteasas y favoreciendo la progresión de la placa y su ruptura⁹¹.

Otro hecho que apoya el papel de la activación de la inflamación en la aterosclerosis es el resultado de los estudios realizados *in vitro* donde se mide la heterogeneidad “termogénica” de las placas estables frente a aquellas inestables cercanas de la ruptura. En animales de experimentación se ha observado que las

placas inestables, presentaban una mayor termogénesis que las estables⁹⁹. Esto se ha analizado en humanos, midiéndolo mediante un catéter de termografía en las arterias coronarias, confirmando los mismos resultados¹⁰⁰.

3.1.1 Papel aterogénico de las VLDL y de los triglicéridos

Los triglicéridos (TG) de la dieta se absorben a nivel de intestino delgado junto al colesterol formándose una vez unido a la apoB48 los quilomicrones. Estos se transfirieren a la linfa y posteriormente al torrente sanguíneo donde reciben apoC y apoE por parte de las partículas de HDL. A nivel de la pared vascular se encuentra la lipoproteinlipasa (LPL) periférica, principalmente en tejido adiposo y muscular donde son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos. Los remanentes de quilomicrones acuden al hígado donde son captados por receptores hepáticos B48:E para continuar su catabolismo por la LPL hepática. A nivel hepático se sintetizan las partículas de VLDL a partir de los TG sintetizados en el hígado unido a la apoB100, apoC y apoE. Las partículas de VLDL son hidrolizadas al igual que los quilomicrones por la LPL, aunque parece que el aclaramiento no es igual en ambas, siendo los quilomicrones el sustrato “preferido” por esta enzima¹⁰¹, acudiendo los remanentes de VLDL parte al hígado y parte sintetizándose como partículas de LDL.

El aumento de la trigliceridemia postprandial se asocia a una serie de cambios proaterogénicos como el aumento de las concentraciones de quilomicrones y sus remanentes, aumento de las concentraciones de VLDL y remanentes a nivel hepático, disminución de las HDL por un aumento de la actividad de la CETP transfiriendo colesterol HDL a las lipoproteínas ricas en triglicéridos, una disminución del tamaño y una mayor densidad de las LDL favoreciendo su oxidación y una mayor

asociación de la Lp(a) a las lipoproteínas ricas en triglicéridos¹⁰². Los remanentes de quilomicrones y de VLDL son capaces de atravesar el endotelio disfuncional¹⁰³, acumulándose a nivel del espacio subendotelial y siendo captados por los macrófagos. Este proceso favorece la formación de las células espumosas, iniciando la formación de las estrías grasas.

Además actualmente existen estudios que plantean la existencia de nuevas vías de interacción de las lipoproteínas con las células sanguíneas (leucocitos y eritrocitos). De hecho se postula que la interacción lipoproteína-célula puede estar implicada en el proceso aterosclerótico induciendo cambios proinflamatorios en el caso de los leucocitos y antiinflamatorios a través de los eritrocitos mediante un sistema de transporte ligado al receptor de complemento 1 (CR1) por el que se unirían lipoproteínas que contengan ApoB. Las lipoproteínas ricas en triglicéridos median la activación de los leucocitos aumentando la producción de citoquinas y originando por tanto un daño endotelial agudo, mientras que los eritrocitos podrían constituir un sistema de extracción de partículas proinflamatorias¹⁰⁴.

3.2. Marcadores de inflamación y aterosclerosis

Numerosas evidencias a nivel epidemiológico establecen una asociación directa entre las elevaciones plasmáticas de marcadores inflamatorios como la PCR, la IL-6 y el TNF- α , con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, pues posiblemente el aumento local de mediadores de la inflamación en distintos puntos arteriales facilita el paso de estas sustancias a la sangre, reflejándose en un incremento sérico de estos marcadores.

Al ser la aterosclerosis un proceso inflamatorio crónico, los factores pro-inflamatorios podrían constituir un marcador de riesgo por sí mismos, independientemente de los niveles de colesterol y de los reguladores de la presión arterial.⁹⁸

3.2.1. La proteína C reactiva (PCR)

La PCR es una proteína pentamérica sintetizada en el hígado en su mayor parte aunque se han sugerido otras localizaciones de síntesis y secreción a nivel local, como a nivel de la placa de ateroma¹⁰⁸. Su acción es activar el complemento y contrarrestar las infecciones, siendo el principal estímulo para su síntesis la IL-1 y la IL-6 e indirectamente el TNF- α ¹⁰⁹.

Si se analiza su papel dentro de la patogenia de la aterosclerosis, en aquellos estados donde hay una mayor producción de IL-6 a partir de los adipocitos, como en el síndrome metabólico²⁰, la resistencia a la insulina, la obesidad abdominal¹⁸ e incluso la diabetes mellitus¹⁹ se asocian con un aumento en las concentraciones de PCR. Este incremento puede ser secundario al aumento de las concentraciones de IL-6.

La PCR tiene la capacidad de unirse a los lípidos y a las lipoproteínas plasmáticas LDL y VLDL de forma selectiva¹¹⁰. Se cree que se une particularmente a las LDL oxidadas, aquellas con mayor potencial aterogénico, favoreciendo posteriormente la activación del complemento¹¹¹.

En estudios realizados in vitro a partir de extractos de arteria procedente de endarterectomías o by-pass cardiaco se observa que expresan ampliamente ARN mensajero para PCR, relacionándose con las concentraciones de PCR plasmáticas y confirmando la colaboración de la placa de ateroma en el aumento de los niveles de PCR en plasma¹¹². Al añadir PCR a un cultivo celular en presencia de LDL se favorece la formación de células espumosas¹¹³ aunque se desconoce si se debe a un efecto directo de la PCR sobre el macrófago o bien si actúan sobre la LDL favoreciendo la opsonización.

En estudios realizados en modelos animales se observa que la PCR junto con la Lp-PLA2 (fosfolipasa tipo 2 asociada a las lipoproteínas) pueden predecir la inestabilidad de la placa de ateroma¹¹⁴. Sin embargo, en un estudio realizado con ratones knockout incapaces de producir PCR, no se observa un menor desarrollo aterosclerótico¹¹⁵.

Datos procedentes de estudios prospectivos en humanos demuestran que la PCR puede predecir de forma independiente la aparición de enfermedad cardiovascular¹¹⁶. De hecho actualmente la American Heart Association considera la PCR un marcador independiente de riesgo cardiovascular^{117,118}, recomendándose su uso como marcador de riesgo principalmente en pacientes asintomáticos con riesgo cardiovascular intermedio. Estas recomendaciones se basan en una serie de estudios de cohortes donde se objetiva la relación entre concentraciones elevadas de PCR y la aparición de un mayor riesgo o enfermedad cardiovascular.

En el estudio MONICA (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease), realizado en hombres sanos de mediana edad se observó que los niveles de PCRus elevados constituían un factor de riesgo cardiovascular, de forma que el aumento de 1 desviación estándar de PCRus se asociaba con un riesgo relativo de 1,67 (95%IC 1,29-2,17) de desarrollar enfermedad cardiovascular¹¹⁹.

En otro trabajo realizado en hombres sanos se vio que aquellos con concentraciones más elevadas de PCRus presentaban mayor riesgo de desarrollar infarto agudo de miocardio o accidente cerebro vascular frente a aquellos con concentraciones bajas. En aquellos hombres con concentraciones elevadas de PCRus a los que se les administró aspirina⁹ se apreció una menor incidencia de enfermedad cardiovascular que en los que tomaron placebo¹²⁰, apoyando el papel antiinflamatorio beneficioso o antiagregante del AAS en la aterosclerosis y una situación de mayor micro- inflamación y por tanto de mayor riesgo en los sujetos con PCRus más alta.

En un estudio realizado en mujeres dentro del Women's Health Study se observó que, en las de bajo y alto riesgo cardiovascular según los parámetros clásicos, la PCRus era un factor de riesgo independiente de desarrollo de enfermedad cardiovascular¹²¹. En un trabajo posterior también realizado en mujeres del mismo estudio, pero en este caso post-menopáusicas, se comprobó que añadir los valores de PCRus a los valores de medición tradicionales de riesgo cardiovascular, constituía un mejor método para seleccionar personas en riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares¹²².

En el caso de los pacientes diabéticos, la PCRus constituye un factor predictor de riesgo de mortalidad cardiovascular y mortalidad por todas las causas situación que se observó también en los controles no diabéticos¹⁷.

Si se analiza el papel de la PCRus en los ancianos, también se observa en

este grupo de edad que las concentraciones elevadas constituyen un factor de riesgo de mortalidad¹²³. En otro trabajo publicado, se ve que la PCRus constituye un factor de riesgo independiente de mortalidad, sólo en aquellos pacientes de 75 años, frente a otras cohortes de 80 y 85 años, estando no obstante asociados los niveles elevados de PCRus con otros factores de riesgo convencionales en los tres grupos de edad¹²⁴.

Dentro de los trabajos realizados en prevención primaria se encuentra el estudio Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention que comparó el efecto de lovastatina frente a placebo en hombres y mujeres sin enfermedad cardiovascular con bajo colesterol-HDL. En el brazo de lovastatina se observó un marcado descenso del riesgo cardiovascular en aquellos con un ratio colesterol total: colesterol-HDL por debajo de la media y con PCRus elevada¹²⁵ frente a aquellos sin tratamiento con estatinas y con un ratio colesterol total: colesterol-HDL por debajo de la media y con PCRus elevada. Esto planteó que la PCRus elevada por si misma podría constituir un factor de riesgo vascular en personas en prevención primaria con concentraciones de colesterol-LDL o un ratio colesterol total: colesterol HDL por debajo de la media. Por ello se planteó el desarrollar un estudio prospectivo randomizado contra placebo a gran escala para corroborar esta hipótesis: el estudio JUPITER¹²⁶.

El estudio JUPITER hizo un seguimiento prospectivo donde se examinó el efecto del consumo de rosuvastatina en pacientes con PCR elevada (> 2 mg/l), sin enfermedad cardiovascular previa y con niveles normales o bajos de colesterol de baja densidad (colesterol LDL < 130 mg/dl, colesterol LDL $< 3,4$ mmol/l) frente a placebo. El objetivo primario del estudio era comparar la aparición de un episodio cardiovascular mayor en ambos grupos (infarto agudo de miocardio, accidente cerebro vascular agudo no fatal, hospitalización por angina inestable, revascularización arterial o muerte secundaria a enfermedades cardiovasculares). Las características basales de ambos

grupos no diferían presentando una concentración media de PCRus de 4,2 mg/l en el grupo de rosuvastatina y de 4,3 mg/l en el grupo de placebo, con cifras de colesterol LDL 2,8 mmol/l (108 mg/dl) de mediana en ambos grupos. Tras un seguimiento de media de 1,9 años se vio una reducción del 44% en la aparición de enfermedad cardiovascular y una disminución del 20% en la mortalidad total en los pacientes tratados con rosuvastatina frente a placebo. Estos resultados ponen de manifiesto que la PCRus superior a 2 mg/l puede constituir el único factor o marcador de riesgo vascular y que aquellos pacientes con este único factor de riesgo se pueden beneficiar de un tratamiento con estatinas para disminuir su mortalidad tanto cardiovascular como total.

En pacientes con enfermedad coronaria aguda, la PCRus también puede ayudar a estratificar el riesgo de aparición de nuevos eventos y tiene un valor pronóstico.

En el estudio CARE se demostró que la presencia de niveles elevados de PCRus después de un infarto agudo de miocardio (IAM) se asocia con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular recurrente. Además, se observó que el tratamiento con estatinas disminuye las concentraciones de PCRus en 20-30%, disminuyendo el riesgo cardiovascular sin considerar el propio secundario al descenso de colesterol¹²⁷. En estudios realizados en pacientes con síndrome coronario agudo se observó, mediante un catéter de termografía, un aumento de temperatura de las placas inestables, que guardaba relación con mayores concentraciones de PCRus¹²⁸. El hecho de presentar concentraciones de PCRus elevadas en el momento del ingreso en pacientes con angina inestable, se asocia con una peor evolución¹²⁹. No obstante, hay una relación más potente entre una peor evolución post-angina y las concentraciones de PCRus al alta, que en el momento del ingreso¹³⁰. Sin embargo, en

otros dos trabajos publicados, la PCRus no era capaz de predecir la evolución de los pacientes en cuanto al desarrollo de enfermedad cardiovascular^{131,132}.

En aquellos pacientes donde se realiza trombolisis tras IAM, el presentar concentraciones elevadas de PCRus se relaciona con una mayor mortalidad a los 6 meses después del IAM¹³³. Resultados similares se encontraron en pacientes a los que se les realiza coronariografía, donde las concentraciones elevadas de PCRus se relacionan con el desarrollo de nuevos episodios cardiovasculares¹³⁴.

En el caso de la prevención secundaria, un sub-estudio del PROVE-IT evaluó los efectos de pravastatina vs atorvastatina en pacientes con antecedentes de IAM, y reveló que las disminuciones de la PCRus se relacionaban con un menor riesgo de presentar enfermedad coronaria recurrente en pacientes que ya habían presentado un infarto agudo de miocardio. Aquellos pacientes que tras el tratamiento con estatinas presentaban altas concentraciones de PCRus, pese a tener bajas concentraciones de colesterol-LDL tenían mayor riesgo de nuevos episodios cardiovasculares¹³⁵. En otro estudio realizado en pacientes que habían padecido un episodio de angina inestable o con angina estable, la PCRus elevada se considera un factor de riesgo de desarrollo de nuevos episodios de angina, siendo útil, por tanto, en el manejo de la enfermedad coronaria¹³⁶. Si nos preguntamos sobre el efecto de la PCRus sobre la progresión de la lesión aterosclerótica en pacientes con enfermedad coronaria, en el estudio REVEAL se vio que al disminuir las concentraciones de PCRus con tratamiento intensivo con estatinas, disminuía la progresión de la placa¹³⁷.

3.2.2. La interleucina-6 (IL-6)

La IL-6 es una de las principales citoquinas proinflamatorias junto con el TNF alfa y la IL-1. Es un mediador central de la respuesta inflamatoria de fase aguda y uno de los principales determinantes de la producción de PCR¹³⁸. Es secretada por monocitos y macrófagos, promoviendo la disfunción endotelial, la proliferación y migración de células musculares lisas, reclutamiento y activación de células inflamatorias y la formación de células espumosas¹³⁹. Además parece que las especies reactivas de oxígeno lipídicas y la angiotensina II juegan un papel en la regulación de la expresión de IL-6¹⁴⁰.

En un estudio realizado *in vitro*, se demostró que los extractos de placa ateromatosa humana aumentaban la expresión de ARN mensajero de factores proinflamatorios como la IL-6, entre otras citoquinas, en los macrófagos.¹⁴¹ Esto demuestra el papel pro-inflamatorio de la placa y la vinculación de los factores proinflamatorios con la activación y perpetuación del proceso aterosclerótico. No obstante, actualmente se plantea si la IL-6 puede jugar un papel protector de la acumulación de colesterol en los macrófagos. Los macrófagos con gran carga lipídica presentan una gran expresión de IL-6. Esta mayor expresión de IL-6 origina una mayor expresión de ABCA1 (ATP binding cassette A1), transportador encargado de mantener la homeostasis del macrófago y por tanto del acúmulo lipídico en su interior mediante la capacidad de eliminar colesterol libre hacia la apoA1. En un estudio reciente se observó que los macrófagos tratados con IL-6 aumentaban su capacidad de fagocitar células apoptóticas, aumentaban la síntesis de citoquinas antiinflamatorias como la IL-4 o la IL-10, minimizando el fenotipo inflamatorio de los macrófagos, y favorecían la eliminación de colesterol libre mediante la ABCA1¹⁴².

En estudios experimentales realizados en ratones modificados genéticamente, susceptibles a la aterosclerosis, que son alimentados con una dieta rica en grasas aumentaban las lesiones ateroscleróticas al tratarlos con IL-6¹⁴³. Esto es apoyado por otros trabajos experimentales con ratones donde observan una asociación causal entre la IL-6 y el TNF α y el desarrollo de la aterosclerosis^{144,145}. Sin embargo, en ratones IL6/ApoE doble KO mantenidos durante un año con una dieta proaterogénica, rica en grasas, se observaba un factor ateroprotector de la IL-6. Por eso parece que la IL-6 puede jugar diferentes papeles dentro del proceso aterosclerótico, una veces de protección, otras de daño¹⁴⁶.

La asociación existente en estudios epidemiológicos entre la IL-6 y el TNF α y el aumento del riesgo cardiovascular es más débil que para la PCRus¹⁴⁷. De todos modos existen varios estudios de casos-controles y prospectivos poblacionales en pacientes sanos y/o con enfermedad cardiovascular donde se observa que la IL-6 se asocia con el desarrollo de enfermedad cardiovascular o con progresión de la misma.

En la Offspring Cohort del estudio de Framingham, la concentración de IL-6 se asociaba con un mayor grosor de intima media y con la presencia de estenosis carotídea¹⁴⁸. En un estudio prospectivo realizado en mujeres postmenopáusicas se observó que la IL-6 se asocia con el desarrollo de enfermedad cardiovascular, siendo definida ésta como muerte por enfermedad coronaria, IAM, accidente cerebrovascular o necesidad de revascularización coronaria¹²². En un trabajo prospectivo realizado en hombres sanos, se observó que aquellos con concentraciones de IL-6 más elevadas, presentaban mayor riesgo de desarrollo de IAM en 6 años de seguimiento¹⁴⁹.

Si se analizan los estudios prospectivos realizados en pacientes ancianos sanos se observa que las concentraciones elevadas de IL-6 se relacionan con una mayor mortalidad a los 4 años de seguimiento tanto de origen cardiovascular como por

todas las causas¹²³. Resultados similares se obtienen en una cohorte donde se observó que las concentraciones plasmáticas elevadas de IL-6, TNF- α y PCRus pueden predecir el desarrollo de enfermedad cardiovascular, siendo la asociación más consistente para la IL-6¹⁵⁰. Sin embargo, en una cohorte italiana (InChianty Study) también de ancianos, se vio que las concentraciones elevadas de IL-6 se asocian con concentraciones bajas de colesterol-HDL¹⁵¹. No obstante se desconoce el por qué de esta asociación.

En lo referente al papel de la IL-6 en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida, se vio en estudios de casos-controles en comparación con pacientes sanos que aquellos pacientes con angina estable presentaban concentraciones de IL-6, PCRus e IL-1 β superiores a los controles, disminuyendo estas concentraciones tras tratamiento con aspirina durante 6 semanas¹⁵². Similares resultados se observaron en otros trabajos realizados en pacientes con enfermedad coronaria crónica^{153,154}.

En el caso de la enfermedad coronaria aguda, no se observaron diferencias en la concentración de IL-6 entre pacientes con angina inestable y angina estable¹⁵⁵. Sin embargo en un estudio prospectivo se vio que aquellos pacientes ingresados por un episodio de angina inestable que presentaban un incremento de niveles de IL-6 a las 48h respecto al día de ingreso, presentaban una mayor tasa de complicaciones hospitalarias¹⁵⁶.

En lo referente a la arteriopatía periférica crónica, las concentraciones elevadas mantenidas de IL-6 se asocian con un empeoramiento funcional más rápido en comparación con aquellos pacientes con concentraciones de IL-6 fluctuantes o más bajas de forma persistente¹⁵⁷.

3.2.3. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El TNF α es una citoquina multifuncional, sintetizada en el endotelio, en las células de músculo liso, en los macrófagos, mastocitos y neutrófilos. Juega uno de los papeles principales en la cascada inflamatoria y estimula la síntesis de otras citoquinas.

Como se ha comentado previamente la aterosclerosis comienza con el daño endotelial, aumentando la expresión de moléculas de adhesión celular como la VCAM-1, ICAM-1 que a su vez favorecen la migración al espacio subendotelial de leucocitos y su reclutamiento. Dentro de los estímulos necesarios para una mayor expresión de estas moléculas se encuentra el TNF α ⁸³ junto a otras citoquinas como la IL6 y el IFN γ . Siendo el TNF α la que induce una respuesta más potente activando la célula endotelial y la promoviendo la adhesión de los neutrófilos¹⁵⁸. Ya que la fuente de síntesis del TNF α puede ser múltiple a nivel de la lesión aterosclerótica, en un estudio reciente se ha observado que la funcionalidad de ésta es la misma independientemente de su origen en cuanto a estímulo sobre las moléculas de adhesión molecular expresadas por el endotelio.

En cuanto a la relación entre la dieta y las concentraciones de TNF α , en estudios realizados en cultivos celulares, la incubación de macrófagos con colesterol resultaba en un incremento en la secreción de TNF α ¹⁵⁹. En estudios realizados en animales de forma experimental, se observó que aquellos ratones knockout para apoE y TNF α , presentaban menos lesiones ateroscleróticas pese a una dieta rica en grasas^{144,145}.

En un análisis multi-variante de estudios poblacionales se observó que aquellos pacientes tratados con estatinas no presentaban concentraciones menores

de $\text{TNF}\alpha$ que aquellos sin tratamiento, mientras que sí presentaban una menor concentración de PCRus¹⁶⁰. Sin embargo en un trabajo realizado en pacientes con enfermedad aterosclerótica establecida, se vio que las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ junto con las de PCRus y del grosor íntima media carotideo, aportan un valor añadido en la estratificación del riesgo cardiovascular¹⁶¹.

En pacientes con enfermedad coronaria aguda, no se observaron diferencias en la concentración de $\text{TNF}\alpha$ entre pacientes con angina inestable y angina estable¹⁵⁵. En otro trabajo realizado en pacientes que habían sufrido un IAM, tras un seguimiento de tres años, no existían diferencias en las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ entre aquellos que padecían un nuevo episodio coronario frente a aquellos que se mantenían estables. Ello puede justificarse porque aquellos pacientes de alto riesgo cardiovascular presentan un estado inflamatorio crónico inestable, pese a la estabilidad de su enfermedad¹⁶².

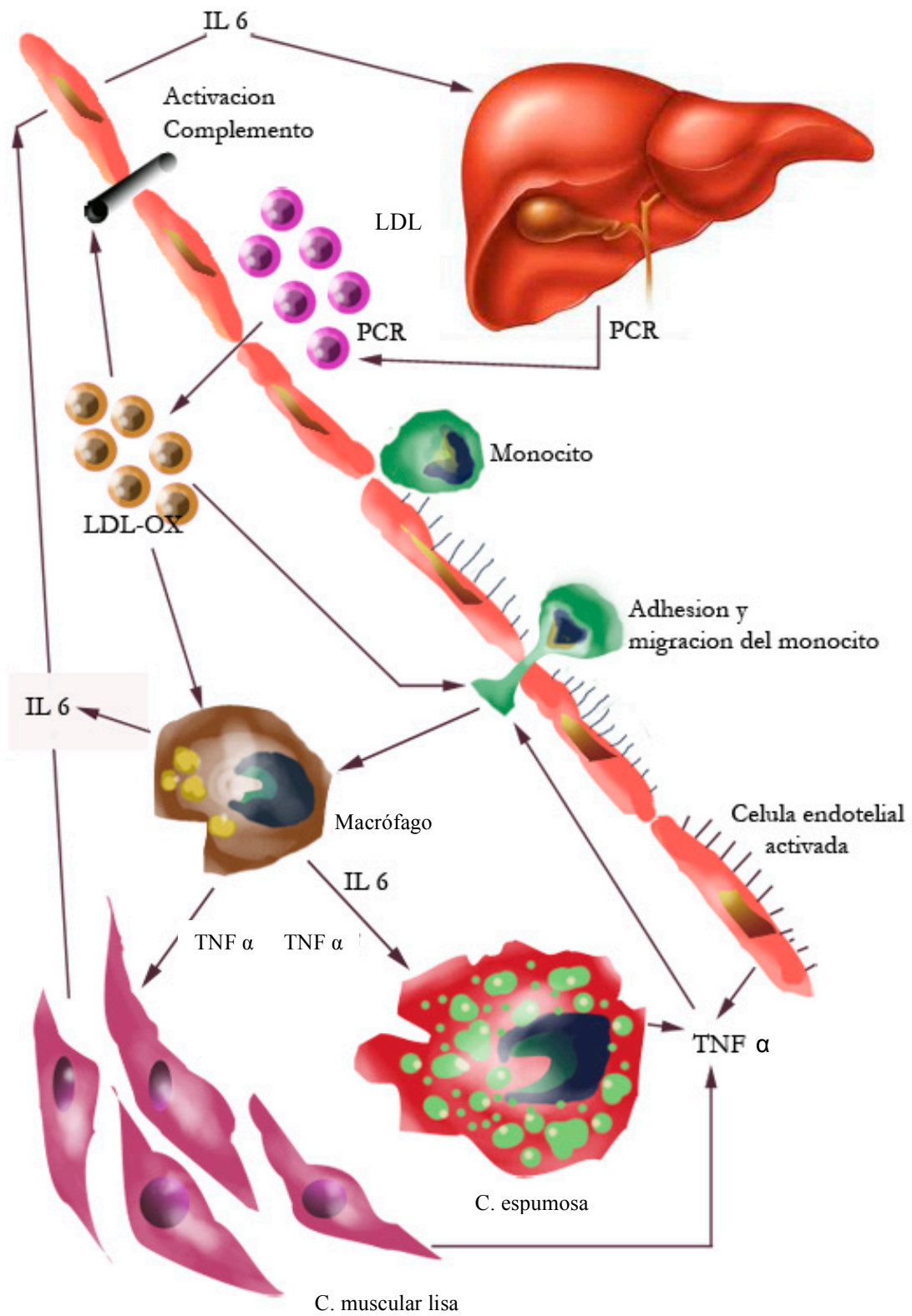


Figura 2. Esquema del papel de la IL-6, TNF α y PCR en la formación de la placa de ateroma

3.2.4. La fosfolipasa A2 secretora (PLA_{2s})

La fosfolipasa A2 es una enzima ubicua, encargada de la hidrólisis de la porción sn-2-acyl de los fosfolípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, y de ceder ácidos grasos libres y liso fosfolípidos, precursores de varios mediadores inflamatorios como los leucotrienos, eicosanoides, prostaglandinas y el factor activador de plaquetas¹⁶³. Se han diferenciado hasta 15 grupos de fosfolipasa A2, dividiéndose en 4 grupos principales¹⁶⁴:

- La secretora (PLA_{2s})
- La citosólica
- La calcio-independiente
- La acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas o fosfolipasa asociada a las lipoproteínas (Lp-PLA₂).

La PLA_{2s} se caracteriza por ser una enzima de tamaño menor que el resto de la familia de PLA₂, y es calcio-dependiente. Se diferencian 3 grupos según su localización, encontrándose en el hombre la tipo IB o pancreática y la tipo IIA que se encuentra en la sinovial, plaquetas y placa de ateroma¹⁶³.

Se expresa en gran cantidad en la pared arterial a nivel de las placas ateroscleróticas¹⁶⁵, colaborando en la inducción de la diferenciación de los monocitos a macrófagos, incrementando su capacidad adhesiva y migratoria y posteriormente participando en su transformación en células espumosas¹⁶⁶.

En modelos animales transgénicos que expresan PLA_{2s} tipo II, éstos presentan una marcada aterosclerosis y alteración de las lipoproteínas sugiriendo un papel dentro de la patogenia de la aterosclerosis¹⁶⁷.

Los pacientes con enfermedad coronaria establecida, presentan concentraciones más elevadas de PLA₂s tipo II, prediciendo estos niveles la aparición de nuevos episodios cardiovasculares en este grupo de pacientes¹⁶⁸. En pacientes con angina, los niveles de PLA₂s tipo II se correlacionan de forma positiva con la edad y con las concentraciones de PCRus. Se ha visto que las concentraciones en pacientes diabéticos son superiores así como en los pacientes con angina estable o vasoespástica. Además constituyen un factor de riesgo independiente para el desarrollo de angina vasoespástica¹⁶⁹. En un estudio publicado muy recientemente, la fosfolipasa A2 plasmática es capaz de predecir mortalidad a las 16 semanas de un episodio de angina coronaria. Parece que las estatinas, en este caso atorvastatina, presenta efectos moduladores de la inflamación sobre las fosfolipasas, disminuyendo su concentración después de un episodio de angina coronaria¹⁷⁰.

Otro trabajo de reciente publicación, realizado en una cohorte sueca de pacientes ancianos, muestra que las concentraciones plasmáticas de la PLA₂s son un factor de riesgo para la mortalidad por todas las causas (HR 1,45 para 1 desviación estándar de incremento (IC 95% 1,15-1,18)) así como para un nuevo infarto agudo de miocardio en pacientes con un episodio previo¹⁷¹.

3.3. Oxidación, capacidad antioxidante y aterosclerosis

El metabolismo aeróbico en el ser humano origina especies reactivas de oxígeno que son pro-oxidantes. Estas especies pro-oxidantes lesionan las moléculas biológicas como el ADN, los lípidos o proteínas, por lo que el organismo debe tener capacidad de neutralizarlas, es decir tiene que disponer de toda una serie de mecanismos antioxidantes tanto intra como extracelulares¹⁷². La ingesta de una dieta aterogénica estimula el desarrollo de mecanismos de defensa antioxidantes¹⁷³ pero si se mantiene el estímulo aterogénico, estos mecanismos llegan a ser insuficientes. La oxidación de las biomoléculas origina una pérdida de sus funciones biológicas, de la homeostasis del medio y la alteración de células y tejidos. La cronicidad de este daño conlleva el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como la aterogénesis, la diabetes mellitus y el cáncer^{174,175}.

Una de las biomoléculas capaces de ser oxidada es el colesterol. El colesterol participa de forma activa en el mantenimiento de la funcionalidad de las membranas biológicas. Al ser oxidado, da lugar a oxisteroles, promoviendo la oxidación de otros lípidos de membrana y de las LDL. Ello favorece no solo alteraciones en la permeabilidad de las membranas, sino también el proceso aterosclerótico¹⁷⁶

La oxidación del colesterol de las LDL se lleva a cabo principalmente en la íntima de la pared arterial. Uno de los principales oxidantes implicados es el anión superóxido, liberado por los monocitos-macrófagos y por las células de músculo liso. Dentro de las posibles vías para la oxidación in vivo se encuentran las mediadas por¹⁷⁷:

- La NADPH oxidasa de membrana.
- La inhibición de la superóxido dismutasa a través de los neutrófilos y

monocitos activados.

- Los quelantes de metales. Los tioles se autooxidan en presencia de metales, formando radicales libres y superóxidos.
- La mieloperoxidasa, secretada por macrófagos activados.
- El óxido nítrico y peroxinitritos producidos por las células endoteliales y macrófagos activados.

Las LDL oxidadas desempeñan un papel importante tanto en el inicio como en la progresión de la placa de ateroma. De este modo, una vez que se inicia la oxidación de una partícula de LDL a nivel del espacio subendotelial ésta se transforma en una LDL con una oxidación lipídica mínima (LDL-MM) o media (LDL-M). Una vez transformada se comporta como un cuerpo extraño y provoca el aumento de la adhesión vascular de los linfocitos y la secreción de MCP-1 por el endotelio y posteriormente por los monocitos que son atraídos para eliminar esos cuerpos extraños en los que se han convertido las LDL modificadas. Posteriormente los monocitos transformados en macrófagos también liberan M-CSF, favoreciendo la proliferación celular en el espacio subendotelial. Según aumenta la concentración de macrófagos, las LDL-MM aumentan su oxidación, perdiendo la capacidad para ser reconocidas por el receptor de LDL, siendo eliminadas a través de los receptores scavengers de los monocitos-macrófagos. Este proceso no es regulado por las concentraciones de colesterol intracelular, como sí ocurre con el receptor clásico de LDL, que se “satura” impidiendo que entren más LDL a las células de los parénquimas. Esa falta de inhibición del receptor scavenger favorece el acúmulo de lípidos en su interior y con ello la transformación de los macrófagos en células espumosas. Éstas originan un aumento de la inflamación, de la agregación plaquetaria y de la

proliferación de células musculares lisas¹⁷⁸.

Frente a la tendencia oxidativa, el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos que lo protegen frente a ella, desempeñado por los factores antioxidantes.

La alteración del balance entre factores oxidantes y antioxidantes es lo que origina las alteraciones a nivel de la pared arterial. Se ha de tener en cuenta que los radicales de oxígeno libre, en concentraciones bajas, son necesarios para regular la contracción-relajación de células musculares lisas, su crecimiento, etc., actuando como moléculas señalizadoras y tienen un papel en condiciones fisiológicas normales³¹. Dentro de los elementos antioxidantes se encuentran:

- Enzimas como la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa, la catalasa y la superóxido dismutasa¹⁰¹.
- Sustancias lipofílicas como el α -tocoferol, el β -caroteno, retinoides, flavonoides, ubiquinol-10.
- Sustancias hidrosolubles como la vitamina C, tioles, bilirrubina y uratos.
- Cofactores de las enzimas citadas previamente, como el cobre, selenio, hierro, manganeso, zinc y aminoácidos.

La superóxido dismutasa¹⁰¹ es la principal defensa antioxidante del organismo de los mamíferos. Existen 3 isoformas: la citoplasmática, la mitocondrial y la extracelular, necesitando todas ellas un metal como coenzima (cobre o manganeso) para su activación¹⁷⁹. Juega un papel importante en la inhibición del óxido nítrico, previene la formación de peroxinitritos y por tanto la disfunción endotelial y mitocondrial. La isoforma citoplasmática se expresa en la mayor parte de las células,

estando también presente en la pared arterial. Su expresión es mayor en las mujeres y tras la realización de ejercicio. Su déficit se relaciona con una mayor respuesta vasoconstrictora, mayor permeabilidad vascular y con mayor hipertrofia de la muscular arteriolar en estudios realizados en ratas¹⁸⁰. La isoforma extracelular se encuentra en la pared arterial, entre el endotelio y la capa muscular, y parece que es el músculo y no el endotelio el que la produce. Constituye la mayor parte de la SOD activa en el vaso, de forma que su expresión se puede alterar por la presencia de citoquinas, angiotensina II, etc. Se cree que su principal función es la de proteger frente al NO mientras atraviesa la pared vascular. La isoforma mitocondrial se encuentra en menor concentración en el vaso sanguíneo, existiendo diferencias según el sexo, probablemente secundarias al estímulo estrogénico, de forma que las mujeres expresan más esta enzima¹⁷⁹.

Las glutatión peroxidasas son una familia de enzimas encargadas de disminuir la oxidación de los lípidos. Se encargan de reducir los peróxidos de hidrógeno a agua y los hidroperóxidos lipídicos a alcohol. Existen varias isoformas de las cuales la 1 se encuentra en el citoplasma y en la mitocondria y la 3 en las moléculas de HDL. Aquellos individuos con una menor actividad plasmática de esta enzima y bajas concentraciones de colesterol HDL tienen una mayor mortalidad cardiovascular¹⁸¹.

Dentro de los antioxidantes liposolubles, el α -tocoferol es el principal antioxidante de las partículas de colesterol LDL, con una media de 6 moléculas en cada una. Esta capacidad la desarrolla gracias al transporte de radicales peróxido, siendo de esta forma menos reactiva. El ubiquinol-10, beta caroteno, y los flavonoides, también juegan un papel en inhibir la oxidación del colesterol LDL^{182,183}.

No está claro el papel de los tioles en la oxidación de las moléculas de LDL,

existiendo datos que apuestan por un papel en la oxidación, mediante el estímulo de iones férricos (III)¹⁸⁴ y otros que hablan de cierto potencial antioxidante, a través de la inhibición mediada por el cobre (Cu II)¹⁸⁵.

La vitamina C es uno de los antioxidantes hidrosolubles más potentes, siendo la base de su capacidad antioxidante el hecho de que es capaz de donar electrones, siendo ella oxidada en ese proceso. En comparación con otros radicales libres, el radical ascórbico es más estable, en lo que se basa su capacidad antioxidante. La acción antioxidante del ácido ascórbico está presente a nivel del metabolismo de los lípidos, las proteínas y el ADN. A nivel vascular parece que favorece la síntesis de NO, protegiéndolo de su oxidación. Sin embargo a nivel de estudios in vivo es difícil asociar un efecto protector de la vitamina C con un menor riesgo cardiovascular debido a la presencia de numerosos factores de confusión¹⁸⁶. Sí parece que existe una asociación entre menores concentraciones de PCRus y mayor concentración de vitamina C en plasma¹⁸⁷.

Respecto al papel de los uratos en el proceso aterosclerótico, éstos constituyen otras de las sustancias encargadas de la resistencia a la peroxidación lipídica. Esto se debe a la interacción con otro potente antioxidante como el ácido ascórbico. No sólo actúa como scavenger sino que es capaz de estabilizar el ácido ascórbico, gracias a la quelación del hierro originada por el ácido úrico¹⁸⁸.

3.3.1 Polifenoles y antioxidación

Los polifenoles son uno de los antioxidantes más ubicuos en la naturaleza, estando presentes en multitud de alimentos de origen vegetal, así como en bebidas realizadas a partir de estos alimentos como el vino, el té, la cerveza y el café. Los

polifenoles son sustancias bioactivas derivadas de estructuras fenólicas que engloban numerosos compuestos químicos con diferente estabilidad, biodisponibilidad y funciones biológicas.

Se pueden clasificar según su estructura química en ácidos fenólicos, flavonoides, amidas polifenólicas y otros polifenoles donde se englobarían el resveratrol, la curcumina, los lignanos, el ácido gálico y eláxico, el ácido rosmarínico, el gingerol, etc.¹⁸⁹

El vino tinto es una de las bebidas con mayor concentración de polifenoles (1.000-4.000 ng/ml), como el ácido fenólico, flavonoides, resveratrol, quercetina, los antocianinos, los taninos y los estilbenos. La capacidad de absorción oral de los polifenoles se ve influida por el metabolismo intraluminal y de primer paso, junto a otros menos conocidos que disminuyen la biodisponibilidad de los polifenoles en su forma metabolizada¹⁹⁰. De hecho la absorción oral de la quercetina es de aproximadamente un 20% en humanos¹⁹¹.

Dentro de los efectos antioxidantes de los polifenoles destacan la protección contra la oxidación de las LDL¹⁹² y la disminución de la expresión del CD 36 en los macrófagos (receptor scavenger)¹⁹³ que origina una menor progresión a células espumosas, la activación de ABCA1¹⁹⁴ y la disminución de MCP-1¹⁹⁵, así como un efecto antitrombótico¹⁹⁶.

Diferentes estudios de cohortes han observado una asociación entre una menor ingesta de polifenoles (flavonoides) y un mayor riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria. En una cohorte de ancianos se observó un mayor riesgo de mortalidad coronaria en aquello con menor ingesta de flavonoides aunque la asociación con el infarto agudo de miocardio no tuvo diferencias significativas¹⁹⁷. Posteriormente se analizaron cohortes más amplias como la perteneciente al estudio

de Siete Países¹⁹⁸ donde la ingesta de flavonoides se asoció con una menor mortalidad cardiovascular y una cohorte de población finlandesa¹⁹⁹ sin enfermedad cardiovascular donde la ingesta baja de flavonoides se asoció con un mayor riesgo de enfermedad coronaria. Sin embargo, en el caso de las cohortes del Health Professionals Follow up Study²⁰⁰ y Caerphilly Study²⁰¹ no se objetivó asociación entre el consumo de flavonoides y la mortalidad de origen coronario. Debido a la controversia en los resultados en 2002 se desarrolló un nuevo trabajo a partir de la cohorte del Rotterdam Study donde se confirmaba de nuevo que la ingesta de flavonoides se asociaba de forma inversa con la aparición de infarto agudo de miocardio fatal²⁰².

3.4. Papel del consumo de una dieta rica en grasas

3.4.1. Sobre el proceso aterosclerótico y la enfermedad cardiovascular

Los cambios en el estilo de vida constituyen una de las principales y primeras medidas para la prevención y tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Junto con las recomendaciones de evitar el hábito tabáquico y realizar ejercicio físico diario se encuentran las relacionadas con la dieta.

Dentro del contenido en grasas se ha de diferenciar la repercusión de los diferentes tipos de ácidos grasos. Mientras que las grasas saturadas y las grasas insaturadas trans aumentan las concentraciones de colesterol total y colesterol LDL y por tanto incrementan el riesgo cardiovascular, las grasas monoinsaturadas y las grasas poliinsaturadas lo disminuyen²⁰³. Dentro de las grasas poliinsaturadas se encuentran los ácidos grasos omega 3 y 6, esenciales y éstos últimos también con un efecto ateroprotector, debido a su capacidad para disminuir las concentraciones de triglicéridos²⁰⁴. El consumo de ácidos grasos omega-3 se asocia con una menor mortalidad cardiovascular en pacientes de alto riesgo²⁰⁵.

Tanto la dieta occidental como la dieta mediterránea tienen aproximadamente un 35-38% de contenido en grasas. Sin embargo la dieta mediterránea tiene menor porcentaje de ácidos grasos saturados, por lo que presenta un perfil más cardiosaludable²⁰⁶.

Los animales no desarrollan aterosclerosis de forma espontánea, por lo que para poder extrapolar los resultados a humanos se deben crear modelos de experimentación. Desde hace un siglo se conoce la repercusión de la dieta rica en grasas sobre el perfil lipídico en experimentación animal²⁰⁷. Estas líneas de

investigación siguen en plena vigencia, ya que persiste el interés en mejorar el conocimiento en la patogenia de la aterosclerosis y su relación con los cambios dietéticos.

En un estudio reciente realizado en ratones, en un modelo de hipercolesterolemia moderada se estableció no sólo la repercusión sobre el perfil lipídico sino también el tiempo en el que se desarrollan. El consumo de una dieta rica en grasas saturadas origina un incremento de colesterol total y colesterol LDL en las primeras 2 semanas, seguido de un descenso posterior, quizá debido al desarrollo de mecanismos de compensación y una posterior elevación en un seguimiento a un año. Sin embargo el colesterol HDL se eleva levemente y no se ven cambios en las concentraciones de triglicéridos. Si se analiza la repercusión sobre las lesiones ateroscleróticas, el consumo de una dieta rica en grasas saturadas se asocia con el desarrollo de lesiones a nivel de grandes vasos a partir del 3^{er} mes de comenzar con la dieta aterogénica. La frecuencia de aparición de las lesiones varía según el vaso, de modo que las primeras lesiones aparecen en el seno aórtico, extendiéndose posteriormente a la aorta torácica y abdominal. La progresión de las lesiones se correlaciona con el desarrollo del proceso aterosclerótico a nivel microscópico, cursando a los 9 meses con estrechamiento y pérdida de la estructura del vaso²⁰⁸.

A nivel experimental, en humanos se ha observado que el consumo de ácidos grasos saturados y ácidos grasos trans actúan negativamente sobre la función endotelial, principalmente a través del aumento de las concentraciones de moléculas de adhesión vascular que favorecen el proceso aterosclerótico, así como reduciendo la capacidad de vasodilatación arterial, medida empleada tradicionalmente para conocer la funcionalidad del endotelio. Estos resultados se han corroborado posteriormente en estudios observacionales en humanos, lo cual apoya los datos descritos

previamente²⁰⁹.

A partir de los estudios experimentales y de los resultados obtenidos en los estudios transversales de poblaciones con diferentes hábitos de vida a partir de los años 50, se diseñaron diferentes estudios de cohortes. Su seguimiento nos ha permitido establecer la base de las recomendaciones citadas previamente, en cuanto a estilo de vida y prevención del riesgo cardiovascular. Dentro de estos trabajos destaca el estudio de los 7 países dirigido por Ancel Keys, donde se analizó la incidencia de mortalidad coronaria, cerebrovascular, y total y la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular y los hábitos dietéticos en 12.763 hombres de 40 a 59 años pertenecientes a 18 cohortes de 7 países diferentes (Yugoslavia, Grecia, Italia, Holanda, Finlandia, Japón y Estados Unidos). Con este estudio se demostró la asociación existente entre las concentraciones de colesterol total, la obesidad y el sobrepeso y una mayor mortalidad cardiovascular²¹⁰. Se relacionó el consumo de una dieta mediterránea con una menor mortalidad cardiovascular al comparar las cohortes mediterráneas frente a las del norte de Europa, o Estados Unidos a los 10 años de seguimiento²¹¹⁻²¹⁵. Del mismo modo se ha observado que el cambio dietético en los países de la cuenca mediterránea hacia el modelo occidental incrementa el riesgo de enfermedad coronaria²¹⁶. El efecto protector de la dieta mediterránea se ha asociado tanto con un mayor consumo de grasas mono-insaturadas, fibra, así como con el consumo moderado de vino tinto²¹⁷.

Respecto a los beneficios de intervención con cambios de alimentación introduciendo la dieta mediterránea cabe destacar dos grandes estudios de cohortes.

En el Lyon Diet Heart Study se demuestra la eficacia de la dieta mediterránea en la prevención secundaria de enfermedades cardiovasculares, con un 50% de reducción del riesgo de recurrencia a los 4 años. Sin embargo no se encontraron

diferencias entre la dieta mediterránea y una dieta hipolipemiente en las concentraciones de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos, Apo AI, Apo B y Lp(a)²¹⁸.

En el estudio PREDIMED (prevención con dieta mediterránea) se analizó el papel de la dieta mediterránea en la prevención primaria sobre el riesgo cardiovascular. Es un estudio multi-céntrico, aleatorizado, prospectivo y controlado que pretendía estudiar la eficacia de dos dietas mediterráneas suplementadas bien con aceite de oliva en una de las ramas de intervención o bien con nueces en otra de las ramas de modificación dietética frente a una tercera opción dietética, una dieta pobre en grasas. El estudio se llevó a cabo en pacientes de alto riesgo. Se estudió la repercusión sobre el perfil lipídico, glucosa basal en plasma, tensión arterial y marcadores de inflamación, obteniendo una disminución en la relación colesterol total/colesterol HDL, en las concentraciones basales de glucosa y en la presión arterial con los dos tipos de dieta mediterránea. Además en este trabajo la dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva se asocia con concentraciones menores de PCR frente a una dieta baja en grasas²¹⁹. Recientemente, se ha demostrado a partir de este estudio que ambos tipos de dieta mediterránea reducen un 30 % la incidencia de episodios cardiovasculares mayores (infartos de miocardio, ictus o muertes cardiovasculares)²²⁰.

3.4.2. *Sobre los factores proinflamatorios.*

El consumo de una dieta rica en grasas saturadas puede aumentar la concentración plasmática de marcadores inflamatorios⁵⁹. A nivel molecular se sabe que tras el inicio de una dieta aterogénica, las células endoteliales comienzan a

expresar en su superficie moléculas de adhesión selectivas como la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), que se encargan de fijar leucocitos, monocitos y linfocitos T a la placa de ateroma en fases iniciales⁸⁷, favoreciendo la cascada aterogénica.

Las concentraciones de ácidos grasos en suero se relacionan con una alta ingesta de grasas saturadas. El tipo de ácidos grasos de la dieta se refleja en la composición de los ácidos grasos en el suero, unidos tanto a las distintas lipoproteínas como a las membranas de las células circulantes²²¹. En una población de jóvenes indios se observó que los ácidos grasos saturados de la dieta eran el nutriente que más colaboraba a incrementar las concentraciones de PCR²²². En un estudio realizado en una población con una edad media de 70 años se observa que las concentraciones de ácidos grasos en plasma se relacionan de forma independiente con las concentraciones de PCR, pero no con otros marcadores de inflamación como la IL-6, TNF alfa o MCP-1²²³.

Sin embargo, en el caso de pacientes con sobrepeso, el consumo de 3 tipos de dieta ricas en grasas (ácidos omega 3 poli-insaturados, grasas saturadas y grasas monoinsaturadas, respectivamente) se relaciona con un aumento en las concentraciones de PCR, sin encontrar diferencias entre los 3 tipos de dieta²²⁴. Similares resultados se han encontrado en un estudio multi-céntrico realizado en 417 voluntarios con síndrome metabólico donde las concentraciones de PCR eran similares en los 4 tipos de dieta administrados: dos dietas ricas en grasas, en una principalmente saturadas y en otra mono-insaturadas y dos dietas pobres en grasas, rica en carbohidratos una de ellas suplementada con ácidos grasos poliinsaturados n-3²²⁵.

Por tanto parece que una dieta rica en grasas saturadas eleva las

concentraciones de PCRus en pacientes sanos, no estando tan clara esta asociación en pacientes con sobrepeso o síndrome metabólico con un estado proinflamatorio basal.

Respecto a la asociación entre TNF alfa e IL-6 con la dieta rica en grasas en un estudio realizado en mujeres sanas, parece que el consumo de ácidos grasos insaturados trans se asocia positivamente con las concentraciones de TNF alfa, pero no con las concentraciones de IL-6 y PCRus, siendo mayor cuando se compara con los efectos de ácidos grasos insaturados cis. Sin embargo, parece que este efecto no se encuentra mediado por los efectos de los ácidos grasos sobre los lípidos y que el IMC juega un papel importante. De forma que en pacientes con mayor IMC sí se relaciona con concentraciones elevadas tanto de TNF alfa como de IL-6 y PCRus^{209,226}.

Dentro de los estudios de cohortes realizados para conocer la relación entre dieta e inflamación se encuentra el Health ABC Study (Health, Aging and Body Composition Study)²²⁷. En este trabajo se analizó la repercusión de diferentes tipos de componentes de la dieta sobre los factores de inflamación en 1.751 participantes de 70 a 79 años. Para ello dividieron los alimentos en “saludables” (que incluía productos bajos en grasas saturadas, fruta, cereales, pescado, vegetales y aves), “desayuno con cereales”, “carne y alcohol”, “dulces y postres”, “granos refinados” y “productos con alto contenido en grasa”. El consumo de alimentos saludables se asoció con una concentración inferior de IL-6 frente al grupo de consumo de dulces y de consumo de alimentos ricos en grasas. Sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de PCR ni de TNF alfa²²⁷. Sin embargo, en otros trabajos, como el realizado en pacientes con insuficiencia cardiaca, el consumo de ácidos grasos saturados se correlacionaba positivamente con las concentraciones de TNF alfa²²⁸.

Respecto a la relación entre el consumo de una dieta rica en grasas y la concentración de PLA2s no existen datos.

3.4.3. *Sobre la capacidad antioxidante*

La oxidación juega un papel primordial en la aterosclerosis, existiendo mecanismos naturales para intentar conseguir un balance entre oxidación-antioxidación. Es conocido que determinados tipos de dieta así como otros factores exógenos influyen sobre la capacidad antioxidante. De hecho, el efecto beneficioso de la dieta mediterránea sobre los marcadores de estrés oxidativo y factores de inflamación está asociado probablemente con la sinergia entre macro y micronutrientes procedentes de alimentos que constituyen esta dieta. A favor de esa idea conviene mencionar que, las dietas ricas en grasas²²⁹ y azúcares refinados empeoran estos marcadores²³⁰, mientras que la dieta mediterránea aumenta la capacidad antioxidante como se ha observado en el estudio PREDIMED⁷².

En un trabajo realizado en ratas alimentadas con una dieta de similares características (rica en grasas saturadas y azúcares refinados) se observa una mayor actividad de la NADPH oxidasa, relacionándose con una mayor capacidad para la producción de especies reactivas de oxígeno, así como con una menor actividad de enzimas encargadas de la antioxidación, como diferentes isoformas de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y hemo-oxigenasa 2²³¹. La disminución de la capacidad antioxidante junto con la deficiencia de óxido nítrico causada por la dieta, son las causantes de la disfunción endotelial, como se objetiva en otro trabajo del mismo grupo realizado sobre modelos murinos²³².

Parece que el efecto antioxidante interfiere en el metabolismo lipídico. La

antioxidación afecta a la actividad de la lipoproteín lipasa directa y/o indirectamente a través de la eliminación de especies reactivas de oxígeno. En un trabajo realizado en ratas se observa que después de una dieta rica en grasas, la actividad de la LPL disminuye y aumenta el estrés oxidativo, hecho que se revierte tras la administración de antioxidantes a la dieta rica en grasas²³³.

Para poder conocer el efecto de la dieta sobre la capacidad antioxidante se deben analizar diversos estudios de casos y controles realizados en diferentes poblaciones. En el caso de pacientes sanos con diferentes patrones dietéticos (vegetarianos frente a omnívoros) ambos presentan concentraciones similares de antioxidantes plasmáticos²³⁴. Sin embargo otros trabajos difieren de estos resultados, de forma que los pacientes vegetarianos presentan mayores concentraciones de superóxido-dismutasa²³⁵. En pacientes obesos destaca el trabajo de Peairs et al.²³⁶ donde una dieta hipocalórica rica en grasas origina una pérdida de peso, pero se correlaciona con una menor capacidad antioxidante.

En el caso de la adherencia a la dieta mediterránea, en pacientes con obesidad abdominal, ésta origina a los 2 meses un aumento de la capacidad antioxidante²³⁷.

3.5. Efecto del consumo de alcohol

3.5.1. Sobre la enfermedad cardiovascular

Numerosos estudios prospectivos asocian el consumo de cantidades moderadas de alcohol inversamente con el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, presentando los consumidores moderados un riesgo de aparición de

enfermedad coronaria hasta un 40% inferior al de los abstemios. Esta reducción se ha relacionado con el efecto del alcohol sobre el perfil lipídico, principalmente debido al efecto sobre la elevación de las concentraciones de colesterol HDL³.

La relación existente entre el consumo de alcohol y la enfermedad cardiovascular sigue un modelo de curva en J o U de modo que el consumo de altas cantidades de alcohol, aproximadamente superiores a 60 g/día originan un aumento de la mortalidad cardiovascular.

En cuanto a la relación existente entre el consumo de alcohol y la aparición de accidentes cerebrovasculares, si se analizan los estudios publicados parece que es casi inexistente, pero debido a que en la mayoría de ellos no se diferencia entre aquellos de origen hemorrágico o isquémico.

En el caso del análisis realizado en el Physicians' Health Study en 22.071 varones, el consumo de cantidades moderadas de alcohol se relaciona con una menor incidencia de accidentes cerebrovasculares isquémicos, no encontrando mayor riesgo de aparición de episodios hemorrágicos²³⁸. En el Nurses Health Study se obtuvieron resultados similares a los del trabajo previo, pero en este caso en mujeres²³⁹.

De modo que el consumo de alcohol parece tener un efecto protector para los de origen isquémico y un aumento del riesgo de ictus hemorrágico para los consumidores de alcohol²⁴⁰.

Respecto a la incidencia de enfermedad coronaria en la mayoría de estudios publicados el consumo de alcohol se relaciona con un bajo riesgo de aparición, al igual que con una baja incidencia de mortalidad por la misma causa. No obstante, dos trabajos publicados en 1987 y 2007, el primero perteneciente a la cohorte del British Regional Heart Study²⁴¹ y el segundo a una cohorte de 500 pacientes australianos²⁴² hallan un mayor riesgo de IAM en pacientes que consumían alcohol.

Curiosamente, en ciertos países como Francia, a pesar de que se ingiere una dieta rica en grasas saturadas, presentan una incidencia y prevalencia de enfermedad cardiovascular similar a la de países con un consumo de grasas saturadas mucho menor. Este fenómeno se describe como la paradoja francesa²⁴³ y se ha atribuido al consumo moderado de vino que ejercería un efecto protector⁷³.

Otro aspecto importante en cuanto al consumo de alcohol es el tipo de patrón de consumo. En el estudio Onset, la mortalidad después de un infarto agudo de miocardio fue superior en bebedores de fin de semana tanto en aquellos que presentaban un consumo leve como alto²⁴⁴. En el estudio PRIME, un estudio prospectivo donde se han comparado el patrón de consumidor habitual y el consumo de fin de semana, se ha observado que el consumo regular y moderado de alcohol durante la semana se asocia con un menor riesgo de aparición de enfermedad coronaria frente al patrón de bebedor de fin de semana, confiriendo este patrón un mayor riesgo⁹.

En cuanto al tipo de bebida alcohólica, el consumo de vino tinto aporta un menor riesgo de aparición de enfermedad coronaria frente al consumo de cerveza y otras bebidas (HR 0,51 con IC 95% de 0,20-1,27-frente HR 1,75 con IC 95% de 0,68-4,46 y 1,28 con IC 95% de 0,68-2,41 respectivamente)⁹. De todos modos parece que el consumo de fin de semana se asocia con una mayor mortalidad por enfermedad coronaria (muerte súbita o muerte de origen cardiovascular) que con la morbilidad de origen cardiovascular^{245,246}. Por otra parte, al interpretar los resultados, se ha de tener en cuenta el estilo de vida de los diferentes tipos de consumo puede ser un factor de confusión importante²⁴⁷, de forma que el consumo habitual de vino tinto se relaciona con niveles socioeconómicos más elevados.

3.5.2. Efecto del consumo de alcohol sobre el perfil lipídico

Es conocido la relación existente entre el consumo moderado de alcohol y la mejoría del perfil lipídico. Esta mejoría se basa principalmente en el aumento en las concentraciones de HDL y en menor medida sobre un descenso de las concentraciones de LDL aunque este último efecto no aparece de forma constante en personas sanas y sí en consumidores crónicos de alcohol en cantidades moderadas-elevadas²⁴⁸.

Si se estudian los mecanismos por los que el alcohol interfiere sobre el metabolismo de los lípidos, principalmente sobre el colesterol HDL, parece que existen diferentes vías.

Tradicionalmente se ha relacionado con una disminución de la CETP (colesterol ester transferasa) aunque esta asociación no es clara. En trabajos realizados en consumidores de altas concentraciones de alcohol se ha relacionado el incremento en las concentraciones de HDL con una menor concentración y actividad de la CETP¹⁴. No obstante actualmente se plantea que la repercusión del consumo de alcohol sobre el riesgo cardiovascular puede verse modificado según el genotipo de la CETP. Se sabe a partir del estudio del genoma humano que existen ciertos SNPs (single nucleotide polymorphism) en la CETP que se asocian con las concentraciones de HDL más que otros loci del genoma²⁴⁹. Ciertas variantes del gen de la CETP se asocian con una menor actividad enzimática y menor concentración de la CETP, siendo la más estudiada la TaqIB SNP²⁵⁰. Dentro de esta, los portadores de los alelos B2/B2 en homocigosis, asociado con menor concentración de CETP, tienen concentraciones más elevadas de HDL que los portadores de los alelos B1/B1 homocigotos²⁵¹. En un estudio realizado en población española se objetiva que

aquellos sujetos con consumo de alcohol y con genotipo B2B2 de la CETP tienen mayor riesgo cardiovascular, por lo que se plantea que el alcohol puede jugar un papel modulador, aunque se desconocen los mecanismos²⁵².

Otro de los posibles mecanismos que parece relacionarse es el aumento de la ratio de transporte de la apo AI inducido por el alcohol, aumentando por tanto la síntesis de colesterol HDL²⁵³.

En estudios realizados en animales, el consumo crónico de vino tinto se asociaba con un aumento en las concentraciones de HDL²⁵⁴, así como una hipertrigliceridemia e hiperquilomicronemia postprandial menos pronunciada que en el consumo agudo, por lo que parece que se justificaría el efecto beneficioso del consumo mantenido de dosis moderadas de vino²⁵⁵.

Si se analizan los estudios de intervención, existen más de 70 estudios en humanos que estudian el efecto del consumo de alcohol sobre los lípidos¹¹.

En el estudio realizado por Masarei et al.²⁵⁶ en voluntarios sanos, el consumo de moderadas cantidades de alcohol provocó un incremento en las concentraciones de triglicéridos, colesterol HDL, HDL 2 y HDL 3, apoAI y apoAII, a las 6 semanas, mientras que las concentraciones de LDL disminuyeron. Parece que este efecto es dosis dependiente, ya que en el trabajo realizado por Välimäki et al²⁵⁷, se observan resultados similares siendo la respuesta del HDL y la apoAI, mayor en aquellos consumidores de elevadas cantidades de alcohol (60 g/día) que en los que tenían un consumo moderado.

En un meta-análisis publicado se observa que el consumo moderado de alcohol, entendiendo como tal el consumo de 30 g/día, aumenta las concentraciones de HDL, de apoAI y de TG. Sin embargo no se vieron cambios en las concentraciones de colesterol total, colesterol LDL ni apo B³.

En el caso de que se compare el efecto del consumo de vino tinto frente otras bebidas alcohólicas, parece que el efecto sobre el perfil lipídico difiere según el tipo. De este modo se observa que el vino tinto eleva las concentraciones de HDL en mayor medida frente al vino blanco u otras bebidas alcohólicas²⁵⁸.

Respecto a la asociación entre el consumo de alcohol y las concentraciones de triglicéridos, es compleja, presentando una distribución en J^{4,5}, muy similar a la distribución en J que presenta la asociación entre consumo de alcohol y el riesgo cardiovascular^{9,10}. De hecho la consistencia epidemiológica de la asociación entre TG y consumo de leve o moderado de alcohol es bajo, mientras que el consumo elevado está claro que eleva las concentraciones de TG¹⁵. Se han publicado trabajos donde se observa un aumento, un descenso o cambios nulos de la trigliceridemia en relación con el consumo leve o moderado de alcohol, no estando claro el efecto del alcohol^{3,9,11}.

A nivel metabólico se cree que puede tener diferentes efectos sobre la síntesis de VLDL²⁵⁹. En estudio en animales alimentados con alcohol, éste es capaz de estimular la secreción hepática de VLDL, mediante el aumento de la expresión de la proteína microsomal transportadora de TG aunque también presentan una menor expresión de ARNm de apoB⁴⁹.

A nivel de la LPL el consumo de alcohol agudo disminuye su actividad, dando lugar a una menor hidrólisis de quilomicrones y del VLDL, viéndose reflejado con un aumento de las concentraciones de TG postprandiales²⁶⁰. No obstante el consumo crónico parece que estimula una mayor actividad de la LPL como efecto compensatorio siendo en el consumo elevado de alcohol insuficiente⁴⁸.

El impacto del consumo de alcohol sobre la trigliceridemia diurna no ha sido estudiado, siendo los datos referentes a las concentraciones de TG en ayunas y

postprandiales muy limitados.

3.5.3. Efecto del consumo de alcohol sobre los factores proinflamatorios

Existe disparidad de criterios en cuanto al efecto del consumo de las bebidas alcohólicas sobre los marcadores de inflamación. En un meta-análisis publicado en 2011 se analizó el efecto del consumo moderado de alcohol sobre marcadores de la inflamación en pacientes sin enfermedad cardiovascular y el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria. Para ello se revisaron 63 trabajos, de los cuales 12 incluían un análisis de la PCR, IL-6 y TNF- α (tabla 1).

En este meta-análisis no se encontró relación entre el consumo de alcohol y las concentraciones de PCR, IL-6 o TNF- α . Cabe destacar que la mayor parte de los trabajos emplearon el vino tinto, aunque en el análisis estratificado para diferentes tipos de bebidas alcohólicas (vino, cerveza y bebidas de alta graduación) se encontraban resultados similares¹¹. No obstante, en otros trabajos parece que la reducción del riesgo cardiovascular es más destacable para los que consumen vino que para aquellos que consumen habitualmente cerveza u otras bebidas alcohólicas²⁶. Por ello se plantea que la presencia de polifenoles, abundante en la composición de los vinos, puede estar participando activamente en la prevención de la aterosclerosis, ya que hay algunos datos que demuestran que el consumo regular de moderadas cantidades de vino disminuye la concentración de marcadores inflamatorios^{37,261}.

Estudio	Población de estudio		Tipo de alcohol	Dieta	Tiempo de seguimiento	Factor de inflamación	Efecto sobre las concentraciones plasmáticas
	n	Sexo Tipo					
Bantle 2008	17	V+M DM tipo 2 no ID	Vino blanco	Habitual	1 mes	PCR	No cambios
Beulens 2008	20	V Sanos. IMC en rango vs sobrepeso	Cerveza	Controlada	3 semanas	PCR	No cambios
Djurovic 2007	87	V+M Sanos	Vino tinto		3 semanas	PCR IL-6	No cambios No cambios
Karlsen 2007	49	V+M Sanos	Vino tinto		3 semanas	TNF alfa IL-6	No cambios No cambios
Vazquez-Agell 2007	20	V No FRCV	Vino blanco y ginebra		28 días	PCR IL-6	Disminuye* Disminuye*
Ratterstol 2005	87	V+M Sanos	Vino tinto		3 semanas	TNF alfa	No cambios
Watzl 2004	24	V Sanos	Vino tinto y etanol		2 semanas	TNF alfa	No cambios
Estruch 2004	40	V Sin FRCV/ECV	Vino tinto y ginebra	Isocalórica	28 días	PCR	Disminuye*
Sierksma 2004	23	V Sanos	Whisky	Controlada	17 días	TNF alfa	No cambios
Sierksma 2002	19	V+M Sanos. Mujeres postmenopausicas	Cerveza	Habitual	3 semanas	PCR	Disminuye±
Mezzano 2001	42	V Sanos	Vino tinto	Controlada	1 mes	PCR	No cambios

* Después de consumo de vino tinto (p<0.05)

± Después de consumo de cerveza (p<0.05)

Tabla 1. Estudios de intervención sobre el efecto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas sobre los factores de inflamación. Adaptado de BMJ 2011;342:d636. V = varones, M=mujeres. FRCV= factores de riesgo cardiovascular. ECV =enfermedad cardiovascular

Un estudio previo de nuestro grupo demostró que, en un modelo de consumo agudo de una dieta hipercalórica rica en grasa saturada se activaba la expresión de NF-KB en monocitos circulantes de jóvenes sanos a las pocas horas³⁷. Sin embargo, el vino tinto, pero no el vodka, acompañando a ese desayuno hipercalórico, rico en grasas saturadas, bloqueaba la activación de NF-KB en monocitos circulantes en jóvenes sanos³⁷, es decir reducía la expresión de un factor de transcripción de numerosas citocinas pro-inflamatorias. Posteriormente, en un modelo de dieta hipercalórica, con exceso de grasas saturadas, mantenida durante 5 días se demostró que el vino tinto y en menor grado el ron añejo, pero no el vodka ni el brandy, reducían claramente la expresión de NF-KB en monocitos circulantes. Aunque en mucha menor medida que el vino tinto, el ron añejo también contiene una buena cantidad de polifenoles. En este último estudio, el vino tinto, en comparación con las otras bebidas alcohólicas, redujo también de forma significativa, las concentraciones de MCP-1³⁸.

En otro trabajo donde se comparaba el efecto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas (vino tinto, vino blanco, cerveza, whisky y agua) en dosis moderadas, se observaba un beneficio del consumo de vino y de cerveza sobre la función endotelial pero no hubo cambios en las concentraciones de marcadores inflamatorios²⁶².

3.5.4. Efecto del consumo de alcohol sobre la capacidad antioxidante

En el metabolismo del etanol se producen radicales libres²⁶³, pudiendo aumentar la peroxidación lipídica y disminuir los niveles de glutatión en los hepatocitos²⁸

El etanol se metaboliza de forma diferente dependiendo de las

concentraciones del mismo. La ingesta crónica elevada de etanol induce el sistema microsomal oxidante de etanol. Este sistema tiene una constante de disociación del complejo sustrato-enzima elevada, por lo que en altas concentraciones, el etanol se metaboliza en acetaldehído sin producir NADH (dinucleótido adenina nicotamida hidrogenasa) reducida²⁶⁴. En su lugar produce NADPH reducida, que produce un ambiente oxidativo. Además inhibe la aldehído deshidrogenasa, disminuyendo la capacidad de la mitocondria para oxidar acetaldehído²⁶⁵. Sin embargo, el etanol a concentraciones bajas se puede metabolizar por una alcohol deshidrogenasa con una constante de disociación baja hacia acetaldehído y posteriormente por una aldehído deshidrogenasa a acetato, produciendo NADH en ambas reacciones²⁶⁴. La NADH es una de las enzimas con mayor capacidad antioxidante del organismo, con una gran capacidad reductora. Aunque el etanol se metaboliza principalmente en el hígado, también existe cierta capacidad de metabolización en otros órganos, como los vasos sanguíneos, originando un ambiente reductor o lo que es lo mismo, antioxidante, precisamente donde se encuentra la actividad aterosclerótica (figura 3).

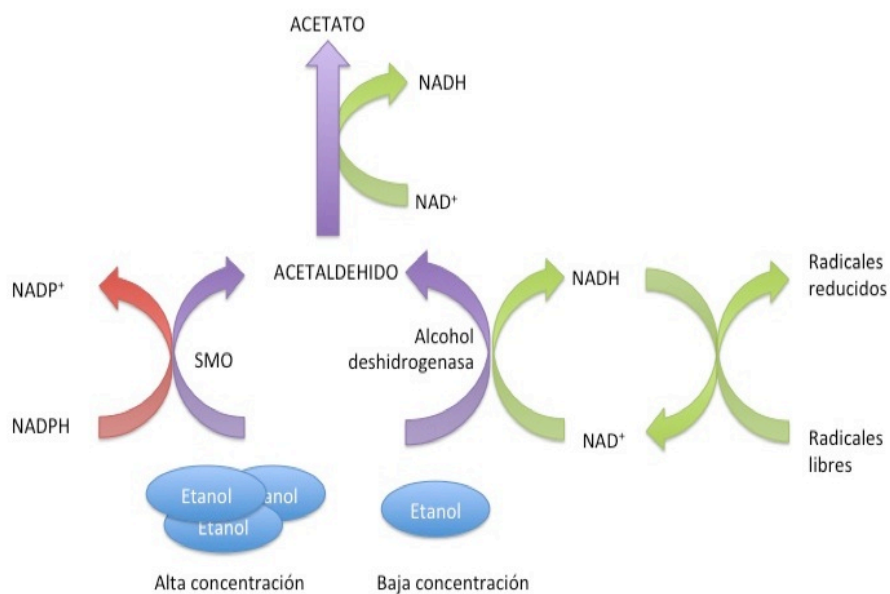


Figura 3. Metabolismo del alcohol según sus concentraciones plasmáticas. SMO = sistema de oxidación microsomal de etanol. Adaptado de Vasc H R Manag 2006;2: 263-276

Apoyando esta idea, el etanol *in vitro* actúa como antioxidante disminuyendo la formación de lipoperóxidos^{266,267}. En modelos animales de aterosclerosis se ha visto que el consumo leve-moderado de alcohol disminuía la proliferación de la neo-íntima, la peroxidación lipídica y el número de células espumosas²⁶⁸. Resultados similares se han encontrado en humanos donde se ha observado que el consumo leve-moderado de alcohol disminuye el estrés oxidativo³⁰ y aumenta la capacidad antioxidante³¹.

No obstante, se cree que este efecto puede variar según el tipo de bebida alcohólica, influyendo no sólo el etanol sino otros componentes de la bebida. En varios trabajos se ha comprobado que el consumo de vino pero no de otras bebidas alcohólicas, aumenta la capacidad antioxidante²⁶⁹ así como disminuye la susceptibilidad a la peroxidación lipídica del plasma humano^{33,34}. Este efecto beneficioso se relacionó con la alta concentración de polifenoles del vino tinto, de hecho en algunos trabajos se ha comprobado que tanto el vino tinto²⁶⁹ como el vino tinto dealcoholizado²⁷⁰ son capaces de aumentar la capacidad antioxidante. Del mismo modo que en trabajos realizados en humanos administrando alcohol solo, éste no tiene efecto sobre la capacidad antioxidante²⁷¹. No obstante se ha visto que la capacidad de absorción de los polifenoles en el ser humano por la dieta es muy baja, relacionándose el aumento en la capacidad antioxidante con una mayor concentración de uratos en plasma y no sólo con las concentraciones de polifenoles²⁷¹. El aumento de ácido úrico se ha relacionado con un aumento del riesgo cardiovascular²⁷², sin embargo el incremento de urato originado por el vino tinto junto con la dieta mediterránea previene la peroxidación lipídica, coincidiendo con el estrés oxidativo postprandial³³.

El efecto de otras bebidas alcohólicas sobre la capacidad antioxidante no está muy claro, aunque en algún trabajo se observa que el consumo agudo de whisky

origina un aumento de la concentración de fenoles y de la capacidad antioxidante similar al del vino tinto²⁷³. En un estudio realizado con cerveza sin alcohol se ha visto que el consumo de esta bebida durante 45 días origina una disminución del estrés oxidativo, pero sin originar una modificación de los mediadores de inflamación²⁷⁴.

Hoy en día, no está claro el efecto del consumo de alcohol sobre la trigliceridemia diurna, por ello nos planteamos investigar si el consumo crónico de leve o moderadas cantidades de alcohol puede influir de forma beneficiosa en las concentraciones plasmáticas en ayunas de triglicéridos y sobre la trigliceridemia a lo largo del día en población general con una dieta libre, y si este efecto beneficioso puede estar acompañado por una disminución de la inflamación, medido por la PCRus. A la vista de la dudas surgidas de los resultados de esta parte del estudio sobre la PCRus se planteó llevar a cabo un estudio mucho más controlado y en población sana, con un diseño de “ensayo clínico”, pretendiendo en esa segunda parte dar respuesta a otras preguntas con respuestas inciertas en relación con aspectos diferenciales de distintas bebidas alcohólicas. Hay falta de información o controversia en relación con el efecto del consumo de vino tinto o de otras bebidas alcohólicas sobre la capacidad antioxidante y los niveles de marcadores de inflamación en sangre.

4a Hipótesis y objetivos del estudio

4a.1 Hipótesis del estudio

La hipótesis de este estudio es doble:

El consumo crónico de pequeñas o moderadas cantidades de alcohol puede asociarse de forma beneficiosa con la trigliceridemia diurna en una población general en una situación no controlada. Este potencial efecto beneficioso debe acompañarse con una disminución de los marcadores de inflamación como la PCRus.

El consumo de vino tinto, rico en polifenoles, pero no otras bebidas alcohólicas, reduce el estrés oxidativo y los marcadores de inflamación inducidos por una dieta rica en grasas saturadas en una población sana con un consumo de alcohol y una dieta controlada.

4a.2 Objetivos del estudio

1. Conocer el impacto del consumo de diferentes cantidades de alcohol sobre la trigliceridemia diurna (medida como trigliceridemia capilar) en una situación no controlada en población general.
2. Establecer si existe alguna asociación entre el consumo de diferentes cantidades de alcohol y la concentración de PCRus en una situación no controlada en población general.
3. Analizar si existe alguna asociación entre las concentraciones de PCRus en población general y las concentraciones de TG en ayunas y la trigliceridemia postprandial.
4. Analizar los cambios en la concentración plasmática de marcadores de inflamación (PCRus, TNF- α e IL-6 y PLA₂s) producidos por una dieta rica en grasa saturada mantenida durante 5 días en jóvenes sanos.
5. Evaluar los cambios en la concentración plasmática de marcadores de

oxidación: capacidad antioxidante total (CAT) y peroxidación lipídica ²⁶⁶ producidos por una dieta rica en grasa saturada mantenida durante 5 días en jóvenes sanos.

6. Valorar el efecto del consumo de bebidas con diferente contenido en polifenoles (vino tinto, ron, brandy y vodka) junto a una dieta rica en grasas, sobre las concentraciones plasmáticas de los marcadores inflamatorios (PCRus, TNF- α e IL-6 y PLA₂s) .
7. Conocer el efecto del consumo de bebidas con diferente contenido en polifenoles (vino tinto, ron, brandy y vodka) junto a una dieta rica en grasas sobre los marcadores de oxidación (CAT y LPO) potencialmente inducidos por esa dieta rica en grasa saturada.
8. Determinar si existe alguna correlación entre las concentraciones plasmáticas de marcadores de inflamación (PCRus, IL-6, TNF- α y PLA₂s) y marcadores de oxidación (LPO y CAT) después del consumo de diferentes bebidas alcohólicas.

4b Hypothesis and objectives of the study

4b.1. Hypothesis of the study

The hypothesis of this study is double:

The chronic consumption of moderate or small amounts of alcohol can influence beneficially in fasting triglycerides and postprandial triglyceridemia in the general population with a free diet. This potential beneficial effect may be go with a decrease in plasma markers of inflammation such as usCRP.

The consumption of red wine, rich in polyphenols, but not other alcoholic beverages, reduces oxidative stress and inflammatory markers concentration induced by a diet rich in saturated fats in a healthy population with a controlled diet and alcohol consumption.

4b.2. Objectives of the study

1. To know the impact of consumption of different amounts of alcohol on daytime triglyceridemia (measured as capillary triglyceridemia) in an uncontrolled situation in the general population.
2. To establish if there is any association between the consumption of different amounts of alcohol and the concentration of usCRP in uncontrolled situation in the general population.
3. To analyse if there is any association between usCRP concentrations in the general population and fasting TG concentrations and diurnal triglyceridemia.
4. To analyse changes in plasma concentration of inflammatory markers (usCRP, TNF- α , IL-6 and sPLA₂) produced by a saturated fat enriched diet during 5 days in healthy young people.

5. To evaluate changes in plasma oxidation markers: total antioxidant capacity ²⁷⁵ and lipid peroxidation ²⁶⁶ produced by a saturated fat enriched diet during 5 days in healthy young people.
6. To assess the effect of alcohol consumption with different content in polyphenols (red wine, rum, brandy and vodka), added to a saturated fat-enriched diet on plasma concentrations of inflammatory markers (usCRP, TNF- α , IL-6, sPLA₂).
7. To know the effects of alcohol consumption with different content in polyphenols (red wine, rum, brandy and vodka), consumed with a diet enriched with saturated fat, on markers of oxidation (TAC and LPO).
8. To determine if there is any correlation between plasma concentrations of inflammatory markers (usCRP, IL-6, TNF- α and PLA₂s,) and markers of oxidation (LPO and TAC) after consumption of different alcoholic beverages.

5. Material y métodos

5.1. Estudio observacional en población general

5.1.1. Población del estudio

Se incluyeron voluntarios sanos o pacientes con hiperlipemia, enfermedad cardiovascular establecida o diabetes tipo 2 que participaron en diferentes estudios con el mismo protocolo con el objetivo de estudiar la lipemia postprandial ^{39-42,44}. Presentaban una edad entre 18 y 80 años. Los criterios de exclusión fueron la presencia de enfermedad renal, hepática o tiroidea. Los sujetos en tratamiento con fármacos hipolipemiantes suspendieron éstos durante 4 semanas previas a la inclusión en el estudio. Era población holandesa del entorno de la ciudad de Utrecht. El estudio fue aprobado por el comité ético local del University Medical Center de Utrecht.

5.1.2. Determinaciones analíticas

El día de la inclusión se realizó la medida del peso, talla, índice de masa corporal (IMC) y presión arterial. Además se extraía una analítica sanguínea después de un período de ayunas de 12h para la determinación de lípidos, apolipoproteínas y glucosa plasmática. El colesterol total, triglicéridos plasmáticos y colesterol HDL (obtenido tras precipitación con dextranosulfato/MgCl²) se determinaron empleando el analizador Vytros 250 (Johnson & Johnson Rochester, NY, USA). La apolipoproteína B plasmática (Apo B) se midió mediante nefelometría empleando anticuerpos monoclonales contra Apo B (Behring Diagnostics NV, OSAN 14/15). La apolipoproteína plasmática AI (Apo AI) se midió mediante nefelometría empleando anticuerpos

monoclonales contra Apo AI (Behring Diagnostics NV, OUED 14/15). La glucosa plasmática se midió mediante química seca con oxidasa (Vitros Glu slides) y colorimetría. El colesterol LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald. La determinación cuantitativa de PCRus se midió mediante un inmunoensayo de alta sensibilidad empleando un nefelómetro (Dade Behring, Inc, Newark, DE).

5.1.3. Auto-medidas capilares de triglicéridos

La auto-medida capilar de triglicéridos se llevó a cabo con un dispositivo para determinación de triglicéridos (Accutrend GCT®, Roche Diagnostics, Germany). Los sujetos fueron instruidos en lavarse las manos y secárselas antes de cada medición. Con una lanceta se obtenía una gota de sangre (30 μ l) del pulpejo del dedo y se aplicaba sobre la tira que se insertaba en el analizador de triglicéridos. El resultado de la trigliceridemia diurna era anotado en un diario por los sujetos del estudio. Se les enseñó a medir su trigliceridemia capilar (TGc) durante 3 días (preferiblemente lunes, miércoles y viernes) durante los siguientes horas fijas: en ayunas, antes de comer, 3h después de comer, antes de cenar, 3h después de cenar y antes de acostarse.

Se incidió en los participantes en el estudio que evitasen actividad física severa, recomendándose que realizaran sus actividades diarias habituales. El rango de medidas para la TGc es de 0,80 a 6,86 mmol/l (71- 607 mg/dl). El analizador de TG mide de forma fiable, independientemente de la naturaleza de las lipoproteínas que transporten los triglicéridos. El coeficiente de correlación entre las medidas de TGc con el analizador de TG y las mediciones realizadas de acuerdo con métodos enzimáticos es de 0,94²⁷⁶. Resultados similares se obtuvieron en nuestro laboratorio^{39,41}. Las concentraciones de TGc son generalmente 0,2-0,3 mmol/l superiores a las medidas de

TG venosas en plasma⁴⁴, lo que puede justificar las diferencias encontradas entre muestras capilares y venosas.

5.1.4. Ingesta de alcohol y grasas

La ingesta de grasas y alcohol se recogió en un diario los días de medida de TGc. Todos los cuestionarios se evaluaron individualmente por un médico entrenado junto al sujeto que participaba en el estudio. La ingesta de grasas y la cantidad de alcohol se estimó de acuerdo con las guías dadas por un dietista. Las comidas ingeridas se transformaban en nutrientes a partir del Dutch Nutrient Data Base²⁷⁷El consumo de alcohol inferior a 10 g/día se consideró bajo, el consumo de alcohol entre 10 y 30 g/día se consideró moderado y más de 30 g/día se consideró elevado. Los sujetos no recibieron ninguna sugerencia en cuanto a composición y frecuencia de sus comidas, y se les explicó que debían llevar a cabo su dieta y consumo de alcohol habitual durante el estudio.

5.1.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos procedían de diferentes estudios empleando el mismo protocolo. Los datos se han descrito como media \pm desviación estándar (DE). El consumo de alcohol se dividió en: no consumo, consumo leve (<10 g/día), moderado (10- 30 g/día), elevado (>30 g/día). Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante el test ANOVA, empleando para análisis post hoc el test de Bonferroni, Chi cuadrado o la exacta de Fisher cuando fuese apropiado. Ya que los hombres tienden a tener mayores concentraciones de TG y mayor consumo de alcohol en comparación

con las mujeres, todos los análisis se estratificaron por sexo. La trigliceridemia diurna se definió como el área total bajo la curva de TGc (ABC-TGc) y como el incremento del área bajo la curva de TGc (Δ ABC- TGc). El consumo dietético y la trigliceridemia diurna se calculó empleando la media de 2 ó 3 días. Se empleó un análisis de regresión lineal para analizar las diferencias en trigliceridemia diurna entre los diferentes grupos de consumo de alcohol con y sin ajuste para edad, IMC y tabaquismo, ya que el IMC se relaciona con las concentraciones de TG y el consumo de alcohol interactúa con el consumo de tabaco y las concentraciones de TG²⁷⁸. Se realizó una regresión lineal para analizar la asociación de las concentraciones de PCRus con el consumo de alcohol y aquellas variables con diferencias significativas entre los grupos de consumo de alcohol en el análisis univariante. Se realizó una transformación logarítmica de aquellas variables sin distribución normal, pero los valores sin transformar son los que se muestran en las tablas y figuras. Todo el análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico PASW versión 18.0. El ABC-TGc y el Δ ABC- TGc se calcularon mediante PRISM versión 3.0 (Graph Pad Software, San Diego). Se consideró estadísticamente significativo una p inferior a 0,05 (dos colas).

5.2. Ensayo clínico en voluntarios sanos

5.2.1. Población del estudio

Se incluyeron 16 estudiantes sanos no fumadores de 20 a 30 años, 8 hombres y 8 mujeres, que participaron voluntariamente y firmaron un consentimiento informado. Se les realizó un estudio clínico y analítico para confirmar su estado de salud. Se incluyeron aquellos que presentaban una colesterolemia < 220 mg/dl y

triglicéridos < 200 mg/dl, no eran fumadores y presentaban un índice de masa corporal inferior (IMC) a 25. Se determinó el peso y la talla de todos, calculándose la superficie corporal por la fórmula de Dubois. Todos los participantes incluidos cumplían los criterios. El estudio obtuvo la aprobación del comité ético del hospital, siguiendo las guías de buena práctica clínica.

5.2.2. *Diseño del estudio*

Todos los participantes pasaron por 5 fases de 5 días cada una. Durante las 5 fases los participantes recibieron la misma dieta hipercalórica controlada. En 4 de las 5 fases recibieron además una bebida alcohólica, diferente en cada una de ellas: vino tinto, ron añejo, vodka o brandy. Se administró la misma bebida alcohólica durante los 4 primeros días, administrando en todos los casos los mismos gramos de alcohol para todas las bebidas alcohólicas. La bebida alcohólica se administró con la comida y con la cena. En la quinta fase o de control, se sustituyeron las calorías del alcohol por azúcar que se añadió a la dieta, diluida en las bebidas de la comida y de la cena. El estudio tuvo un diseño cruzado, de modo que los 16 participantes pasaron por las 5 fases de estudio. Entre cada una de las 5 fases del estudio se dejaron transcurrir al menos 2 semanas de lavado con su alimentación habitual. Durante el periodo de observación los participantes mantuvieron sus actividades habituales, absteniéndose de tomar alimentos o bebidas, salvo agua, fuera de las 3 comidas principales. El peso se mantuvo constante durante el estudio.

Dieta. Los desayunos y las comidas tuvieron lugar en el comedor del hospital y la cena en sus domicilios. Los desayunos y las cenas fueron los mismos durante los 4 días de observación (lunes a jueves), y se elaboró de forma personalizada después de una encuesta dietética previa para conocer los gustos de cada participante. La comida era

el menú del hospital, que se repite de forma cíclica cada 3 semanas. Se suplementaron los menús (comida y cena) con queso, unas galletas con chocolate (Kit-Kat®) y una bebida azucarada, para lograr una dieta de 1.487 ± 39 Kcal/m² diarias, con 654 ± 15 Kcal/m² ($44 \pm 2,2$ % de las calorías) en forma de grasa.

Aporte de alcohol. Durante los 4 días de cada una de las fases se administró la misma bebida alcohólica (vino tinto, ron, brandy o vodka), a la dosis diaria de 16 g/m² de alcohol (12 g/m² en el caso de las mujeres), repartida 2/3 en la comida y 1/3 en la cena. La bebida alcohólica se administraba diariamente en pequeños envases de plástico individualizados durante la comida, con la medida exacta de bebida alcohólica de cada participante. La bebida alcohólica correspondiente a cada una de las fases se diluía en la bebida azucarada administrada como suplemento a cada uno de los participantes junto con los suplementos grasos hipercalóricos correspondientes (queso y chocolate). Para mantener la dieta isocalórica en las cinco fases, el aporte calórico del alcohol en la fase de dieta control se administró en forma de azúcar, que se añadió a las bebidas azucaradas.

En cada comida se entregaba a cada uno de los participantes una bolsa con los suplementos calóricos, el envase con la bebida alcohólica y la bebida dulce correspondientes a la cena. Al menos uno de los investigadores desayunaba y comía diariamente con los 16 participantes para vigilar el cumplimiento dietético en el hospital. Se telefoneaba por las noches cada segundo día, y de forma aleatoria a 3-4 participantes para confirmar el cumplimiento de la cena.

Se advirtió a todos los participantes que se abstuvieran de compartir sus suplementos calóricos o la bebida calórica con sus familiares, administrándose incluso una pequeña cantidad aparte si algún familiar mostraba especial interés en probar la

bebida alcohólica o los suplemento calóricos.

Extracción de sangre. Se obtuvo sangre en cada uno de los 5 periodos en la mañana del comienzo del estudio (basal), antes de administrar el primer desayuno y en la mañana del quinto día, también en ayunas. En las dos extracciones se obtuvo sangre tras al menos diez horas en ayunas.

5.2.3. *Determinación de parámetros del perfil lipídico*

Las muestras venosas se recogieron en tubos con citrato. Posteriormente se almacenaron a -80°C hasta que fueron procesadas.

Las determinaciones de lípidos se realizaron siguiendo técnicas estándar. El perfil lipídico incluía: colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos. Las lipoproteínas se aislaron mediante un método de ultracentrifugación²⁷⁹. El colesterol total y los triglicéridos se analizaron mediante un método enzimático mediante análisis en las sub-fracciones obtenidas. El colesterol HDL se obtuvo después de tratar el sobrenadante de la ultra-centrifugación con ácido magnésico fosfotúngstico. El colesterol LDL se calculó como la diferencia existente entre el colesterol infranadante y el colesterol HDL. Para ello se emplearon kits enzimáticos comerciales (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) adaptado a un autoanalizador RA-XT (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EEUU). En todos los casos, los procesos se adaptaron (ratio muestra/reactivo) para obtener un precisión fotométrica equivalente a unas concentraciones de colesterol y triglicéridos en el rango de 150 a 300mg/dl.

5.2.4. *Determinación de IL-6, PCR us, y TNF- α*

La determinación de IL-6 y TNF- α en suero se realizó mediante una técnica cuantitativa tipo sándwich de inmuno-ensayo enzimático con kits comerciales (R&D Systems, Inc. Minneapolis, EEUU). Para ello se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para IL-6 y TNF- α .

La PCRus se midió mediante un inmuno-ensayo turbidimétrico de látex de alta sensibilidad en un auto-analizador (Ortho Clinical Diagnostic, Rochester, EEUU).

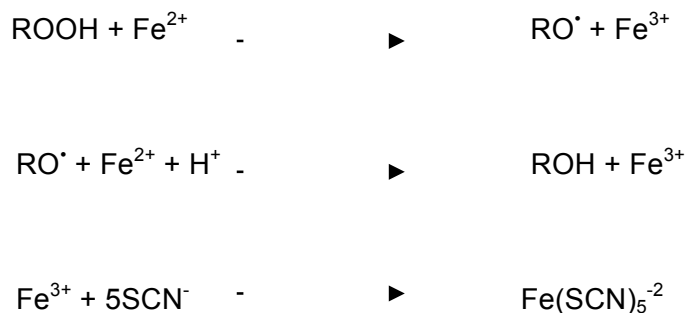
5.2.5. *Determinación de fosfolipasa A₂ secretora (PLA₂s)*

Las concentraciones de PLA₂s en suero se determinaron con kits comerciales (EIA cat. No. 585000. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU) mediante un inmuno-ensayo enzimático empleando fosfolipasa A₂ secretora de origen sinovial humano. Las muestras se diluyeron 1:20 con un buffer procedente del kit, empleándose para el estudio 100 μ l de la muestra diluida, realizándose las determinaciones por duplicado. El inmunoensayo enzimático es específico para determinar las concentraciones de fosfolipasa A₂ secretora tipo IIA, no presentando reacciones cruzadas con la fosfolipasa A₂ tipo I, IV,V ni con otros mediadores de la inflamación como el TNF α , la IL-1 o el factor activador de plaquetas. La concentración mínima detectable por el kit es 15,6 pg/ml.

5.2.6. *Determinación de lipoperóxidos*

La medida de la concentración de hidroperóxidos lipídicos se realizó

utilizando un kit comercial (Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit Catalog No. 705002. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU), que se basa en reacciones redox con el ión ferroso siguiendo el siguiente esquema:



El ión férrico se detecta con ión tiocianato que es utilizado como cromógeno. Para evitar cualquier interferencia con los iones férricos contenidos en la muestras se realizó una extracción de las muestras con cloroformo y se realizó la medida en el extracto obtenido. La determinación de la LPO se midió en μM .

5.2.7. *Determinación de la capacidad antioxidante total (CAT)*

La medida de la concentración total de antioxidantes (hidrosolubles y liposolubles) se realizó mediante un inmuno-ensayo basado en la capacidad de los antioxidantes de la muestra en inhibir la oxidación del compuesto (2,2'-acino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] por met-mioglobina con un kit comercial (Antioxidant Assay Kit Catalog No 709001. Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU).

La concentración de este compuesto se midió por espectrofotometría con una sensibilidad para determinar antioxidantes sin diluir ni concentrar la muestra de 0,044- 0,330 nM (capacidad para medir la absorbancia a 750nm).

5.2.8. *Cuantificación de fenoles de las diferentes bebidas alcohólicas*

El total de los fenoles, expresado como equivalentes del ácido gálico, se obtuvieron mediante los reactivos de Folin-Ciocalteu como ya está descrito³⁸.

5.2.9. *Análisis estadístico*

Se calcularon las cifras de TNF- α (pg/ml), IL6 (pg/ml), PCRus (mg/dl), PLA₂s (pg/ml), CAT(nM) y LPO (μ M) a nivel basal y al 5º día tras la ingesta de una dieta rica en grasas y los diferentes tipos de bebidas alcohólicas. Se calculó el porcentaje de incremento/decremento de los valores finales respecto de los basales (cambios relativos) empleando la siguiente fórmula:

$$(C \text{ al } 5^\circ \text{ día} - C \text{ basal}) / C \text{ basal}$$

Siendo C = concentración de TNF- α (pg/ml), IL6 (pg/ml), PCRus (mg/dl), PLA₂s (pg/ml), CAT(nM) ó LPO(μ M).

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS 18.0. Se calculó la normalidad de las muestras mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La t de Student para datos apareados se empleó para calcular las diferencias existentes entre los diferentes grupos antes y después de la intervención. Se empleó el test estadístico ANOVA para calcular los cambios a nivel relativo de los diferentes factores proinflamatorios/antioxidantes. Las comparaciones post-hoc se realizaron mediante

el test de Tukey para identificar diferencias entre grupos.

Se calcularon las correlaciones existentes al 5º día tras el consumo de las diferentes bebidas alcohólicas, entre las concentraciones plasmáticas de los factores proinflamatorios, peroxidación lipídica y capacidad antioxidante total (correlación de Pearson).

Los datos absolutos se expresaron como media \pm error estándar de la media. Los datos relativos se expresaron como porcentaje \pm error estándar de la media. Las diferencias se han considerado significativas cuando $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Estudio observacional en población general

6.1.1. Características generales

Las características generales de 273 individuos (139 hombres y 134 mujeres) se muestran en la tabla 2. En comparación con los hombres, las mujeres presentan concentraciones más elevadas de apoA1 y colesterol HDL junto con una menor concentración de triglicéridos en ayunas, colesterol LDL y apoB. El consumo de alcohol fue significativamente superior en hombres que en mujeres (tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas y bioquímicas de hombres y mujeres

	Mujeres (n = 134)	Hombres (n = 139)
Edad (años)	41,5 ± 14,2	39,9 ± 14,2
IMC (kg/m ²)	25,4 ± 5,0	24,6 ± 3,4
TAS (mmHg)	125,5 ± 16,1	125,0 ± 13,5
TAD (mmHg)	82,6 ± 9,6	81,5 ± 10,2
Fumadores (n,%)	39 (27,9%)	35 (25,2%)
Historia de ECV (n, %)	20 (14,3%)	27 (19,4%)
Historia de DM2 (n, %)	4 (2,9%)	3 (2,2%)
Colesterol total (mg/dl)	197,21 ± 46,40	204,95 ± 38,67
Colesterol LDL (mg/dl)	119,88 ± 38,67	131,48 ± 38,67 ^a
Colesterol HDL (mg/dl)	54,14 ± 14,69	47,56 ± 11,99 ^b
Apo B (g/l)	0,85 ± 0,25	0,97 ± 0,24 ^b
Apo A-I (g/l)	1,48 ± 0,31	1,32 ± 0,22 ^b
TG plasmáticos (mg/dl)	108,06 ± 65,54	119,57 ± 68,20 ^a
Ingesta de alcohol		
No consumo (n, %)	64 (45,7%)	34 (24,5%) ^b
Bajo, <10g/día (n, %)	36 (25,7%)	27 (19,4%) ^b
Moderado, 20-30 g/día (n, %)	35 (25,0%)	54 (38,8%) ^b
Alto, >30g/día (n, %)	5 (3,6%)	24 (17,3%) ^b

^a Diferencias significativas respecto al valor en mujeres (p < 0,05)

^b Diferencias significativas respecto al valor en mujeres (p < 0,001)

6.1.2. Efectos del consumo de alcohol sobre la trigliceridemia basal y variación diurna

Las características clínicas según la ingesta de alcohol para hombres y mujeres se muestran en la tabla 3 y en la tabla 4 respectivamente.

Respecto a las variables antropométricas, las mujeres con bajo consumo de alcohol tienen un IMC más bajo en comparación con mujeres que no consumen alcohol y valores de TG en ayunas menores en comparación con mujeres que no consumen alcohol o con un alto consumo. Las mujeres con alto consumo de alcohol son fumadoras con mayor frecuencia que aquellas con menor consumo.

Si se analizan las características clínicas de los varones, aquellos con elevado consumo de alcohol son de mayor edad que aquellos que no consumen, sin encontrarse diferencias en los valores de IMC. Como en las mujeres, los hombres con mayor consumo de alcohol son con mayor frecuencia fumadores en comparación con aquellos que consumen alcohol en bajas cantidades. No se encontraron diferencias en las concentraciones plasmáticas de TG en ayunas según diferente consumo de alcohol.

En cuanto a la dieta, la ingesta de grasas fue similar en todos los grupos según consumo de alcohol tanto en hombres como en mujeres.

El patrón de trigliceridemia diurna capilar para mujeres y hombres según el consumo de diferentes cantidades de alcohol se muestra en la figura 4.

No se han encontrado diferencias significativas en la TGc en ayunas y en ABC-TGc entre las medidas de los tres días consecutivos en cada grupo de consumo de alcohol. Las mujeres presentan un patrón de TGc diurna con menos variaciones que los hombres. En mujeres, las concentraciones de TGc en ayunas difieren según el consumo de alcohol (p para la tendencia $< 0,05$), sucediendo lo mismo con las

concentraciones de TGc antes de la comida (p para tendencia $< 0,001$). Ver figura 4A. Sin embargo, en los hombres las concentraciones de TGc son similares entre todos los grupos tanto en ayunas como antes y después de la comida y antes de la cena, encontrando diferencias significativas después de la cena (p para tendencia $< 0,001$) y antes de acostarse (p para tendencia $< 0,001$). Ver figura 4B.

No se encontraron diferencias significativas en el ABC-TGc ni en Δ ABC-TGc entre no consumo, bajo consumo, consumo moderado o alto, ni en hombres ni en mujeres, sin ajuste por edad, IMC y tabaquismo (tablas 3 y 4). Tras ajuste por edad, tabaquismo e IMC, los hombres con bajo consumo de alcohol presentan menor Δ ABC-TGc en comparación con aquellos que no consumen alcohol, con consumo moderado o alto (p ajustada $< 0,05$), sin embargo los resultados en mujeres no se vieron modificados tras el ajuste.

Tabla 3. Características clínicas y bioquímicas para mujeres según el consumo de alcohol. Los datos se expresan como media \pm DE salvo aquel donde esté expresado otra medida.

	Ingesta de alcohol		
	No (N = 59)	Bajo (N = 36)	Moderado (N = 34)
Ingesta de alcohol (g/día)	0.0 \pm 0.0	5.2 \pm 2.5	17.2 \pm 4.3
Edad (años)	42.5 \pm 15.2	40.4 \pm 13.7	42.4 \pm 13.3
IMC (kg/m ²)	26.9 \pm 5.7	23.9 \pm 4.7 ^a	24.7 \pm 3.8
PAS (mmHg)	128.5 \pm 18.1	124.8 \pm 14.1	120.4 \pm 14.2
PAD (mmHg)	82.7 \pm 9.7	86.1 \pm 8.5	79.2 \pm 10.0
Fumadores (n, %)	15 (23.4%)	10 (27.8%)	10 (28.6%)
Historia de ECV (n, %)	11 (17.2%)	4 (11.1%)	4 (11.4%)
Historia de DM2 (n, %)	2 (3.1%)	1 (2.8%)	1 (2.9%)
Colesterol total (mg/dl)	193.35 \pm 42.54	189.48 \pm 46.40	201.08 \pm 54.14
Colesterol LDL (mg/dl)	116.01 \pm 38.66	119.88 \pm 38.67	127.61 \pm 46.40
Colesterol HDL (mg/dl)	51.04 \pm 15.47	54.91 \pm 13.15	58.00 \pm 15.08
Apo B (g/l)	0.84 \pm 0.25	0.81 \pm 0.21	0.90 \pm 0.30
Apo A-I (g/l)	1.41 \pm 0.32	1.52 \pm 0.23	1.57 \pm 0.30
TG plasmáticos (mg/dl)	126.66 \pm 76.17	84.14 \pm 54.03 ^{a,b}	91.23 \pm 46.94
Ingesta de grasa de la dieta (g/día)	74.19 \pm 30.03	79.55 \pm 26.55	79.97 \pm 25.80
ABC-TGc (mg·h/dl)	2302.92 \pm 1302.03	1762.62 \pm 673.16	1886.62 \pm 859.17
ABC-TGc (mg·h/dl) ajustado*	2311.78 \pm 602.30	1727.19 \pm 655.44	1824.62 \pm 487.16
Δ ABC-TGc (mg·h/dl)	327.72 \pm 398.58	398.58 \pm 372.01	310.01 \pm 389.72
Δ ABC-TGc (mg·h/dl) ajustado*	283.43 \pm 106.29	380.87 \pm 106.29	301.15 \pm 79.72
Alto (N = 5)			46.1 \pm 18.8
Alto			32.0 \pm 11.1
Alto			25.7 \pm 3.2
Alto			127.5 \pm 8.7
Alto			80.0 \pm 7.1
Alto			4 (80.0%) ^c
Alto			1 (20.0%)
Alto			0 (0.0%)

* ajustado para edad, tabaquismo e IMC.

^a Diferencias significativas respecto el valor correspondiente en el grupo de no ingesta de alcohol (p < 0.05)

^b Diferencias significativas respecto el valor correspondiente en el grupo de alta ingesta de alcohol (p < 0.05)

^c Diferencias significativas respecto el valor correspondiente en el grupo de no, baja y moderada ingesta de alcohol (p < 0.05)

Tabla 4. Características clínicas y bioquímicas para hombres según el consumo de alcohol. Los datos se expresan como media \pm DE salvo aquel donde esté expresado otra medida.

	Ingesta de alcohol		
	No (N = 34)	Bajo (N = 27)	Moderado (N = 54)
Ingesta de alcohol (g/día)	0.0 \pm 0.0	5.4 \pm 2.7	19.9 \pm 6.2
Edad (años)	34.9 \pm 14.5	41.7 \pm 13.4	45.2 \pm 10.9 ^a
IMC (kg/m ²)	24.6 \pm 3.4	23.8 \pm 2.9	25.4 \pm 3.8
PAS (mmHg)	127.4 \pm 14.2	122.1 \pm 11.1	126.4 \pm 15.1
PAD (mmHg)	83.0 \pm 8.9	81.9 \pm 9.2	81.1 \pm 12.6
Fumadores (n, %)	6 (17.6%)	5 (18.5%)	12 (22.2%) ^b
Historia de ECV (n, %)	6 (17.6%)	3 (11.1%)	8 (33.3%)
Historia de DM2 (n, %)	2 (5.9%)	1 (3.7%)	1 (4.2%)
Colesterol total (mg/dl)	197.21 \pm 42.53	201.08 \pm 42.54	208.82 \pm 30.93
Colesterol LDL (mg/dl)	127.61 \pm 38.67	131.48 \pm 42.54	135.34 \pm 38.67
Colesterol HDL (mg/dl)	46.40 \pm 11.21	46.40 \pm 14.31	49.11 \pm 10.44
Apo B (g/l)	0.89 \pm 0.22	0.99 \pm 0.29	1.02 \pm 0.26
Apo A-I (g/l)	1.34 \pm 0.24	1.34 \pm 0.23	1.38 \pm 0.22
TG plasmáticos (mg/dl)	116.92 \pm 69.09	116.92 \pm 66.43	122.23 \pm 92.12
Ingesta de grasa de la dieta(g/día)	86.95 \pm 28.37	93.00 \pm 24.93	87.48 \pm 26.67
ABC-TGc (mg·h/dl)	2382.64 \pm 1089.46	2063.77 \pm 655.45	2533.21 \pm 1052.26
ABC-TGc (mg·h/dl) ajustado*	2533.21 \pm 540.30	2046.06 \pm 460.58	2524.36 \pm 584.59
Δ ABC-TGc (mg·h/dl)	602.30 \pm 620.02	248.01 \pm 646.59	575.73 \pm 496.01
Δ ABC-TGc (mg·h/dl) ajustado*	628.87 \pm 159.43	274.58 \pm 168.29 ^c	575.73 \pm 159.43

* ajustado para edad, tabaquismo e IMC.

^a Diferencias significativas respecto el valor correspondiente en el grupo de no ingesta de alcohol (p < 0.05)

^b Diferencias significativas respecto el valor correspondiente en el grupo de alta ingesta de alcohol (p < 0.05)

^c Diferencias significativas respecto el valor correspondiente en el grupo de no, baja y moderada ingesta de alcohol (p < 0.05)

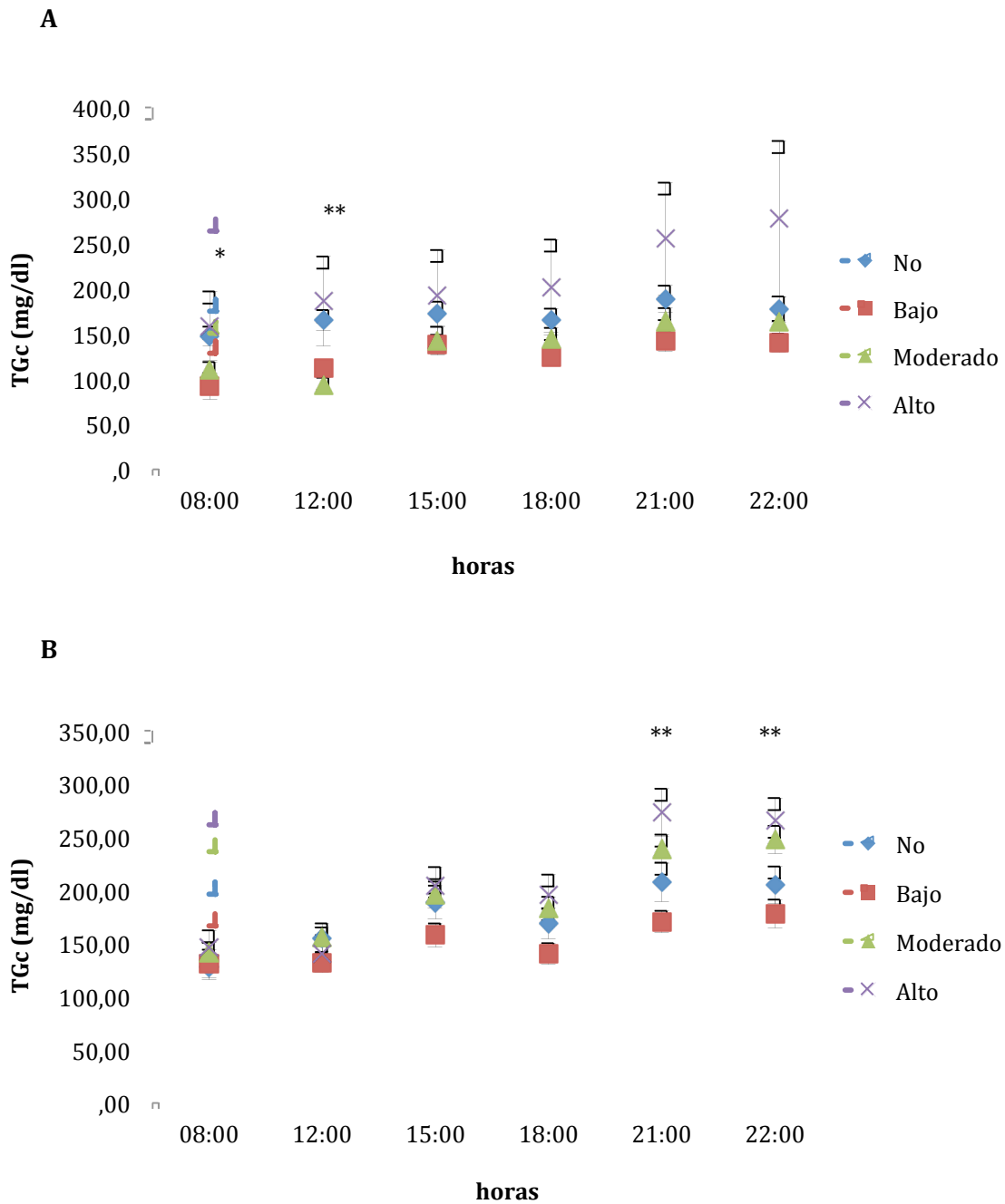


Figura 4. Concentración de TGc según la ingesta de alcohol en mujeres (A) y en hombres (B). Los datos se expresan como media \pm EEM.

*Diferencias significativas en TGc para un punto de tiempo específico (p para la tendencia $< 0,05$). ** Diferencias significativas en TGc para un punto de tiempo específico (p para la tendencia $< 0,001$).

6.1.3. Asociación entre el consumo de alcohol y las concentraciones de PCRus

En una muestra aleatoria de la población estudiada previamente con las mismas características clínicas y bioquímicas, 49 hombres y 31 mujeres, se calcularon las concentraciones de PCRus en ayunas para analizar su asociación con el consumo de alcohol, la trigliceridemia diurna y la concentraciones de TG en ayunas. Se observa que, en varones, el consumo de alcohol no se asocia con diferentes concentraciones de PCRus (p para la tendencia de 0,846. ver figura 5), no existiendo tampoco una correlación con las concentraciones de triglicéridos basales ($r= 0,017$, $p= 0,910$) ni con el ABC-TGc ($r= 0,117$, $p= 0,420$) o el Δ ABC-TGc ($r= 0,065$, $p= 0,665$).

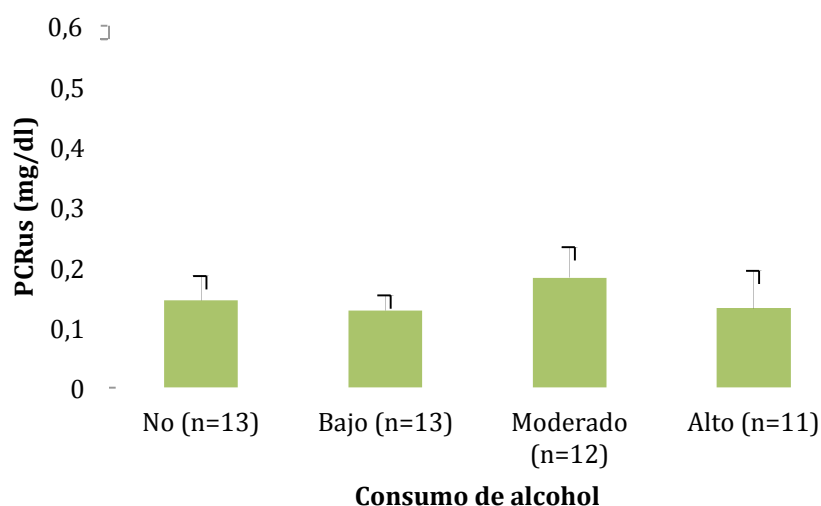


Figura 5. Concentraciones de PCRus en varones según el consumo de alcohol. Datos expresados como media \pm EEM.

Sin embargo, en mujeres se ve una clara asociación entre un mayor consumo de alcohol y unas concentraciones superiores de PCRus (p para la tendencia de 0,007) (figura 6). En cuanto a su asociación con la trigliceridemia basal, sí existe una correlación entre ambos parámetros ($r= 0,474$; $p=0,007$), aunque no con el ABC-

TGc ($r=0,272$, $p=0,119$) ni con el $\Delta ABC-TGc$ ($r= 0,155$, $p= 0,381$).

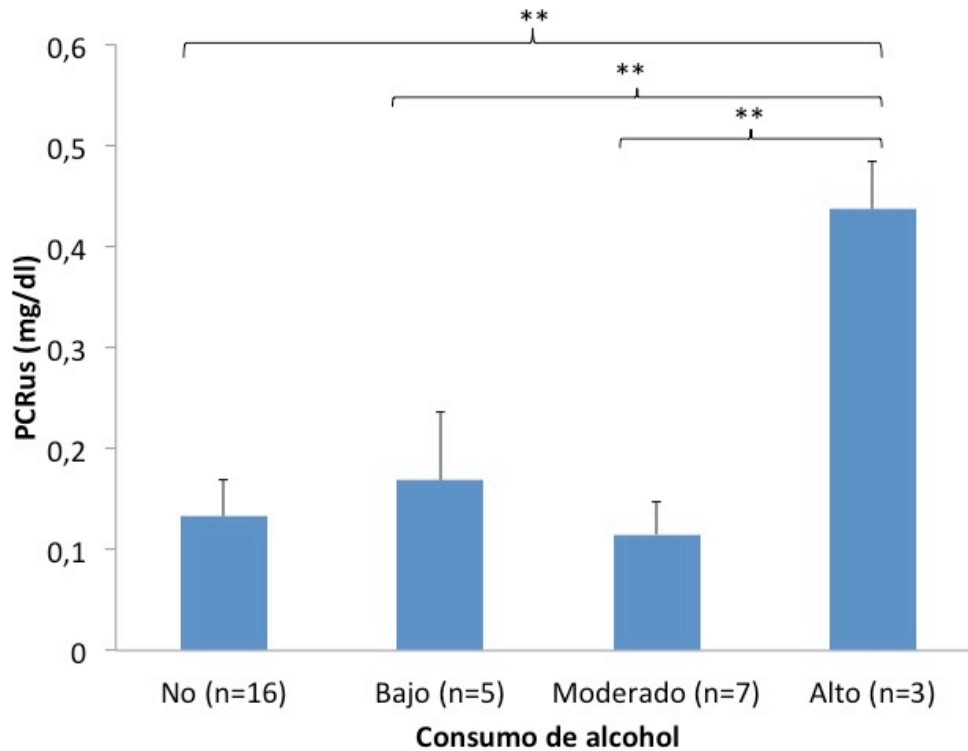


Figura 6. Concentraciones de PCRus en mujeres según el consumo de alcohol. Datos expresados como media \pm EEM. ** $p<0,01$.

Debido a las diferencias encontradas en las concentraciones de PCRus en mujeres al comparar abstemias con bajo, moderado y alto consumo se realizó una regresión lineal, manteniéndose la asociación entre el consumo de alcohol y las concentraciones de PCRus ($p = 0,001$) y las concentraciones de TG en ayunas ($p<0,001$) tras ajuste con la edad, con las concentraciones de TG en ayunas, el hábito tabáquico y el IMC (p ANOVA $<0,001$). Ver tabla 7.

Variable dependiente	Variables introducidas	B corregida	p
logPCRus	logTG	0,749	0,000
	+Consumo de alcohol	0,597	0,001
	+Edad	0,006	0,138
	+Tabaquismo	0,066	0,647
	+IMC	0,222	0,180

R^2 del modelo = 0,582. R^2 corregida del modelo= 0,498. $p < 0,001$

Tabla 7. Regresión lineal de las concentraciones de PCRus en mujeres.

6.2. Ensayo clínico en voluntarios sanos

La adherencia al protocolo fue completa en todos los casos. El peso y los parámetros antropométricos se mantuvieron constantes a lo largo del estudio.

Se analizó el componente en fenoles de las diferentes bebidas alcohólicas. El vino tinto presentaba 2.660 mg/l, el ron 375 mg/l y el brandy 89 mg/l. El vodka carecía de polifenoles. Las medidas se expresan como equivalentes del ácido gálico.

Todas las variables analizadas presentaban una distribución normal.

6.2.1. Efecto del consumo mantenido de una dieta rica en grasas y distintas bebidas alcohólicas sobre el perfil lipídico basal

El consumo de una dieta rica en grasa mantenida durante 5 días no se asocia con diferencias significativas en las concentraciones basales de colesterol total, cLDL, cHDL, cVLDL, TG, apoA1 ni apoB. El consumo de las diferentes bebidas alcohólicas con la dieta rica en grasas no se asocia con un incremento significativo en las

concentraciones de colesterol total, cLDL, cHDL, TG, apoA1 ni apoB (tabla 8).

		CT (mg/dL)	p	LDL (mg/dL)	p	ApoB (g/L)	p
Control	Día 0	163,33 ± 5,84		103,6 ± 4,97		0,68 ± 0,28	
	Día 5	167,19 ± 5,07	0,451	104,06 ± 4,28	0,953	0,69 ± 0,24	1,000
Vino	Día 0	165,88 ± 6,38		104,25 ± 5,11		0,68 ± 0,27	
	Día 5	169 ± 5,25	0,426	104,25 ± 4,45	1,000	0,69 ± 0,27	0,625
Ron	Día 0	162,19 ± 6,45		98,13 ± 5,13		0,65 ± 0,33	
	Día 5	166,19 ± 5,62	0,234	101,31 ± 4,20	0,283	0,64 ± 0,30	0,653
Brandy	Día 0	171,31 ± 6,37		97,07 ± 5,07		0,66 ± 0,32	
	Día 5	173,19 ± 5,30	0,542	102,06 ± 5,16	0,928	0,67 ± 0,36	0,666
Vodka	Día 0	155,53 ± 6,35		110 ± 5,59		0,72 ± 0,31	
	Día 5	162,31 ± 5,47	0,141	110,31 ± 4,61	0,300	0,72 ± 0,31	0,684

		TG (mg/dL)	p	HDL (mg/dL)	p	ApoA1 (g/dL)	p
Control	Día 0	81 ± 7,91		51 ± 0		1,44 ± 0,40	
	Día 5	83,75 ± 7,34	0,639	52,94 ± 2,94	0,490	1,46 ± 0,41	0,304
Vino	Día 0	76,44 ± 5,40		53,88 ± 2,65		1,46 ± 0,49	
	Día 5	90,25 ± 8,18	0,070	53,38 ± 2,64	0,796	1,47 ± 0,33	0,803
Ron	Día 0	80 ± 5,26		50,69 ± 2,49		1,47 ± 0,41	
	Día 5	87,75 ± 5,91	0,239	51,88 ± 2,68	0,277	1,44 ± 0,49	0,209
Brandy	Día 0	78,63 ± 5,82		50,67 ± 3,26		1,43 ± 0,39	
	Día 5	86,19 ± 7,64	0,086	52,13 ± 2,78	0,356	1,42 ± 0,42	0,637
Vodka	Día 0	71,93 ± 8,38		53,81 ± 3,32		1,47 ± 0,35	
	Día 5	83,69 ± 5,88	0,099	55,44 ± 3,16	0,226	1,46 ± 0,57	0,745

Tabla 8. Perfil lipídico antes y después de la intervención. Los datos se expresan como media ± error estándar de la media.

6.2.2. Efecto del consumo crónico de una dieta rica en grasas y diferentes bebidas alcohólicas sobre los factores proinflamatorios

6.2.2.1. Efecto sobre las concentraciones de TNF α

La dieta rica en grasas (período control) aumenta sus concentraciones plasmáticas ($6,08 \pm 0,73$ vs $7,34 \pm 0,72$ pg/ml) aunque de forma no significativa. La dieta rica en grasas suplementada con vino tinto desciende las concentraciones plasmáticas ($7,42 \pm 0,69$ vs $5,95 \pm 0,84$ pg/ml) mientras que el resto de las bebidas alcohólicas seguían manteniendo las elevaciones de TNF- α propias de la dieta rica en grasa, aunque sin existir diferencias significativas en ninguno de los casos (figura 7).

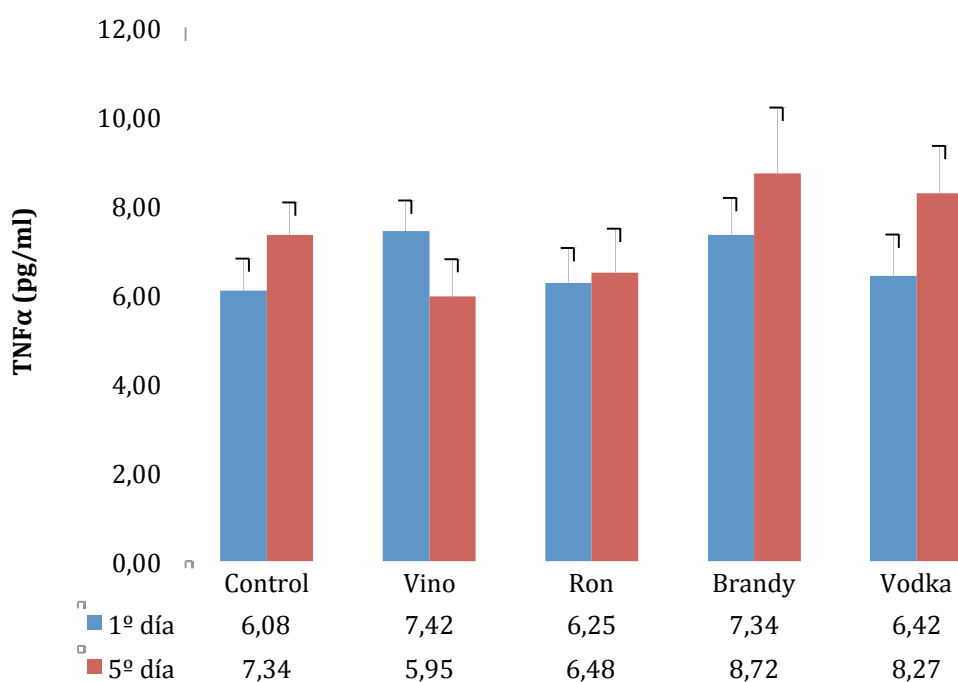


Figura 7. Niveles plasmáticos de TNF α al 1º y 5º día después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos (pg/ml). Expresado como media \pm EEM. * $p < 0,05$.

Si se calcula el cambio relativo, el vino disminuye los valores un $28,95 \pm 9,75\%$ frente al control que incrementa los valores un $55,23 \pm 33,85\%$ ($p < 0,05$). Las otras bebidas alcohólicas lo incrementan sin existir diferencias estadísticamente significativas con respecto a los cambios porcentuales de la dieta basal (figura 8).

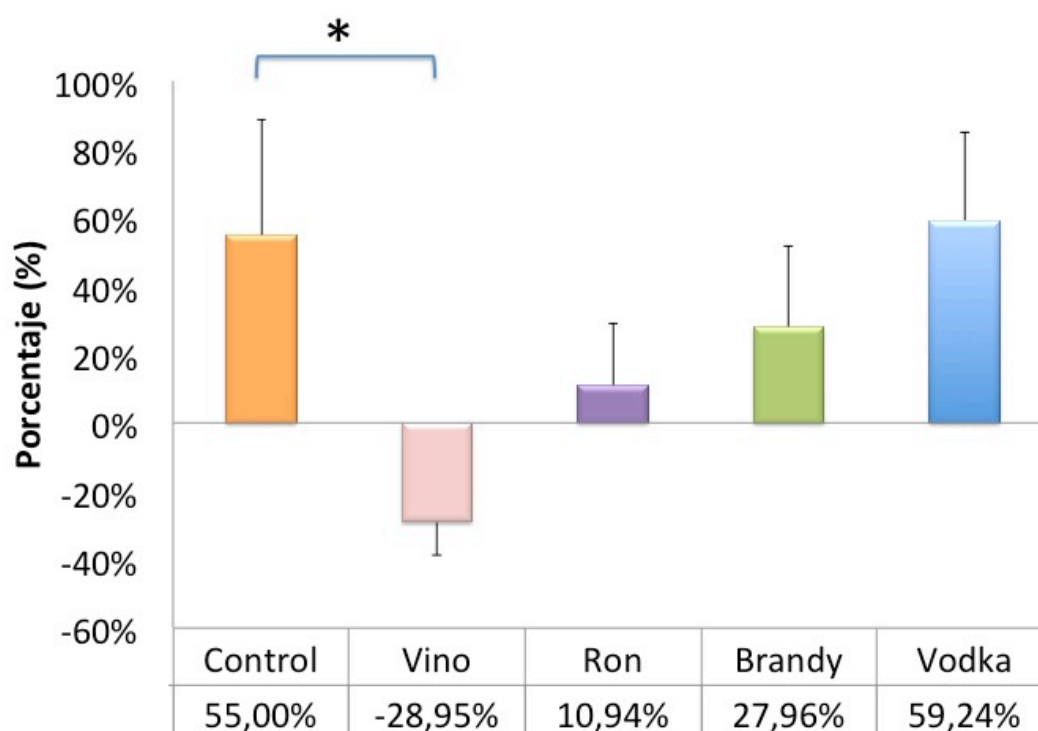


Figura 8. Cambio porcentual de los niveles plasmáticos de TNF α después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos. Expresado como media en porcentaje \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control.

6.2.2.2. Efecto sobre las concentraciones de IL-6

La ingesta rica en grasas (período control) no modifica las concentraciones de IL-6. El consumo de bebidas alcohólicas tampoco modifica las concentraciones de IL-6. (figura 9), aunque se observó una leve tendencia no significativa al descenso durante la fase de consumo de vino tinto, mientras que tanto en la dieta sin alcohol como en las fases con los otros alcoholes, la tendencia era la contraria.

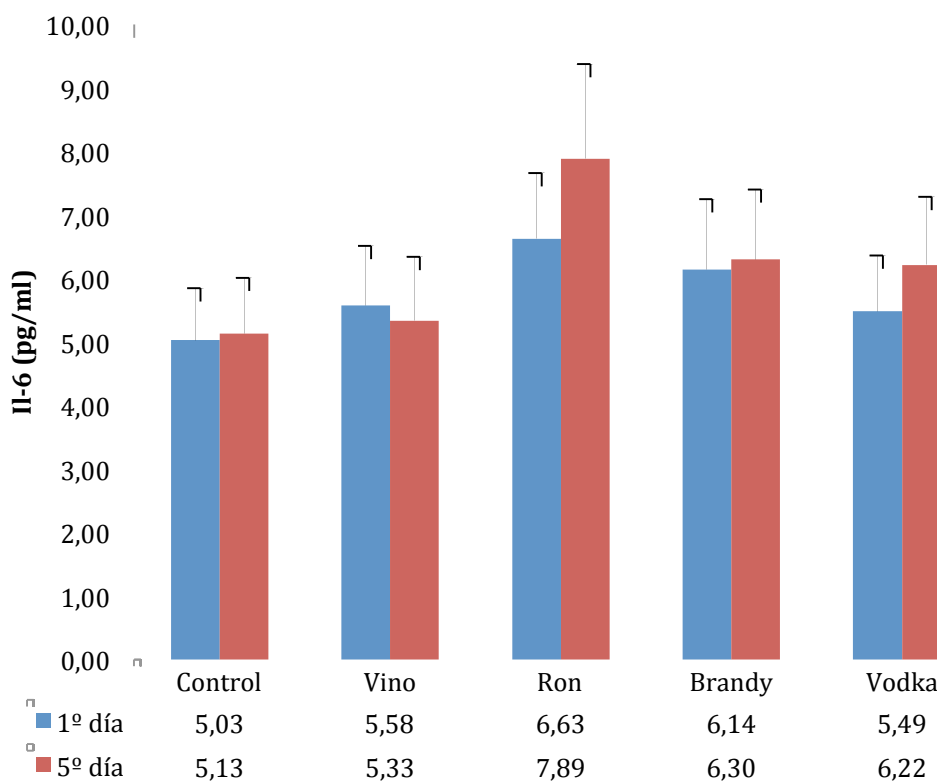


Figura 9. Niveles plasmáticos de IL-6 al 1º y 5º día después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos (pg/ml). Expresado como media± EEM. *p<0,05.

En cuanto a las diferencias relativas entre los niveles de IL-6 antes y después de la ingesta de los diferentes tipos de alcoholes, se obtiene un descenso significativo ($-16,74 \pm 10,08 \%$ vs $15,40 \pm 13,84\%$; $p < 0,05$) en los valores de IL-6 obtenidos con el vino comparándolo con el control. El descenso fue menor con el consumo de ron ($-0,82 \pm 7,97 \%$) y no alcanzó significación estadística. El resto de las bebidas alcohólicas muestran una tendencia a incrementar las cifras, aunque de forma no significativa con respecto al control. (figura 10).

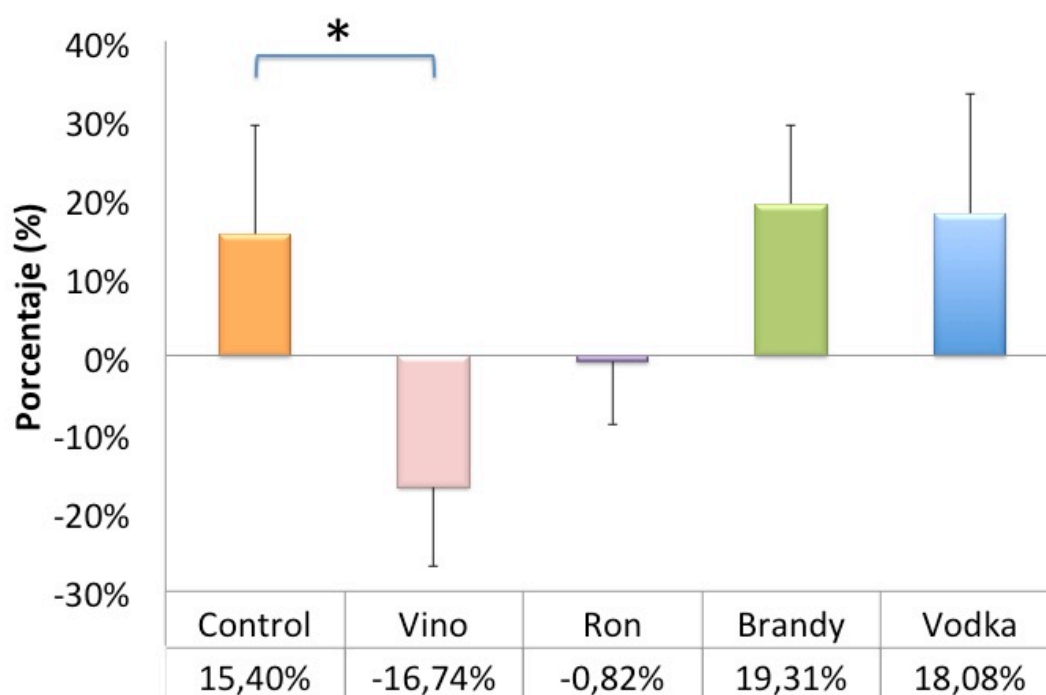


Figura 10. Cambio porcentual en las determinaciones plasmáticas de IL-6 después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos. Expresado como media en porcentaje \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control.

6.2.2.3. Efecto sobre las concentraciones de PCR ultrasensible

La dieta rica en grasas (control) originó un incremento de las mismas ($0,81 \pm 0,23$ vs $1,22 \pm 0,32$ mg/dl; $p= 0,019$), mientras que el consumo de las bebidas alcohólicas consideradas las redujo, aunque de forma no significativa. (figura 11).

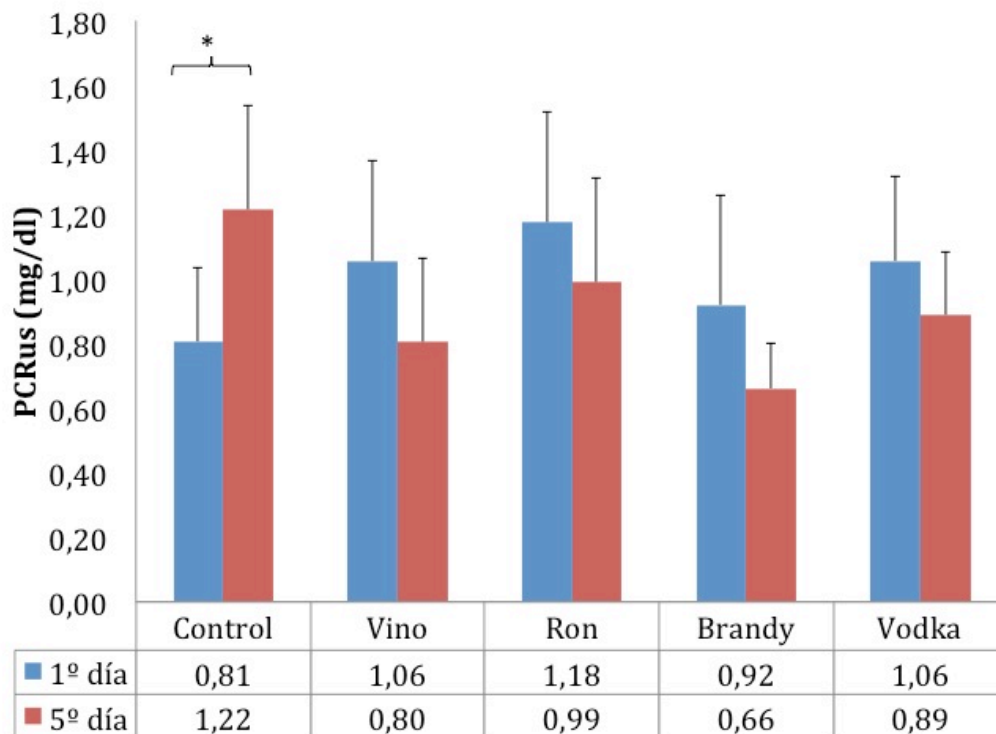


Figura 11. Concentraciones plasmáticas de PCRus al 1º y 5º día después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos(mg/dl). Expresado como media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs 1º día.

Si se comparan los cambios porcentuales entre el período control y cuando consumieron los diferentes tipos de bebidas alcohólicas, se observa que el vino provoca un descenso de $-21,50 \pm 14\%$ ($p < 0,05$). En el resto de bebidas se apreció incremento, aunque no se vieron diferencias con respecto al control (figura 12).

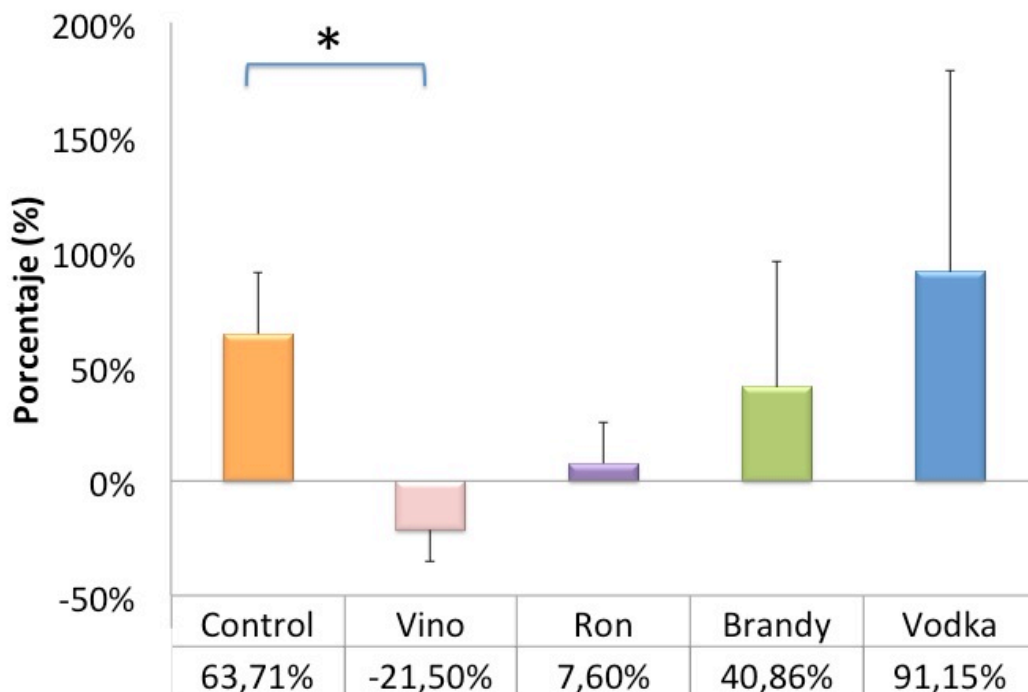


Figura 12. Cambio porcentual en las determinaciones de PCRus después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin el consumo añadido de los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos. Expresado como media en porcentaje \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control.

6.2.2.4. Efecto sobre las concentraciones de fosfolipasa A2 plasmática (PLA_{2s}).

La dieta rica en grasas (control) origina una tendencia a incrementar las concentraciones de PLA_{2s} y sin embargo, al añadirle vino y ron esta tendencia se invierte, aunque de forma no significativa. El consumo de brandy y vodka origina una tendencia a incrementar las concentraciones de PLA_{2s} sin encontrar diferencias significativas (figura 13).

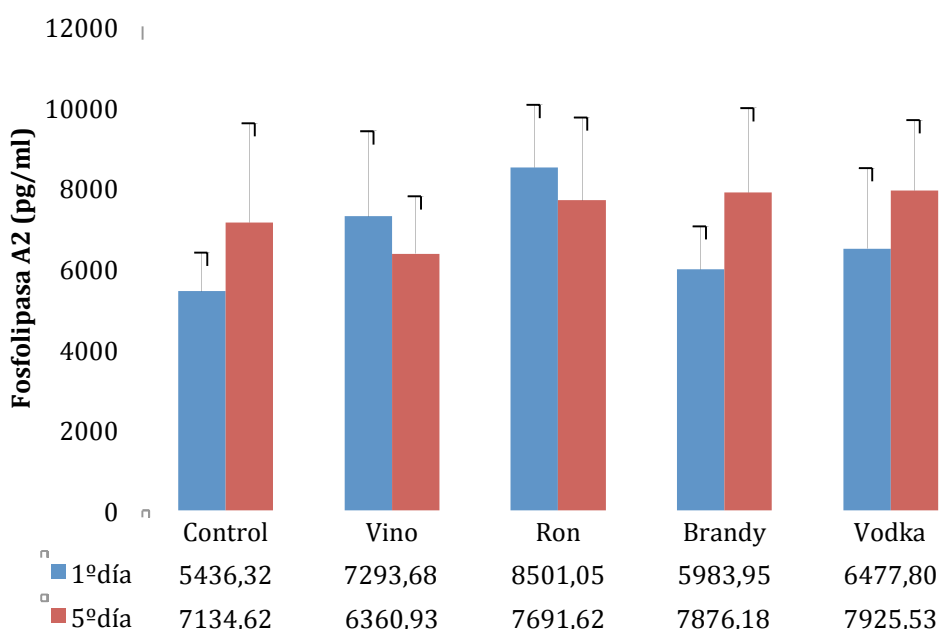


Figura 13. Concentraciones plasmáticas de PLA_{2s} al 1º y 5º día después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos (pg/ml). Expresado como media \pm EEM.

Si analizamos los cambios porcentuales de las concentraciones de PLA_{2s}, el consumo de vino y de ron originan un descenso en el porcentaje de las concentraciones de PLA_{2s} frente al control, aunque no alcanzan diferencias

significativas (figura 14) .

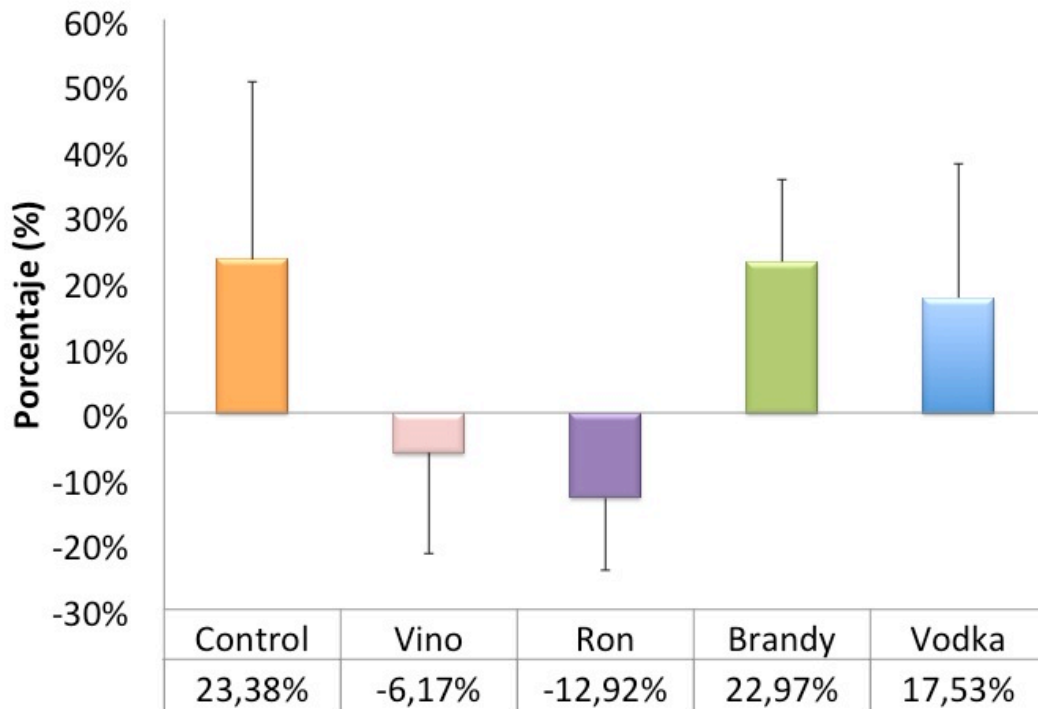


Figura 14. Cambio porcentual de las concentraciones de PLA₂s después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin diferentes bebidas alcohólicas. Expresado como media en porcentaje \pm EEM. * $p < 0,05$.

6.2.3. Efecto del consumo crónico de una dieta rica en grasas y diferentes bebidas alcohólicas sobre los marcadores de oxidación

6.2.3.1. Efecto sobre las concentraciones de la peroxidación lipídica

El consumo de una dieta rica en grasas (período control) origina un incremento significativo de la LPO ($p=0,04$). El consumo de vino, ron, brandy y vodka no modifica de forma significativa las concentraciones de LPO (figura 15).

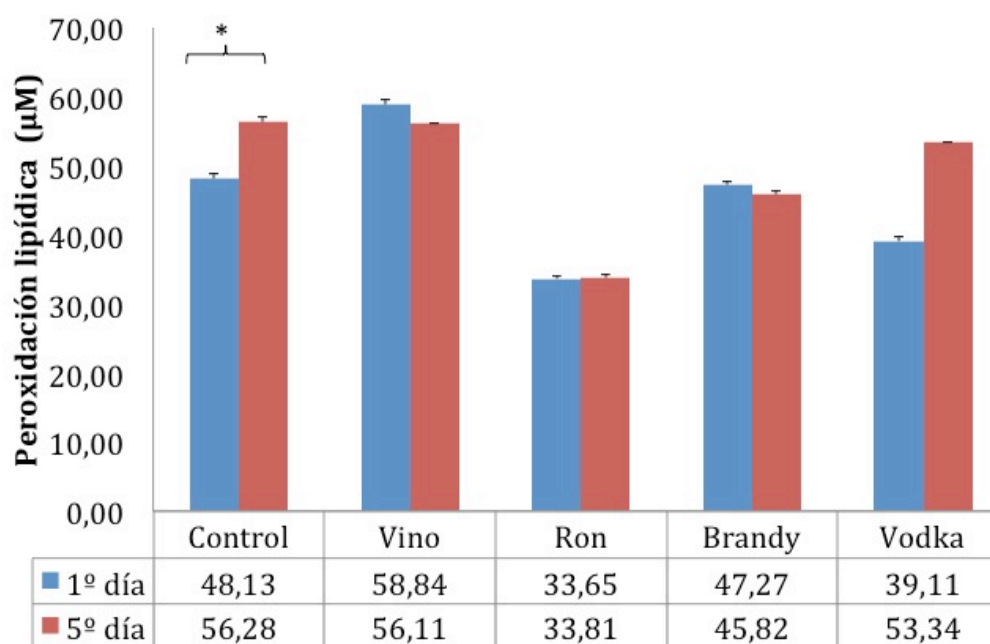


Figura 15. Concentraciones plasmáticas de LPO al 1º y 5º día después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos. Expresado como media \pm EEM. * $p<0,05$ vs 1º día.

Si se compara el cambio porcentual de las concentraciones de LPO, se observa que el consumo de vodka incrementa la peroxidación lipídica frente a otras bebidas alcohólicas como el brandy, que muestra una tendencia a disminuirla con respecto a la dieta basal sin alcohol ($77,47 \pm 0,21\%$ vs $2,48 \pm 0,49\%$; $p=0,05$). Al compararlo con el consumo de vino y ron, también parece que muestran una tendencia a disminuir la LPO originada por la dieta aunque no se vieron diferencias significativas ($p=0,07$), (figura 16).

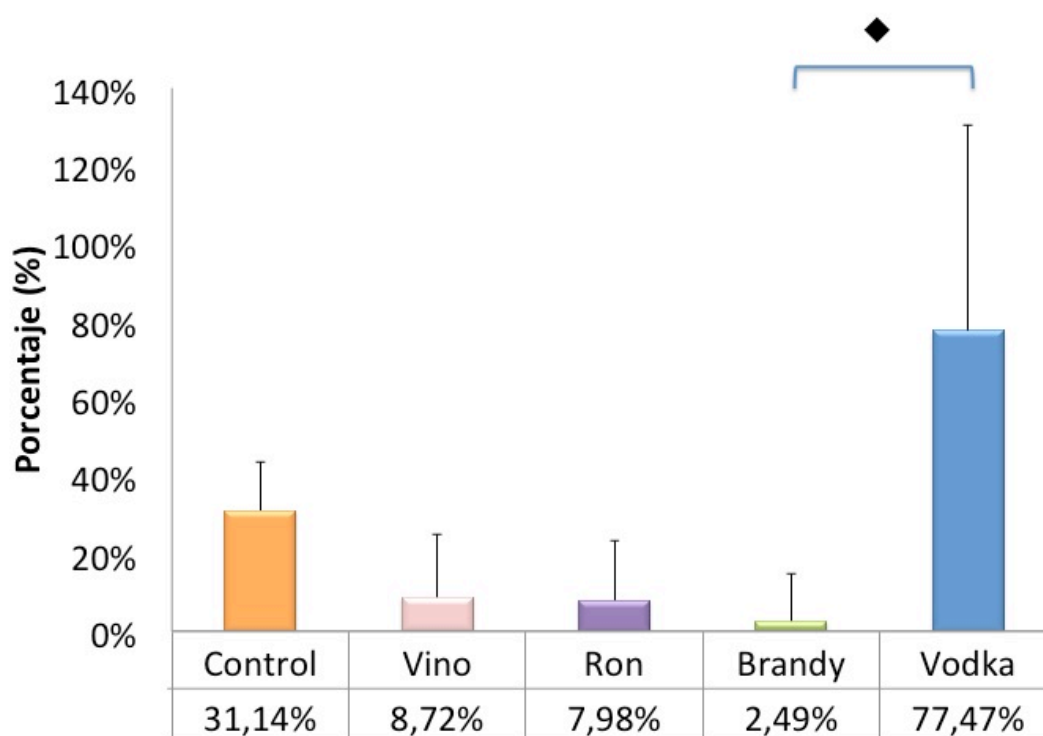


Figura 16. Cambio porcentual en las determinaciones de LPO después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos. Expresado como media en porcentaje \pm EEM. $\blacklozenge p=0,05$ vs brandy.

6.2.3.2. Efecto sobre las concentraciones de la capacidad antioxidante total (CAT).

El consumo de una dieta rica en grasas (periodo control) origina una disminución de la capacidad antioxidante total ($17,94 \pm 0,14 \mu\text{M}$ vs $13,84 \pm 0,18 \mu\text{M}$; $p=0,036$). El consumo de vino tinto origina un incremento de la capacidad antioxidante total a pesar de la ingesta de una dieta rica en grasas ($17,91 \pm 0,16 \mu\text{M}$ vs $21,71 \pm 0,12 \mu\text{M}$; $p=0,018$). Con la ingesta de ron, brandy y vodka no se obtuvieron diferencias en la CAT con respecto a sus respectivos valores basales (figura 17).

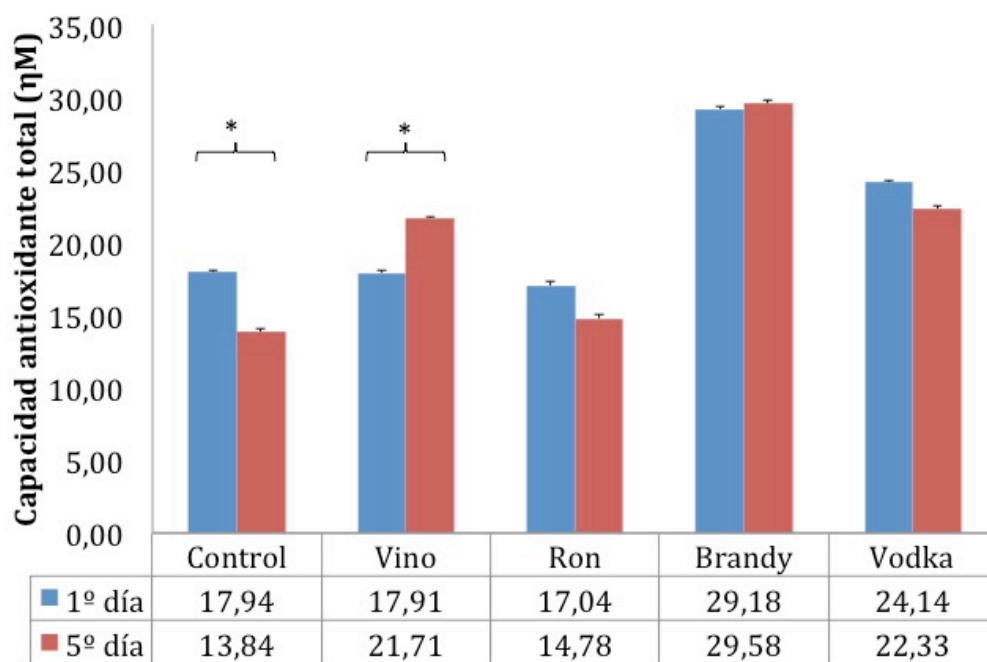


Figura 17. Concentraciones plasmáticas de CAT al 1º y 5º día después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas en voluntarios sanos. Expresado como media \pm EEM, * $p<0,05$ vs 1º día.

Al analizar el cambio porcentual de la CAT se observa que el vino tinto origina un incremento frente al descenso originado por la dieta rica en grasas ($60,60 \pm 33,16\%$ vs $-21,75 \pm 9,89\%$; $p=0,002$). Si se compara el consumo de vino tinto con las otras bebidas alcohólicas se observa que aumenta la capacidad antioxidante total respecto al consumo de ron ($60,60 \pm 33,16\%$ vs $3,35 \pm 19,47\%$. $p=0,028$), al consumo de brandy ($60,60 \pm 33,16\%$ vs $-7,59 \pm 4,24\%$; $p=0,01$) y al consumo de vodka ($60,60 \pm 33,16\%$ vs $2,51 \pm 5,14\%$; $p=0,026$). Los datos se reflejan en la figura 18.

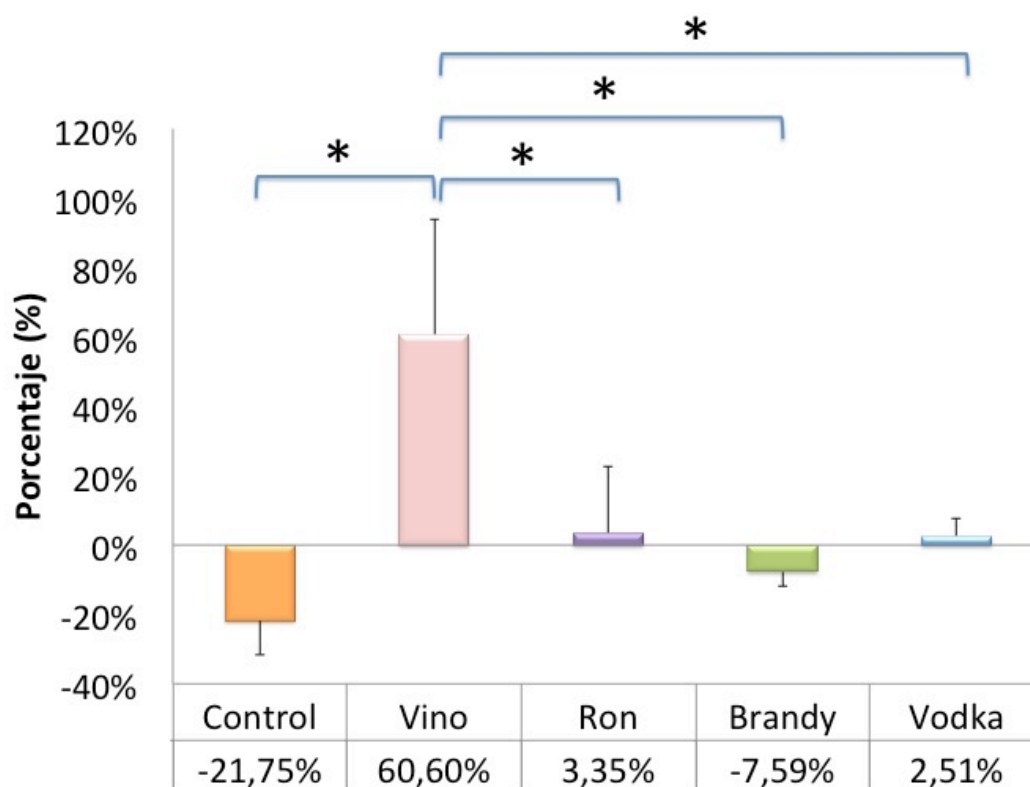


Figura 18. Cambio porcentual en las determinaciones de CAT después del consumo de una dieta rica en grasas con o sin los diferentes tipos de bebidas alcohólicas. Expresado como media en porcentaje \pm EEM. * $p<0,05$ vs consumo de vino.

6.2.4. Correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de los factores proinflamatorios, peroxidación lipídica y capacidad antioxidante total

En las siguientes tablas se exponen las diferentes correlaciones calculadas entre los factores proinflamatorios, la peroxidación lipídica y la capacidad antioxidante total después del consumo de una dieta rica en grasas (tabla 9), y el consumo de vino tinto (tabla 10), ron (tabla 11), brandy (tabla 12) y vodka (tabla 13).

		r	p
IL-6	TNF	0,202	0,454
	PCR us	-0,379	0,164
	PLA2s	-0,149	0,628
	LPO	-0,049	0,858
	CAT	-0,572	0,026
TNF	PCR us	0,707	0,007
	PLA2s	0,425	0,168
	LPO	0,184	0,496
	CAT	-0,243	0,365
PCR us	PLA2s	0,138	0,654
	LPO	0,174	0,535
	CAT	0,265	0,339
PLA2s	LPO	0,514	0,072
	CAT	-0,022	0,943
LPO	CAT	0,309	0,244

Tabla 9. Correlación de Pearson entre los diferentes factores proinflamatorios, peroxidación lipídica y capacidad antioxidante total después de una dieta rica en grasas en voluntarios sanos. r= coeficiente de correlación. p= significación estadística.

		r	p
IL-6	TNF	-0,305	0,268
	PCR us	-0,373	0,232
	PLA2s	-0,627	0,039
	LPO	0,394	0,147
	CAT	0,267	0,336
TNF	PCR us	0,717	0,006
	PLA2s	0,425	0,168
	LPO	0,273	0,307
	CAT	-0,510	0,044
PCR us	PLA2s	0,249	0,487
	LPO	0,412	0,162
	CAT	-0,357	0,231
PLA2s	LPO	-0,252	0,429
	CAT	-0,347	0,269
LPO	CAT	-0,113	0,676

Tabla 10. Correlación de Pearson entre los diferentes factores proinflamatorios, peroxidación lipídica y capacidad antioxidante total después de una dieta rica en grasas y consumo de vino tinto en voluntarios sanos. r= coeficiente de correlación. p= significación estadística.

		r	p
IL-6	TNF	0,583	0,023
	PCR us	-0,322	0,242
	PLA2s	0,136	0,689
	LPO	0,235	0,473
	CAT	-0,199	0,460
TNF	PCR us	-0,500	0,058
	PLA2s	-0,273	0,417
	LPO	0,216	0,459
	CAT	-0,284	0,306
PCR us	PLA2s	0,624	0,040
	LPO	0,009	0,976
	CAT	0,264	0,342
PLA2s	LPO	0,055	0,873
	CAT	0,098	0,762
LPO	CAT	-0,188	0,503

Tabla 11. Correlación de Pearson entre los diferentes factores proinflamatorios, peroxidación lipídica y capacidad antioxidante total después de una dieta rica en grasas y consumo de ron en voluntarios sanos. r= coeficiente de correlación. p= significación estadística.

		r	p
IL-6	TNF	0,405	0,120
	PCR us	0,163	0,579
	PLA2s	0,018	0,957
	LPO	0,495	0,051
	CAT	0,001	0,998
TNF	PCR us	0,071	0,808
	PLA2s	0,077	0,811
	LPO	0,284	0,286
	CAT	0,334	0,206
PCR us	PLA2s	-0,128	0,709
	LPO	-0,048	0,871
	CAT	-0,078	0,791
PLA2s	LPO	0,134	0,678
	CAT	-0,609	0,035
LPO	CAT	0,282	0,289

Tabla 12. Correlación de Pearson entre los diferentes factores proinflamatorios, peroxidación lipídica y capacidad antioxidante total después de una dieta rica en grasas y consumo de brandy en voluntarios sanos. r= coeficiente de correlación. p= significación estadística.

		r	p
IL-6	TNF	0,402	0,122
	PCR us	0,038	0,890
	PLA2s	-0,231	0,470
	LPO	0,473	0,064
	CAT	-0,199	0,460
TNF	PCR us	0,191	0,480
	PLA2s	0,204	0,524
	LPO	0,325	0,219
	CAT	-0,374	0,154
PCR us	PLA2s	0,000	1,000
	LPO	0,222	0,409
	CAT	0,017	0,950
PLA2s	LPO	0,046	0,887
	CAT	0,049	0,879
LPO	CAT	0,128	0,637

Tabla 13. Correlación de Pearson entre los diferentes factores proinflamatorios, peroxidación lipídica y capacidad antioxidante total después de una dieta rica en grasas y consumo de vodka en voluntarios sanos. r = coeficiente de correlación. p = significación estadística.

Dentro de todas las correlaciones estudiadas, se observaron sólo algunas significativas tras el consumo de vino tinto, ron y brandy, y no de otras bebidas alcohólicas como el vodka. Se ha observado una correlación positiva tras el consumo de vino tinto, entre las concentraciones de PCRus y LPO ($r= 0,57$; $p=0,042$) y entre PCRus y la PLA2s tras el consumo de ron ($r=0,624$; $p= 0,040$).

Además se ha encontrado una correlación negativa entre las concentraciones

plasmáticas de la CAT y el TNF α tras el consumo de vino tinto ($r = -0,51$; $p = 0,044$), entre las concentraciones de CAT e IL6 tras el consumo de ron ($r = -0,57$; $p = 0,026$) y entre las concentraciones de CAT y PLA2s tras el consumo de brandy ($r = -0,609$; $p = 0,035$).

7a. Discusión

La aterosclerosis es la primera causa de mortalidad en el mundo (OMS 2011)²⁸⁰. Los hábitos de vida saludables constituyen la primera medida para controlar y evitar el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Dentro de estos hábitos de vida se encuentra el realizar una dieta sana pobre en grasas saturadas, evitar el consumo de tabaco y realizar ejercicio físico diario. El consumo de alcohol constituye una parte de la dieta importante debido a sus efectos sobre el organismo tanto deletéreos como posiblemente beneficiosos, dependiendo de la cantidad y del patrón de consumo. Del mismo modo se plantea que el tipo de alcohol puede constituir un factor determinante en los efectos del consumo de diferentes bebidas alcohólicas.

7a.1. Efecto del consumo de alcohol sobre la trigliceridemia diurna

Desde que la trigliceridemia postprandial es capaz de predecir de forma independiente el riesgo de desarrollar la enfermedad cardiovascular y de ser incluso un mejor predictor que la trigliceridemia en ayunas^{7,10,46}, es importante el investigar el impacto de los factores de estilo de vida, como el consumo de alcohol sobre la trigliceridemia diurna en una situación real, no controlada.

En nuestro estudio se sugiere que la ingesta de bajas concentraciones de alcohol se asocia con una menor trigliceridemia diurna en hombres, pero si consideramos en su conjunto esta parte de estos resultados parece que el consumo de alcohol no contribuye significativamente a la trigliceridemia diurna en la vida diaria sin intervención. Estos resultados están en línea con un reciente meta-análisis y otros trabajos sobre el consumo de alcohol, donde se sugiere que el alcohol no tiene mayor impacto sobre las concentraciones de triglicéridos¹¹⁻¹⁴.

En estudios experimentales, sin embargo se ha observado que el alcohol

afecta al metabolismo postprandial de las lipoproteínas. El consumo crónico de alcohol aumenta la captación hepática y la oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria, aumentando la síntesis hepática de TG, dirigido a aumentar la secreción y acumulación de VLDL en el hígado¹⁶. El consumo de alcohol antes de la comida se asocia con una disminución de la hidrólisis de los quilomicrones tras una sobrecarga oral de grasa²⁸¹. Sin embargo, el consumo regular de alcohol se asocia con una mayor hidrólisis de los TG procedentes de las partículas de VLDL por acción de la LPL lo cual atenúa las concentraciones de TG^{16,282,283}. Si se analiza la repercusión del consumo de alcohol sobre las concentraciones de TG, un estudio experimental realizado en hombres sanos de mediana edad donde durante 3 semanas se observó que el consumo de 40g de alcohol en la cena, originaba un incremento de las concentraciones de TG tras la cena, a las 5h de consumo⁵¹. Estos resultados son comparables a los obtenidos en este trabajo, ya que la trigliceridemia capilar es significativamente superior en hombres con alto o moderado consumo de alcohol durante la noche. El consumo de alcohol origina este incremento en la trigliceridemia capilar ya que éste es más frecuente a la hora de la cena⁴³. En comparación con los hombres, el consumo de alcohol en las mujeres se asocia mejor con las concentraciones de TGc en ayunas. Una posible explicación para estas diferencias secundarias al sexo puede ser una diferente actividad de las enzimas metabolizadoras de alcohol⁵² y el efecto de los estrógenos sobre el metabolismo de los TG⁵³. Además debemos tener en cuenta que en nuestro trabajo sólo 5 mujeres consumían altas concentraciones de alcohol, sobre 30g al día. No obstante, el número de mujeres incluidas en los otros grupos era suficiente. Las mujeres habitualmente consumen menos alcohol que los hombres⁴ y tienden a comunicar un consumo de alcohol inferior al real en comparación con los hombres⁵⁴. Esto debe ser considerado como un

potencial sesgo de información en nuestro estudio.

El consumo leve a moderado de alcohol se relaciona con una disminución del riesgo de la enfermedad cardiovascular debido a un incremento en las concentraciones de colesterol HDL, apoAI y una disminución de las concentraciones de fibrinógeno, pero este efecto “protector” del consumo de alcohol disminuye con el consumo excesivo^{11,240}. En nuestro trabajo encontramos un descenso de las concentraciones de TGc en los sujetos con bajo consumo de alcohol, siendo en mujeres ese descenso en ayunas y antes de la comida y en varones después de la cena y a la hora de acostarse. Además, el Δ ABC-TGc disminuye en varones con baja ingesta de alcohol, pero sólo tras corrección por el IMC y el consumo de tabaco. Potencialmente estos resultados contribuyen a demostrar que el consumo leve o moderado pueden disminuir el riesgo cardiovascular, ya que la hipertrigliceridemia se asocia con el proceso aterosclerótico^{284,285}.

Teóricamente, es posible que exista algún sesgo en el consumo de alcohol, de modo que los sujetos que se incluyeron en el estudio alterasen su consumo habitual, a pesar de que se les instruyó para que mantuviesen adherencia a sus hábitos dietéticos y de consumo de alcohol habituales. Otra limitación para el estudio actual es la inexactitud al reflejar el consumo de alcohol en los cuestionarios y diarios⁵⁴. No obstante, todos los cuestionarios se evaluaron individualmente, lo cual puede mejorar su validez. Además los sujetos vivían en una situación no controlada, con diferentes hábitos de consumo de alcohol y comidas lo cual puede afectar de diferente modo al metabolismo de las lipoproteínas^{38,57}. La mayoría de los sujetos consumen vino y cerveza y por tanto estos resultados no pueden ser extrapolados al consumo de otras bebidas alcohólicas. El impacto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas sobre el metabolismo de los TG no está claro. Parece que el consumo de

vino tinto incrementa menos los TG en comparación con otras bebidas⁴, con resultados similares en mujeres postmenopáusicas⁵⁸. De todos modos, con el diseño observacional de nuestro estudio no es posible analizar el efecto de diferentes modelos de consumo sobre la trigliceridemia diurna.

En conclusión, el consumo de alcohol en bajas cantidades se asocia con una menor trigliceridemia diurna en hombres tras ajuste por IMC y hábito tabáquico pero el consumo de alcohol no impresiona que contribuya de forma importante a la trigliceridemia diurna tanto en hombres como en mujeres en una situación de vida normal.

7a.2. Efecto del consumo de alcohol sobre las concentraciones de PCRus y la trigliceridemia diurna

La PCR constituye un importante marcador de riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, principalmente enfermedad coronaria así como de aterosclerosis^{119,122}. Respecto a su asociación con las concentraciones de TG, varios estudios epidemiológicos han demostrado la relación entre la hipertrigliceridemia y las concentraciones de PCR, principalmente estudiado como un criterio dentro del síndrome metabólico, tanto en población general²⁰ como en pacientes con cardiopatía isquémica¹³⁶ o ancianos²⁸⁶.

En este trabajo se observa una marcada diferencia entre hombres y mujeres, de modo que en estas últimas sí existe una correlación entre las concentraciones de PCRus y las concentraciones en ayunas de TG aunque esta relación se pierde al analizar la trigliceridemia postprandial. En el caso de los hombres no encontramos asociación en ninguno de los casos. Estos datos son similares a los obtenidos en un

subestudio del Women's Health Study donde se observó que aquellas mujeres con hipertrigliceridemia presentaban concentraciones de PCR superiores frente a aquellas con concentraciones normales de TG plasmáticos en ayunas (2,56 mg/dl vs 1,11 mg/l, $p < 0,001$)⁵⁵. No obstante, no existen muchos trabajos publicados donde se estudie la asociación entre la PCRus y la trigliceridemia postprandial. En uno reciente de casos y controles realizado en un grupo de varones japoneses sanos, sí encuentran una relación entre las concentraciones de PCRus y la hipertrigliceridemia postprandial y en ayunas frente a normotriglicéridémicos²⁸⁷.

Respecto a la asociación entre PCRus y consumo de alcohol, de nuevo queda patente una diferencia entre hombres y mujeres en nuestro estudio. Mientras que en éstos no parece que presenten diferencias en concentraciones de PCRus según consumo de alcohol, en mujeres, aquellas que no consumen o con consumo bajo o moderado presentan cifras de PCRus similares e inferiores a las de aquellas con alto consumo de alcohol, observándose una cierta tendencia a una distribución en J. De hecho aquellas que presentan concentraciones más bajas de PCRus son las que tienen un consumo moderado de alcohol. Esta asociación es independiente de las concentraciones de TG en ayunas, de la edad, del hábito tabáquico y del IMC. Otros trabajos publicados ya han descrito la asociación en J entre el consumo de alcohol y los factores de inflamación, encontrándose entre ellos la PCR²¹. En un estudio epidemiológico realizado a partir de la cohorte que participó en el Pravastatin/ Inflammation CRP Evaluation Study también se ha asociado el consumo de moderadas cantidades de alcohol con concentraciones menores de PCR y con menores concentraciones de TG plasmáticos tanto en hombres como en mujeres, pero no encontraron diferencias entre el grupo de mayor consumo y los de consumo moderado⁵⁶, diferencias que sí encontramos en nuestro trabajo.

De todos modos al interpretar estos resultados debemos considerar las limitaciones del estudio. En primer lugar el tamaño muestral es pequeño, y la población analizada heterogénea. Por ello planteamos a partir de estos resultados el desarrollo de un ensayo clínico controlado en sujetos sanos donde se pudiesen minimizar los sesgos y los factores de confusión.

7a.3. Efecto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas después de una dieta rica en grasa sobre el perfil lipídico

En nuestro estudio no se observa un cambio significativo del perfil lipídico basal a pesar de la ingesta de una dieta hipercalórica rica en grasas. Esto se podría deber a distintos motivos. Uno de ellos, que no hubiera habido suficiente tiempo para originar un aumento del perfil lipídico, debido al desarrollo de mecanismos de compensación fisiológicos, como se citó en un trabajo publicado al respecto por nuestro grupo³⁸. Otra razón podría ser el número de casos estudiados, que se suponía suficiente para analizar cambios en parámetros en marcadores de inflamación y de oxidación, pero no para valorar cambios en el perfil lipídico.

En este modelo de consumo mantenido durante 5 días, no se ven modificaciones en el perfil lipídico tras el consumo de ninguna de las bebidas alcohólicas estudiadas a pesar de la ingestión de una dieta rica en grasas. Estos resultados son similares a los encontrados en el trabajo de van Tol et al⁵¹, donde el consumo de dosis moderadas de vino, cerveza o licores después de una comida, no provocaba diferencias en el perfil lipídico entre ellas, aunque en este caso la medición era del perfil lipídico postprandial y no del basal.

En el caso de la lipemia postprandial, se sabe que el consumo agudo de

alcohol es uno de los factores dietéticos que la incrementan, principalmente debido a la inducción de una mayor oxidación de las grasas y a una inhibición de la lipoproteína lipasa (LPL), mientras que las concentraciones basales permanecen dentro de la normalidad o aumentan en el caso del consumo elevado de alcohol. En el caso del consumo crónico, el alcohol favorece una mayor hidrólisis de los TG procedentes de las VLDL debido a una mayor actividad de la LPL secundaria a una adaptación al alcohol de su actividad a un consumo moderado de alcohol²⁸⁸, disminuyendo por tanto las concentraciones de TG, lo que justificaría que no hubiese cambios después del consumo crónico de bebidas alcohólicas en dosis moderadas¹⁶. Similares resultados se han obtenido en trabajos realizados en hombres sanos donde se les administraba vino tinto durante un tiempo similar (10 días), de forma que no se observan cambios en las concentraciones de colesterol total, HDL o triglicéridos²⁵⁸. Si se comparan nuestros resultados con un meta-análisis donde se analiza el efecto del consumo moderado de alcohol sobre el perfil lipídico se observa que el consumo moderado de alcohol no origina un incremento en las concentraciones de colesterol total, colesterol LDL, Lp(a) ni triglicéridos¹¹. Sin embargo esto no debe confundirse con los efectos deletéreos del consumo de elevadas cantidades de alcohol sobre el perfil lipídico, que causan principalmente una hipertrigliceridemia²⁸⁹.

Respecto a las concentraciones de HDL y apo A1 en nuestro trabajo no vemos un incremento tras el consumo de alcohol que sí se mencionan tanto en el metaanálisis descrito previamente¹¹ como en otros trabajos³ se asocian con el consumo de alcohol. El hecho de que el tamaño muestral del estudio sea pequeño puede ser una de las causas, así como la mezcla del efecto de una dieta rica en grasas saturadas con el del alcohol. Además es posible que el realizar una ingesta rica en grasas saturadas modifique la capacidad del alcohol para activar el transporte

reverso de colesterol, y por ello no vemos los cambios esperados en las concentraciones de HDL y apo A1. En estudios realizados en animales que expresan la CETP humana se observa que el consumo de ácidos grasos mono-insaturados en presencia de colesterol implica que no se produzca la expresión de genes relacionados con la estimulación de la CETP²⁹⁰.

7a.4. Efecto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas después de una dieta rica en grasa sobre los factores proinflamatorios

En este trabajo se pone de manifiesto que el consumo de una dieta rica en grasas durante 4 días origina una elevación de las concentraciones de la PCRus. Estudios experimentales han demostrado que las dietas ricas en grasas saturadas incrementan las concentraciones de PCRus tanto en modelos animales sanos²⁹¹ como en aquellos con alto riesgo vascular²⁹². Estudios de cohortes como el Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis²⁹³ pusieron de manifiesto la asociación existente entre el consumo de una dieta rica en grasas saturadas (aperitivos salados, carnes procesadas, aceites industriales, patatas fritas) con una mayor concentración de PCRus, no modificándose esta asociación tras ajuste por estilo de vida, características demográficas y circunferencia de cintura.

Sin embargo, los cambios en las concentraciones de TNF α e IL-6 no muestran diferencias significativas, si bien podemos observar en el caso de las concentraciones plasmáticas de TNF α cierta tendencia a aumentar su concentración.

Estos datos apoyan los resultados obtenidos en varios estudios en población sana, independientemente de la edad^{222,223}.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que el consumo de diferentes tipos

de alcohol acompañando a una dieta hiperlipemiente no tiene los mismos efectos sobre distintos factores pro-inflamatorios plasmáticos.

En el caso de la PCRus, el incremento originado por la dieta hiperlipémica se anula con la toma de cantidades moderadas de bebidas alcohólicas, con un efecto similar para las 4 bebidas alcohólicas analizadas, aunque sólo el consumo de vino tinto es capaz de disminuir las concentraciones de PCRus de forma significativa cuando se hace una valoración porcentual de los descensos. En un trabajo de intervención publicado por el grupo de Estruch et al.³², el consumo moderado de vino tinto disminuía las concentraciones de PCRus frente a la ginebra, que no las modificaba. Si se analizan estudios de cohortes, en el British Regional Heart Study, el consumo de vino tinto se asociaba inversamente con las concentraciones de PCRus, mientras que no encontraron asociación entre consumo de alcohol independientemente del tipo y las concentraciones de PCRus⁶². Se ha de considerar que este efecto es dosis dependiente, asociándose con el consumo moderado y no con el excesivo. En aquellos países donde el consumo mayoritario de alcohol es de vodka, se observó un aumento de las concentraciones de PCR y de la peroxidación lipídica en sujetos con consumo excesivo. Los ex alcohólicos son el grupo con mayores concentraciones de PCR frente a consumidores habituales y abstemios, con una distribución de la PCR en U según cantidad de alcohol consumida diaria. Este relación en U se pierde para el consumo de vodka donde a mayor consumo mayores son las concentraciones de PCR²⁹⁴.

En el caso de las concentraciones de TNF α e IL-6, el vino tinto muestra una tendencia a disminuir la elevación de estos factores originada por la dieta, y al analizar la disminución de forma porcentual, ésta resulta significativa. Sin embargo, en el caso del ron, brandy y vodka las concentraciones son similares a las originadas por la dieta,

no teniendo por tanto el efecto beneficioso que implica el consumo de vino tinto. Similares resultados se han obtenido en un trabajo publicado recientemente pero realizado en ese caso en sujetos con alto riesgo cardiovascular donde se ve que los fenoles que forman parte del vino tinto aumentan las concentraciones de IL-6 tras 4 semanas de consumo, cosa que no ocurría tras el consumo de ginebra²⁹⁵. Sin embargo en un meta-análisis realizado por Brien et al¹¹, no encuentran asociación entre el consumo de cantidades moderadas de alcohol (15 a 30 g/ día) de alcohol y las concentraciones de PCRus, IL-6 ni TNF α . Aunque el análisis lo realizaron para todo tipo de bebidas alcohólicas, posteriormente lo estratificaron sin encontrar diferencias significativas. No obstante se ha de considerar que en este meta-análisis se han analizado 13 estudios, con una gran heterogeneidad y con un tiempo de intervención muy variable (de 10 días a 12 semanas) y sin analizar la dieta ni el índice de masa corporal de los participantes. De hecho actualmente se plantea si cantidades moderadas de alcohol, en nuestro caso vino tinto, pueden tener un efecto beneficioso sobre el riesgo cardiovascular no solo a través de su efecto sobre el perfil lipídico si no a través de una mejoría de la sensibilidad a la insulina²³. En nuestro trabajo, el consumo de vino tinto disminuye el incremento de IL-6 y TNF α inducido por la dieta, pudiendo estar originado por una menor liberación de IL-6 por los adipocitos como postulan Pai et al.²³, y por una menor activación de los macrófagos a través de la inhibición de NF-KB como ha demostrado nuestro grupo en trabajos previos. En estos trabajos se observó que el consumo de una dieta rica en grasas originaba a las 9h una elevación en la expresión de NF-KB, en los monocitos plasmáticos, disminuyendo su activación tras el consumo moderado de vino tinto pero no de vodka³⁷. Posteriormente se creó un modelo de consumo de una dieta rica en grasas durante 5 días donde se comprobó que al añadir el consumo de bebidas alcohólicas ricas en polifenoles como

vino tinto o el ron se inhibía la expresión de NF- κ B en los monocitos plasmáticos³⁸.

En nuestro trabajo, por tanto, se encuentra un beneficio del consumo de vino tinto frente a otras bebidas alcohólicas sobre las concentraciones de factores proinflamatorios, resultado similar a los de otros estudios de intervención y estudios de cohortes. Si se revisa el estudio realizado en población americana, tanto en hombres como en mujeres tras unificar dos cohortes (la perteneciente al Health Professionals Follow Up Study (HPFS), compuesta por hombres y la de las Nurses Health Study II (NHS II), compuesta por mujeres, los participantes que consumían cantidades moderadas de alcohol presentaban concentraciones inferiores de IL-6, una menor expresión del receptor de TNF α y una relación en U entre el consumo de alcohol y las concentraciones de PCRus²³. Similares resultados se han encontrado en otros estudios de cohortes como el de Health, Aging And Body Composition Study donde también se relacionaba con un patrón en J entre el consumo de alcohol y las concentraciones de IL-6 y PCRus²⁴. En el caso de estudios de intervención cabe destacar los realizados con vino tinto, cava y ginebra por un grupo español. En estos trabajos, el consumo de vino tinto da lugar a una disminución de la concentración de PCRus frente al consumo de ginebra³² así como el consumo de cava a una menor concentración de IL-6 frente a ginebra también⁶⁴. Parece que este efecto beneficioso del consumo de vino tinto se debe a la modulación sobre los factores inflamatorios de los polifenoles del vino aunque el etanol también puede jugar un papel²⁹⁵. De hecho, si extrapolamos estos efectos al de los polifenoles incluidos en otros alimentos, como el aceite de oliva, es conocido que poseen una capacidad antiinflamatoria y antioxidante independientemente de su concentración en ácido oleico²⁹⁶. Parece que los fenoles del aceite de oliva son capaces de modular la expresión de genes relacionados con las rutas de señalización celular, con el estrés oxidativo²⁹⁷ y la aterosclerosis²⁹⁸.

Respecto a los resultados obtenidos con las concentraciones de PLA₂s, se puede apreciar que el patrón seguido es similar al de la PCRus aunque las diferencias no fueron significativas, quizá secundario al bajo número de participantes y a la gran dispersión de resultados.

El consumo de una dieta rica en grasas origina un aumento en las concentraciones de PLA₂s plasmática. Este incremento tiende a anularse tras el consumo de las bebidas alcohólicas, no existiendo claras diferencias entre ellas. Al analizar el cambio porcentual de PLA₂s se observa una disminución con todas las bebidas alcohólicas, excepto con el consumo de vodka aunque las diferencias no fueron significativas. Actualmente existe un escaso número de publicaciones sobre el efecto del consumo de alcohol sobre la PLA₂s. En un trabajo realizado por Beulens et al.²⁹⁹ en un grupo de 20 hombres, 11 con un índice de masa corporal dentro de la normalidad y 9 con sobrepeso, se observó que tras el consumo de dosis moderadas de cerveza durante 3 semanas tampoco existían modificaciones en la actividad de la lipoproteína asociada a la actividad de la PLA₂s frente a aquellos que consumieron cerveza sin alcohol. En este caso la dieta administrada era la habitual de los voluntarios²⁹⁹. En el caso del Nurses Health Study, la modificación de carbohidratos por proteínas y el consumo de alcohol se relacionaba con una menor actividad de la Lp-PLA₂, relacionándose con las concentraciones de VLDL-C³⁰⁰.

Nos planteamos que el consumo de alcohol anule el posible efecto de la dieta hiperlipémica, no encontrando diferencias, si bien, tampoco apreciamos una mayor actividad de la PLA₂s tras la ingesta sólo de dieta. Quizá eso se deba a que en nuestro trabajo no existen diferencias en las concentraciones de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL ni VLDL. De hecho en un trabajo realizado en voluntarios vegetarianos estos tenían menor actividad de PLA₂ frente a participantes omnívoros,

pero se relacionaba con una menor concentración de colesterol total y colesterol LDL⁶⁵. Otra posibilidad es que la PLA₂s se secreta en respuesta a citoquinas como la IL-6 o el TNF α , siendo la elevación de la PLA₂s posterior a la de otras citoquinas y similar en el tiempo a la de la PCRus, como se ha descrito en el caso de los pacientes con cardiopatía isquémica³⁰¹. Por ello es posible que en 5 días no seamos capaces de ver diferencias significativas en las concentraciones de PLA₂s, aunque si hemos objetivado una correlación con las de la PCRus en el caso del consumo de una dieta rica en grasas y el consumo de ron.

7a.5. Efecto del consumo de diferentes bebidas alcohólicas después de una dieta rica en grasa sobre la capacidad antioxidante

En nuestro estudio se objetiva que una dieta rica en grasas origina un aumento de la peroxidación lipídica y una clara disminución de la capacidad antioxidante total. Estos resultados son similares a los realizados en otros estudios de intervención como el de Leighton et al.⁶¹, donde a dos grupos de 21 hombres sanos se les administró una dieta rica en grasas o bien una dieta mediterránea durante 3 meses, añadiendo el segundo mes una dosis isocalórica de 240 ml de vino tinto al día. El consumo de una dieta rica en grasas origina un aumento del estrés oxidativo, mientras que la dieta mediterránea aumenta la capacidad antioxidante. El aumento del estrés oxidativo inducido por la dieta rica en grasas disminuye cuando se suplementa con vino tinto, incrementando la capacidad antioxidante. Además este aumento de la capacidad antioxidante originado por el consumo de vino tinto se ve en el grupo que consumió la dieta mediterránea. Similares resultados se obtuvieron en otro estudio de este mismo grupo pero ampliado a 42 hombres sanos³⁰².

El consumo de diferentes bebidas alcohólicas tiende a minimizar el aumento de la peroxidación lipídica originado por la dieta rica en grasas, sin existir diferencias significativas entre ellas. No obstante, si analizamos los cambios porcentuales, se objetiva que el consumo de vodka origina un gran aumento de la peroxidación lipídica, mayor incluso que el originado por la dieta sola en comparación con el brandy. Nuevamente vemos en este caso que el consumo de diferentes bebidas alcohólicas no tiene la misma repercusión sobre la peroxidación lipídica. El vodka carece de polifenoles, por lo que presenta menor acción antioxidante que otras bebidas alcohólicas. Esta podría ser la causa de que no descienda la peroxidación lipídica inducida por la dieta con la toma de vodka.

En un trabajo llevado a cabo en un modelo agudo de consumo en voluntarios sanos, a los 90 minutos el consumo de vino tinto consigue disminuir el estrés oxidativo frente al vodka, el cual tiene valores similares al de los controles⁶⁹.

El consumo de una dieta rica en grasas origina una disminución de la capacidad antioxidante total. El consumo de vino tinto, pero no las otras bebidas alcohólicas origina un incremento de la misma pese a la ingesta de una dieta rica en grasas.

El incremento de la capacidad antioxidante inducido por el consumo de vino tinto puede estar relacionado con el efecto de los polifenoles así como con cierto papel del incremento en ácido úrico. Los vinos y principalmente el vino tinto, independientemente de la variabilidad asociada a los diferentes tipos de vino existentes, presenta altas concentraciones de polifenoles como la rutina, el cis-resveratrol, la quercitrina y la quercetina³⁰³. En estudios in vitro el resveratrol se asocia con la inhibición de la oxidación de las LDL así como con una disminución de la agregación plaquetaria³⁰⁴. No obstante para extrapolar estos resultados al ser humano

hemos de considerar la concentración de polifenoles que se absorbe a nivel intestinal y el porcentaje que alcanza el torrente sanguíneo. De todos los polifenoles que contiene el vino tinto las isoflavonas, el ácido gálico, las catequinas, flavononas y la quercetina son los mejor absorbidos a nivel intestinal, presentando mayores concentraciones a nivel del plasma humano³⁰⁵. Aquellos sujetos con una mayor capacidad de absorción de polifenoles presentan menores concentraciones de factores de inflamación plasmático que aquellos con menor absorción, aunque la microflora bacteriana juega también un papel importante³⁰⁶. En cuanto al efecto de los polifenoles in vivo, principalmente las concentraciones de catequinas y de quercetina se asocian con una mayor capacidad antioxidante total, una disminución de la peroxidación lipídica y una menor agregabilidad plaquetaria^{306,307}

Es conocido que la hiperuricemia crónica constituye un marcador de riesgo cardiovascular y de aparición de síndrome metabólico, sin embargo, el aumento agudo inducido por el consumo de vino tinto constituye un antioxidante contra el estrés oxidativo inducido por la hiperoxia secundario al consumo de alcohol³⁰⁸. En otros trabajos publicados se ha demostrado la relación entre la capacidad antioxidante y el aumento de las concentraciones de urato inducidas por el vino tinto³⁰⁹ confirmándose posteriormente que hasta un 50% de la capacidad antioxidante del vino se debe a un incremento del ácido úrico³⁵. Desafortunadamente, en nuestro estudio no se midió uricemia.

En otros trabajos publicados se ha demostrado que el consumo de vino tinto aumenta la capacidad antioxidante pero en modelos de consumo agudo. En un trabajo realizado en voluntarios sanos el consumo de vino tinto aumentaba la capacidad antioxidante tanto in vitro como in vivo en comparación con el consumo de vino blanco, alcanzando concentraciones similares a las de la ingesta de antioxidantes como la

vitamina C³⁴. En un trabajo italiano, el consumo de vino, en este caso tanto tinto como blanco incrementaba las concentraciones de la capacidad antioxidante a la hora y a las 2 horas del consumo en voluntarios sanos, sin hacer referencia al tipo de dieta²⁷⁵. En el estudio de Krnic et al.⁶⁹, ya citado previamente, se obtienen resultados similares a las 2 horas, en beneficio del consumo de vino tinto frente a vodka y a un grupo control.

Nuestro trabajo aporta que este efecto beneficioso se mantiene incluso tras la ingesta de una dieta hiperlipémica, tras 5 días de consumo y comparándolo con otras bebidas alcohólicas. De hecho, si analizamos los cambios porcentuales de la capacidad antioxidante, el vino tinto origina un incremento que no se consigue con el ron, brandy o vodka.

7a.6. Limitaciones del estudio en voluntarios sanos

Dentro de las limitaciones de nuestro estudio se encuentra que éste se ha desarrollado sobre una población pequeña de sujetos sanos, por dificultades de reclutamiento y de manejo de las muestras biológicas. Por ello es necesario realizar estudios sobre una población más amplia que apoyen estos resultados. Debido a que la muestra era pequeña, no se han realizado comparaciones entre sexos, pese a que es posible que hombres y mujeres respondan de forma diferente al consumo moderado de alcohol. Otro factor importante es la cantidad de consumo de alcohol. El consumo de alcohol presenta una curva dosis – respuesta en forma de J sobre los factores inflamatorios así como sobre el riesgo cardiovascular^{23,24}. En nuestro trabajo las dosis de alcohol son moderadas, que son las que se vinculan con una disminución del riesgo cardiovascular. El consumo de dosis superiores se asocia con un mayor

riesgo cardiovascular y otros efectos deletéreos derivados del consumo de alcohol.

7b.Discussion

Atherosclerosis is the leading cause of death worldwide (WHO 2011)²⁸⁰. Adopting healthy habits such as eating a diet low in saturated fat, avoiding smoking habits and doing daily physical exercise, constitute the first step to control and prevent the development of cardiovascular diseases. Alcohol consumption is an important part of the diet because of its deleterious as well as beneficial effects on the body, depending on the amount and pattern of consumption. Similarly it is argued that the type of alcohol can be a factor in the effects of alcohol consumption on cardiovascular diseases and atherosclerosis.

7b.1. Effect of alcohol consumption on diurnal triglyceridemia.

Since non-fasting TG independently predict the risk for cardiovascular disease and are potentially an even better predictor than fasting TG^{7,10,46}, it is important to investigate the impact of lifestyle factors such as alcohol consumption on diurnal triglyceridemia in a real not controlled situation.

Our study suggests that intake of low concentrations of alcohol is associated with reduced diurnal triglyceridemia in men, but if we consider this part of results as a whole it seems that alcohol consumption does not contribute significantly to the diurnal triglyceridemia in daily life without intervention. These results are in line with a recent meta-analysis and other studies on alcohol, suggesting that alcohol has no more impact on TG concentrations¹¹⁻¹⁴.

In experimental studies it has been observed that alcohol intake affects the postprandial metabolism of lipoproteins. Alcohol have been shown to stimulate the secretion of very low density lipoproteins, to reduce lipoprotein lipase activity, to stimulate adipose tissue lipolysis resulting in elevated hepatic delivery of free fatty

acids and to impair the oxidation of fatty acids in the mitochondria¹⁶. Alcohol consumption before the meal is associated with a decrease in the hydrolysis of chylomicrons after an oral fat overload²⁸¹. However, regular alcohol consumption is associated with an increased hydrolysis of the TG from VLDL particles by the action of LPL that attenuates TG concentrations^{16,282,283}. If we analyse the impact of alcohol consumption on TG concentrations, increased postprandial TG after dinner have also been described after three weeks of high alcohol intake (40g of alcohol daily)⁵¹. These results are comparable with our observations, because a trend for increased cTG in males with moderate and high alcohol intake was observed after dinner and at bedtime. A similar pattern was observed in females with high alcohol intake, but the group was too small (N=5) to achieve statistical significance. It seems likely that alcohol consumption caused the elevated cTG since alcohol is most often consumed at the dinner time⁴³. Therefore alcohol consumption in women is more associated with fasting TG concentrations compared to men. One possible explanation for these gender differences may be related to different alcohol -metabolizing enzyme activity⁵² and the effects of estrogens on TG metabolism⁵³. However, it should be noted that only 5 women in our study reported high alcohol consumption above 30g/day. Women usually drink less alcohol than men⁴ and women tend to underreport their alcohol intake compared to men⁵⁴. This should be considered a potential information bias in our study. However, the number of females included in the other groups was sufficient.

Mild to moderate consumption of alcohol is associated with a decreased risk of cardiovascular diseases, due to an increase in HDL cholesterol, apoAI and a decrease in fibrinogen concentrations, but this "protective" effect of alcohol consumption disappears with a high alcohol consumption^{11,240}. In our work we found a decrease in cTG concentrations in subjects with low alcohol consumption, finding

gender differences on time-of-day effects. In fact, cTG declines in the fasting state and before meals in women but after dinner and at bedtime in males. In addition, the Δ ABC-cTG decreases in men with low alcohol intake, but only after correction by BMI and smoking habits. Potentially these results serve to demonstrate that mild to moderate consumption cardiovascular may decrease cardiovascular risk because hypertriglyceridemia is related to atherosclerotic process^{284,285}.

Theoretically, it is possible that a bias was introduced and that some of the subjects altered their drinking habits during the study despite the fact that we asked all participants to adhere to their regular diet and drinking habits. Another limitation of the present study is the possibility of inaccuracy in the self-reported amount of alcohol intake, due to the fact that we used questionnaires and diaries⁵⁴. However, all answered questionnaires were evaluated individually, which may have improved the validity. Furthermore, subjects were in a free-living, non-controlled situation with different drinking habits and meals which could all affect lipoprotein metabolism differently^{38,57}. The majority of subjects consumed wine and beer and therefore our results cannot be extrapolated to other beverages. The impact of different beverages on TG metabolism remains uncertain, but there is some evidence that red wine increases TG less compared to other type of alcoholic drinks⁴. Moreover, it was not possible to analyse the effect of different drinking patterns on diurnal triglyceridemia with our observational study design.

In conclusion, low intake of alcohol was associated with decreased diurnal triglyceridemia in males, which was most pronounced during the evening. In contrast to males, low alcohol intake in females was associated with decreased TG in the fasting state and before lunch.

7b.2. Effect of alcohol consumption on concentrations of usCRP and diurnal triglyceridemia.

CRP is an important marker of risk for cardiovascular disease, especially coronary artery disease as well as atherosclerosis^{119,122}. Regarding its association with TG concentrations, several epidemiological studies have shown the relationship between hypertriglyceridemia and CRP, mainly studied in people with the metabolic syndrome within the general population²⁰, as well as within patients with coronary heart disease¹³⁶ and with old ages²⁸⁶.

In our study there is a marked gender difference, so that a correlation between the concentrations of usCRP and fasting TG concentrations was found in women although this relationship was lost when we analysed postprandial triglyceridemia. We did not find association in any of the cases in men. These data are similar to those obtained in a sub-analysis of the Women's Health Study where they found that women with hypertriglyceridemia had higher CRP levels than those with normal fasting plasma TG (2.56 mg/l vs 1.11 mg/l, $p < 0.001$)⁵⁵. However, there are few published papers examining the association between usCRP and postprandial triglyceridemia. In one recent case-control study developed in a group of healthy Japanese men, they found a relationship between usCRP concentrations, postprandial hypertriglyceridemia and fasting triglycerides²⁸⁷.

Regarding the association between usCRP and alcohol consumption, again it is patent a difference between men and women in our study. While men do not seem to differ in usCRP concentrations according to alcohol consumption, nondrinker and light to moderate drinking women have lower usCRP concentrations compared to high drinkers, showing a tendency to a distribution in J. Indeed, those women having the

lowest usCRP concentrations are those who have moderate consumption of alcohol. This association is independent of the fasting TG concentrations, age, smoking status and BMI. Other published papers have described the association in J between alcohol consumption and inflammatory factors, such as usCRP²¹. In an epidemiological study coming from the cohort who participated in the Pravastatin/ Inflammation CRP Evaluation Study, moderate alcohol consumption was associated with lower concentrations of CRP and lower plasma TG concentrations in both men and women, but this study did not find any difference between high and moderate consumption group⁵⁶, differences that were found in our study.

Anyway we must consider the limitations of the study when we evaluate the results. The sample size is small and the study population is heterogeneous. This is the reason why we propose from these results the development of a controlled clinical trial in healthy subjects that could minimize biases and confounding factors.

7b.3. Effect of consumption of different alcoholic beverages after a fat enriched diet on lipid profile.

In our study we did not observe a significant change in the fasting lipid profile, neither fasting triglycerides despite eating a saturated fat enriched diet. This could be due to various reasons. One of them, could be that there was not enough time to cause an increase in the lipid profile, due to the development of physiological compensation mechanisms, as quoted in a paper published by our group³⁸. The number of cases studied could be another reason. This is supposed to be sufficient to analyse changes in inflammatory and oxidation markers parameters, but not to assess changes in the lipid profile.

In this model of consumption maintained for 5 days, there are not changes in lipid profile after consumption of any of the alcoholic drinks studied despite the ingestion of a high fat diet. These results are similar to those found in the work of van Tol et al⁵¹, where consumption of moderate doses of wine, beer or spirits after a meal, did not cause differences in lipid profile between them, although in this case they measured postprandial but not fasting lipid profile.

In the case of postprandial lipemia, acute alcohol intake is one of the dietary factors that increases it, mainly due to the induction of increased fat oxidation and the inhibition of lipoprotein lipase (LPL), while basal LPL concentrations remain within the normal range or increased in the case of high alcohol consumption. It is known that acute alcohol intake

Nevertheless chronic alcohol consumption promotes greater hydrolysis of TG from VLDL due to an increased LPL activity secondary to an adaptation of its activity to a regular intake of alcohol²⁸⁸, decreasing the concentrations of TG. This process would justify that there is not any change after moderate chronic consumption of beverages on triglyceridemia¹⁶. Similar results were obtained in a study conducted in healthy men where after red wine intake for 10 days, no changes in total cholesterol, HDL or TG concentrations were seen²⁵⁸. If we compare our results with a meta-analysis which analyses the effect of moderate alcohol consumption on lipid profile it showed that moderate alcohol consumption did not rise total cholesterol, LDL, Lp (a) or triglycerides concentrations¹¹. However this should not be confused with the deleterious effects of consumption of large quantities of alcohol on the lipid profile, which causes a hypertriglyceridemia²⁸⁹.

Concerning HDL and apo A1 concentrations we did not see an increase after

alcohol consumption as we expected. In fact, this association has been described in the meta-analysis cited before¹¹ as well as in other studies³. The fact that the sample size of our study is small can be one of the causes. We should also consider the mixed effect of a diet rich in saturated fats and alcohol together. Studies realized in animals that express human CETP showed that the consumption of monounsaturated fatty acids in the presence of cholesterol decreased the expression of genes involved in CETP activity²⁹⁰. It is possible that a saturated fat enriched diet may affect alcohol's capacity to activate reverse cholesterol transport, and perhaps this is the reason why we do not see the expected changes in HDL and apo A1 concentrations.

7b.4. Effect of different alcoholic beverages intake after a fat enriched diet on inflammatory factors.

This study shows that consuming a fat enriched diet for 4 days results in a increase of usCRP concentrations. Experimental studies have shown that diets rich in saturated fat increase usCRP concentrations in both healthy animal models²⁹¹ as in those conducted in animals with high cardiovascular risk²⁹². Cohort studies such as the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis²⁹³ showed the association between the consumption of a diet rich in saturated fat (salty snacks, processed meat, industrial oils, chips) with a higher concentration of usCRP, not modified after adjustment for waist circumference, demographic and lifestyle characteristics.

However, changes in TNF- α and IL-6 concentrations did not show significant differences after a fat enriched diet, but we can observe in the case of plasma concentrations of TNF- α a tendency to increase their concentration.

These data support the results of several population studies developed in healthy population^{222,223}.

Our study has shown that the consumption of different types of alcohol with a fat enriched diet does not have the same effect on pro-inflammatory factors.

In the case of usCRP, the increase originated by the lipid-rich diet is cancelled by taking moderate amounts of alcoholic beverages, with an similar effect for all analyzed drinks, although only red wine consumption is able to lower usCRP concentrations significantly. In an intervention study published by Estruch et al³², moderate red wine consumption decreased usCRP concentrations compared to gin intake, whereas gin did not modify it. If cohort studies are analysed, in the British Regional Heart Study, the red wine consumption was inversely associated with usCRP concentrations, while no association between alcohol consumption regardless of the type and concentrations of usCRP was found.⁶² This effect may be considered dose dependent and it is associated with moderate consumption but not with excessive alcohol intake. In those countries where the major intake of alcohol is vodka, there was an increase of CRP and lipid peroxidation in patients with high consumption. Former alcoholics were the group with higher CRP concentrations compared to regular users and abstainers with an U-distribution of CRP, according to quantity of alcohol consumed. This U shaped distribution was lost for vodka consumers, where the higher the vodka intake, the higher the concentrations of CRP were found²⁹⁴. In case of TNF- α and IL-6 concentrations, red wine intake shows a tendency to decrease the elevation induced by the diet on these inflammatory factors. However, TNF- α and IL-6 concentrations after rum, brandy or vodka intake are similar to those concentrations after only the fat enriched diet. In fact, the beneficial effect showed by red wine intake on inflammation was not reach by these beverages. A recent study developed in high

cardiovascular risk subjects found similar results. They showed that red wine but not gin intake increased IL-6 concentrations after four weeks of consumption²⁹⁵.

However a recent metanalysis¹¹, did not find any association between moderate alcohol consumption (15 to 30 g/ day) and usCRP, IL-6 and TNF α concentrations. Although the meta-analysis was performed for all types of beverages, further analysis stratifying the sample according to different alcohol beverages did not achieve significative differences. Nevertheless we may consider that only 13 studies were analysed, with a large heterogeneity and a variable intervention time (from 10 days to 12 weeks) without a correct analysis of diet and BMI of participants. In fact, nowadays it is considered that moderate amounts of red wine intake improves cardiovascular risk due to a beneficial effect not only in lipid profile, but also to an increase in sensitivity to insuline²³. In our study, red wine intake decreases IL-6 and TNF α concentrations, induced by the fat enriched diet which may be caused by a lower release of IL-6 by adipocytes²³ and a lower macrophage activation induced by NF-KB inhibition. In a previous study a fat enriched diet increased the NF-KB expression in plasmatic monocytes, lowering its activation after red wine but not vodka intake³⁷. These initial results led to an analysis within a chronic model of consumption, where after 5 days of red wine intake or rum plus a fat enriched diet NF-KB expression of plasmatic monocytes was inhibited³⁸.

In our study, therefore, there is a benefit of red wine consumption compared to spirits on proinflammatory factor concentrations. If we review an American population study after unifying two cohorts (belonging to Health Professionals Follow Up Study (HPFS), composed by men and the Nurses Health Study II (NHS II), composed by women), participants who consumed moderate quantities of alcohol had lower concentrations of IL-6, lower TNF receptor expression and an U-

shaped relationship between alcohol consumption and usCRP concentrations²³. Similar results have been found in other cohort studies such as the Health, Aging And Body Composition Study where also alcohol consumption and IL-6 and usCRP concentrations are associated following to a J pattern distribution²⁴. In case of intervention studies, those conducted by a Spanish group highlighted that the consumption of red wine but not vodka resulted in a decreased concentration of usCRP³², as well as the sparkling wine but not vodka intake decreased IL-6 concentrations⁶⁴. It seems that this beneficial effect of red wine consumption is due to the modulation of inflammatory factors induced by red wine polyphenols although ethanol can also play a role²⁹⁵. In fact, if we extrapolate the effects of polyphenols included in other foods, such as olive oil, it has been shown that they possess an anti-inflammatory and an antioxidant capacity regardless of its oleic acid concentrations²⁹⁶. It seems that phenols from olive oil can modulate the expression of genes involved in cellular signalling routes, oxidative stress²⁹⁷ and atherosclerosis²⁹⁸. Maybe phenols from red wine had the same properties.

Concerning sPLA₂ concentrations, we found that the effect of the different types of alcohol intake on sPLA₂ concentrations has a similar pattern compared to usCRP concentrations. However significant differences were not reached in this case, perhaps due to the low number of volunteers or the scattered results.

Consuming a high-fat diet causes an increase in the sPLA₂ concentrations. This increase tends to be cancelled after the alcohol consumption, with no clear differences between the different beverages. When we analyse the effect on sPLA₂ concentrations there is a decrease after the intake of any of the studied alcoholic beverages, except to the vodka consumption although the differences are not

significant. Currently there is a limited number of publications about the effect of alcohol consumption on the sPLA₂. In a study conducted by Beulens et al.²⁹⁹, developed in a group of 20 men, 11 with a normal BMI and 9 overweighted, no changes were observed in the activity of the lipoprotein-associated sPLA₂ activity between those who consumed beer and non-alcoholic beer for 3 weeks. In this study the volunteers were told to maintain their usual diet²⁹⁹. In the case of the Nurses Health Study, the substitution of carbohydrates with protein and the alcohol consumption was associated with lower Lp-PLA₂ activity, interacting with the concentrations of VLDL-C³⁰⁰.

We propose that alcohol consumption may override the effect of an hyperlipidemic diet, although we did not appreciate higher sPLA₂ concentrations after ingestion of a fat enriched diet only. May be that is because in our study no differences in the concentrations of total cholesterol, LDL, HDL and VLDL were found. In fact, in a study conducted in vegetarian volunteers they had lower sPLA₂ concentrations against omnivores participants, but it was associated with a lower concentration of total cholesterol and LDL⁶⁵. Another possibility is that sPLA₂ is secreted in response to cytokines such as IL-6 and TNF α , being the plasmatic sPLA₂ increase after other cytokines release and at similar time of usCRP, as described in the case of patients with coronary heart disease³⁰¹. Perhaps it could be a reason explaining why we were not be able to see significant differences in the concentrations of sPLA₂ after five days, although we have observed a correlation to usCRP in the case of consumption of a fat enriched diet consumed in addition to rum.

7b.5. Effect of different alcoholic beverages intake after a fat enriched diet on antioxidant capacity.

Our study shows that a fat enriched diet causes a increased lipid peroxidation and a clear reduction in the total antioxidant capacity. These results are similar to those found in other intervention studies. Leighton et al.⁶¹, evaluated two groups of 21 healthy men who received a high fat diet or a Mediterranean diet for 3 months, adding in the second month an isocaloric dose of 240 ml of red wine a day. Consuming a high-fat diet leded to an increased oxidative stress, while the Mediterranean diet increased the antioxidant capacity. The increase of oxidative stress induced by high fat diet decreased when it was supplemented with red wine, Furthermore this increase of antioxidant capacity caused by the consumption of red wine is seen in the group who consumed the Mediterranean diet. Similar results were obtained in another study of this same group but expanded to 42 healthy men³⁰².

The consumption of different alcoholic beverages tends to minimize the increase on lipid peroxidation caused by high-fat diet, without significant differences between them. However, if we look at the percentage changes, vodka consumption results in a large increase on lipid peroxidation even higher than the one caused by the diet compared with brandy. Again we see in this case that the consumption of different alcoholic beverages has not the same effect on lipid peroxidation. Vodka lacks polyphenols, so it has lower antioxidant properties than other alcoholic beverages. This may be the reason explaining the lack of decrease of diet induced-lipid peroxidation after the vodka intake. Similar results were found in a study carried out in an acute model of alcohol consumption in healthy volunteers, where after 90 minutes of the consumption of red wine there was a decreased oxidative stress in comparison to

vodka intake⁶⁹.

Fat enriched diet causes a decrease in the total antioxidant capacity. The consumption of red wine, but not the other alcoholic drinks causes an increase in its concentrations despite the ingestion of a diet rich in fats. The increase in antioxidant capacity induced by the consumption of red wine may be related to the effect of polyphenols as well as a role of higher concentrations of uric acid. The wines and specially red wine, irrespective of the variability associated with different types of wine, presents high levels of polyphenols as routine, cisresveratrol, quercitrin and quercetin³⁰³.

In in vitro studies, resveratrol is associated with the inhibition of LDL oxidation as well as with a decrease in platelet aggregation³⁰⁴. However if we want to extrapolate these results to humans, we have to consider the concentration of polyphenols that is absorbed in the intestine and the percentage of this polyphenols that reaches the bloodstream. Isoflavones, the gallic acid, the catechins, flavanones and quercetin are the best absorbed red wine polyphenols in the intestine, reaching the highest concentrations in human plasma³⁰⁵.

Those subjects with a greater absorption capacity of polyphenols have lower concentrations of inflammation factors than those with lower plasma absorption, although intestinal bacterial micro-flora plays an important role³⁰⁶. Regarding the effect of the polyphenols in vivo, particularly the concentrations of catechins and quercetin, they are associated with a higher total antioxidant capacity, a lower lipid peroxidation and a lower platelet aggregability^{306,307}.

It is known that chronic hyperuricemia is a cardiovascular risk marker and predictor of metabolic syndrome. However, the increase of uric acid induced by acute consumption of red wine is an antioxidant against hyperoxia-induced oxidative stress

secondary to alcohol consumption³⁰⁸. Other published studies have shown the relationship between the antioxidant capacity and the increased concentrations of urate induced by the red wine³⁰⁹, supporting that 50% of the antioxidant capacity of red wine is associated to uric acid concentrations³⁵. Unfortunately, we did not measure uricemia in our study.

Consumption of red wine increases the antioxidant capacity in acute consumption models. In a study conducted in healthy volunteers, wine consumption increased antioxidant capacity both in vitro and in vivo, compared with white wine consumption, reaching similar concentrations than other antioxidants such as vitamin C³⁴. In a Italian study, red and white wine intake increased antioxidant capacity after one and two hours of consumption in healthy volunteers, without reference to the type of diet²⁷⁵. Similar results were obtained in other study after two hours of red wine consumption but not after vodka intake⁶⁹.

Our study contributes to clarify that the beneficial effect of moderate red wine consumption remains even after a 5 days hyperlipidemic diet intake, when compared to other alcoholic beverages. In fact, red wine intake decreases inflammation and oxidative stress, benefits that are not achieved with rum, brandy or vodka intake.

7b.6. Limitations of the study developed in healthy volunteers.

The main limitation of our study is that it has been developed on a small population of healthy subjects, due to difficulties in recruitment and management of biological samples. Therefore it is necessary to desing further studies on a larger population to support these results. Because the sample was small, no comparisons were made between sexes, although

it is possible that men and women respond differently to moderate alcohol consumption. Another important factor is the amount of alcohol consumption. Alcohol has a J dose-response curve on inflammatory factors as well as the cardiovascular risk^{23,24}. In our study alcohol doses are moderate, which are those that are associated with decreased cardiovascular risk. Higher consumption is associated with an increased cardiovascular risk and other deleterious effects derive from the alcohol consumption.

8a. Conclusiones

1. El efecto del consumo de alcohol sobre la trigliceridemia diurna y en ayunas presentó diferencias entre mujeres y hombres. En condiciones de vida habitual, un bajo consumo de alcohol se asociaba con reducción de la trigliceridemia diurna cuando se ajustaba por la edad, el índice de masa corporal y el consumo de tabaco en los hombres, pero no en las mujeres. Sin embargo, y por el contrario, en las mismas condiciones, un bajo consumo de alcohol se asociaba con menor trigliceridemia en ayunas en las mujeres, no así en los hombres.
2. También se mantuvieron diferencias de género en la asociación entre consumo de alcohol, la trigliceridemia y la inflamación en personas en condiciones de vida habitual. Un alto consumo de alcohol se asocia con mayor concentración de PCRus en mujeres, hallándose una correlación positiva entre las concentraciones de triglicéridos en ayunas y el consumo de alcohol con las concentraciones basales de PCRus persistiendo tras ajuste por edad, índice de masa corporal y hábito tabáquico de forma independiente en las mujeres pero no en los hombres.
3. El consumo de una dieta rica en grasas durante 5 días aumentó las concentraciones de PCRus, pero no las concentraciones de $TNF\alpha$, IL-6 o PLA₂s en una población joven y sana.
4. La dieta rica en grasas en esa población aumentó la peroxidación lipídica y disminuyó la capacidad antioxidante total.

5. El consumo de bebidas alcohólicas pobres en polifenoles o carentes de ellos, tal como ron, brandy o vodka no modificó los cambios inducidos por la dieta rica en grasa sobre PCRus, TNF α , IL-6 o PLA₂s ni tuvo efecto sobre los marcadores de oxidación, aunque parecía que había una tendencia a aumentar la concentración de la peroxidación lipídica plasmática tras el consumo de vodka.

6. El consumo de vino tinto se asoció con un descenso en el cambios porcentuales de las concentraciones de PCRus, TNF α e IL-6 provocados por una dieta rica en grasas. Sin embargo, los cambios en las concentraciones de PLA₂S no se vieron modificados de forma significativa. Tras el consumo de vino tinto y una dieta rica en grasas, la capacidad antioxidante total aumentó en relación con los valores previos a dicho consumo, pero también con respecto al consumo de la misma dieta rica en grasas acompañada bien fuera por ron, brandy o por vodka. Esto apoya la idea de que las bebidas ricas en polifenoles pueden jugar un papel relevante en la inflamación y en la oxidación y por tanto también en la prevención de la aterosclerosis.

8b. Conclusions

1. Gender differences were found in the relation between alcohol intake and fasting and diurnal triglyceridemia. Low alcohol intake was associated with decreased diurnal triglyceridemia in males but not in females after adjustment for age, body mass index and smoking in a free-living situation. However low fasting triglyceridemia was related to low alcohol intake in females.
2. Again gender differences exist in the association between alcohol intake, triglyceridemia and inflammation. High alcohol intake is associated with higher usCRP levels in females and a positive correlation between fasting triglyceridemia and usCRP was found in women but not in men in a free-living situation. The association between usCRP, fasting triglyceridemia and alcohol intake remained after adjustment for age, smoking habits and body mass index in women.
3. After 5 days of a controlled fat enriched diet, usCRP concentrations increased but not the concentrations of $\text{TNF}\alpha$, IL-6 nor sPLA₂ in young healthy volunteers.
4. The fat enriched diet increased the plasmatic lipid peroxidation and decreased total antioxidant capacity under the same circumstances.
5. Low or no polyphenol containing beverages intake, as rum, brandy or vodka, did not modify the usCRP, $\text{TNF}\alpha$, IL-6 nor the sPLA₂ concentrations induced by fat enriched diet, neither an effect was found on oxidation markers although it seemed a tend to increase lipid peroxidation by vodka intake.

6. Red wine intake was associated with decreased mean change of concentrations of usCRP, $\text{TNF}\alpha$ and IL-6 induced by fat enriched diet, nevertheless sPLA₂ concentrations were not modified significantly. After red wine intake and a fat enriched diet, total antioxidant capacity was increased compared to control period, rum, brandy and vodka intake. This supports the idea that high polyphenol beverages can modulate inflammation and oxidation, thus potentially can play a role in the prevention of atherosclerosis.

9. Bibliografía

1. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29-38.
2. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-6.
3. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 1999;319:1523-8.
4. Foerster M, Marques-Vidal P, Gmel G, Daeppen JB, Cornuz J, Hayoz D, et al. Alcohol drinking and cardiovascular risk in a population with high mean alcohol consumption. *Am J Cardiol* 2009;103:361-8.
5. Whitfield JB, Heath AC, Madden PA, Pergadia ML, Montgomery GW, Martin NG. Metabolic and Biochemical Effects of Low-to-Moderate Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 2012.
6. Lehto S, Ronnema T, Haffner SM, Pyorala K, Kallio V, Laakso M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. *Diabetes* 1997;46:1354-9.
7. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007;298:299-308.
8. O'Keefe JH, Bybee KA, Lavie CJ. Alcohol and cardiovascular health: the razor-sharp double-edged sword. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1009-14.
9. Ruidavets JB, Ducimetiere P, Evans A, Montaye M, Haas B, Bingham A, et al. Patterns of alcohol consumption and ischaemic heart disease in culturally divergent countries: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *BMJ* 2010;341:c6077.
10. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007;115:450-8.
11. Brien SE, Ronksley PE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *BMJ* 2011;342:d636.
12. Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL, Goldhaber SZ, Rosner B, VanDenburgh M, et al. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*

1993;329:1829-34.

13. Marques-Vidal P, Cambou JP, Nicaud V, Luc G, Evans A, Arveiler D, et al. Cardiovascular risk factors and alcohol consumption in France and Northern Ireland. *Atherosclerosis* 1995;115:225-32.

14. Savolainen MJ, Hannuksela M, Seppanen S, Kervinen K, Kesaniemi YA. Increased high-density lipoprotein cholesterol concentration in alcoholics is related to low cholesteryl ester transfer protein activity. *Eur J Clin Invest* 1990;20:593-9.

15. Sharrett AR, Heiss G, Chambless LE, Boerwinkle E, Coady SA, Folsom AR, et al. Metabolic and lifestyle determinants of postprandial lipemia differ from those of fasting triglycerides: The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:275-81.

16. Baraona E, Lieber CS. Alcohol and lipids. *Recent Dev Alcohol* 1998;14:97-134.

17. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G, et al. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:3071-8.

18. Chambers JC, Eda S, Bassett P, Karim Y, Thompson SG, Gallimore JR, et al. C-reactive protein, insulin resistance, central obesity, and coronary heart disease risk in Indian Asians from the United Kingdom compared with European whites. *Circulation* 2001;104:145-50.

19. Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1971-7.

20. Frohlich M, Imhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* 2000;23:1835-9.

21. Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001;357:763-7.

22. Lassaletta AD, Chu LM, Elmadhun NY, Burgess TA, Feng J, Robich MP, et al. Cardioprotective effects of red wine and vodka in a model of endothelial dysfunction. *J Surg Res* 2012.

23. Pai JK, Hankinson SE, Thadhani R, Rifai N, Pischon T, Rimm EB. Moderate alcohol consumption and lower levels of inflammatory markers in US men and women. *Atherosclerosis* 2006;186:113-20.

24. Volpato S, Pahor M, Ferrucci L, Simonsick EM, Guralnik JM, Kritchevsky SB, et al. Relationship of alcohol intake with inflammatory markers and plasminogen activator

inhibitor-1 in well-functioning older adults: the Health, Aging, and Body Composition study. *Circulation* 2004;109:607-12.

25. Wong CK, White HD. Effects of dietary factors on lipoprotein-associated phospholipase A(2) (Lp-PLA (2)). *Curr Atheroscler Rep* 2011;13:461-6.

26. Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, et al. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med* 2000;133:411-9.

27. Imhof A, Woodward M, Doering A, Helbecque N, Loewel H, Amouyel P, et al. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *Eur Heart J* 2004;25:2092-100.

28. Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997;257:59-84.

29. Videla LA, Fernandez V, Valenzuela A. Age-dependent changes in rat liver lipid peroxidation and glutathione content induced by acute ethanol ingestion. *Cell Biochem Funct* 1987;5:273-80.

30. Yoshida R, Shioji I, Kishida A, Ogawa Y. Moderate alcohol consumption reduces urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by inducing of uric acid. *Ind Health* 2001;39:322-9.

31. Vasdev S, Gill V, Singal PK. Beneficial effect of low ethanol intake on the cardiovascular system: possible biochemical mechanisms. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2:263-76.

32. Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antunez E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, et al. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis* 2004;175:117-23.

33. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995;61:549-54.

34. Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem* 1995;41:32-5.

35. Maxwell S, Thorpe G. Impact of red wine on antioxidant status in vivo. *Eur Heart J* 2000;21:1482-3.

36. Covas MI, Gambert P, Fito M, de la Torre R. Wine and oxidative stress: up-to-

date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Atherosclerosis* 2010;208:297-304.

37. Blanco-Colio LM, Valderrama M, Alvarez-Sala LA, Bustos C, Ortego M, Hernandez-Presa MA, et al. Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 2000;102:1020-6.

38. Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, Alvarez-Sala LA, Castilla M, Bustamante A, et al. Ethanol beverages containing polyphenols decrease nuclear factor kappa-B activation in mononuclear cells and circulating MCP-1 concentrations in healthy volunteers during a fat-enriched diet. *Atherosclerosis* 2007;192:335-41.

39. Castro Cabezas M, Halkes CJ, Meijssen S, van Oostrom AJ, Erkelens DW. Diurnal triglyceride profiles: a novel approach to study triglyceride changes. *Atherosclerosis* 2001;155:219-28.

40. Halkes CJ, Castro Cabezas M, van Wijk JP, Erkelens DW. Gender differences in diurnal triglyceridemia in lean and overweight subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1767-74.

41. Delawi D, Meijssen S, Castro Cabezas M. Intra-individual variations of fasting plasma lipids, apolipoproteins and postprandial lipemia in familial combined hyperlipidemia compared to controls. *Clin Chim Acta* 2003;328:139-45.

42. van Oostrom AJ, Castro Cabezas M, Ribalta J, Masana L, Twickler TB, Remijnse TA, et al. Diurnal triglyceride profiles in healthy normolipidemic male subjects are associated to insulin sensitivity, body composition and diet. *Eur J Clin Invest* 2000;30:964-71.

43. van Wijk JP, Cabezas MC, Halkes CJ, Erkelens DW. Effects of different nutrient intakes on daytime triacylglycerolemia in healthy, normolipemic, free-living men. *Am J Clin Nutr* 2001;74:171-8.

44. van Wijk JP, van Oostrom AJ, Castro Cabezas M. Normal ranges of non-fasting triglycerides in healthy Dutch males and females. *Clin Chim Acta* 2003;337:49-57.

45. Swain T HW. The phenolics constituents of *Pruunus domestica*. *J Sci Food Agric* 1969;10:63-8.

46. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007;298:309-16.

47. Mudrakova E, Poledne R, Kovar J. Postprandial triglyceridemia after single

dose of alcohol in healthy young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011.

48. Schneider J, Liesenfeld A, Mordasini R, Schubotz R, Zofel P, Kubel F, et al. Lipoprotein fractions, lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase during short-term and long-term uptake of ethanol in healthy subjects. *Atherosclerosis* 1985;57:281-91.

49. Zhong W, Zhao Y, Tang Y, Wei X, Shi X, Sun W, et al. Chronic alcohol exposure stimulates adipose tissue lipolysis in mice: role of reverse triglyceride transport in the pathogenesis of alcoholic steatosis. *Am J Pathol* 2012;180:998-1007.

50. Park H, Kim K. Relationship between alcohol consumption and serum lipid levels in elderly Korean men. *Arch Gerontol Geriatr* 2012;55:226-30.

51. van Tol A, van der Gaag MS, Scheek LM, van Gent T, Hendriks HF. Changes in postprandial lipoproteins of low and high density caused by moderate alcohol consumption with dinner. *Atherosclerosis* 1998;141 Suppl 1:S101-3.

52. Chrostek L, Jelski W, Szmitkowski M, Puchalski Z. Gender-related differences in hepatic activity of alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in humans. *J Clin Lab Anal* 2003;17:93-6.

53. Welty FK. Cardiovascular disease and dyslipidemia in women. *Arch Intern Med* 2001;161:514-22.

54. Malarcher AM, Giles WH, Croft JB, Wozniak MA, Wityk RJ, Stolley PD, et al. Alcohol intake, type of beverage, and the risk of cerebral infarction in young women. *Stroke* 2001;32:77-83.

55. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391-7.

56. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 2003;107:443-7.

57. Covas MI, Konstantinidou V, Mysytaki E, Fito M, Weinbrenner T, De La Torre R, et al. Postprandial effects of wine consumption on lipids and oxidative stress biomarkers. *Drugs Exp Clin Res* 2003;29:217-23.

58. Naissides M, Mamo JC, James AP, Pal S. The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2006;185:438-45.

59. Galland L. Diet and inflammation. *Nutr Clin Pract* 2010;25:634-40.

60. Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bon GB, Sevanian A. Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and

atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1998;25:250-2.

61. Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Perez DD, Strobel P, San Martin A, et al. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp Clin Res* 1999;25:133-41.

62. Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper G, Whincup PH, Rumley A, Walker M, et al. The effects of different alcoholic drinks on lipids, insulin and haemostatic and inflammatory markers in older men. *Thromb Haemost* 2003;90:1080-7.

63. Sacanella E, Vazquez-Agell M, Mena MP, Antunez E, Fernandez-Sola J, Nicolas JM, et al. Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1463-9.

64. Vazquez-Agell M, Sacanella E, Tobias E, Monagas M, Antunez E, Zamora-Ros R, et al. Inflammatory markers of atherosclerosis are decreased after moderate consumption of cava (sparkling wine) in men with low cardiovascular risk. *J Nutr* 2007;137:2279-84.

65. Chen CW, Lin CT, Lin YL, Lin TK, Lin CL. Taiwanese female vegetarians have lower lipoprotein-associated phospholipase A2 compared with omnivores. *Yonsei Med J* 2011;52:13-9.

66. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993;341:454-7.

67. Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol* 1997;80:1627-31.

68. Estruch R, Sacanella E, Mota F, Chiva-Blanch G, Antunez E, Casals E, et al. Moderate consumption of red wine, but not gin, decreases erythrocyte superoxide dismutase activity: a randomised cross-over trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:46-53.

69. Krnic M, Modun D, Budimir D, Gunjaca G, Jajic I, Vukovic J, et al. Comparison of acute effects of red wine, beer and vodka against hyperoxia-induced oxidative stress and increase in arterial stiffness in healthy humans. *Atherosclerosis* 2011;218:530-5.

70. de Rijke YB, Demacker PN, Assen NA, Sloots LM, Katan MB, Stalenhoef AF. Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am J Clin Nutr* 1996;63:329-34.

71. Caccetta RA, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB. Ingestion of red wine significantly

increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr* 2000;71:67-74.

72. Zamora-Ros R, Serafini M, Estruch R, Lamuela-Raventos RM, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, et al. Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: Evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013.

73. Vidavalur R, Otani H, Singal PK, Maulik N. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp Clin Cardiol* 2006;11:217-25.

74. Ventura P, Bini A, Panini R, Marri L, Tomasi A, Salvioli G. Red wine consumption prevents vascular oxidative stress induced by a high-fat meal in healthy volunteers. *Int J Vitam Nutr Res* 2004;74:137-43.

75. Natella F, Ghiselli A, Guidi A, Ursini F, Scaccini C. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1036-44.

76. Blackhurst DM, Marais AD. Concomitant consumption of red wine and polyunsaturated fatty acids in edible oil does not influence the peroxidation status of chylomicron lipids despite increasing plasma catechin concentration. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:550-8.

77. Arendt BM, Ellinger S, Kekic K, Geus L, Fimmers R, Spengler U, et al. Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial (ISRCTN68505294). *Nutr J* 2005;4:33.

78. Addolorato G, Leggio L, Ojetti V, Capristo E, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Effects of short-term moderate alcohol administration on oxidative stress and nutritional status in healthy males. *Appetite* 2008;50:50-6.

79. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J* 2007;6:27.

80. Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB, De Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* 2002;105:2836-44.

81. Arbabi S, Garcia I, Bauer GJ, Maier RV. Alcohol (ethanol) inhibits IL-8 and TNF: role of the p38 pathway. *J Immunol* 1999;162:7441-5.

82. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138:S419-20.
83. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
84. Beaudoux JL, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Gardes-Albert M, Legrand A, Delattre J, et al. Comparison of the effects of O₂^{*}-/HO^{*} free radical- and copper ions-oxidized LDL or lipoprotein(a) on the endothelial cell releases of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Life Sci* 2001;69:2371-82.
85. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol* 1991;14:11-16.
86. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481-8.
87. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
88. Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu SN, Chen M, Guha D, Cybulsky MI. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *J Exp Med* 2006;203:2073-83.
89. Chia MC. The role of adhesion molecules in atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998;35:573-602.
90. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-7.
91. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:63-71.
92. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 2007;117:195-205.
93. Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:228-32.
94. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 2010;74:213-20.
95. Willerson JT. Systemic and local inflammation in patients with unstable atherosclerotic plaques. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;44:469-78.
96. Schaar JA, Muller JE, Falk E, Virmani R, Fuster V, Serruys PW, et al.

Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *Eur Heart J* 2004;25:1077-82.

97. Robertson AK, Hansson GK. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2421-32.

98. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008;54:24-38.

99. Casscells W, Hathorn B, David M, Krabach T, Vaughn WK, McAllister HA, et al. Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implications for plaque rupture and thrombosis. *Lancet* 1996;347:1447-51.

100. Stefanadis C, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, Tsiamis E, Dernellis J, Toutouzas K, et al. Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected in vivo: A new method of detection by application of a special thermography catheter. *Circulation* 1999;99:1965-71.

101. Adiels M, Matikainen N, Westerbacka J, Soderlund S, Larsson T, Olofsson SO, et al. Postprandial accumulation of chylomicrons and chylomicron remnants is determined by the clearance capacity. *Atherosclerosis* 2012;222:222-8.

102. Cohn JS. Postprandial lipemia: emerging evidence for atherogenicity of remnant lipoproteins. *Can J Cardiol* 1998;14 Suppl B:18B-27B.

103. Proctor SD, Mamo JC. Retention of fluorescent-labelled chylomicron remnants within the intima of the arterial wall--evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins. *Eur J Clin Invest* 1998;28:497-503.

104. Bovenberg SA, Alipour A, Elte JW, Rietveld AP, Janssen JW, van de Geijn GJ, et al. Cell-mediated lipoprotein transport: a novel anti-atherogenic concept. *Atheroscler Suppl* 2010;11:25-9.

105. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350:1387-97.

106. Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Ford I, O'Reilly DS, Packard CJ. Interleukin-6, fibrin D-dimer, and coagulation factors VII and XIIa in prediction of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1529-34.

107. Tuomisto K, Jousilahti P, Sundvall J, Pajunen P, Salomaa V. C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality. A population-based, prospective study.

Thromb Haemost 2006;95:511-8.

108. Zhang YX, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;145:375-9.

109. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805-12.

110. de Beer FC, Soutar AK, Baltz ML, Trayner IM, Feinstein A, Pepys MB. Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein. *J Exp Med* 1982;156:230-42.

111. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1386-92.

112. Wilson AM, Swan JD, Ding H, Zhang Y, Whitbourn RJ, Gurry J, et al. Widespread vascular production of C-reactive protein (CRP) and a relationship between serum CRP, plaque CRP and intimal hypertrophy. *Atherosclerosis* 2007;191:175-81.

113. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001;103:1194-7.

114. Du Y, Wei F, Dong Z, Liu J, Jiang W, Lu Q. Prognostic value of serum LP-PLA2 and hs-CRP in unstable atherosclerotic plaques. *Clin Exp Hypertens* 2011;33:113-6.

115. Teupser D, Weber O, Rao TN, Sass K, Thiery J, Fehling HJ. No reduction of atherosclerosis in C-reactive protein (CRP)-deficient mice. *J Biol Chem* 2011;286:6272-9.

116. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.

117. Pearson TA, Bazzarre TL, Daniels SR, Fair JM, Fortmann SP, Franklin BA, et al. American Heart Association guide for improving cardiovascular health at the community level: a statement for public health practitioners, healthcare providers, and health policy makers from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science. *Circulation* 2003;107:645-51.

118. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui

M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.

119. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999;99:237-42.

120. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-9.

121. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998;98:731-3.

122. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-43.

123. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, Jr., et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* 1999;106:506-12.

124. Strandberg TE, Tilvis RS. C-reactive protein, cardiovascular risk factors, and mortality in a prospective study in the elderly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1057-60.

125. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 2001;344:1959-65.

126. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008;359:2195-207.

127. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1998;98:839-44.

128. Stefanadis C, Diamantopoulos L, Dernellis J, Economou E, Tsiamis E, Toutouzas K, et al. Heat production of atherosclerotic plaques and inflammation assessed by the acute phase proteins in acute coronary syndromes. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:43-52.
129. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
130. Ferreiros ER, Boissonnet CP, Pizarro R, Merletti PF, Corrado G, Cagide A, et al. Independent prognostic value of elevated C-reactive protein in unstable angina. *Circulation* 1999;100:1958-63.
131. Montalescot G, Philippe F, Ankri A, Vicaut E, Bearez E, Poulard JE, et al. Early increase of von Willebrand factor predicts adverse outcome in unstable coronary artery disease: beneficial effects of enoxaparin. French Investigators of the ESSENCE Trial. *Circulation* 1998;98:294-9.
132. Oltrona L, Ardissino D, Merlini PA, Spinola A, Chiodo F, Pezzano A. C-reactive protein elevation and early outcome in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1997;80:1002-6.
133. Pietila KO, Harmoinen AP, Jokiniitty J, Pasternack AI. Serum C-reactive protein concentration in acute myocardial infarction and its relationship to mortality during 24 months of follow-up in patients under thrombolytic treatment. *Eur Heart J* 1996;17:1345-9.
134. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995;332:635-41.
135. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005;352:20-8.
136. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997;349:462-6.
137. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:29-38.

138. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621-36.
139. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009;102:215-22.
140. Henry RM. Interleukin 6 as therapeutic target in athero-/arteriosclerosis--small steps towards a new treatment paradigm in cardiovascular disease? *Atherosclerosis* 2011;219:390-1.
141. Yehuda H, Szuchman-Sapir A, Khatib S, Musa R, Tamir S. Human atherosclerotic plaque lipid extract promotes expression of proinflammatory factors in human monocytes and macrophage-like cells. *Atherosclerosis* 2011;218:339-43.
142. Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, Robillard P, Chapman MJ, Huby T, et al. Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J Biol Chem* 2011;286:30926-36.
143. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2364-7.
144. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2137-42.
145. Canault M, Peiretti F, Mueller C, Kopp F, Morange P, Rihs S, et al. Exclusive expression of transmembrane TNF-alpha in mice reduces the inflammatory response in early lipid lesions of aortic sinus. *Atherosclerosis* 2004;172:211-8.
146. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, et al. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004;110:3493-500.
147. Welsh P, Woodward M, Rumley A, Lowe G. Associations of plasma pro-inflammatory cytokines, fibrinogen, viscosity and C-reactive protein with cardiovascular risk factors and social deprivation: the fourth Glasgow MONICA study. *Br J Haematol* 2008;141:852-61.
148. Thakore AH, Guo CY, Larson MG, Corey D, Wang TJ, Vasan RS, et al. Association of multiple inflammatory markers with carotid intimal medial thickness and stenosis (from the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 2007;99:1598-602.
149. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men.

Circulation 2000;101:1767-72.

150. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 2003;108:2317-22.

151. Zuliani G, Volpato S, Ble A, Bandinelli S, Corsi AM, Lauretani F, et al. High interleukin-6 plasma levels are associated with low HDL-C levels in community-dwelling older adults: the InChianti study. *Atherosclerosis* 2007;192:384-90.

152. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999;100:793-8.

153. Rifai N, Joubran R, Yu H, Asmi M, Jouma M. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. *Clin Chem* 1999;45:1967-73.

154. Erren M, Reinecke H, Junker R, Fobker M, Schulte H, Schurek JO, et al. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2355-63.

155. Simon AD, Yazdani S, Wang W, Schwartz A, Rabbani LE. Circulating levels of IL-1beta, a prothrombotic cytokine, are elevated in unstable angina versus stable angina. *J Thromb Thrombolysis* 2000;9:217-22.

156. Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuffi AG, Ginnetti F, et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation* 1999;99:2079-84.

157. McDermott MM, Liu K, Ferrucci L, Tian L, Guralnik JM, Tao H, et al. Relation of interleukin-6 and vascular cellular adhesion molecule-1 levels to functional decline in patients with lower extremity peripheral arterial disease. *Am J Cardiol* 2011;107:1392-8.

158. Zhang J, Alcaide P, Liu L, Sun J, He A, Luscinskas FW, et al. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS One* 2011;6:e14525.

159. Kurano M, Iso ON, Hara M, Noiri E, Koike K, Kadowaki T, et al. Plant sterols increased IL-6 and TNF-alpha secretion from macrophages, but to a lesser extent than cholesterol. *J Atheroscler Thromb* 2011;18:373-83.

160. Lyngdoh T, Vollenweider P, Waeber G, Marques-Vidal P. Association of statins with inflammatory cytokines: a population-based Colaus study. *Atherosclerosis*

2011;219:253-8.

161. Kablak-Ziembicka A, Przewlocki T, Sokolowski A, Tracz W, Podolec P. Carotid intima-media thickness, hs-CRP and TNF-alpha are independently associated with cardiovascular event risk in patients with atherosclerotic occlusive disease. *Atherosclerosis* 2011;214:185-90.

162. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2149-53.

163. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994;269:13057-60.

164. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S237-42.

165. Menschikowski M, Kasper M, Lattke P, Schiering A, Schiefer S, Stockinger H, et al. Secretory group II phospholipase A2 in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1995;118:173-81.

166. Elinder LS, Dumitrescu A, Larsson P, Hedin U, Frostegard J, Claesson HE. Expression of phospholipase A2 isoforms in human normal and atherosclerotic arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2257-63.

167. Ivandic B, Castellani LW, Wang XP, Qiao JH, Mehrabian M, Navab M, et al. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1284-90.

168. Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, et al. Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:1280-4.

169. Kugiyama K, Ota Y, Kawano H, Soejima H, Ogawa H, Sugiyama S, et al. Increase in plasma levels of secretory type II phospholipase A(2) in patients with coronary spastic angina. *Cardiovasc Res* 2000;47:159-65.

170. Ryu SK, Mallat Z, Benessiano J, Tedgui A, Olsson AG, Bao W, et al. Phospholipase A2 Enzymes, High-Dose Atorvastatin, and Prediction of Ischemic Events Following Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2012.

171. Lind L, Simon T, Johansson L, Kotti S, Hansen T, Machecourt J, et al. Circulating levels of secretory- and lipoprotein-associated phospholipase A2 activities: relation to atherosclerotic plaques and future all-cause mortality. *Eur Heart J* 2012.

172. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993;215:213-9.
173. Moukdar F, Robidoux J, Lyght O, Pi J, Daniel KW, Collins S. Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice. *J Lipid Res* 2009;50:59-70.
174. Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnell JP, et al. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H904-11.
175. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
176. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull* 1993;49:566-76.
177. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996;42:498-506.
178. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
179. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1367-73.
180. Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res* 2002;91:938-44.
181. Buijsse B, Lee DH, Steffen L, Erickson RR, Luepker RV, Jacobs DR, Jr., et al. Low Serum Glutathione Peroxidase Activity Is Associated with Increased Cardiovascular Mortality in Individuals with Low HDLc's. *PLoS One* 2012;7:e38901.
182. Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21:111-27.
183. Barbosa KB, Bressan J, Zulet MA, Martinez Hernandez JA. [Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans]. *An Sist Sanit Navar* 2008;31:259-80.
184. Graham A, Wood JL, O'Leary VJ, Stone D. Human (THP-1) macrophages oxidize LDL by a thiol-dependent mechanism. *Free Radic Res* 1996;25:181-92.
185. Lynch SM, Frei B. Physiological thiol compounds exert pro- and anti-oxidant effects, respectively, on iron- and copper-dependent oxidation of human low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1997;1345:215-21.

186. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003;22:18-35.
187. Kubota Y, Moriyama Y, Yamagishi K, Tanigawa T, Noda H, Yokota K, et al. Serum vitamin C concentration and hs-CRP level in middle-aged Japanese men and women. *Atherosclerosis* 2010;208:496-500.
188. Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 1991;54:1129S-34S.
189. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010;2:1231-46.
190. Gonzalez R, Ballester I, Lopez-Posadas R, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011;51:331-62.
191. Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME. Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos* 2008;29:205-17.
192. Vivancos M, Moreno JJ. Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br J Nutr* 2008;99:1199-207.
193. Lian TW, Wang L, Lo YH, Huang IJ, Wu MJ. Fisetin, morin and myricetin attenuate CD36 expression and oxLDL uptake in U937-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:601-9.
194. Gao J, Xu Y, Yang Y, Yang Y, Zheng Z, Jiang W, et al. Identification of upregulators of human ATP-binding cassette transporter A1 via high-throughput screening of a synthetic and natural compound library. *J Biomol Screen* 2008;13:648-56.
195. Nagarajan S, Burris RL, Stewart BW, Wilkerson JE, Badger TM. Dietary soy protein isolate ameliorates atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice potentially by inhibiting monocyte chemoattractant protein-1 expression. *J Nutr* 2008;138:332-7.
196. Jin YR, Im JH, Park ES, Cho MR, Han XH, Lee JJ, et al. Antiplatelet activity of epigallocatechin gallate is mediated by the inhibition of PLCgamma2 phosphorylation, elevation of PGD2 production, and maintaining calcium-ATPase activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:45-54.
197. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary

antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.

198. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995;155:381-6.

199. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996;312:478-81.

200. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 1996;125:384-9.

201. Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1489-94.

202. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2002;75:880-6.

203. Lichtenstein AH, Kennedy E, Barrier P, Danford D, Ernst ND, Grundy SM, et al. Dietary fat consumption and health. *Nutr Rev* 1998;56:S3-19; discussion S-28.

204. Musa-Veloso K, Binns MA, Kocenas AC, Poon T, Elliot JA, Rice H, et al. Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid dose-dependently reduce fasting serum triglycerides. *Nutr Rev* 2010;68:155-67.

205. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F. Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. *Br J Nutr* 2012;107 Suppl 2:S201-13.

206. Sacks FM, Katan M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med* 2002;113 Suppl 9B:13S-24S.

207. ND A. Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose* 1913;56:379-404.

208. Ma Y, Wang W, Zhang J, Lu Y, Wu W, Yan H, et al. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in *ldl*-deficient mice on a long-term high-fat diet. *PLoS One* 2012;7:e35835.

209. Mozaffarian D, Aro A, Willett WC. Health effects of trans-fatty acids:

- experimental and observational evidence. *Eur J Clin Nutr* 2009;63 Suppl 2:S5-21.
210. Menotti A, Lanti M, Kromhout D, Blackburn H, Jacobs D, Nissinen A, et al. Homogeneity in the relationship of serum cholesterol to coronary deaths across different cultures: 40-year follow-up of the Seven Countries Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008;15:719-25.
211. Fidanza F, Puddu V, Imbimbo AB, Menotti A, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. VII. Five-year experience in rural Italy. *Circulation* 1970;41:l63-75.
212. Aravanis C, Corcondilas A, Dontas AS, Lekos D, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. IX. The Greek islands of Crete and Corfu. *Circulation* 1970;41:l88-100.
213. Buzina R, Keys A, Mohacek I, Marinkovic M, Hahn A, Blackburn H. Coronary heart disease in seven countries. V. Five-year follow-up in Dalmatia and Slavonia. *Circulation* 1970;41:l40-51.
214. Taylor HL, Blackburn H, Keys A, Parlin RW, Vasquez C, Puchner T. Coronary heart disease in seven countries. IV. Five-year follow-up of employees of selected U.S. railroad companies. *Circulation* 1970;41:l20-39.
215. Kimura N, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. X. Rural southern Japan. *Circulation* 1970;41:l101-12.
216. Menotti A, Keys A, Kromhout D, Blackburn H, Aravanis C, Bloemberg B, et al. Inter-cohort differences in coronary heart disease mortality in the 25-year follow-up of the seven countries study. *Eur J Epidemiol* 1993;9:527-36.
217. Rimm EB, Ellison RC. Alcohol in the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1378S-82S.
218. 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;99:779-85.
219. Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Salas-Salvado J, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI, et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;145:1-11.
220. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279-90.
221. Zock PL, Mensink RP, Harryvan J, de Vries JH, Katan MB. Fatty acids in serum

- cholesteryl esters as quantitative biomarkers of dietary intake in humans. *Am J Epidemiol* 1997;145:1114-22.
222. Arya S, Isharwal S, Misra A, Pandey RM, Rastogi K, Vikram NK, et al. C-reactive protein and dietary nutrients in urban Asian Indian adolescents and young adults. *Nutrition* 2006;22:865-71.
223. Petersson H, Lind L, Hulthe J, Elmgren A, Cederholm T, Riserus U. Relationships between serum fatty acid composition and multiple markers of inflammation and endothelial function in an elderly population. *Atherosclerosis* 2009;203:298-303.
224. Peairs AD, Rankin JW, Lee YW. Effects of acute ingestion of different fats on oxidative stress and inflammation in overweight and obese adults. *Nutr J* 2011;10:122.
225. Petersson H, Riserus U, McMonagle J, Gulseth HL, Tierney AC, Morange S, et al. Effects of dietary fat modification on oxidative stress and inflammatory markers in the LIPGENE study. *Br J Nutr* 2010;104:1357-62.
226. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr* 2004;79:606-12.
227. Anderson AL, Harris TB, Tyllavsky FA, Perry SE, Houston DK, Lee JS, et al. Dietary patterns, insulin sensitivity and inflammation in older adults. *Eur J Clin Nutr* 2012;66:18-24.
228. Lennie TA, Chung ML, Habash DL, Moser DK. Dietary fat intake and proinflammatory cytokine levels in patients with heart failure. *J Card Fail* 2005;11:613-8.
229. Jimenez-Gomez Y, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Marin C, Perez-Martinez P, Ruano J, et al. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 2009;204:e70-6.
230. Aeberli I, Gerber PA, Hochuli M, Kohler S, Haile SR, Gouni-Berthold I, et al. Low to moderate sugar-sweetened beverage consumption impairs glucose and lipid metabolism and promotes inflammation in healthy young men: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011;94:479-85.
231. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* 2006;55:928-34.

232. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* 2005;98:203-10.
233. Yang R, Le G, Li A, Zheng J, Shi Y. Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diet. *Nutrition* 2006;22:1185-91.
234. Haldar S, Rowland IR, Barnett YA, Bradbury I, Robson PJ, Powell J, et al. Influence of habitual diet on antioxidant status: a study in a population of vegetarians and omnivores. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1011-22.
235. Rauma AL, Torronen R, Hanninen O, Verhagen H, Mykkanen H. Antioxidant status in long-term adherents to a strict uncooked vegan diet. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1221-7.
236. Pears AT, Rankin JW. Inflammatory response to a high-fat, low-carbohydrate weight loss diet: effect of antioxidants. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1573-8.
237. Kolomvotsou AI, Rallidis LS, Mountzouris KC, Lekakis J, Koutelidakis A, Efstathiou S, et al. Adherence to Mediterranean diet and close dietetic supervision increase total dietary antioxidant intake and plasma antioxidant capacity in subjects with abdominal obesity. *Eur J Nutr* 2012.
238. Berger K, Ajani UA, Kase CS, Gaziano JM, Buring JE, Glynn RJ, et al. Light-to-moderate alcohol consumption and risk of stroke among U.S. male physicians. *N Engl J Med* 1999;341:1557-64.
239. Jimenez M, Chiuve SE, Glynn RJ, Stampfer MJ, Camargo CA, Jr., Willett WC, et al. Alcohol consumption and risk of stroke in women. *Stroke* 2012;43:939-45.
240. Ronksley PE, Brien SE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2011;342:d671.
241. Shaper AG, Phillips AN, Pocock SJ, Walker M. Alcohol and ischaemic heart disease in middle aged British men. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;294:733-7.
242. Burke V, Lee AH, Hunter E, Spargo R, Smith R, Beilin LJ, et al. Alcohol intake and incidence of coronary disease in Australian aborigines. *Alcohol Alcohol* 2007;42:49-54.
243. St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* 1979;1:1017-20.

244. Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Mittleman MA. Binge drinking and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 2005;112:3839-45.
245. Murray RP, Connett JE, Tyas SL, Bond R, Ekuma O, Silversides CK, et al. Alcohol volume, drinking pattern, and cardiovascular disease morbidity and mortality: is there a U-shaped function? *Am J Epidemiol* 2002;155:242-8.
246. Malyutina S, Bobak M, Kurilovitch S, Gafarov V, Simonova G, Nikitin Y, et al. Relation between heavy and binge drinking and all-cause and cardiovascular mortality in Novosibirsk, Russia: a prospective cohort study. *Lancet* 2002;360:1448-54.
247. Fuchs FD, Chambless LE, Folsom AR, Eigenbrodt ML, Duncan BB, Gilbert A, et al. Association between alcoholic beverage consumption and incidence of coronary heart disease in whites and blacks: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 2004;160:466-74.
248. Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Effects of alcohol on lipoproteins in relation to coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:243-50.
249. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 2008;40:189-97.
250. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martinez A, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1323-9.
251. Frisdal E, Klerkx AH, Le Goff W, Tanck MW, Lagarde JP, Jukema JW, et al. Functional interaction between -629C/A, -971G/A and -1337C/T polymorphisms in the CETP gene is a major determinant of promoter activity and plasma CETP concentration in the REGRESS Study. *Hum Mol Genet* 2005;14:2607-18.
252. Corella D, Carrasco P, Amiano P, Arriola L, Chirlaque MD, Huerta JM, et al. Common cholesteryl ester transfer protein gene variation related to high-density lipoprotein cholesterol is not associated with decreased coronary heart disease risk after a 10-year follow-up in a Mediterranean cohort: Modulation by alcohol consumption. *Atherosclerosis* 2010;211:531-8.
253. De Oliveira ESER, Foster D, McGee Harper M, Seidman CE, Smith JD, Breslow JL, et al. Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation* 2000;102:2347-52.
254. Munday JS, Thompson KG, James KA, Manktelow BW. The effect of moderate

alcohol consumption as either red or white wine in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Coron Artery Dis* 1999;10:97-102.

255. Daher CF, Slaiby R, Haddad N, Boustany K, Baroody GM. Effect of acute and chronic moderate red or white wine consumption on fasted and postprandial lipemia in the rat. *J Toxicol Environ Health A* 2006;69:1117-31.

256. Masarei JR, Puddey IB, Rouse IL, Lynch WJ, Vandongen R, Beilin LJ. Effects of alcohol consumption on serum lipoprotein-lipid and apolipoprotein concentrations. Results from an intervention study in healthy subjects. *Atherosclerosis* 1986;60:79-87.

257. Valimaki M, Taskinen MR, Ylikahri R, Roine R, Kuusi T, Nikkila EA. Comparison of the effects of two different doses of alcohol on serum lipoproteins, HDL-subfractions and apolipoproteins A-I and A-II: a controlled study. *Eur J Clin Invest* 1988;18:472-80.

258. Sharpe PC, McGrath LT, McClean E, Young IS, Archbold GP. Effect of red wine consumption on lipoprotein (a) and other risk factors for atherosclerosis. *QJM* 1995;88:101-8.

259. Klop B, Rego AT, Cabezas MC. Alcohol and plasma triglycerides. *Curr Opin Lipidol* 2013.

260. Mudrakova E, Poledne R, Kovar J. Postprandial triglyceridemia after single dose of alcohol in healthy young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23:183-8.

261. Bertelli AA, Baccalini R, Battaglia E, Falchi M, Ferrero ME. Resveratrol inhibits TNF alpha-induced endothelial cell activation. *Therapie* 2001;56:613-6.

262. Tousoulis D, Ntarladimas I, Antoniadou C, Vasiliadou C, Tentolouris C, Papageorgiou N, et al. Acute effects of different alcoholic beverages on vascular endothelium, inflammatory markers and thrombolysis fibrinolysis system. *Clin Nutr* 2008;27:594-600.

263. Situnayake RD, Crump BJ, Thurnham DI, Davies JA, Gearty J, Davis M. Lipid peroxidation and hepatic antioxidants in alcoholic liver disease. *Gut* 1990;31:1311-7.

264. Lieber CS. Mechanism of ethanol induced hepatic injury. *Pharmacol Ther* 1990;46:1-41.

265. Bello AT, Bora NS, Lange LG, Bora PS. Cardioprotective effects of alcohol: mediation by human vascular alcohol dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1858-64.

266. Kircher MF, Grimm J, Swirski FK, Libby P, Gerszten RE, Allport JR, et al. Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions. *Circulation* 2008;117:388-95.

267. Bonnefont-Rousselot D, Rouscilles A, Bizard C, Delattre J, Jore D, Gardes-Albert M. Antioxidant effect of ethanol toward in vitro peroxidation of human low-density lipoproteins initiated by oxygen free radicals. *Radiat Res* 2001;155:279-87.
268. Merritt R, Guruge BL, Miller DD, Chaitman BR, Bora PS. Moderate alcohol feeding attenuates postinjury vascular cell proliferation in rabbit angioplasty model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30:19-25.
269. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* 1994;344:193-4.
270. Serafini M, Laranjinha JA, Almeida LM, Maiani G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem* 2000;11:585-90.
271. Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, Obad A, et al. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis* 2008;197:250-6.
272. Feig DI, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2008;359:1811-21.
273. Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, et al. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:733-6.
274. Martinez Alvarez JR, Belles VV, Lopez-Jaen AB, Marin AV, Codoner-Franch P. Effects of alcohol-free beer on lipid profile and parameters of oxidative stress and inflammation in elderly women. *Nutrition* 2009;25:182-7.
275. Pinzani P, Petruzzi E, Magnolfi SU, Malentacchi F, De Siena G, Petruzzi I, et al. Red or white wine assumption and serum antioxidant capacity. *Arch Gerontol Geriatr* 2010;51:e72-4.
276. Moses RG, Calvert D, Storlien LH. Evaluation of the Accutrend GCT with respect to triglyceride monitoring. *Diabetes Care* 1996;19:1305-6.
277. J Breedveld JH, HM van Oosten HM. The Dutch food composition table. The Hague: Netherlands Centre for Nutrition Education.; 1998.
278. Wakabayashi I. Associations of alcohol drinking and cigarette smoking with serum lipid levels in healthy middle-aged men. *Alcohol Alcohol* 2008;43:274-80.
279. Fontanals-Ferrer N, Serrat-Serrat J, Sorribas-Vivas A, Gonzalez-Garcia C, Gonzalez-Sastre F, Gomez-Gerique J. Quick method of determining lipoproteins, including those of intermediate density, in serum. *Clin Chem* 1988;34:1753-7.

280. The 10 leading causes of death by broad income group. World Health Organization, 2008. . (Accessed 29 de diciembre de 2012, at <http://www.who.int>.)
281. Pownall HJ. Dietary ethanol is associated with reduced lipolysis of intestinally derived lipoproteins. *J Lipid Res* 1994;35:2105-13.
282. Sane T, Nikkila EA, Taskinen MR, Valimaki M, Ylikahri R. Accelerated turnover of very low density lipoprotein triglycerides in chronic alcohol users. A possible mechanism for the up-regulation of high density lipoprotein by ethanol. *Atherosclerosis* 1984;53:185-93.
283. Valimaki M, Kahri J, Laitinen K, Lahdenpera S, Kuusi T, Ehnholm C, et al. High density lipoprotein subfractions, apolipoprotein A-I containing lipoproteins, lipoprotein (a), and cholesterol ester transfer protein activity in alcoholic women before and after ethanol withdrawal. *Eur J Clin Invest* 1993;23:406-17.
284. Austin MA. Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991;11:2-14.
285. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996;3:213-9.
286. Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, et al. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1121-7.
287. Okada K, Furusyo N, Murata M, Sawayama Y, Kainuma M, Hayashi J. A hypertriglyceridemic state increases high sensitivity C-reactive protein of Japanese men with normal glucose tolerance. *Endocrine* 2012;41:96-102.
288. Van de Wiel A. The effect of alcohol on postprandial and fasting triglycerides. *Int J Vasc Med* 2012;2012:862504.
289. Baraona E, Lieber CS. Effects of ethanol on lipid metabolism. *J Lipid Res* 1979;20:289-315.
290. Cheema SK, Agarwal-Mawal A, Murray CM, Tucker S. Lack of stimulation of cholesteryl ester transfer protein by cholesterol in the presence of a high-fat diet. *J Lipid Res* 2005;46:2356-66.
291. Jonsson T, Ahren B, Pacini G, Sundler F, Wierup N, Steen S, et al. A Paleolithic diet confers higher insulin sensitivity, lower C-reactive protein and lower blood pressure

- than a cereal-based diet in domestic pigs. *Nutr Metab (Lond)* 2006;3:39.
292. Koopmans SJ, Dekker R, Ackermans MT, Sauerwein HP, Serlie MJ, van Beusekom HM, et al. Dietary saturated fat/cholesterol, but not unsaturated fat or starch, induces C-reactive protein associated early atherosclerosis and ectopic fat deposition in diabetic pigs. *Cardiovasc Diabetol* 2011;10:64.
293. Nettleton JA, Steffen LM, Mayer-Davis EJ, Jenny NS, Jiang R, Herrington DM, et al. Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 2006;83:1369-79.
294. Averina M, Nilssen O, Arkhipovsky VL, Kalinin AG, Brox J. C-reactive protein and alcohol consumption: Is there a U-shaped association? Results from a population-based study in Russia. The Arkhangelsk study. *Atherosclerosis* 2006;188:309-15.
295. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Llorach R, Rotches-Ribalta M, Guillen M, Casas R, et al. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2012;95:326-34.
296. Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:1199-208.
297. Oliveras-Lopez MJ, Berna G, Carneiro EM, Lopez-Garcia de la Serrana H, Martin F, Lopez MC. An extra-virgin olive oil rich in polyphenolic compounds has antioxidant effects in OF1 mice. *J Nutr* 2008;138:1074-8.
298. Acin S, Navarro MA, Perona JS, Surra JC, Guillen N, Arnal C, et al. Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Nutr* 2007;97:628-38.
299. Beulens JW, van den Berg R, Kok FJ, Helander A, Vermunt SH, Hendriks HF. Moderate alcohol consumption and lipoprotein-associated phospholipase A2 activity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:539-44.
300. Tzotzas T, Filippatos TD, Triantos A, Bruckert E, Tselepis AD, Kiortsis DN. Effects of a low-calorie diet associated with weight loss on lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity in healthy obese women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:477-82.
301. Hartford M, Wiklund O, Mattsson Hulten L, Perers E, Person A, Herlitz J, et al. CRP, interleukin-6, secretory phospholipase A2 group IIA, and intercellular adhesion

- moleculé-1 during the early phase of acute coronary syndromes and long-term follow-up. *Int J Cardiol* 2006;108:55-62.
302. Urquiaga I, Strobel P, Perez D, Martinez C, Cuevas A, Castillo O, et al. Mediterranean diet and red wine protect against oxidative damage in young volunteers. *Atherosclerosis* 2010;211:694-9.
303. Alvarez-Sala Walther LA, Slowing Barillas K, Gomez-Serranillos Cuadrado P, Torres Segovia F, Valderrama Rojas M, Millan Nunez-Cortes J. [Variability of polyphenol content in different types of wine and its potential application in the understanding of its biologic effects]. *Med Clin (Barc)* 2000;114:331-2.
304. Brown L, Kroon PA, Das DK, Das S, Tosaki A, Chan V, et al. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:1513-23.
305. Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martinez P, Medina-Reimon A, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients* 2012;4:759-81.
306. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:243S-55S.
307. Alvarez-Sala LA VRM, de Torres Segovia FJ, Rodriguez Gorostiza FJ, Vélez Rodriguez D, Millán Nuñez-Cortés J. . El alcohol un arma de doble filo en la prevención cardiovascular. . *Rev Lat Cardiol* 2002;253:28-40.
308. Vukovic J, Modun D, Budimir D, Sutlovic D, Salamunic I, Zaja I, et al. Acute, food-induced moderate elevation of plasma uric acid protects against hyperoxia-induced oxidative stress and increase in arterial stiffness in healthy humans. *Atherosclerosis* 2009;207:255-60.
309. Day A, Stansbie D. Cardioprotective effect of red wine may be mediated by urate. *Clin Chem* 1995;41:1319-20.