

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia



Programa doctorado: Ciencia de los Alimentos (265-D)

“Esteroles vegetales en bebidas lácteas: efecto sobre el perfil lipídico y estimación de su biodisponibilidad”

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Celia Bañuls Morant

Dirigida por:

Dra. M^a Jesús Lagarda Blanch

Dr. Antonio Hernández Mijares

Valencia, Mayo de 2012



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultat de Farmàcia
Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal
Àrea de Nutrició i Bromatologia

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Medicina

M^a JESÚS LAGARDA BLANCH, profesora titular del área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València y ANTONIO HERNÁNDEZ MIJARES catedrático del Departamento de Medicina de la Universitat de València,

INFORMAN QUE: la licenciada en Biología CELIA BAÑULS MORANT ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del área de Nutrición y Bromatología y los laboratorios del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Dr. Peset, un trabajo que lleva por título "**Esteroles vegetales en bebidas lácteas: efecto sobre el perfil lipídico y estimación de su biodisponibilidad**" y autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe, en Valencia, Mayo de 2012.

Fdo: M^a Jesús Lagarda Blanch

Fdo: Antonio Hernández Mijares

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación UVEG2004-ALIFUNC-01-03, para el estudio "Efecto hipolipemiente y seguridad de uso de los fitosteroles en relación con su absorción y posible mediación por genes candidatos" financiado por la Universitat de València en la Convocatoria de Ayudas para la realización de proyectos interdisciplinarios de I+D en el Área de Alimentos Funcionales.

La doctoranda Celia Bañuls Morant ha disfrutado de una Beca de Investigación de la Universitat de València adscrita al mencionado proyecto.

A mis padres

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en estos años colaborando, de un modo u otro, en la realización de esta Tesis doctoral.

De modo especial quiero agradecer a mis directores su incondicional apoyo profesional y humano. A la Dra. M^a Jesús Lagarda, excelente científica y mejor persona, por su paciencia y comprensión. Al Dr. Antonio Hernández por su estímulo y espíritu investigador, por haber confiado en mí, gracias a su empeño, esfuerzo y dedicación personal.

A Rosaura Farré, Reyes Barberá y Amparo Alegría por su apoyo técnico y su tiempo.

A mis compañeros del laboratorio de Bromatología (Lupe, Clara, Sara, Lourdes, Ana, Toni, Ramón, Jaime, M^a José,...) por vuestra ayuda y amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Endocrinología, desde que empecé (Marisa, Antonio Lopez, Maria del Monte), los que han ido pasando (Lledó, Kathe) y, especialmente, a los actuales (Víctor M, Milagros, Lorena, Susana, Rosa y Raquel), así como al personal del Servicio de Endocrinología (Carlos, Marcelino, Eva, Ana, Isabel, Leo...) que me han ayudado y apoyado durante todo este tiempo.

A mis compañeros de carrera (Vanesa, Noelia, Carmen, Silvia, Davinia, Juan,...) por vuestro apoyo y amistad.

A mis amigos (M^aCarmen, Mónica, Pau, Amparo, Manolo, Esther, Roberto, Laura M, Rafa, Jessica, Fernando, Laura B, Lluís, Judith, Dolores, Toni,

Maribel, César, Ximo, Jordi,...) por los buenos momentos que hemos pasado, para que mantengamos la amistad.

Y sobre todo agradecer el apoyo y el cariño de mi familia, quien ha estado a mi lado en todo momento:

A mis tíos, primos, cuñado y sobrina, por todo el apoyo que he recibido durante estos años.

A mi hermana, por su alegría y apoyo en todo momento, por nuestra complicidad, por saberme escuchar, por ser como es.

A mi padre, por darme siempre su apoyo y mi madre por ser mi mejor amiga. No hay suficientes palabras para expresar mi gratitud. Gracias por quererme, comprenderme y ayudarme, sois mi mejor ejemplo a seguir. "Os quiero mucho".

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
A. Lipoproteínas circulantes y metabolismo lipídico	3
A.1. Lípidos y lipoproteínas plasmáticas	3
A.2. Metabolismo de las lipoproteínas	5
B. Riesgo cardiovascular asociado con el perfil lipídico	9
C. Esteroles vegetales	13
C.1. Definición y estructuras de los esteroles vegetales.....	13
C.2. Biosíntesis	15
C.3. Fuentes	17
C.4. Efectos sobre la absorción de colesterol	18
C.4.1. <i>Digestión y absorción del colesterol</i>	18
C.4.2. <i>Efecto hipocolesterolemiante de los esteroles vegetales:</i> <i>Mecanismo de acción</i>	20
C.5. Aspectos clínicos de los esteroles vegetales	23
C.5.1. <i>EV ingeridos en una dieta normal</i>	23
C.5.2. <i>Fitosteroles vs fitostanoles</i>	24
C.5.3. <i>Dosis y duración de la suplementación</i>	26
C.5.4. <i>Frecuencia en el consumo diario</i>	28
C.5.5. <i>Matriz alimentaria</i>	30
C.5.6. <i>Otros efectos potenciales</i>	32
C.6. Influencia individual en la eficacia de los esteroles vegetales.....	33
C.6.1. <i>Ingesta de colesterol</i>	34
C.6.2. <i>Genotipo de la apolipoproteína E</i>	35
C.6.3. <i>Colesterolemia</i>	37
C.6.4. <i>Concentraciones de esteroles vegetales en suero</i>	38
C.7. Seguridad y efectos secundarios	39
C.7.1. Carotenoides y vitaminas liposolubles	40
C.7.2. <i>Sitosterolemia</i>	42
C.8. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de esteroles vegetales	42
C.9. Determinación de esteroles vegetales en alimentos y fluidos biológicos: metodologías	47
HIPOTÉISIS Y OBJETIVOS.....	57

MATERIAL Y MÉTODOS	63
A. Optimización de la determinación de EV en bebida láctea y en suero por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)	65
A.1. Material y reactivos	65
A.2. Determinación de EV en bebida láctea: Modo operatorio.....	67
A.3. Determinación de EV en suero: Modo operatorio.....	69
A.4. Identificación y cuantificación de EV	69
A.5. Parámetros analíticos	71
B. Diseño del estudio clínico de intervención para valorar el efecto de la ingesta de una bebida láctea enriquecida en EV	73
B.1. Sujetos del estudio	75
B.2. Recomendaciones dietéticas.....	76
B.3. Descripción de la bebida láctea utilizada en el estudio	77
B.4. Determinación de parámetros antropométricos	79
B.5. Determinación de parámetros bioquímicos.....	79
B.6. Determinación del genotipo de la apolipoproteína E	81
B.7. Evaluación del estrés oxidativo tras una ingesta prolongada de EV	82
<i>B.7.1. Susceptibilidad a la oxidación de las LDL in vitro.....</i>	<i>82</i>
<i>B.7.2. Evaluación de la capacidad antioxidante total</i>	<i>83</i>
<i>B.7.3. Evaluación de la actividad oxidante</i>	<i>85</i>
C. Evaluación de la biodisponibilidad de esteroides vegetales	86
C.1. Biodisponibilidad <i>in vitro</i>	86
<i>C.1.1. Cultivo celular (Línea celular Caco-2).....</i>	<i>86</i>
<i>C.1.2. Viabilidad e inhibición de la proliferación celular</i>	<i>87</i>
<i>C.1.3. Funcionalidad mitocondrial (test MTT)</i>	<i>88</i>
<i>C.1.4. Ciclo celular: análisis del contenido de ADN.....</i>	<i>88</i>
<i>C.1.5. Ensayos de captación y transporte</i>	<i>89</i>
<i>C.1.6. Determinación de esteroides vegetales por CG.....</i>	<i>91</i>
<i>C.1.7. Determinación de proteínas en el cultivo celular</i>	<i>91</i>
C.2. Biodisponibilidad <i>in vivo</i>	92
D. Tratamiento estadístico.....	93
RESULTADOS.....	95
A. Optimización de la determinación de EV en bebida láctea y en suero por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)	97

A.1. Parámetros analíticos	97
A.1.1. <i>Determinación de EV en bebida láctea</i>	97
A.1.2. <i>Determinación de EV en suero</i>	98
A.2. Identificación y cuantificación de EV en la bebida láctea	99
B. Estudio clínico de intervención para valorar el efecto de la ingesta de una bebida láctea enriquecida en EV	101
B.1. Efecto del consumo de 2 g de EV/día en población general (grupo C del estudio de intervención)	101
B.1.1. <i>Variables antropométricas</i>	101
B.1.2. <i>Variables bioquímicas sanguíneas</i>	102
B.2. Factores que pueden influir sobre la eficacia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica	105
B.2.1. <i>Influencia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica (grupo A, B y parte del C) en función del aporte en grasa de la dieta</i>	105
B.2.2. <i>Influencia de la eficacia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica en función del genotipo de la apolipoproteína E</i>	109
B. 3. Evaluación del estrés oxidativo tras una ingesta prolongada de EV ...	113
B. 3.1. <i>Variables antropométricas</i>	113
B. 3.2. <i>Variables bioquímicas</i>	114
B. 3.3. <i>Parámetros de estrés oxidativo</i>	117
C. Estudio de la biodisponibilidad de los esteroides vegetales	119
C.1. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de EV (células Caco-2)	119
C.2. Biodisponibilidad <i>in vivo</i> de EV	125
DISCUSIÓN	135
A. Parámetros analíticos de la determinación de EV en bebida láctea y en suero por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG (FID))	137
B. Estudio clínico de intervención para valorar el efecto de la ingesta de una bebida láctea enriquecida en EV	139
B.1. Efecto del consumo de 2 g de EV/día en población general (grupo C del estudio de intervención)	139
B.2. Factores que pueden influir sobre la eficacia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica	142

<i>B.2.1. Influencia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica (grupo A, B y parte del C) en función del aporte en grasa de la dieta.....</i>	<i>142</i>
<i>B.2.2. Influencia de la eficacia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica en función del genotipo de la apolipoproteína E</i>	<i>145</i>
B.3. Evaluación del estrés oxidativo tras una ingesta prolongada de EV	149
C. Estudio de la biodisponibilidad de los EV	154
C.1. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de EV	154
C.2. Biodisponibilidad <i>in vivo</i> de EV	155
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA.....	163
ANEXOS.....	195
I. Abreviaturas	197
II. Consentimiento informado	199
III. Reactivos	201

INTRODUCCIÓN

A. Lipoproteínas circulantes y metabolismo lipídico

A.1. Lípidos y lipoproteínas plasmáticas

(Palou *et al.*, 2005; Gotto *et al.*, 1986)

Los principales lípidos en el plasma son triglicéridos, ácidos grasos, colesterol (libre y esterificado) y fosfolípidos. Éstos son importantes en el mantenimiento de la estructura de la membrana celular (colesterol, fosfolípidos), la síntesis de hormonas esteroideas (colesterol), y el metabolismo energético (triglicéridos y ácidos grasos). Debido a la insolubilidad de los lípidos en un medio acuoso, y para facilitar su transporte en el plasma sanguíneo, se asocian con proteínas y forman unas estructuras que se conocen con el nombre de lipoproteínas. Las lipoproteínas constan de un núcleo hidrofóbico formado por triacilglicéridos y ésteres de colesterol, rodeado de una envoltura organizada en una monocapa y formada por lípidos polares (fosfolípidos y colesterol libre) y por proteínas (Figura nº 1). Las proteínas que constituyen las lipoproteínas reciben el nombre de apoproteínas y cumplen una función estructural, solubilizando los lípidos, y además regulan la ruta metabólica de las diferentes lipoproteínas al servir de cofactores enzimáticos y por interactuar y ser reconocidas por receptores específicos localizados en las membranas celulares.

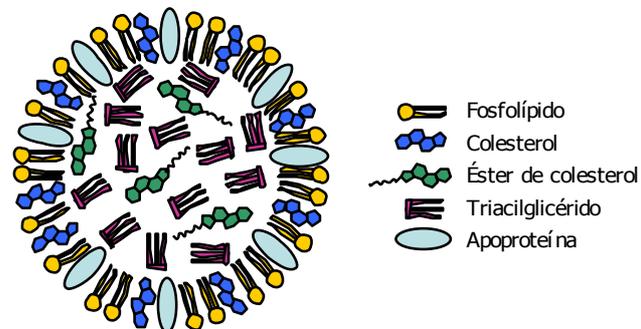


Figura nº 1. Estructura general de una lipoproteína

Las lipoproteínas plasmáticas se clasifican normalmente en cinco subclases principales en base a sus densidades. En la Tabla nº 1 se muestran las características de los distintos tipos de lipoproteínas: los quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Algunas subclases de lipoproteínas pueden ser divididas por la densidad de las partículas, o el tamaño, la carga eléctrica, o el contenido de apolipoproteína.

Tabla nº 1. Lipoproteínas del plasma humano: propiedades físicas, contenido lipídico y apolipoproteínas

	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Origen	Intestino	Hígado	Lipólisis de VLDL	Lipólisis de VLDL, via IDL	Hígado, intestino; lipólisis de CM y VLDL
Densidad (g/ml)	<0,96	0,96-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
Diámetro (nm)	75-1200	30-80	25-35	22-28	5-12
Composición (%)					
Triglicéridos	86	55	23	6	5
Fosfolípidos	7	18	19	22	33
Colesterol éster	4	12	29	42	17
Colesterol libre	2	7	9	8	5
Proteínas	2	8	19	22	40-55
Principales apolipoproteínas	A-I, A-IV, B-48, C, E	B-100, C, E	B-100, C, E	B-100	A-I, A-II, C, E

QM= quilomicrones; VLDL= lipoproteínas de muy baja densidad; IDL= lipoproteínas de densidad intermedia; LDL= lipoproteínas de baja densidad; HDL= Lipoproteínas de alta densidad.

A.2. Metabolismo de las lipoproteínas

(Mathews *et al.*, 2000; Palou *et al.*, 2005)

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

a) Vía exógena: transporta los lípidos de la dieta desde el intestino a sus diferentes destinos metabólicos en diversos tejidos. Los ácidos grasos, colesterol y fosfolípidos que provienen del intestino son ensamblados en los QM que contienen la apolipoproteína (apo) B-48 sintetizada en el intestino; esta es una apoproteína B más corta que la B-100 de origen hepático. Los QM además contienen apo A-I, A-II y A-IV y son vertidos desde el intestino a la linfa para alcanzar luego el torrente sanguíneo. En la circulación son hidrolizados por el sistema de la lipoprotein lipasa (LPL) del endotelio vascular. Los QM a medida que circulan van perdiendo triglicéridos y van haciéndose más pequeños y densos, enriqueciéndose más en colesterol, transformándose en QM remanentes. Adquieren a su vez desde las HDL apo C-II que es el activador de la LPL y apo E que es imprescindible para la unión a receptores hepáticos que no reconocen a la apo B48 al no contener la región para ser reconocida por el receptor. Estas partículas son retiradas de la circulación por el hígado utilizando los receptores para LDL y en menor proporción por un sistema de receptores distinto denominados LRP-1 (*LDL receptor-related protein*) el que actúa en conjunto con el proteoglicano de superficie celular. Casi todos los triglicéridos que son transportados por los QM son utilizados en los tejidos extrahepáticos, mientras que casi todo el colesterol es entregado al hígado. Una pequeña proporción de los remanentes de QM son extraídos por tejidos periféricos.

b) Vía endógena: es un sistema mediado por apo B-100 de síntesis hepática que forma parte de la estructura de las VLDL, IDL y LDL. Esta vía se inicia en el hígado donde primero se ensamblan y luego se secretan las VLDL. La síntesis hepática de estas lipoproteínas aumenta con la ingestión de grasa e hidratos de carbono. Las VLDL transportan triglicéridos hacia los tejidos

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

esterificado de nuevo por la acil-CoA-colesterol aciltransferasa (ACAT) para el almacenamiento intracelular

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

En la Figura nº 2 se observa la compleja interacción entre lípidos, lipoproteínas, apoproteínas, enzimas y receptores.

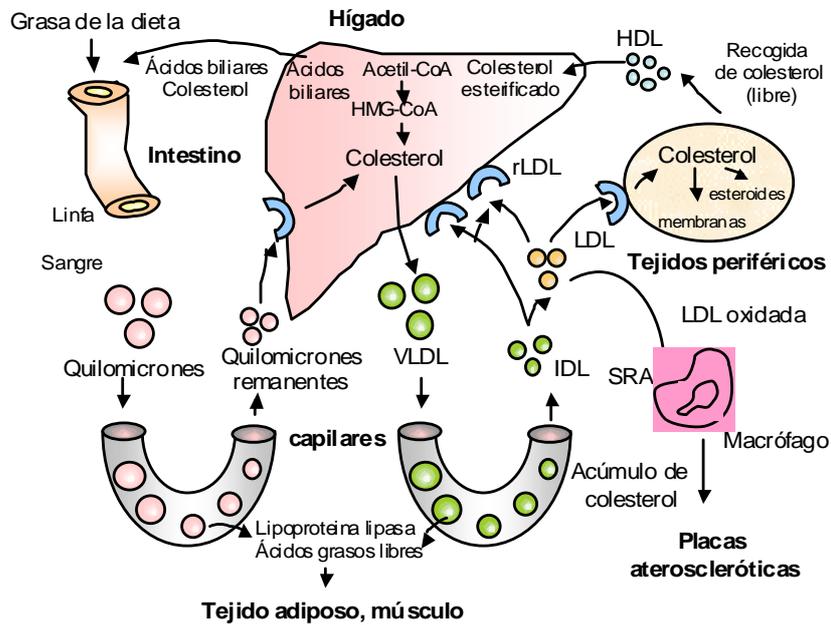


Figura nº 2. Metabolismo del colesterol

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; SRA: receptor scavenger o receptor de las LDL acetiladas; rLDL: receptor de las LDL.

B. Riesgo cardiovascular asociado con el perfil lipídico

La enfermedad cardiovascular (ECV) es un término general que abarca una gran variedad de estados patológicos como la enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca. Ésta es responsable colectivamente de 17,1 millones de muertes cada año, según datos de la Organización Mundial de la Salud. La etiología de la cardiopatía coronaria es atribuible en gran medida a la aterosclerosis, o la acumulación de placas en las paredes de los vasos sanguíneos como consecuencia de la deposición de colesterol y células espumosas. El aumento de la deposición de células espumosas conduce a un estado inflamatorio caracterizado por la oxidación de lípidos y eventual ruptura de los trombos, probablemente bloqueando el flujo sanguíneo a través de los vasos afectados y que conduce a las manifestaciones características de la enfermedad coronaria, infarto de miocardio y la angina de pecho.

Debido a la gran influencia que tiene la enfermedad coronaria en la salud humana, ésta se ha convertido en el foco de una gran cantidad de investigaciones. El aumento de incidencia de enfermedad coronaria se asocia con una serie de factores, tales como la inactividad física, el tabaquismo y la obesidad, así como factores lipídicos, tales como niveles bajos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), niveles elevados de triglicéridos y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL). De estos factores, un nivel elevado de c-LDL ha sido ampliamente aceptado, desde hace años, como el más importante para el desarrollo de enfermedad coronaria (Lloyd-Jones *et al.*, 2010; National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002) y, por lo tanto, los tratamientos terapéuticos dirigidos a reducir el c-LDL son de suma importancia.

Las partículas de LDL son las responsables del transporte de la mayoría de colesterol plasmático en humanos (Galeano *et al.*, 1998), éstas son eliminadas por el hígado, proceso facilitado por la interacción de la proteína apo B de las LDL con receptores de LDL del hígado. Sin embargo, cantidades significativas de esta lipoproteína todavía pueden interactuar con otros tejidos de forma independiente a los receptores de LDL, de ahí la naturaleza aterogénica de las LDL en tejidos extrahepáticos (Galeano *et al.*, 1998).

Las partículas de LDL son heterogéneas en términos de tamaño, densidad y propiedades físicas, concretamente las partículas LDL pequeñas y densas se han asociado recientemente con un mayor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria, incluso en presencia de una concentración de c-LDL relativamente normal (St Pierre *et al.*, 2001). Estudios cinéticos han demostrado que las partículas VLDL grandes son las precursoras de las LDL pequeñas y densas, y que el largo tiempo de residencia de las VLDL favorece el intercambio de lípidos (Taskinen *et al.*, 2001). En el metabolismo (figura nº 3), los ésteres de colesterol permanecen en el corazón de las partículas de LDL, pero parte de los ésteres de colesterol se transfieren por acción de la CETP a las VLDL mediante su intercambio con triglicéridos. Como consecuencia las partículas de LDL, se enriquecen en triglicéridos, los cuales son mejor substrato para la LH (Packard y Shepherd, 1997; Chapman *et al.*, 1998; Rajman *et al.*, 1999; Marais, 2000). A continuación, la LH remodela las LDL grandes mediante la hidrólisis de triglicéridos de su parte central y de fosfolípidos de su superficie, para convertirlas así en partículas más pequeñas y densas (Packard y Shepherd, 1997; Chapman *et al.*, 1998; Rajman *et al.*, 1999; Marais, 2000). Estas partículas se concentran con mayor facilidad en la pared arterial, son más propensas a la oxidación y tienen una menor afinidad para los receptores LDL (Berneis y Krauss, 2002, Galeano *et al.*, 1998, Tribble *et al.*, 1995). Por otra parte, la modificación oxidativa de los lípidos asociados a LDL es un iniciador directo de la aterogénesis (Figura nº 3) (Rizzo *et al.*, 2009).

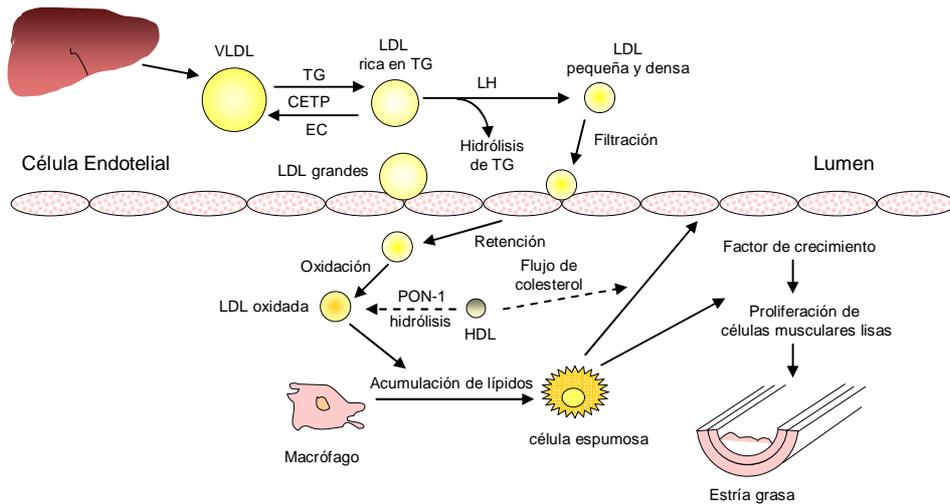


Figura nº 3. Esquema de la formación de las LDL pequeñas y densas y de la hipótesis de la "oxidación de las LDL" en la aterogénesis.

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; TG: triglicéridos; EC: ésteres de colesterol; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; LDL: lipoproteínas de baja densidad; LH: lipasa hepática; PON1: paroxonasa-1; HDL: lipoproteínas de alta densidad.

Mediante la alimentación se pueden modificar varios factores de riesgo de aterosclerosis, como la obesidad y la dislipidemia. Los componentes mayoritarios de la dieta que aumentan las concentraciones de colesterol total y c-LDL son los ácidos grasos saturados, los ácidos grasos trans y, en menor grado, el colesterol de la dieta. Por otra parte, los factores dietéticos que reducen el c-LDL incluyen los ácidos grasos monoinsaturados y polinsaturados, y en menor grado el uso de fibra soluble. El sobrepeso y la inactividad física pueden aumentar el riesgo de enfermedad coronaria debido en parte a su asociación con concentraciones bajas de c-HDL, mientras que la sustitución de hidratos de carbono por grasa, especialmente ácidos grasos monoinsaturados, aumenta las concentraciones de c-HDL.

Los experimentos realizados en unidades metabólicas y en estudios bien controlados durante cortos periodos han demostrado que las dietas bajas en grasa saturada y colesterol reducen las concentraciones de colesterol de un 10 a un 15%. Sin embargo, en la mayoría de la población los consejos dietéticos reducen los niveles de colesterol sólo un 5% (Tang *et al.*, 1998). Estas diferencias se deben principalmente a un pobre cumplimiento de los consejos dietéticos debido a la dificultad, la mayoría de las veces, en hacer los cambios necesarios en la dieta y en mantener una buena adherencia durante periodos prolongados.

Por estos motivos, y por el hecho de que en un determinado grupo poblacional el tratamiento farmacológico no está prescrito o en ocasiones se requiere la adición de otros fármacos con el consiguiente aumento de efectos secundarios (Katragadda *et al.*, 2010), para alcanzar los niveles óptimos recomendados, la industria alimentaria ha desarrollado alimentos funcionales enriquecidos con esteroides vegetales que han demostrado una reducción significativa de los niveles de colesterol total y c-LDL haciendo de este tipo de productos una alternativa cada vez más atractiva para la población general.

C. Esteroles vegetales

C.1. Definición y estructuras de los esteroides vegetales

Los esteroides vegetales (EV) representan un grupo de compuestos alcohólicos de 28 o 29 carbonos (C) que pertenecen a la familia de los triterpenos. Presentan una estructura muy similar a la del colesterol, pero con pequeñas variaciones en la cadena hidrocarbonada lateral, como la adición de algún grupo alquilo (metilo o etilo) en posición 24 (C-24) y, menos frecuentemente, una insaturación en el C-22. Se trata de compuestos bioactivos que actúan como componentes estructurales de las membranas vegetales a la vez que sirven de intermediarios para la biosíntesis de celulosa y numerosos productos vegetales secundarios, como los alcaloides (Peng *et al.*, 2002; Read *et al.*, 2002).

Dentro del grupo de los EV pueden distinguirse dos categorías, los fitosteroides, con un doble enlace en posición 5, y los fitostanoles que no cuentan con este doble enlace (Ostlund, 2002). Los fitosteroides pueden ser convertidos a fitostanoles por hidrogenación química. Ya que de modo natural los fitostanoles son mucho menos abundantes que los fitosteroides en los alimentos, cuando se indica, en términos generales, "esteroides vegetales" se suele hacer referencia a estos últimos.

Se han descrito más de 200 estructuras diferentes de EV en diferentes especies de plantas, siendo la más abundante la correspondiente al sitosterol o beta-sitosterol (24- α -etilcolesterol), seguido por el campesterol (24- α -metilcolesterol) y el estigmasterol (Δ^{22} , 24- α -etilcolesterol) (Ostlund, 2007). En la figura nº 4 se muestran las estructuras de los principales esteroides vegetales.

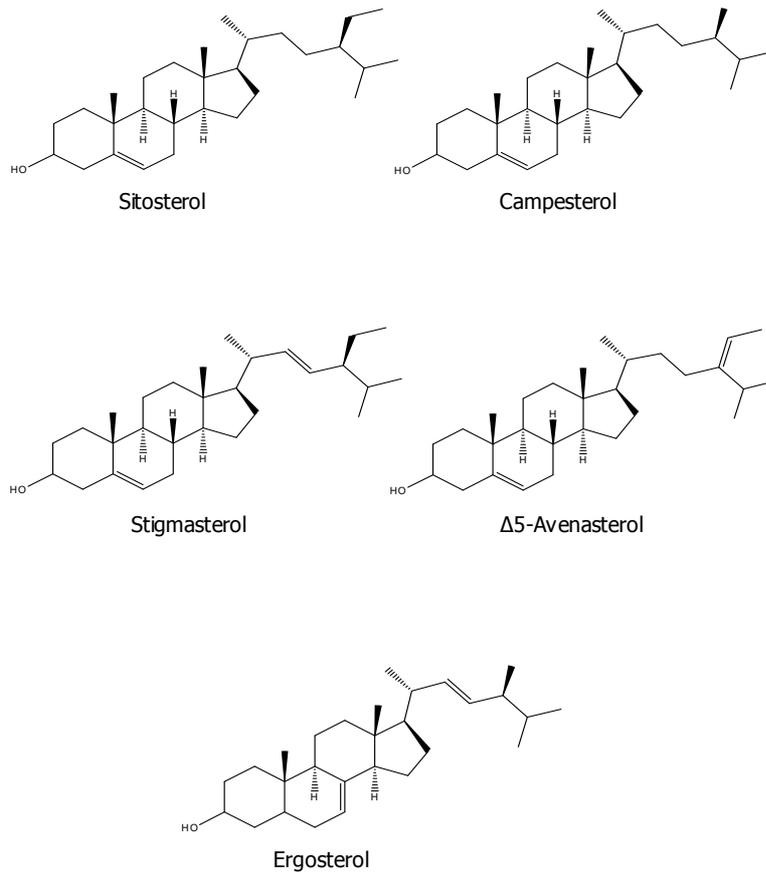


Figura nº 4. Estructura de los principales esteroides vegetales.

En la naturaleza, además de en su forma libre, los esteroides vegetales pueden encontrarse como derivados en los cuales un grupo hidroxilo ($3\beta\text{-OH}$) del esteroide es esterificado, bien por ácidos grasos, ácido ferúlico, o bien está glicosilado con una hexosa (normalmente glucosa) (Palou *et al.*, 2005). En la figura nº 5 se indican las modificaciones del grupo 3β -hidroxilo de los esteroides vegetales.

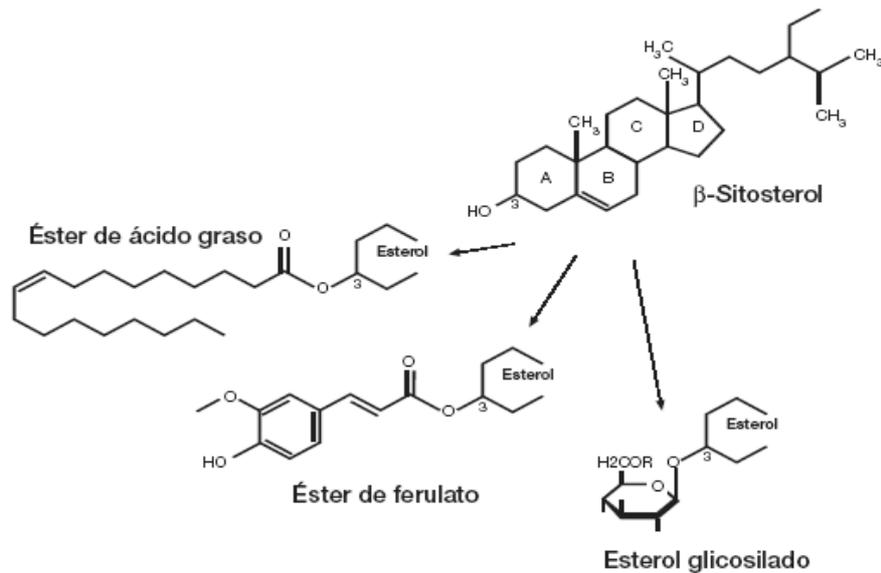


Figura nº 5. Modificaciones del grupo 3β-hidroxilo de los esteroides vegetales (Palou *et al.*, 2005).

Los ésteres con ácidos grasos están presentes en la mayoría de las plantas y constituyen cerca del 50% del total de EV en algunos alimentos, como el aceite de maíz (Kochhar, 1983); por su parte, los ésteres de ácido ferúlico también se encuentran en cantidades apreciables en muchos alimentos (Ostlund *et al.*, 2002a), mientras que los esteroides vegetales glicosilados son un componente minoritario en los alimentos vegetales, salvo algunas excepciones. Al contrario que los esteroides o estanoles libres que son cristalinos y muy poco solubles en medios lipídicos, las formas esterificadas se disuelven fácilmente en alimentos que contengan una matriz grasa (Clifton, 2002).

C.2. Biosíntesis

La biosíntesis y el metabolismo de los esteroides es bastante diferente en plantas y animales (Ostlund, 2002). En los animales, el colesterol es sintetizado

a partir del acetato a través del escualeno, compuesto de cadena lineal que luego es ciclado para dar lugar a muchos intermediarios precursores de esteroides, pero el producto final es principalmente colesterol puro, de tal forma que en los humanos tan sólo se encuentran cantidades traza de productos relacionados (Miettinen *et al.*, 1990). El organismo humano no puede sintetizar otro tipo de esteroles, por lo que la presencia en plasma de EV se debe al aportado por los alimentos ingeridos.

En los vegetales, los esteroides son sintetizados también a partir de acetato a través de escualeno, pero el primer producto ciclado tras el escualeno es el cicloartenol. La estereoquímica del C-24 viene determinada por la acción de la metiltransferasa particular que convierte el cicloartenol en 24-metilen cicloartenol (Moreau *et al.*, 2002).

Algunos alimentos, como el arroz, contienen cicloartenol o compuestos relacionados en cantidades significativas (Rogers *et al.*, 1993). A partir de este compuesto las plantas producen una diversidad de productos derivados, de tal manera que cada especie dispone de perfiles de esteroides característicos. Aunque se producen modificaciones en el núcleo de esteroles, la mayoría de los EV presentan un núcleo que es idéntico al colesterol, con cambios en la cadena lateral. Por otra parte, si bien en los animales la mayor parte del colesterol se presenta en forma libre, con una cierta proporción en forma de ésteres con ácidos grasos en las lipoproteínas y células especializadas, las plantas, tal como se ha comentado, disponen de una mayor variedad de derivados de EV en la posición C-3: ésteres de ácidos grasos, ésteres de ácido ferúlico y esteroides vegetales glicosilados.

C.3. Fuentes

A pesar de que los alimentos funcionales enriquecidos en EV, comercialmente disponibles, tales como margarina, leche, o leche fermentada, son los alimentos con más riqueza en estos compuestos, prácticamente todos los alimentos vegetales contienen cantidades apreciables de los mismos (Patel *et al.*, 2006). La ingesta dietética habitual de EV varía entre las distintas poblaciones, dependiendo de sus hábitos alimentarios, siendo las principales fuentes dietéticas los aceites vegetales (maíz, girasol, soja y colza) que contienen entre un 0,1% y 0,8%. También se encuentran en legumbres (0,2%) y, en menor proporción, en frutos secos, pan y hortalizas (Palou *et al.*, 2007).

Los EV no se ven afectados al cocinar los alimentos que los contienen, sin embargo, el proceso de refinado de aceites vegetales, sí que puede reducir su contenido entre un 10% y 70% (Ellegard *et al.*, 2007).

En las dietas occidentales, la ingesta diaria de EV se estima entre 150-400 mg, aproximadamente la misma que la ingesta de colesterol, siendo mayor en algunas dietas vegetarianas y en la dieta japonesa, en las cuales puede llegar a 300-500 mg/día (Hirai *et al.*, 1986; Morton *et al.*, 1995).

Excepto los productos de origen animal y los alimentos muy refinados, ricos en hidratos de carbono, casi todos los alimentos contribuyen a la ingesta de EV. Los aceites son el principal contribuyente (39,3%), seguido de los cereales (29,6%), frutas (12,2%), legumbres (9,1%), verduras y hortalizas (7,3%), y, por último, los frutos secos (2,4%). Los EV del aceite son los que presentan mayor biodisponibilidad (Thurnham, 1999). Así, una persona que consumiera al día 30 g de aceite de maíz estaría ingiriendo alrededor de 300 mg de EV, cantidad que influye en la reducción de la absorción de colesterol

(Ostlund et al., 2002a) como se comentará más adelante. Una excepción es el aceite de palma, que tras el proceso de refinado es muy pobre en EV.

Entre los EV aportados con la dieta, también están presentes los fitostanoles, concretamente pueden citarse como fuentes los aceites vegetales hidrogenados y los cereales (MacMurray y Morrison, 1970; Dutta y Appelqvist, 1996; Schuhmann y Schneller, 1996). Parece que los fitostanoles suponen alrededor de un 10% de la ingesta total de EV.

Jiménez *et al.* (2006), determinaron la composición y contenido de EV en distintos alimentos de origen vegetal comúnmente consumidos en España y, con los datos de consumo de alimentos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación español (MAPA, 2001), estimaron la ingesta promedio en fitosteroles de la población española de 375 mg/persona/día.

Entre los EV identificados, el β -sitosterol es el que más contribuye a la ingesta total (79,7%), seguido por el campesterol (9,5%), estigmasterol (6,8%), y estigmastanol (4,1%) (Jiménez *et al.*, 2006).

C.4. Efectos sobre la absorción de colesterol

C.4.1. Digestión y absorción del colesterol

El colesterol plasmático proviene de dos fuentes principales: el alimento ingerido (colesterol exógeno) y el sintetizado en el hígado (colesterol endógeno).

La ingesta diaria de colesterol puede variar desde 250 hasta 500 mg, o más en algunos casos. Entre un 95-98% del colesterol ingerido se encuentra

esterificado por ácidos grasos en el -OH del C-3. Generalmente, los ácidos sustituyentes son el ácido palmítico, esteárico, oleico y, en menor proporción, linoleico.

El páncreas secreta hacia el intestino delgado colesterol esterasa que hidroliza prácticamente el 100% de los ésteres de colesterol con la ayuda de las sales biliares, cuyos componentes actúan como activadores de la enzima (Huff, 2003). El colesterol libre que se encuentra en el lumen intestinal durante el proceso digestivo está constituido por el colesterol dietético (250-500 mg/día) y por el colesterol procedente de la secreción biliar (600-1000 mg/día). El colesterol libre se incorpora a unas micelas mixtas, quedando solubilizado en la fracción fosfolipídica que forma la superficie de estas estructuras micelares. Estas micelas que contienen además ácidos grasos libres, monoglicéridos, fosfoglicerato y sales biliares, se acercan al borde en cepillo de las microvellosidades del epitelio intestinal donde la turbulencia del contenido intestinal es muy baja y, al contacto con la membrana, transfieren su contenido al interior del enterocito; así, es bien conocido que los ácidos grasos y los monoglicéridos son transportados activamente hacia el interior de la célula intestinal, mientras que los mecanismos moleculares implicados en la absorción del colesterol desde el lumen intestinal a las células del epitelio son aún poco conocidos. Sin embargo, recientemente se ha caracterizado una proteína identificada como Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1) que desempeña una función clave en el transporte de esteroides al enterocito (Altmann *et al.*, 2004). Se estima que aproximadamente un 50% del colesterol se reabsorbe y el resto se elimina por heces. Debe destacarse que la única vía de eliminación del colesterol es la intestinal.

El colesterol absorbido se reesterifica de nuevo en el enterocito (participa la enzima ACAT) y se incorpora a la estructura de los quilomicrones exportándose al torrente circulatorio (Chen, 2001). El colesterol que no es

reesterificado, se secreta de nuevo al lumen intestinal a través del transportador ATP Binding Cassette tipo (ABC) 5/8 (Repa y Mangelsdorf, 1999).

C.4.2. Efecto hipocolesterolemiante de los esteroides vegetales: Mecanismo de acción

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, la absorción del colesterol no se limita a la ingesta dietética de colesterol, sino que el colesterol dietético y el procedente de la secreción biliar, se mezclan en el intestino y son parcialmente absorbidos (Grundy, 1983). Por tanto, el fallo o disminución de la reabsorción intestinal del colesterol es la principal vía de eliminación de colesterol del organismo.

El mecanismo mediante el cual los EV (fitosteroides y fitostanoles) ejercen su efecto hipocolesterolemiante no está totalmente elucidado (Nguyen, 1999). Sin embargo, basándose en sus propiedades fisicoquímicas, se ha postulado que estas sustancias actúan a tres niveles diferentes (Valenzuela y Ronco, 2004):

- a) inhiben la absorción del colesterol a nivel intestinal, tanto del procedente de la dieta como del de origen biliar (Jones *et al.*, 1997).
- b) inhiben la reesterificación del colesterol a nivel de la actividad de la ACAT.
- c) aumentan la actividad y expresión del transportador de tipo ABC, acelerando el eflujo de colesterol desde las células intestinales al lumen intestinal (Plat y Mensink, 2002a).

Debido a que los fitosteroides/fitostanoles son más lipófilos que el propio colesterol, propiedad derivada de las características de mayor longitud y complejidad de la cadena lateral, éstos desplazarían competitivamente al colesterol desde la micela mixta formada por la acción de los fosfolípidos y de las sales biliares en el lumen intestinal (Valenzuela *et al.*, 1997). Si los EV se

administran en forma de ésteres, éstos, son primero hidrolizados por la lipasa pancreática y posteriormente son incluidos en las micelas; este proceso ocurre de modo eficiente (Nissinen *et al.*, 2002).

Armstrong (1987) demostró que el β -sitosterol muestra mayor afinidad por incorporarse a las micelas que el colesterol, es decir, la incorporación del sitosterol a las micelas está favorecida. Este efecto se observó en aquellas micelas que contenían la sal biliar de trihidroxi taurocolato y no en las que contenían trihidroxi glicodeoxicolato, sugiriendo que la distribución de las sales biliares presentes en el intestino podría ser importante en la determinación de la efectividad de los EV en la reducción de la absorción de colesterol.

De esta forma, al contactar la micela mixta con el borde en cepillo formado por las microvellosidades de las células intestinales, los EV ocuparían el lugar del colesterol. El colesterol no emulsionado (desplazado de la micela) no puede ser absorbido y se elimina con las heces. Por su parte, los EV, y más particularmente los fitostanoles, muestran escasa absorción a nivel intestinal, por lo que, durante el proceso de transferencia de los ácidos grasos y monoglicéridos desde la micela mixta a las células intestinales, los EV se liberarían acompañando al colesterol no absorbido, siendo finalmente eliminados vía fecal (Compassi, 1997). Este proceso constituiría el primer nivel de acción de los EV. La absorción intestinal de los fitosteroles es extraordinariamente baja (< 1%) y la de los fitostanoles todavía más baja (Miettinen, 1990). Sin embargo, si los EV se absorben inhiben la ACAT (segundo nivel de acción), con lo cual el colesterol no se reesterifica, y no se incorpora a los quilomicrones de forma eficaz, estimulando así el eflujo del colesterol no esterificado hacia el lumen intestinal. Además, los esteroides producirían sobre-expresión de los genes que codifican las proteínas de la estructura del transportador ABC, acelerando así el eflujo de colesterol (tercer nivel de acción). En la figura nº 6 se resume los posibles mecanismos y niveles de acción de los EV.

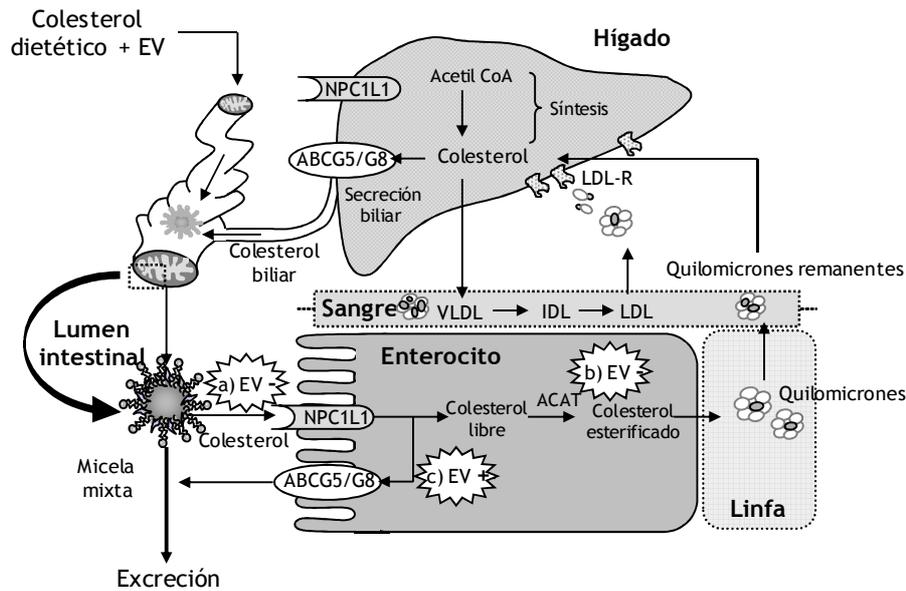


Figura nº 6. Mecanismos y niveles de acción de los fitosteroles y fitostanoles

Los EV que llegan a la circulación sanguínea se esterifican en el plasma y se transportan al hígado mediante el mecanismo de transporte reverso del colesterol (Robins y Fasulo, 1997). Se estima que los EV no actúan en competencia metabólica con el colesterol pues se encuentran en concentraciones plasmáticas muy inferiores al colesterol (Robins y Fasulo, 1997).

Parece que el hígado compensa la reducción de la absorción de colesterol aumentando su síntesis e incrementando, a la vez, los receptores LDL (Ling y Jones, 1995). El efecto es una reducción de los niveles de colesterol total y c-LDL, mientras que los de c-HDL y triglicéridos no se ven afectados, siendo el efecto global, la mejora del perfil lipídico.

C.5. Aspectos clínicos de los esteroides vegetales

El efecto de los EV en la disminución del colesterol se conoce desde los años 50. Hasta la fecha, numerosos estudios han demostrado que los EV disminuyen de manera efectiva el colesterol total y c-LDL aunque el efecto hipocolesterolemizante puede variar dependiendo de muchos factores:

C.5.1. EV ingeridos en una dieta normal

Poco se sabe sobre los efectos de los EV en el metabolismo del colesterol cuando se administra en forma nativa, sin purificar y en las cantidades ingeridas en la dieta. En una población sueca, se ha demostrado una correlación inversa entre la ingesta de EV y los niveles séricos de c-LDL, lo que sugiere la posibilidad de que los EV pueden reducir las concentraciones de colesterol sérico, incluso a los niveles normales de la ingesta alimentaria (Klingberg *et al.*, 2008). Ostlund *et al.* (2003) mostraron que los niveles naturales de EV pueden atenuar la absorción del colesterol, incluso después de una dosis única. Sin embargo, la reducción de la absorción del colesterol no siempre requiere que se obtenga una disminución significativa de c-LDL. En un estudio reciente, se compararon dos dietas diferentes: una dieta pobre en EV (126 mg/día) y otra dieta abundante en EV (449 mg/día). La administración de una dieta rica en EV mostró como resultado una absorción de colesterol más baja y una mayor excreción fecal de colesterol en relación a la dieta pobre en EV a pesar de que la concentración de cLDL fue similar entre ambas dietas (Lin *et al.*, 2010). En otro estudio, Racette *et al.* (2009) obtuvieron resultados similares con una dieta deficiente en EV suplementada con 400 mg/día de EV, la cual no indujo una reducción significativa del c-LDL, pero disminuyó la absorción del colesterol y aumentó tanto el colesterol total de heces como su excreción biliar.

C.5.2. Fitosteroles vs fitostanoles

Los EV pueden ser administrados en dos formas diferentes: los fitosteroles y los fitostanoles. Se debe considerar si existen diferencias entre el potencial terapéutico de cada uno de ellos con el fin de maximizar el efecto reductor del c-LDL. A pesar de que los esteroides y estanoles vegetales tienen una estructura molecular muy similar, tienen diferentes efectos metabólicos y su eficacia a largo plazo parece ser diferente (Miettinen y Gylling, 2006). La absorción de los fitosteroles es mayor que la de los fitostanoles, aunque no parece haber diferencias significativas entre los dos EV en su capacidad para reducir el c-LDL, por lo menos en estudios a corto plazo. Hallikainen *et al.* (2000) demostraron que 2 g/día de ésteres de fitostanoles o ésteres de fitosteroles, como parte de una dieta baja en grasas redujo el c-LDL sin diferencias significativas. De acuerdo con esto, Vanstone *et al.* (2002) encontraron que los fitosteroles y fitostanoles reducen las concentraciones de c-LDL de forma similar en pacientes hipercolesterolémicos con dosis de 1,8 g/día y Weststrate y Meijer (1998) también encontraron este efecto en pacientes con hipercolesterolemia leve y normocolesterolemia.

Se han realizado varios meta-análisis para comparar la eficacia de las dos formas de EV en la reducción del c-LDL. Los datos de un meta-análisis que engloba 41 estudios (Katan *et al.*, 2003), muestra que la reducción del c-LDL de los fitostanoles no fue significativamente diferente de la de los fitosteroles. Este efecto, se estableció principalmente en unas pocas semanas, y se mantuvo estable en un estudio que duró un año (Miettinen *et al.*, 1995; Hendriks *et al.*, 2003). Más recientemente, Talatí *et al.* (2010) realizaron un meta-análisis de ensayos aleatorizados controlados donde compararon la eficacia de los fitostanoles y fitosteroles y concluyeron que la diferencia en la reducción del c-LDL no fue estadísticamente significativa en las dosis estudiadas. Ellos sugieren que ambos EV son igualmente eficaces. Sin embargo, en otro meta-análisis se

concluyó que la reducción del c-LDL, a través de un rango de dosis continua, es dependiente de la dosis de fitostanoles, pero no para la ingesta de fitosteroles. Esto significa que la ingesta de fitostanoles por encima de la dosis recomendada de 2 g/día está asociada con una reducción de c-LDL adicional y dependiente de la dosis, lo cual podría producir una mayor reducción en el riesgo de enfermedad coronaria (Musa Veloso *et al.*, 2011). Esta mayor eficacia se relaciona con el hecho de que los fitostanoles, que presentan una menor absorción que los fitosteroles, permanecen durante más tiempo en la luz intestinal donde interfieren continuamente y de manera más eficiente en la absorción de colesterol (Nguyen, 1999).

Si bien la misma eficacia de ambos tipos de EV a corto plazo es comúnmente aceptada, la igualdad de ambos EV a largo plazo es objeto de debate. Pocos estudios han examinado la eficacia a largo plazo de la suplementación con EV. O'Neill *et al.* (2005) concluyeron en un meta-análisis de 14 ensayos, donde se comparaban ambos ésteres de fitosteroles y fitostanoles, que los ésteres de fitostanoles mantienen su efecto reductor de c-LDL con el tiempo, mientras que los ésteres de fitosteroles no. Sin embargo, sólo tres de estos ensayos comparaban ambos EV y ninguno de ellos llegó a la conclusión de que los fitostanoles fueran superiores. Por otra parte, Gylling *et al.* (2009) demostraron que los ésteres de fitosteroles y de fitostanoles administrados durante más de un año fueron estadísticamente equivalentes en la reducción del colesterol total sérico.

Por último, en conjunto, no parece haber ninguna evidencia para recomendar unos EV sobre otros con el fin de maximizar una reducción sobre el c-LDL; no son posibles conclusiones más firmes debido a que los datos se limitan a estudios individuales y se precisa de más información sobre este asunto a largo plazo.

C.5.3. Dosis y duración de la suplementación

A pesar de la posible implicación de los EV de la dieta en el metabolismo del colesterol, son necesarias dosis suplementarias de EV para lograr una reducción máxima del c-LDL. La mayoría de los ensayos clínicos han encontrado que el consumo diario de alimentos enriquecidos con formas libres o esterificadas de EV reducen las concentraciones séricas de colesterol total, c-LDL y la apo B sin que ello afecte a los triglicéridos o el c-HDL en suero (Law, 2000; Katan *et al.*, 2003; Ellegard *et al.*, 2007; Van Horn *et al.*, 2008; Demonty *et al.*, 2009).

En este contexto, un meta-análisis, que combinó los resultados de 18 ensayos clínicos controlados, encontró que el consumo de untables enriquecidos con un promedio de 2 g/día de EV reducen las concentraciones séricas de c-LDL entre un 9% y un 14% (Law, 2000). Otro meta-análisis examinó los resultados de 41 ensayos clínicos con alimentos enriquecidos con EV por separado. A dosis de, al menos, 2 g/día, ambos EV disminuyeron las concentraciones de c-LDL en un 10% (Katan *et al.*, 2003). Ambos meta-análisis concluyeron que los EV reducen el c-LDL con una disminución máxima de 8-14% dependiendo de la dosis (hasta 2 g EV/día) y un beneficio mínimo más allá de los 2,5 g EV/ día (Law, 2000; Katan *et al.*, 2003). Esto está en consonancia con la dosis de 2,15 g EV/ día calculada a partir de la disminución máxima de 8,8% en el c-LDL mostrado en la curva dosis-respuesta obtenida en el meta-análisis de Demonty *et al.* (2009). El meta-análisis de Moruisi *et al.* (2006), aunque solo incluyó ensayos con sujetos que padecieran hipercolesterolemia familiar, llegó a una conclusión similar, dosis de 2,3 g EV/ día en 6,5 semanas redujo el colesterol total y c-LDL entre un 7-11% y un 10-15%, respectivamente. Si dosis diarias de más de 2,5 g tiene efectos beneficiosos adicionales es una cuestión de controversia. En el meta-análisis publicado por Chen *et al.* (2005) en el que fueron estudiados los resultados de 23 ensayos clínicos controlados, el consumo

de alimentos enriquecidos con una media de 3,4 g EV/día disminuyeron las concentraciones c-LDL en un 11%, que está en el rango de la reducción media producida por una dosis diaria de 2 g. Sin embargo, Musa-Velosa *et al.* (2011) han publicado recientemente un meta-análisis en el que se evalúa la eficacia para reducir el c-LDL de fitostanoles y fitosteroles en un rango de dosis continua. Los autores concluyen que la ingesta de fitostanoles por encima de la dosis recomendada de 2 g/día, se asocia con una reducción adicional y dependiente de la dosis en el c-LDL. Por otro lado, varios estudios sugieren que, si se pretende obtener una reducción clínicamente significativa de c-LDL, la dosis de EV no debe ser inferior a 0,8-1,0 g/día (Pelletier *et al.*, 1995; Hendriks *et al.*, 1999; Sierksma *et al.*, 1999). Dos recientes meta-análisis de los resultados de ensayos controlados aleatorios encontraron que la reducción de c-LDL fueron mayores en pacientes con niveles basales más altos de c-LDL (AbuMweis *et al.*, 2008; Naumann *et al.*, 2008).

El efecto de los EV en el c-LDL se aprecia generalmente durante las primeras 2-3 semanas de la intervención y se mantiene estable en las semanas siguientes (Miettinen *et al.*, 1995; Hallikainen y Uusitupa, 1999); por otra parte, se observa una vuelta a los valores basales de c-LDL un par de semanas después del cese del consumo de EV (Miettinen *et al.*, 1995; Christiansen *et al.*, 2001). Son escasos los estudios realizados con duración superior a 12 semanas, a pesar de que la eficacia a largo plazo de los EV se ha demostrado en más de una ocasión. Después de 6 meses de consumo de 1,5 g/día, ó 3,0 g/día de EV, Christiansen *et al.* (2011) encontraron una reducción significativa en el c-LDL del 11,3% y 10,3%, respectivamente, que no varió con la dosis administrada. Esto está de acuerdo con la reducción del 11,0% observada en otro estudio en el que se ingirieron 1,5 g EV/día en el mismo período de tiempo (Amundsen *et al.*, 2004). Muy pocos estudios han evaluado si el efecto hipocolesterolémico de los EV se prolonga hasta un año. Un estudio de pacientes que reciben sitostanol a una dosis de 1,8 g/día durante los primeros 6 meses y 2,6 g/día durante los

siguientes 6 meses resultó en una media de reducción anual de colesterol sérico de 10,2% y de c-LDL de 14,1% (Miettinen *et al.*, 1995). Hendriks *et al.* (2003) obtuvieron que el consumo de 1,6 g EV/día baja el colesterol total y c-LDL durante el período de un año en un promedio del 4% y 6%, respectivamente. En un estudio a largo plazo de 85 semanas (De Jong *et al.*, 2008a), el consumo de ésteres de fitosteroles y de fitostanoles redujo el c-LDL en un 8,7% y 13,1%, respectivamente. En un estudio de 5 años, el uso de EV, sin una dieta controlada, produjo efectos beneficiosos en los niveles de colesterol (Wolf *et al.*, 2006). Al examinar los datos disponibles en la literatura, es evidente que los efectos reductores del colesterol de los EV no varían con la duración del tratamiento, a pesar de los posibles efectos secundarios a largo plazo, por lo que este consumo debe ser evaluado en estudios futuros.

C.5.4. Frecuencia en el consumo diario

Otro factor que puede afectar a la eficacia de los EV en la reducción del c-LDL es el número de porciones consumidas durante el día. Hasta ahora, sólo dos estudios han comparado directamente los efectos de los EV consumidos una vez al día en comparación con la ingesta en 3 veces/día junto con las comidas. Plat *et al.* (2000a) compararon los efectos de 2,5 g de fitostanoles consumidos durante 4 semanas no mostrando diferencias significativas entre las dos frecuencias, mientras que AbuMweis *et al.* (2009) compararon los efectos de la suplementación de 1,8 g de EV durante 6 días y llegaron a la conclusión que para obtener mejores efectos en la reducción de colesterol, los EV se deben consumir en pequeñas dosis administradas con mayor frecuencia, en lugar de una sola dosis. Sin embargo, cabe señalar que la duración del período experimental no ha tenido tiempo suficiente para que la frecuencia de dosis-efecto se manifieste.

Muchos de los estudios que utilizan diferentes matrices en las que se evaluó la ingesta de una vez por día de EV encuentran una reducción significativa del c-LDL. Cuando se incorporaron ésteres de EV de soja a la carne picada, el colesterol total y c-LDL se redujeron en un 9,3% y 14,6%, respectivamente (Matvienko *et al.*, 2002). Cuando se incorporaron EV libres a una leche baja en grasa y se consumió durante 6 semanas, la reducción de c-LDL fue superior al 10% (Plana *et al.*, 2008). La eficacia hipocolesterolemia de un yogur que contiene ésteres de fitostanoles también se evaluó durante 3 semanas. Después de este período, los autores encontraron reducciones significativas del colesterol total y c-LDL (Algorta Pineda *et al.*, 2005). Sin embargo, otros datos demuestran que una dosis única por la mañana no baja el colesterol total y c-LDL (AbuMweis *et al.*, 2006). Un meta-análisis de AbuMweis *et al.* (2008) demostró que el momento de la ingesta de una dosis única de EV puede afectar su acción para reducir el colesterol; así, el consumo de una dosis única con el almuerzo o la comida principal bajó los niveles de c-LDL, pero no antes o con el desayuno. En la determinación de la dosis de la curva de descenso de c-LDL en el meta-análisis realizado por Demonty *et al.* (2009), se estudió la posibilidad de un efecto dosis-frecuencia en la reducción del c-LDL. Cuando se comparó el consumo de dosis múltiples de EV frente a la dosis única, el descenso del c-LDL con dosis múltiples no fue significativamente mayor que una sola dosis. Sin embargo, esta frecuencia de dosis-efecto podría estar confundida por la dosis porque los tratamientos de dosis múltiples tienden a administrar mayores dosis en comparación con los ensayos de dosis única (Demonty *et al.*, 2009).

Basado en el principal mecanismo de acción de los EV, se podría plantear la hipótesis de que múltiples ingestas diarias, favorecen la presencia de colesterol, EV y ácidos biliares en el intestino en varias ocasiones al día, dando lugar a una mayor eficacia que una dosis única. En la eficacia de los EV se pudo demostrar una variación en la hora del día, posiblemente coincidiendo con el

ritmo diurno del metabolismo del colesterol (Cella *et al.*, 1995). Por otra parte, la síntesis de ácidos biliares en el organismo humano también tiene un ritmo diurno que se encuentra en contraste directo con el ritmo diurno de la síntesis de colesterol (Galman *et al.*, 2005). Por lo tanto, hasta que se esclarezcan los mecanismos por el que los EV reducen los niveles de c-LDL, en particular en el caso de una sola dosis, y hasta que más estudios clínicos, adecuadamente controlados confirmen los resultados obtenidos hasta ahora con la administración de una vez al día de EV, se recomienda su consumo en dos o tres porciones por día.

C.5.5. Matriz alimentaria

En la última década, el mercado mundial de alimentos enriquecidos con EV se ha ido ampliando y diversificando. Los primeros productos alimenticios utilizados como agentes hipocolesteroemiantes presentaban un alto contenido en grasas, como la margarina, que debido a sus propiedades lipofílicas, fueron utilizados para introducir un agente reductor del colesterol. Sin embargo, esta propiedad generó una paradoja ya que los productos ricos en grasa no son la mejor opción en una dieta saludable. Por esta razón, la industria alimentaria ha desarrollado nuevas tecnologías que permiten mejorar la solubilidad de los EV en alimentos de bajo contenido graso. Recientemente, se ha evaluado la eficacia de los EV incorporados en alimentos de bajo contenido en grasa, tales como los productos lácteos. En contraste con las matrices de alto contenido en grasa, los alimentos bajos en grasa son fáciles de incluir en una dieta saludable y poseen una eficacia similar (Abumweis *et al.*, 2008).

Los EV se han incorporado en matrices de alimentos diversos y se han probado bajo muchas dietas diferentes como terapias para disminuir la

colesterolemia. En concreto, los EV han bajado de forma variable pero efectiva el c-LDL cuando se incorporan a las grasas para untar, bebidas a base de leche fermentada, leche baja en grasa, mayonesa, aderezos para ensaladas, aceites vegetales, chocolate, zumo de naranja, jugo de verduras, queso, queso fresco, carne picada, magdalenas, croissants, pan, refrescos, frituras de maíz, bebidas sin grasa, cereales, así como, en forma de cápsulas y comprimidos (Demonty *et al.*, 2009). La eficacia de los EV parece ser independiente del porcentaje de grasa en la dieta; por lo tanto, actualmente existe una tendencia de incorporar los EV en alimentos bajos en grasa con el fin de promover una dieta baja en grasa y poder conseguir perfiles de lípidos saludables (Chen *et al.*, 2009).

A pesar de la variabilidad de la eficacia de los EV en matrices de alimentos diversos, el meta-análisis de Demonty *et al.* (2009) llegó a la conclusión de que ni el contenido de grasa de los alimentos, ni la naturaleza de los mismos, como lácteos o productos no-lácteos, afectó significativamente la eficacia de los EV en la disminución del c-LDL. Sin embargo, la comparación entre alimentos sólidos y líquidos demostró un efecto significativo sobre la curva dosis-respuesta, lo que indica que las altas dosis de EV (>2 g/día) en matrices sólidas daría mayores reducciones de c-LDL que en los alimentos líquidos (Demonty *et al.*, 2009).

Por el contrario, el meta-análisis de AbuMweis *et al.* (2008) concluyó que la reducción de la concentración de c-LDL dependía del contenido de grasa y la forma física de los diferentes alimentos utilizados para la administración de EV. Estos autores clasificaron los 59 estudios considerados en cuatro grupos: a) grasas para untar, b) mayonesa y aderezos para ensaladas, c) leche y leches fermentadas y d) otros (incluido el chocolate, barritas de cereales, bebidas, jugos, carne y productos horneados). La incorporación de los EV en los untables, mayonesa / aderezo para ensaladas o leche o leches fermentadas se asoció con una mayor eficacia en la reducción del c-LDL, lo que sugiere el importante papel de la matriz alimentaria que afecta a la reducción del colesterol. En esta línea, previamente Clifton *et al.* (2004) habían demostrado

que los ésteres de EV tienen capacidades muy diferentes para reducir c-LDL cuando se incorporan a diferentes matrices de alimentos bajos en grasa: leche > pan > yogur = cereales para el desayuno. En particular, se demostró que la leche baja en grasa fue casi tres veces más eficaz que el pan o los cereales de desayuno.

El impacto de las diferentes matrices alimentarias sobre el efecto hipocolesterolemizante de los EV aún no ha sido completamente esclarecido. Aunque está ampliamente aceptado que las matrices grasas tradicionales tienen una eficacia comparable, es un asunto controvertido si las matrices de bajo contenido en grasa, sin grasa, o incluso si las matrices no alimentarias pueden ser viables para obtener una dosis eficaz de EV. Así, son necesarios más estudios para identificar la formulación adecuada de EV que mejore su eficacia en los distintos productos alimentarios de aquellos con alto contenido de grasa.

C.5.6. Otros efectos potenciales

Aunque la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en demostrar que los EV reducen los niveles plasmáticos de colesterol, también se ha comprobado que los EV pueden controlar ciertas enfermedades si se ingieren en las cantidades necesarias para disminuir la colesterolemia.

Se dispone de pruebas experimentales y epidemiológicas que indican que los EV pueden ser un factor protector frente a ciertos tipos de cáncer de colon, mama y próstata (De Jong *et al.*, 2003; Bradford *et al.*, 2007). Este efecto protector se basaría en una serie de mecanismos que incluyen efectos sobre la estructura y función de la membrana en las células tumorales y del huésped, vías de transducción de señales que regulan el crecimiento del tumor y apoptosis, función inmunitaria del huésped, y metabolismo del colesterol del

huésped (Awad *et al.*, 2003). Por otra parte, también pueden aumentar la actividad de enzimas antioxidantes y por lo tanto reducir el estrés oxidativo asociado a esta patología (Woyengo *et al.*, 2009).

También se han descrito algunos beneficios para los síntomas urinarios asociados a la hiperplasia benigna de próstata, aunque pocos estudios han evaluado la eficacia de los EV en hombres sintomáticos de la hiperplasia prostática benigna (Berges *et al.*, 2000).

Varios estudios sugieren que los EV también ejercen acciones como inmunomoduladores y tienen efectos sobre las citoquinas pro-inflamatorias. Los efectos anti-inflamatorios se han demostrado en algunos estudios donde la proteína C reactiva de alta sensibilidad se redujo en un 12-17% (Devaraj *et al.*, 2006; Athyros *et al.*, 2011). Aunque estos efectos no se han visto en otros estudios donde el consumo de EV no cambió los niveles séricos de proteína C reactiva de alta sensibilidad (Houweling *et al.*, 2009).

C.6. Influencia individual en la eficacia de los esteroides vegetales

Se han observado grandes variaciones sobre los efectos del consumo de EV en las concentraciones de c-LDL entre los distintos estudios y sujetos (Katan *et al.*, 2003). Estas variaciones no sólo pueden deberse a diferencias en los diseños experimentales, sino también a las diferencias en las características basales de los sujetos. Se han estudiado varios modificadores potenciales del efecto de la suplementación de EV en la reducción de los niveles de c-LDL, como son los niveles basales de c-LDL, la dieta, la absorción de colesterol y el perfil genético.

Por otra parte, la identificación de los modificadores de la acción de EV en la reducción del colesterol ayudará a los individuos que puedan beneficiarse más de esta intervención.

C.6.1. Ingesta de colesterol

A los pacientes con hipercolesterolemia se les aconseja limitar su consumo de grasas saturadas y colesterol dietético para reducir la concentración de c-LDL. Sin embargo, poco se sabe si la ingesta de colesterol influye en la eficacia de los EV.

El aporte de colesterol con la dieta acompañado del tratamiento de EV puede alterar el efecto inhibitor de los EV en la absorción del colesterol ya que se ha sugerido que el aumento de la ingesta de colesterol con la dieta puede mejorar la eficacia de los EV. De hecho, la administración de EV a jerbos alimentados con diferentes niveles de colesterol mostró una interacción entre el colesterol de la dieta y la actividad de los EV (Hayes *et al.*, 2002). En los seres humanos, la eficacia de los EV para reducir el colesterol se ha estudiado de forma independiente a niveles altos o bajos de ingesta de colesterol, con reducciones similares en el c-LDL y colesterol total. Se observaron reducciones del 4% al 9% en el colesterol total y del 8% al 16% en el c-LDL tras la administración de diferentes dosis de EV en una dieta baja en colesterol (135-300 mg/día) (Jones *et al.*, 2000; Maki *et al.*, 2001; Devaraj *et al.*, 2004). Del mismo modo, se han observado reducciones de hasta un 9% y 15% en el colesterol total y c-LDL, respectivamente, en estudios con EV con una dieta alta en colesterol (500 mg/día) (Vanstone *et al.*, 2002; Quílez *et al.*, 2003). Sin embargo, sólo unos pocos estudios han comparado directamente dietas altas y bajas en colesterol en términos de su efecto sobre la actividad de los EV. Mientras que algunos autores han indicado que los niveles bajos de colesterol de la dieta atenúan la eficacia de una terapia de dosis bajas de EV o no tienen

efecto en absoluto (Denke, 1995; Mussner *et al.*, 2002), otros autores han demostrado que los niveles de colesterol en la dieta no tienen un impacto en la eficacia de los EV como agentes para reducir el colesterol en sujetos hipercolesterolémicos (Kassis *et al.*, 2008). Este hallazgo podría ser de especial relevancia, ya que estos pacientes son propensos a continuar con su dieta habitual, que puede ser complementada con alimentos enriquecidos con EV.

C.6.2. Genotipo de la apolipoproteína E

La Apolipoproteína E (Apo E) es la principal proteína componente de las partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) y sus remanentes, y también de c-HDL. Sirve como un ligando para la captación de estas lipoproteínas a sus receptores (Mahley, 1988). Sin embargo, esas funciones no son uniformemente eficaces, ya que la Apo E es altamente polimórfica, con tres alelos comunes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) del gen Apo E que codifica sus tres principales isoformas (E2, E3, E4). Estas proteínas determinan los cambios en las concentraciones plasmáticas de Apo E y difieren en su afinidad a sus receptores específicos.

En base a la proporción, cada vez mayor, de portadores del genotipo Apo E4 en los casos de eventos cardiovasculares en comparación con los controles, un meta-análisis llegó a la conclusión de que existe una asociación entre el locus genotipo Apo E y el riesgo de enfermedad cardiovascular; el genotipo Apo E4 tienen un mayor riesgo de cardiopatía coronaria en comparación con los genotipos Apo E3, mientras que los genotipos Apo E2 tienen un menor riesgo (Wilson *et al.*, 1996). Si bien los datos epidemiológicos que estiman el efecto del genotipo Apo E en el riesgo de enfermedad cardiovascular son comúnmente aceptados, las pruebas que apoyan la asociación entre la variación de lípidos séricos y el genotipo Apo E no son tan convincentes. Estudios observacionales han demostrado que poblaciones

fenotípicamente Apo E2 tienen concentraciones de colesterol total y c-LDL significativamente más bajas que los Apo E3 y Apo E4 y, al mismo tiempo, los Apo E4 tienen niveles significativamente más altos de c-LDL que los Apo E3 (Schaefer *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1998; Plat y Mensink, 2002b; Nissinen *et al.*, 2008).

Si bien algunas estimaciones indican que el genotipo Apo E es responsable de un 7% de las variaciones de la concentración sérica de lípidos entre los individuos, el estudio Framingham demostró sólo una variación del 1% y el 2,1% de la varianza en los hombres y mujeres, respectivamente, en los niveles de c-LDL en respuesta al locus Apo E (Schaefer *et al.*, 1994; Ordovas, 2009).

En referencia al efecto de los EV, algunos estudios indican que los EV disminuyen el colesterol con mayor eficacia en los sujetos con genotipo Apo E4 que en los individuos con Apo E3, proporcionando alguna evidencia de un efecto del genotipo Apo E (Vanhanen *et al.*, 1993; Miettinen y Vanhanen, 1994; Hallikainen *et al.*, 2000). Por el contrario, Sánchez-Muniz *et al.* (2009) concluyeron que los suplementos de EV pueden ser de poco valor en los Apo E4 aunque la mayoría de estudios no encontraron efectos significativos de los EV en función del genotipo. Plat y Mensink (2002b) no observaron una diferencia de disminución del c-LDL basada en el genotipo Apo E. En cambio, los participantes experimentaron una disminución de -0,42 mmol/l en el c-LDL a través del grupo de tratamiento sin importar el genotipo Apo E. Geelen *et al.* (2002) demostraron, en un ensayo con individuos normocolesterolémicos que, a pesar de encontrar diferencias en el colesterol total entre los individuos portadores del genotipo Apo E4 respecto al Apo E3, no hubo diferencias significativas en cuanto a la eficacia del éster de EV en la reducción del colesterol en función del genotipo Apo E. Ishiwata *et al.* (2002) también concluyeron que la respuesta de los ésteres de EV en el descenso de colesterol no está influenciada por el genotipo Apo E.

C.6.3. Colesterolemia

En un esfuerzo por maximizar la eficacia de disminución del c-LDL, como respuesta individual a la terapia con EV, uno de los factores más influyentes en la disminución del c-LDL es el nivel basal de colesterol de los individuos. Los resultados proporcionados por diversos estudios no son muy consistentes; se ha demostrado que los niveles basales de c-LDL modifican el efecto de los EV en algunos estudios (Mussner *et al.*, 2002; Naumann *et al.*, 2003), pero no en otros (Weststrate y Meijer, 1998; Maki *et al.*, 2001; Ntanos *et al.*, 2002).

Recientemente, varios meta-análisis han tratado este tema: AbuMweis *et al.* (2008) publicaron un meta-análisis de 59 ensayos clínicos aleatorizados publicados entre 1992 a 2006; los autores concluyen que los niveles basales de c-LDL afectan a la magnitud de la reducción de c-LDL después del consumo de esteroles o estanoles vegetales, lo que podría explicar la amplia variación en la respuesta observada en estudios previos, y que, el consumo de EV reduce los niveles de c-LDL en los individuos adultos de diferentes grupos de edad con niveles basales de c-LDL entre normales y altos; Demonty *et al.* (2009) encontraron resultados similares cuando evaluaron el efecto de la edad sobre la eficacia, demostrando un claro impacto de las concentraciones de c-LDL basales en la magnitud de la disminución absoluta de las concentraciones de c-LDL resultantes del consumo de EV; en anteriores meta-análisis (Law *et al.*, 2000; Katan *et al.*, 2003) se ha obtenido una mayor reducción con la edad de los sujetos, sugiriéndose que este efecto se debe principalmente al aumento de los niveles basales de c-LDL con la edad. El análisis de regresión realizado por Demonty *et al.* (2009), confirmó esta hipótesis ya que al incluir las concentraciones basales de c-LDL en el modelo, la edad no tuvo efecto significativo; en otro meta-análisis, Wu *et al.* (2009) también observaron que la eficacia de los EV en la reducción de c-LDL difieren de acuerdo a los niveles de lípidos basales, de manera que los sujetos con niveles de colesterol total alto, o

en el límite alto, se asociaron con mayores reducciones de c-LDL que los sujetos con niveles normales de colesterol total. Por último, un meta-análisis comprendiendo 5 estudios realizados en el mismo laboratorio, para minimizar la variación de la muestra de análisis, mostró que el consumo de éster de fitostanol produjo mayores disminuciones absolutas en el colesterol total y c-LDL cuando los pacientes tenían mayores niveles séricos basales, pero el porcentaje de disminución de colesterol no quedó afectado (Naumann *et al.*, 2008). En resumen, existe una creciente evidencia de la mayor reducción en los niveles de c-LDL cuando los sujetos presentan altos, o muy altos, niveles iniciales de c-LDL, en comparación con aquellos con niveles óptimos, o en el límite alto de referencia, pero, a su vez, la reducción en el c-LDL sérico parece ser un porcentaje del colesterol total relativamente constante.

C.6.4. Concentraciones de esteroides vegetales en suero

Las concentraciones séricas de EV normalizadas por el colesterol se utilizan como marcadores séricos de la absorción del colesterol debido a la correlación entre los valores ajustados de colesterol y la absorción de colesterol fraccionado (Tilvis y Miettinen, 1986; Miettinen *et al.*, 1990). Las personas con mayores niveles basales de colesterol pueden responder mejor al tratamiento con EV ya que estos actúan principalmente disminuyendo la absorción de colesterol. Además, se da la premisa inversa de que los individuos con menor absorción de colesterol responden mejor al tratamiento con estatinas (Miettinen *et al.*, 1998; Gylling y Miettinen, 2002; Thuluva *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2008), aunque Houweling *et al.* (2009) no encontraron tal asociación.

Por otra parte, Berge *et al.* (2002) apuntan que las concentraciones de EV parecen ser hereditarias y relacionadas con la función diferencial en el transportador ABCG5/G8 encargado de transportar los EV fuera del enterocito, quedando de nuevo en el lumen intestinal, impidiendo así la absorción sistémica.

A pesar de disminuir la absorción del colesterol, se conoce que la administración de los EV aumentan las concentraciones séricas de los mismos (Katan *et al.*, 2003). En las personas que consumen cantidades terapéuticas de EV (1,5-2 g/día), la naturaleza de la relación entre los EV séricos como marcadores biológicos de la absorción de colesterol está alterada, ya que aumentan las concentraciones séricas a pesar de la disminución de la absorción del colesterol. Por el contrario, la terapia con fitostanoles no podría interrumpir la asociación de las concentraciones de colesterol sérico y de EV, ya que los fitostanoles son conocidos por dar lugar a un aumento mínimo en las concentraciones séricas de fitosteroles, mientras que la suplementación con fitosteroles aumenta sustancialmente las concentraciones séricas de los fitosteroles (Hallikainen *et al.*, 2000, Jones *et al.*, 2000, De Jong *et al.*, 2008a). Incluso a altas dosis de ésteres de fitostanol, las concentraciones séricas de campestanol aumentaron ligeramente después de ajustar el control mientras que las concentraciones de campesterol ajustado por el control disminuyeron significativamente (Gylling *et al.*, 2010), lo que indica una reducción de la absorción de colesterol después de un tratamiento con fitostanol. Dado que los EV siempre influyen de forma diferente en los niveles plasmáticos de fitosteroles y el impacto de los EV séricos elevados, sobre todo los fitosteroles, durante el tratamiento podrían aumentar el factor de riesgo para enfermedad coronaria, se debe considerar volver a evaluar el uso de fitostanoles frente a los fitosteroles.

C.7. Seguridad y efectos secundarios

La seguridad de los EV se ha confirmado por organismos gubernamentales tales como la "Food and Drug Administration" (FDA) en Estados Unidos y el Comité Científico de la Unión Europea antes y después de aprobar su uso en alimentos funcionales. Así, este Comité recomendó que la ingesta de alimentos enriquecidos con esteroides y estanoles vegetales no

debiera exceder de 3 g/día, ya que no había evidencia de beneficios adicionales sobre la salud y podría ocasionar efectos no deseados, especialmente una disminución en las concentraciones séricas de algunas vitaminas liposolubles y carotenoides.

C.7.1. Carotenoides y vitaminas liposolubles

Una cuestión importante que se ha planteado respecto a la eficacia y la seguridad del consumo de EV es la disminución concomitante de los niveles plasmáticos de sustancias liposolubles, particularmente tocoferoles y carotenoides.

Dado que los carotenoides y tocoferoles son transportados principalmente en las lipoproteínas, VLDL y LDL, el cambio en las fracciones de lipoproteínas y colesterol total podría explicar la disminución de la concentración media de estos compuestos. Por lo general, en la mayoría de estudios se suelen referenciar estos datos como la proporción de antioxidantes liposolubles normalizada con los lípidos, ya sea con el colesterol total o c-LDL ya que así se relaciona la cantidad de los carotenoides según las lipoproteínas responsables de su transporte (Richelle *et al.*, 2004).

Existen estudios en donde las concentraciones séricas de α y β - caroteno se reducen en un 11-24% (Hendriks *et al.*, 1999; Maki *et al.*, 2001; Heggen *et al.*, 2010) tras una ingesta de 1,1 a 2,2 g EV/día, mientras que en otros casos la reducción de los niveles plasmáticos de carotenoides no es estadísticamente significativa (Hallikainen *et al.*, 1999; Plat y Mensink, 2002a). Sin embargo, se ha comprobado la existencia de una correlación entre la reducción en la absorción de colesterol y la reducción de los niveles de carotenos y licopeno en

suero (Plat y Mensink, 2002a). Katan *et al.* (2003) concluyeron que las disminuciones de los contenidos plasmáticos de α -tocoferol y β -caroteno, por esta causa, suponen entre el 10% y 25% y que no son mayores a las observadas por cambios estacionales (alrededor del 30%).

También se ha estudiado la posibilidad de que los EV disminuyan la absorción de 25-hidroxivitamina D, retinol, y vitamina K; sin embargo, no parece que sus concentraciones plasmáticas se vean afectadas (Gylling y Miettinen, 1999; Hendriks *et al.*, 1999, Gylling H *et al.*, 2010).

El efecto secundario de disminución en la absorción de componentes minoritarios liposolubles quedaría compensado por una dieta controlada; así Raeini-Sarjaz *et al.* (2002) y Noakes *et al.* (2002) demuestran que la ingesta de carotenoides, correspondiente a la pauta recomendada de cinco raciones de frutas y/o verduras al día, es eficaz para mantener los niveles de carotenoides de aquellas personas que consumen alimentos enriquecidos en EV. También, la adición de pequeñas cantidades de β -caroteno al producto enriquecido en EV o incluso la administración de EV en una matriz naturalmente enriquecida con vitaminas, como el zumo de naranja, podrían compensar este déficit (Quílez *et al.*, 2003; Brufau *et al.*, 2004; Devaraj *et al.*, 2006). Sin embargo, se desconoce si la disminución en antioxidantes liposolubles mediada por los EV conduce a un deterioro global de las defensas antioxidantes o un incremento del estrés oxidativo.

Los posibles efectos secundarios de los EV sobre la función hepática y los niveles de vitaminas y hormonas han sido evaluados sin observarse efectos adversos (Volpe *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2001). Tampoco se ha observado efecto estrogénico alguno con esteroides (Baker *et al.*, 1999) o estanoles (Turnbull *et al.*, 1999). Aunque estudios a largo plazo no han mostrado efectos adversos (Lees *et al.*, 1977), el seguimiento epidemiológico de las personas que

consumen productos enriquecidos con EV ampliaría el conocimiento en esta materia.

C.7.2. Sitosterolemia

Existe una enfermedad genética recesiva, poco frecuente, conocida como sitosterolemia, debida a mutaciones de los transportadores ABCG5 y ABCG8, que se caracteriza por la presencia de altas concentraciones de fitosteroles en plasma (Salen et al., 1979). En este caso, hay una disminución de la excreción de colesterol por la bilis, lo que se traduce en una hipercolesterolemia y un eventual riesgo de aterogénesis prematura. El mecanismo del efecto hipercolesterolémico observado en los sitosterolémicos no está claro, aunque se sugiere que los fitosteroles disminuirían la utilización metabólica del colesterol, ejerciendo una inhibición competitiva a nivel de la actividad de las enzimas 7- α -hidroxilasa microsomal y 27-hidroxilasa mitocondrial (Nguyen et al., 1998). En estos pacientes, la ingesta de EV como parte de la dieta, o a través de una suplementación, está contraindicada (Bjorkhelm et al., 1995).

En conclusión, y excepto en las personas que padecen sitosterolemia, los EV son seguros y sus efectos secundarios pueden contrarrestarse fácilmente con una suplementación adecuada.

C.8. Biodisponibilidad *in vitro* e *in vivo* de esteroides vegetales

El concepto de biodisponibilidad (BD) varía según donde se aplique. En nutrición humana la BD se define como la eficiencia con la que los nutrientes son utilizados por el organismo y depende de los procesos de digestión de los alimentos, absorción de los nutrientes y disponibilidad de los mismos para las funciones metabólicas (Schelmer *et al.*, 1995).

En el proceso de BD de los componentes del alimento, se pueden diferenciar tres etapas:

- Disponibilidad química o física del componente en el tracto gastrointestinal, es decir, la fracción del componente ingerido que está disponible para su posterior absorción (fracción soluble o bioaccesible).
- Absorción en la mucosa intestinal que implica un proceso de difusión pasiva o transporte paracelular, no saturable y un proceso de captación, o transporte transcelular, por las células de la mucosa intestinal.
- Transformación del elemento en su forma biológicamente activa.

Para estimar la BD de los EV presentes en un alimento, se precisa conocer la fracción soluble de éstos después de haber sometido al alimento a un proceso de digestión gastrointestinal simulado; parte de los EV solubles serán susceptibles de ser absorbidos y utilizados por el organismo (fracción biodisponible).

Los métodos utilizados en los estudios de BD pueden clasificarse en dos grandes grupos: *in vivo* e *in vitro*.

Aunque los estudios *in vivo* son de elección, presentan algunas limitaciones e inconvenientes:

- El balance químico, que estima la diferencia entre la cantidad ingerida y excretada de un determinado componente durante un cierto periodo de tiempo, es un método largo, laborioso y poco preciso, presenta el inconveniente de la dificultad para diferenciar en la muestra de heces entre el elemento de origen dietético, no absorbido, y el procedente de la excreción endógena (Van Campen y Glahn, 1999)
- Los métodos que utilizan isótopos radioactivos, aunque de extraordinaria utilidad, son costosos, requieren de un

instrumental sofisticado y se aplican a grupos restringidos de población, excluyendo a niños y mujeres embarazadas (Barberá y Farré, 1992; Van Campen y Glahn, 1999)

- Los isótopos estables se emplean con el fin de evitar los posibles riesgos para la salud derivados del uso de radioisótopos; son más estables en el tiempo y pueden utilizarse sin riesgo de contaminación radioactiva, pero son más caros y las dosis necesarias pueden ser demasiado altas para que se considere un marcador, pudiendo afectar al equilibrio natural del organismo (Van Campen y Glahn, 1999; Weaver *et al.*, 1993)
- El uso de modelos animales para predecir la biodisponibilidad es más práctico que los estudios con seres humanos; sin embargo, el principal problema radica en que los resultados obtenidos no siempre son extrapolables debido a las diferencias entre los metabolismos animal y humano, por lo que existen dudas sobre la capacidad predictora de la absorción del componente considerado en seres humanos (Reddy y Cook, 1991)

La estimación de la BD basada en la cantidad de EV soluble (fracción bioaccesible) o dializable, puede ser útil en muchas ocasiones, pero no todo el EV soluble, es absorbido. Los sistemas mencionados carecen de un componente vivo y éste es necesario para una estimación más veraz de la BD.

En un esfuerzo para avanzar en la simulación de la situación *in vivo*, se postula la introducción de cultivos celulares en los sistemas *in vitro*. Ello permite evaluar los procesos de transporte y captación del componente objeto de estudio. Una de las líneas celulares más utilizada es la correspondiente a las células Caco-2, procedente de adenocarcinoma de colon humano y que presenta muchas de las características propias del enterocito maduro, cuando un cultivo llega a la confluencia (13-15 días post-siembra) (Pinto et al., 1983).

La línea celular Caco-2 fue establecida por Fogh *et al.* (1977), a partir de un adenocarcinoma de colon humano, moderadamente bien diferenciado, obtenido de un paciente de raza caucasiana de 72 años. Estas células, en cultivo, crecen adheridas a un sustrato, formando monocapa. Cuando alcanzan la confluencia, se diferencian espontáneamente adquiriendo características morfológicas y funcionales del enterocito maduro: organización de las células en una monocapa polarizada, uniones intercelulares estrechas y formación de domas y actividades de enzimas propias de la membrana de borde en cepillo (Pinto *et al.*, 1983).

El modelo no está libre de inconvenientes y limitaciones (Wienk *et al.*, 1999; Ekmekciouglu, 2002), entre ellos:

- Al tratarse de células procedentes de un adenocarcinoma pueden mantener procesos metabólicos cuestionables
- Presentan mayor resistencia transepitelial que las células del intestino delgado y se asemejan más a las del colon
- La ausencia de una capa de mucina que puede desempeñar un papel importante en la absorción intestinal de algunos compuestos. Este tipo de células tiene una menor expresión de transportadores, lo que se traduce en un proceso de transporte muy bajo, aunque también puede ser debido a que en estos sistemas el área de transporte sea pequeña si se compara con el área de absorción que ofrece el intestino delgado
- Habitualmente, se trata de un sistema estático, donde los nutrientes transportados no se eliminan del medio, pudiéndose alcanzar un estado de saturación. Por el contrario, el sistema *in vivo* es un sistema dinámico ya que el torrente circulatorio elimina los nutrientes de las proximidades del enterocito. Este aspecto es especialmente importante en el caso del transporte pasivo. Para subsanar este inconveniente se ha desarrollado recientemente un sistema dinámico multicompartimental, controlado por un ordenador, capaz de reproducir el proceso cinético del tracto gastrointestinal, obteniéndose mejores

resultados de BD, más reproducibles y comparables a las condiciones *in vivo*.

A pesar de sus inconvenientes y sus diferencias con respecto a los modelos *in vivo*, este sistema es en la actualidad útil para los estudios de BD y se considera un modelo válido de epitelio intestinal.

Los estudios de evaluación de la absorción de EV utilizando el sistema *in vitro* mencionado son muy escasos. Se ha estudiado la captación de sitosterol y sitostanol (Palmgrén *et al.*, 2005) y la interferencia de β -sitosterol (a una concentración de 20 μ M) en la absorción de β -caroteno (Fahy *et al.*, 2004), si bien en soluciones patrón.

Se señala que la absorción *in vivo* de los EV es baja (2-5%) (Igel *et al.*, 2003) pero se dispone de escasa información al respecto. Los métodos de estudio de la BD *in vitro*, mediante el uso de cultivos celulares, presentan la ventaja de permitir controlar más las condiciones del ensayo, además de su menor coste económico.

En personas sanas, el colesterol se absorbe en un $56,2 \pm 12,1\%$ (Bosner *et al.*, 1999). Tradicionalmente, los EV se han considerado compuestos no absorbibles, sin embargo, como se ha mencionado previamente, se ha demostrado que se absorben, aunque en pequeña proporción. Algunos estudios en los que se ha usado β -sitosterol marcado radiactivamente han señalado una absorción del 0,6 al 7,5% de la cantidad administrada (Salen *et al.*, 1992; Lutjohann *et al.*, 1995).

Las condiciones más adecuadas para cuantificar la absorción de los EV serían administrarlos marcados con deuterio, posteriormente obtener muestra de suero, y utilizar técnicas de espectrometría de masas, para la identificación y cuantificación de los distintos EV. Ostlund *et al.*, (2002b) aplicando este tipo de

metodología han obtenido los siguientes porcentajes de absorción: sitosterol 0,51%, campesterol 1,9%, sitostanol 0,04%, y campestanol 0,16%. Los resultados indican una baja absorción de los EV, en especial de los fitostanoles, cuya absorción es aproximadamente un 10% de la correspondiente a los fitosteroles.

En los seres humanos, los contenidos plasmáticos de β -sitosterol y campesterol son tan sólo un 0,1-0,14% de los correspondientes al colesterol (Miettinen *et al.*, 1990). En los estudios de Weststrate y Meijer (1998) y Hallikainen *et al.* (2000), al suplementar la dieta con 2-3 g EV/día, las concentraciones plasmáticas de β -sitosterol y campesterol se incrementan entre un 34 y 73%, respectivamente, respecto a los valores iniciales, encontrándose en la mayoría de los casos dentro del intervalo de normalidad. En el estudio de Hallikainen *et al.* (2000), los contenidos plasmáticos de estanoles representaron entre el 0,003-0,004% de los niveles plasmáticos de colesterol.

C.9. Determinación de esteroides vegetales en alimentos y fluidos biológicos: metodologías

En la actualidad existe una gran cantidad de alimentos funcionales en el mercado adicionados de fitosteroides y/o fitostanoles. El número de productos enriquecidos en esteroides con aprobación de su comercialización en la UE parece que va en aumento; esto explica que el análisis de esteroides y/o estanoles en alimentos enriquecidos adquiera gran importancia (Laakso, 2005).

La metodología clínica habitual de determinación de colesterol (oxidación enzimática, reacción colorimétrica y determinación espectrofotométrica) no puede diferenciar entre el colesterol y los EV. La medida específica de esteroides y/o estanoles vegetales requiere el uso de cromatografía de gases (CG) o

cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR) acompañado, en muchos casos, por espectrometría de masas (EM) (Patel *et al.*, 2006).

Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha desarrollado ningún método de referencia oficial especial para el análisis de fitosteroles o fitostanoles en alimentos enriquecidos (Lagarda *et al.*, 2006); las únicas referencias existentes son para la determinación de fitosteroles y fitostanoles presentes de forma natural en grasas y aceites, como es el caso de los métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) 6799 (determinación de la composición de esteroides en grasas y aceites por cromatografía gas-líquida), Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) 2.401 (determinación de la fracción insaponificable), etc. El problema en estos métodos, en lo que a este estudio concierne, reside en que están desarrollados para el análisis de esteroides que se encuentran de forma natural en los alimentos, en los que suponen una porción muy minoritaria (aproximadamente el 1% ó menos) mientras que en los productos enriquecidos en esteroides/estanoles la concentración suele ser superior al 8% de la grasa (Laakso, 2005), además de no considerar el efecto de la fracción no grasa del alimento.

Se ha mencionado anteriormente que los EV pueden encontrarse en los alimentos de distintos modos (libres, esterificados, glucosilados o acetilados glucosilados). Por ello, es importante que la preparación de la muestra permita determinar la totalidad de los esteroides, incluidas todas sus formas conjugadas (Lagarda *et al.*, 2006).

En el proceso de determinación de EV los pasos más habituales son:

- Preparación de la muestra:
 - *Extracción con disolventes orgánicos de la fracción grasa*: la metodología a aplicar va a depender de la naturaleza de la matriz, su estado físico (líquido o sólido) así como de la forma en la que están los EV.

Cuando se trata de EV adicionados, es suficiente una extracción simple. Los disolventes más frecuentemente utilizados en alimentos complejos, como es el caso de los derivados lácteos, son: cloroformo-metanol-agua, cloroformo-metanol, hexano, u otros (Lagarda *et al.*, 2006).

- *Saponificación*: antes de la saponificación, es aconsejable la adición del patrón interno. Para alimentos enriquecidos puede aplicarse un método de saponificación directa, ya que los esteroides se encuentran en forma libre, o esterificada a ácidos grasos. Es adecuada una saponificación en caliente (60-80°C; 45-90 min) con KOH alcohólica (Santos *et al.*, 2006).

Posteriormente, se extrae la fracción insaponificable con disolventes orgánicos (Lagarda *et al.*, 2006).

Algunas matrices (entre los alimentos no enriquecidos) necesitan, además, una hidrólisis ácida para romper enlaces glucosídicos de los esteroides glucosilados (forma habitual en cereales) (Laakso, 2005; Clement *et al.*, 2010).

- *Elección del patrón interno (p.i.)*: la razón para la utilización de patrón interno es eliminar errores analíticos debidos a fluctuaciones en las condiciones instrumentales, u otras variables experimentales; se evitan los errores debidos a posibles pérdidas de EV durante la preparación de la muestra (Lagarda *et al.*, 2006) y los picos obtenidos en el cromatograma se identifican por su tiempo de retención con relación al patrón interno.

Los patrones internos más comúnmente utilizados en la determinación de EV son: betulina, colestano, epicoprostanol (5 β -colestano-3 α -ol) y β -colestanol (5 α -colestano-3 β -ol).

El epicoprostanol no se encuentra de forma natural como esteroide vegetal, presenta unas buenas propiedades cromatográficas y responde de forma similar a los esteroides/estanoles al detector FID, así no son necesarios factores de corrección para la cuantificación (Laakso, 2005).

El β -colestanol, no puede ser utilizado para el análisis del estanoles porque las muestras pueden contener cantidades pequeñas de β -colestanol como producto de la hidrogenación del colesterol.

Los problemas que presentan la betulina y el colestano son que su composición y estructura química difieren demasiado de los esteroides y, por tanto, su respuesta frente al detector FID presenta diferencias frente a los esteroides, lo que hace necesario la utilización de factores de corrección para la cuantificación (Laakso, 2005).

- *Purificación*: las técnicas de purificación sólo son necesarias en algunos casos de muestras complejas, como es el caso de cereales que presentan enlaces glucosídicos; no suele utilizarse para productos enriquecidos.

- **Determinación:**

La técnica más utilizada para la determinación de EV es la CG con detector de ionización de llama (FID) y columna capilar de naturaleza poco polar; un espectrómetro de masas (EM) como detector resulta de utilidad para confirmar la identificación de los picos, así como para su cuantificación. La CG es la técnica de elección para la determinación de EV en alimentos y dietas, por ser la más efectiva en resolución, identificación y cuantificación (Volin, 2001). En algunos casos, se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detector de fluorescencia (Lin *et al.*, 2007; Maguire *et al.*, 2004).

La forma más habitual de adicionar los EV en bebidas a base de leche es esterificados con ácidos grasos, aunque también pueden encontrarse pequeñas cantidades en forma libre. La utilización en CG de una columna capilar con una fase estacionaria levemente polar, permite una buena separación entre los pares del campesterol/camestanol y del

sitosterol/sitostanol; esta separación no se alcanza con las fases estacionarias totalmente apolares (Laakso, 2005).

- Derivatización de la muestra:

La separación de EV como tal, sin la derivatización, es también posible, pero la resolución de un esteroles y de su estanol correspondiente no es tan buena como la de sus derivados. De este modo, antes de someter la muestra a la CG capilar, los EV se transforman en los derivados trimetilsililados (TMS) que presentan mejor resolución, sensibilidad, y estabilidad a las altas temperaturas que los esteroides (Lagarda et al., 2006).

Los agentes derivatizantes más comúnmente utilizados son: N-metil-N-trimetil-sililtrifluoroacetamida (MSTFA) en piridina anhidra, y bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) conteniendo un 1% de trimetilclorosilano (TMCS).

En la tabla nº 2 y 3 se detallan las especificaciones del análisis por CG de EV en alimentos y muestras biológicas, respectivamente, publicados en la literatura.

Tabla nº 2. Determinación de esteroides vegetales en alimentos por CG.

Alimento	Analito	Preparación muestra	Derivatizante	Condiciones instrumentales	Columna/Parámetros analíticos	Ref.
Leche, margarina	brasicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol	P.I.:Bt método FIL-IDF 159:1992 Extracción insaponificable CCF (20x20cm sílica gel 60 F ₂₅₄ , Merck) Disolvente:Hx	Sylon BFT (BSTFA+TMCS, 99:1: piridina), (1:1), 70°C 30min	Detector FID Tª inyector y detector= 330°C, gas portador He, flujo: 2ml/min, Programa Tª:60°C 2min, 40°C/min hasta 250°C durante 15min, 60°C/min hasta 320°C, Vol inyección=1µl Detector MS: E. I.: 70eV, rango de masas 35-700amu	HP5 (30m x 0,32 mm i.d. x 0,25µm) F.E.: 5%fenil/95%DMP5	Contarini et al., 2002
Productos para untar, margarinas, yogurt, leche, leches fermentadas, zumo de naranja, pasta*, salchichas, masticables, crema de queso	colecsterol, brasicasterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, sitosterol	P.I.:EP Saponificación 2M KOH /EtOH/ 1h/ 60°C. Extracción H ₂ O/heptano (x2), evaporación (N ₂) y derivatización (*HCl 4M/100°C/45 min: hidrólisis enlaces glicosídicos Extracción:EE:EP y Saponificación	(BSTFA con 1% TMCS: piridina), (2:1) 15min 70°C	Detector FID Tª inyector 300°C, split 1:50, Vol inyección=1µl, Tª detector= 300°C, Tª isotermica 300°C, gas portador He Detector MS (confirmación)	Rx-5 (Restek) (30m x 0,32mm i.d.x 0,25µm) F.E.:5%fenil/95% DMP5	Laakso, 2005
Leche (Bécel Pro-Active®), yogurt fresa	colecsterol, dihidrocolecsterol, desmosterol, latosterol, campesterol, dihidrobrasicasterol, olestigmasterol, β -sitosterol, estigmastanol	P.I.:CI Saponificación: KOH /EtOH 90% (leche: 2M/ 80°C / 45min /yogur: 2,5M/ 60°C / /90min) Extracción:Hx Evaporación (N ₂) 60°C	BSTFA/TMCS (99:1) 60°C 30min	Detector MS: Tª inyector=280°C, Vol inyección=2µl modo splitless fase móvil: He 10psi Programa Tª:200°C 1min, 20°C/min hasta 300°C durante 10min	HP-5MS (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm) F.E.: 5%difenil/95% DMP5 Linealidad r> 0,994 Recuperación 89,2, leche, 91,5% yogur; CV intra-día y inter-día: 6% y 11,8% leche, 4,4% y 9,4% yogur, LD: 0,1µg/ml %	Santos et al., 2007

Tabla nº 2. Determinación de esteroides vegetales en alimentos por CG (continuación).

Alimento	Análito	Preparación muestra	Derivatizante	Condiciones instrumentales	Columna/Parámetros analíticos	Ref.
Leche, yogur	colesterol, brasicasterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, β -sitosterol, β -sitostanol	P.I.:Cl Saponificación: KOH EtOH 90% Extracción :Hx Evaporación (N ₂) Derivatización	BSTFA/TMCS (99:1)	Detector MS Tª inyector=280°C Vol inyección=1 μ l splitless (250°C 1min) gas portador He Programa Tª : 200°C 1min, 20°C/min hasta 300°C durante 10min	HP-5MS (30m x 0,25mm i.d. x 0,25 μ m) F.E.: 5% <i>diffenil</i> /95% DMPS r> 0,994 Recuperación 89,2% leche, 91,5% yogur; CV intra-día y inter-día: 6% y 11,8% leche, 4,4% y 9,4% yogur; LD: 0,1 μ g/ml	Saraiwa et al., 2011 (según Santos et al., 2007)
Leche, yogur, pan, zumo naranja, zumo manzana, margarina, crema de café, cereal de maíz inflado*	colesterol, brasicasterol, 24-metilen colesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, estigmast-22-en-3-ol, Ergost-7-en-3-ol, estigmasta-5,7,22-trien-3-ol, β -sitosterol, sitostanol, delta-5-avenasterol, estigmasta-5,24-dien-3-ol, estigmast-7-en-3-ol, delta-7-avenasterol, citrostadieno	P.I.:Ep *Hidrólisis ácida previa a saponificación (3N HCl 100°C 30min) Saponificación 2,3N NaOH:MeOH, 100°C 15min, HCl 3N, fase orgánica NaCl aq	(piridina):BSTF A con 1% TMCS (1:2)	Detector FID: Tª inyector y detector=325°C Vol inyección=1 μ l Programa Tª : 200-300°C 3°C/min durante 11,67min, gas portador H ₂ , 0,8ml/min. Split 1:10 (IS=1 mg/ml), 1:100 (IS>1 mg/ml) Detector MS Splitless liner, Tª inyector:340°C, gas portador He, 1,1 ml/min, (E I.:70eV),	DB™-5 (30m x 0,25mm i.d. x 0,25 μ m) Agilent Technologies F.E.: 5% <i>diffenil</i> /95% DMPS	Clement et al., 2010

BSTFA: bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida; Bt: betulina; Cl: colestano; CGF: cromatografía en capa fina; DMPS: dimetilpolisiloxano; E.I.: energía de ionización; Ep: epicoprostanol; F.E.: fase estacionaria; FID: detector de ionización de llama; Hx: hexano; LD: límite de detección; MS: espectrometría de masas; P.I.: patrón interno; SYLON BFT: N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida contenido 1% trimetilclorosilano; TMCS: trimetildorosilano.

Tabla nº 3. Determinación de esteroides vegetales en muestras biológicas por CG.

Muestra	Analito	Preparación muestra	Derivatizante	Condiciones instrumentales	Columna	Ref
Suero	colestero, 5 α -colestano-3 β -ol, 8-latosterol, 7-dehidrocolesterol, 7-latosterol, campesterol, sitosterol	P.I.: 5 β -d-3ol (84,8 μ mol/l) KOH/H ₂ O (33%) / 56°C/15min, Extracción: (H ₂ O:Hx) (1:2) Evaporación (N ₂) 60°C Derivatización Extracción: Hx:HCl 0,1N (1:1), fase orgánica lavada con H ₂ O Evaporación (N ₂) 40°C Redisolver Hx	Trisil/TBT (N-trimetilsilimidazol): N,O-bis(trimetilsilil)acetamida: trimetilclorosilano (3:3:2) /80°C /30min	Detector FID: T ^a inyector= 305°C ; T ^a detector= 310°C; Vol inyección=1 μ l gas portador He 0,5ml/min split ratio:20 Programa T ^a : inicial 240°C, final 310°C, 2°C/min. Detector MS E.I.: 70eV T ^a interfase 250°C	Columna apolar (OV 1): Ultra 1 (25m, x 0,2mm i.d.x 0,33 μ m) (Hewlett-Packard) Columna polar: CP-Wax 52 CB (25m x 0,32mm i.d.) (Chrompack Middelburg) (2,5ml/min, split ratio 1:6, T ^a horno: isoterma 230)	Wolthers et al., 1991
Suero	Sitosterol, campesterol, stigmasterol, sitostanol, campestanol, latosterol, desmosterol, lanosterol, fucosterol	P.I.: Ecol Extracción: (según Folch) (Cl ₃ CH: CH ₃ OH) (2:1), lavado NaCl 0,9%, CH ₃ OH:Cl ₃ CH:NaCl 0,9% Saponificación (KOH)/H ₂ O 1,28g/ml/85°C/ 30 min Hx.:H ₂ O. Evaporación. Extracción fase sólida: cartuchos aminopropil 10ml/500mg (Cl ₃ CH:isoprop) (2:1) Evaporación (60°C)	piridina-BSTFA con 1% TMCS, 1:1 (v/v)	Detector FID: T ^a inyector= 280°C ; T ^a detector=280°C T ^a horno= 265°C ; Vol inyección= 1 μ l; gas portador H ₂ , 1,18 ml/min split 1:9	Rtx®-1701 (Restek) (60m x0,25mm i.d. x0,25 μ m) F.E.: 14% cianopropilfenil-86%DMPS	Phillips et al., 1999

Tabla nº 3. Determinación de esteroides vegetales en muestras biológicas por CG (continuación).

Muestra	Analito	Preparación muestra	Derivatizante	Condiciones instrumentales	Columna/Parámetros analíticos	Ref
Plasma	Colestano, latosterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, sitosterol, sitostanol, lanosterol, desmosterol	P.I.: ep	TMS: piridina, hexametildisilazano- trimetilclorisisilano (9:3:1)	Detector MS	DB-XLB (J&W Scientific) (30m x250,µm)	Mussner et al., 2002
Suero	Desmosterol, latosterol, lanosterol, sitosterol, sitostanol	P.I.: 5-cl Saponificación: KOH/EtOH/ 70°C /30min). Extracción SPME y derivatización simultánea piridina + KI fibra 90°C 90min.	fibra SPME (poliacrilato 85µm) con BSTFA 70°C 60min	Detector FID T _{in} inyector= 250°C T _d detector= 280°C, Programa T _a : 160°C 3min, 20°C/min hasta 280°C durante 20min, gas portador: He, 1ml/min, Splitless	HP5 (30m x 0,25mm i.d.x 0,25µm) F:E: 5%fenil, 95%DMPS	Domeño et al., 2005
Plasma	Colestano, desmosterol, latosterol, campesterol, β- sitosterol	P.I.: 5-cl,10 µmol/l Saponificación, KOH 1mol/l /EtOH/70°C /60min Extracción: (H ₂ O:Hx:EtOH) (20:1) + 12,5mg BHT /l, x2 Evaporación (N ₂)	piridina-BSTFA con 1% TMCS (1:1)	Detector MS T _{in} inyector= 270°C, gas portador He split 50, flujo 1ml/min; Programa T _a : 90°C 3min, 25°C/min hasta 260°C durante 28min, 1°C/min hasta 275°C durante 13min; Vol inyección=1µl; E.I.: 70eV; Rango de masas=100- 500 amu; monitorización iones (m/z): 305 y 445 Colestanol; 351 y 456 desmosterol; 443 y 458 latosterol; 382 y 472 campesterol; 129 y 486 β-sitosterol	Rtx®-1701 (Restek) (60m x 0,25mm id. x 0,25µm) F.E.: 14%ciano-propilfenil-86% DMPS; LD: campesterol: 0,5 µmol/l; sitosterol: 0,2 µmol/l; LC: campesterol: 1,5 µmol/l, sitosterol: 0,7 µmol/l; Exactitud (% recuperación): campesterol 83,3 y 94,1%, sitosterol 94,9 y 98,2%, Precisión (CV%) intradía: campesterol 5,6, sitosterol 5; interdía: campesterol 7,3, sitosterol 6,7; Linealidad (r=0,99)	Ahmida et al., 2006

Tabla n° 3. Determinación de esteroides vegetales en muestras biológicas por CG (continuación).

Muestra	Analito	Preparación muestra	Derivatizante	Condiciones instrumentales	Columna	Ref
Plasma rata	Colesterol, lanosterol, 7- dehidrocolester ol	P.I.: ep 0,5µg Saponificación, Extracción: Hx:EE	MTBSTFA/NH ₄ I, 1000:4, 9/w (N-metil-N- terbutildimetilsilil)trifluor oacetamida	Detector MS: T _a inyector: interfase y fuente iones= 260, 300 y 230 °C, gas portador He, 0,5 ml/min, split 10:1 T _a horno 240°C (1min) 20°C/min hasta 300°C (10min)	Ultra-2 (Agilent Technologies) (25m x, 20mm i.d. x 0,11µm) F.E.: 5%fenil-95% DMPS	Paik et al., 2008
Cultivos celulares (hepatocit os primarios humanos)	Colesterol, campesterol, sitosterol, Escualeno, desmosterol, 7- dehidro- colesterol, lanosterol, zimossterol, 24,25-dehidro- lanosterol, lanosterol,	P.I.: d6-colesterol; d6- sitosterol; d4-lanosterol Extracción con Folch (Cl ₂ OH/CH ₂ OH) (2:1) Evaporación (Ar) Saponificación: (8g NaOH// EtOH/H ₂ O, 2h /65°C Extracción H ₂ O:Hxc (1:6) (x2) Evaporación (Ar)/ 60°C	piridina/hexametildisilaza no/clorometilsilano, 3:2:1, 60°C 30min Llevar a sequedad, redissolver con Hx	Detector MS T _a inyector= 280°C splitless; gas portador He, 1ml/min; Programa T _a : 180°C 1min, 20°C/min hasta 250°C, 5°C/min hasta 300°C durante 8,5min; Vol inyección = 1 µl T _a inyector= 280°C, splitless; gas portador: He, 0,8 ml/min, Programa T _a : 180°C 1min, 20°C/min hasta 250°C, 4°C/min hasta 300°C durante 7min; Vol inyección = 2 µl	HP-ultra1 (Scantec Lab AB) (25m 0,20mm i.d. x 0,33µm) HP-5MS (Scantec Lab AB) (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm)	Acimovic et al., 2009

Ar: argón; ecoli: epicolesterol; BSTFA: bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida; DMPS: dimetilpolisiloxano; EE: dietil éter; E.I.: energía de ionización; Ep: epicoprostanol; F.E.: fase estacionaria; FID: detector de ionización de llama; Hx: hexano; Hx_c: Cíclohexano; LC: límite cuantificación; LD: límite de detección; MS: espectrometría de masas; P.I.: patrón interno; TMCs: trimetilclorosilano; 5β-cl-3ol: 5β-colestan-3α-ol; 5-ci: 5α-colestanol.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La importancia en la prevención de las enfermedades cardiovasculares en relación con la disminución en c-LDL ha llevado a las distintas sociedades científicas a redactar documentos con recomendaciones sobre el control lipémico. Si unimos esa necesidad de reducir los niveles de colesterol a la capacidad hipolipemiante de los esteroles vegetales (EV) nos encontramos con una herramienta más a la hora de tratar de frenar esa grave "epidemia" del siglo XXI, que es la enfermedad cardiovascular.

Aunque el efecto hipolipemiante de los EV era ya conocido hace tiempo, ha sido en los últimos años cuando se han encontrado los soportes físicos adecuados para su administración, mediante el aumento de su liposolubilidad, y la mejora de su palatabilidad, de forma que se asegurara un fácil cumplimiento de la suplementación. Este hecho ha favorecido que puedan ser adicionados a alimentos tales como margarinas, leches, o leches fermentadas.

Aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud, la similitud de su estructura con el colesterol le permite ser capaz de ocupar su lugar en las micelas intestinales, compitiendo con el colesterol en su absorción, produciéndose ésta en pequeña proporción en intestino delgado e inhibiendo la absorción de colesterol.

El porcentaje de reducción obtenido en el c-LDL tras el tratamiento con EV es variable en función del diseño utilizado en cada estudio y depende de la dosis, duración del tratamiento, tipo de EV administrado, frecuencia diaria de consumo, o matriz en el que se suministra.

Ante la gran variabilidad de resultados obtenidos y no explicados por los diferentes diseños experimentales utilizados, se plantea la existencia de una serie de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos al individuo, que podrían estar afectando la eficacia de los EV en mayor o menor grado. Uno de los factores más obvios a tener en cuenta es la colesterolemia de los pacientes, y cómo ésta podría estar influenciando la respuesta a los EV.

Además, aunque los efectos beneficiosos de una dieta saludable sobre el perfil lipídico están ampliamente demostrados, existen pocos estudios que hayan

evaluado si el contenido de grasa saturada y colesterol de la dieta podría modificar la eficacia de la terapia con EV y su propia absorción, ya que éstos actúan específicamente sobre la absorción del colesterol, mediante mecanismo competitivo.

Otro factor que puede influenciar la acción de los EV es el genético, que determina la respuesta individual. Se ha descrito que la apolipoproteína E desempeña un papel fundamental en el metabolismo del colesterol y, por tanto, el genotipo de cada individuo podría determinar cómo va a ser la respuesta frente a los EV. Sin embargo, existe controversia sobre si un determinado genotipo puede proteger al individuo frente al proceso aterosclerótico y si éste puede influenciar la respuesta a los EV.

Finalmente, está bastante aceptado que el consumo regular de EV produce un descenso sérico de algunas vitaminas liposolubles y carotenoides. Si esta reducción es capaz de alterar el equilibrio entre los pro-oxidantes y antioxidantes es un tema que genera controversia ya que implicaría que el consumo de EV, a largo plazo, podría ocasionar un estado de estrés oxidativo cuyas consecuencias se desconocen.

En relación a lo anteriormente expuesto, se plantea si el consumo regular de EV durante un periodo de tiempo prolongado produce una reducción efectiva de los niveles séricos de colesterol, así como si la dieta habitual influye sobre la eficacia de los EV y sobre su absorción, y la influencia de factores genéticos en dicha eficacia. Finalmente, conocido el efecto competitivo de los EV en la absorción de los carotenoides, interesa averiguar si una dosis terapéutica de EV influye sobre parámetros de estrés oxidativo.

Por lo tanto, definida la hipótesis anterior, en el presente trabajo se pretende abordar los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto del consumo regular y prolongado (tres meses) de una bebida láctea enriquecida en EV sobre el perfil lipídico.

2. Analizar la influencia de diversos factores que podrían afectar la eficacia de los EV en población hipercolesterolémica:
 - a. Composición de la dieta en colesterol y grasas saturadas.
 - b. Factores genéticos que determinan la eficacia del transporte reverso del colesterol (Genotipo Apo E).

3. Determinar si la ingesta prolongada de EV (tres meses) podría generar un estado de estrés oxidativo, por el posible descenso en vitaminas liposolubles y carotenoides.

4. Estimar la biodisponibilidad de los EV *in vitro* e *in vivo*

Para alcanzar los objetivos indicados, se propone el siguiente plan de trabajo:

- A. Optimización de un método de determinación de EV en bebida láctea y en suero por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).
- B. Determinación de EV en bebida láctea enriquecida en éstos
- C. Diseño del estudio clínico de intervención para valorar el efecto de la ingesta de una bebida láctea enriquecida en EV
- D. Valoración de la ingesta a través de encuesta alimentaria y valoración antropométrica y bioquímica de los sujetos participantes en el estudio
- E. Estudio de la influencia del genotipo de la apolipoproteína E
- F. Evaluación del estrés oxidativo tras una ingesta prolongada de EV
- G. Estudio de la biodisponibilidad de los EV *in vitro* e *in vivo*
- H. Discusión de los resultados
- I. Conclusiones

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Optimización de la determinación de EV en bebida láctea y en suero por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)

De la revisión bibliográfica efectuada, se concluye que la técnica más ampliamente utilizada en la determinación de EV es la cromatografía de gases (CG), con detector FID, y es la seleccionada para este estudio.

A.1. Material y reactivos

Instrumentación

- Agitador de tubos Vórtex MS2 Minishaker IKA®
- Balanza de precisión electrónica, HA-180, AND (error $\pm 0,0001$ g)
- Bloque calefactor de tubos (Blockheater-Stuart Scientific)
- Centrífuga con regulador de temperatura (Jouan GT 422)
- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem XL, con detector FID
Software de integración TotalChrom Workstation versión 6.2.
- Homogeneizador Polytron PT 2000, Cinemática
- Rotavapor: Buchi R-200 y baño con recirculación JULABO F12-EC

Material fungible

- Columna capilar SUPELCO equity™-5 (poli/ 5% difenil / 95% dimetilsiloxano) 30 m \times 0,25 mm, 25 μ m fase estacionaria
- Microjeringa 10 μ l (Microliter™ Syringes-Hamilton)
- Papel de filtro separador de fases. Whatman®
- Pipetas automáticas de 100 μ l y 1000 μ l
- Tubos vidrio 6 ml de fondo redondo con tapón de rosca
- Tubos vidrio Pyrex® 10 ml de fondo cónico con tapón de rosca
- Tubos vidrio Pyrex® 10 ml de fondo redondo con tapón de rosca

Reactivos

- N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) con 1% trimetilclorosilano (TMCS). Sigma
- Cloroformo. Merck
- Etanol absoluto pureza para cromatografía. Merck
- Hidróxido potásico. Scharlau
- Sulfato sódico (Na_2SO_4) anhidro, p.a., riqueza: 99%. Panreac Química S.A. Scharlau
- n-hexano 96%. Multisolvent. Scharlau
- 2-propanol (isopropanol) 99,9%, Multisolvent. Scharlau
- Piridina (Syllilation grade). Fluka
- Patrones de esteroides :
 - o Colesterol (5-cholesten-3 β -ol). Sigma-Aldrich
 - o Epicoprostanol (patrón interno) (5- β -cholestan-3 α -ol). Sigma-Aldrich
 - o Campesterol (5-cholesten-24 α -methyl-3 β -ol). Steraloids
 - o β -sitosterol (Stigmast-5-en-3-ol). Fluka
 - o Estigmasterol (5,22-cholestadien-24 β -ethyl-3 β -ol). Steraloids

Disoluciones

- Patrón interno epicoprostanol: 0,2 mg/ml en etanol absoluto (para suero) y 1 mg/ml (para la bebida láctea).
- Patrón de campesterol: 1 mg/ml en etanol absoluto
- Patrón de β -sitosterol: 1,8 mg/ml en etanol absoluto
- Patrón de estigmasterol: 0,95 mg/ml en etanol absoluto
- Hidróxido potásico en etanol 0,71 M
- Reactivo derivatizante: BSTFA/Piridina 5:1 (v/v)

A.2. Determinación de EV en bebida láctea: Modo operatorio

El método aplicado consiste en la extracción de la grasa con disolventes orgánicos, liberación de los EV por hidrólisis alcalina, extracción del insaponificable con disolventes orgánicos, derivatización para obtener trimetilsilil derivados y separación y cuantificación por cromatografía de gases con FID.

a) Extracción de la fracción grasa (Folch et al., 1957)

Se pesa 1 g de la bebida láctea en un tubo pyrex (50 ml) con tapón de rosca y forrado externamente con papel de aluminio como preservación de la luz; se adicionan 3 ml de isopropanol y 200 µg de epicoprostanol (patrón interno). Se agita durante tres minutos con un homogeneizador Polytron, mantenido el tubo en baño de hielo. Se adicionan 3,5 ml de hexano y se agita durante otros tres minutos de igual forma. A continuación, se centrifuga a 3000 rpm y 10 °C durante 10 minutos.

Tras pasar por filtro separador de fases, adicionado de sulfato sódico anhidro, la fase hexánica se transfiere a un matraz de fondo redondo (50 ml), previamente tarado. La fase acuosa e interfase se extraen de nuevo con 3 ml de hexano y tras centrifugar (3000 rpm y 10 °C durante 10 minutos) se reúnen las fases hexánicas.

Se procede a la evaporación del hexano en rotavapor, a 30 °C, hasta un volumen inferior a 1 ml y se completa la evaporación en corriente suave de N₂. A partir del residuo obtenido se calcula el porcentaje de grasa.

b) Saponificación:

La grasa obtenida se redisuelve en hexano y se trasvasa a un tubo Pyrex (6 ml) con tapón de rosca. Después de evaporar el disolvente con N₂ hasta un volumen de 1,6 ml; se adiciona 1 ml de KOH 0,71 M en metanol. Se agita 20 segundos en vórtex, se purga con N₂ y se calienta en bloque calefactor a 65 °C durante 1 hora. Después de enfriar, se añaden 1 ml de agua destilada y 1 ml de hexano y se agita un minuto por inversión.

La fase hexánica se filtra (filtro separador de fases, con sulfato sódico anhidro) y se transfiere a un tubo cónico, previamente tarado. Tras evaporar bajo corriente de N₂ se obtiene la fracción insaponificable, procediéndose a calcular el porcentaje del mismo en la muestra.

c) Derivatización:

Al insaponificable obtenido se le añaden 100 µl de reactivo derivatizante, se purga con N₂ y se calienta a 65 °C, en bloque calefactor, durante 1 hora.

Una vez frío, se evapora el reactivo derivatizante en exceso, mediante corriente de N₂ y el residuo se redissuelve en 200 µl de cloroformo inyectándose 0,5 µl en el cromatógrafo de gases. Las condiciones cromatográficas se indican en la tabla nº 4.

Tabla nº 4. Determinación de EV en bebida láctea y suero por CG (FID).

Condiciones cromatográficas	
Temperatura inyector	280 °C
Temperatura detector	300 °C
Gas portador	Hidrógeno
Split	<ul style="list-style-type: none"> ○ Suero: Sin split ○ Bebida láctea: split ratio 1/10
Presión Hidrógeno	19 psi
Programa de temperaturas	<ul style="list-style-type: none"> ○ 150 °C durante 3 minutos ○ 30 °C/min hasta 280 °C y permanece 23 minutos ○ 10 °C/min hasta 295 °C y permanece 10 minutos
Tiempo programa	42 minutos
Volumen inyección	0,5 µl

A.3. Determinación de EV en suero: Modo operatorio

Para muestras de suero, no se precisa de la extracción previa de la grasa; por tanto, el método consiste en la liberación de los EV mediante hidrólisis alcalina, extracción del insaponificable con disolventes orgánicos y formación de trimetilsilil derivados (Wolthers et al., 1991).

A) Saponificación:

Una vez atemperado el suero, se pipetea 100 µl del mismo en un tubo Pyrex (10 ml) con tapón de rosca y se añaden 2 µg de epicoprostanol (patrón interno) y se procede a la saponificación con 1 mL de disolución de KOH 0,71 M. Después de purgar con N₂, durante 30 segundos, se calienta en bloque calefactor a 65 °C durante 1 hora.

Se deja enfriar a temperatura ambiente y a continuación se añaden 0,5 ml de agua destilada y 3 ml de n-hexano. Después de agitar con ayuda de vórtex durante 30 segundos, se centrifuga a 3600 rpm, a 18 °C durante 10 minutos y la capa superior se transfiere a un tubo cónico. Se repite la extracción con 3 ml de hexano y tras centrifugar se reúnen las fases hexánicas en el tubo cónico, evaporando el disolvente con N₂.

b) Derivatización:

Se realiza según se ha descrito en las muestras de bebida láctea (apartado A.2.).

Posteriormente, el residuo seco se disuelve en 30 µl de cloroformo y se procede a la inyección en el cromatógrafo en las condiciones indicadas en la tabla nº 4.

A.4. Identificación y cuantificación de EV

- Bebida láctea

Para la identificación de los EV en las muestras de bebida láctea, se comparan los tiempos de retención con los obtenidos para los patrones. Para

confirmar la identidad de los picos se recurre al Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València para su confirmación por cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (CG/EM). En la tabla nº 5 se indican las condiciones instrumentales para CG/EM.

Tabla nº 5. Determinación de EV en bebida láctea y suero por CG/EM

	CG-EM
Aparato	6890N-5973N, Agilent
Columna	ZB-5 ms, 30 m x 0,25 mm; f.e.: 0,25 µm, Phenomenex®
Programa del horno	T ₁ =180 °C, t ₁ =2 min; ΔT ₁ =6 °C/min; T ₂ =250 °C, ΔT ₂ =5 °C/min; T ₃ = 300 °C, t ₃ = 20 min
Gas portador (ml/min)	He (1)
Tª Inyector	280 °C
Modo de inyección	Sin split
Detector	EM Tª de la interfase: 280°C; ionización por impacto electrónico a 70 eV

(Tª= temperatura; t= tiempo)

Para la cuantificación de los EV se preparan patrones de campesterol y β-sitosterol (EV mayoritarios de la bebida) a partir de las disoluciones de trabajo de 1 mg campesterol/ml y 1,8 mg β-sitosterol/ml.

Se preparan tres patrones, conteniendo 200 µg de epicoprostanol como patrón interno. Las curvas de calibrado para cada EV son:

- Campesterol: 40, 100 y 200 µg
- β-Sitosterol: 198, 396 y 792 µg

- Suero

Para la identificación de los correspondientes EV, se comparan los tiempos de retención obtenidos con los patrones de EV. Como en el caso del producto lácteo, para confirmar la identidad de los picos se recurre al SCSIE de la Universitat de València para su confirmación por CG/EM.

Para cuantificar los EV presentes en suero se preparan las correspondientes curvas de calibrado. Para ello, se preparan patrones de campesterol (0,25, 0,5 y 0,75 μg) y de β -sitosterol (0,45, 0,90 y 1,35 μg).

Como patrón interno se adicionaron 2 μg de epicoprostanol. Además, se adicionaron a todos los tubos de patrones 200 μg de colesterol. La adición de colesterol a los patrones tiene como finalidad el que los tiempos de retención de los distintos EV queden afectados del mismo modo en muestras y patrones por el contenido de colesterol.

A.5. Parámetros analíticos

Para evaluar la calidad del método se determinan sus parámetros analíticos

- Bebida láctea

a) Precisión:

Se toman tres alícuotas de un mismo envase de Tetra-brick y se aplica el procedimiento descrito. Se calculan las correspondientes medias y desviaciones estándar. La precisión intra-día se calcula como coeficiente de variación (CV) expresado en porcentaje. Para calcular la precisión inter-día, se determinan los EV en tres alícuotas de un mismo suero en dos días diferentes y se calcula el CV.

- *b) Exactitud:*

Se evalúa mediante ensayos de recuperación de patrones adicionados a la matriz. Para ello, se preparan 6 alícuotas de la grasa procedente de la bebida láctea. A tres de ellas se les adicionan cantidades conocidas de campesterol y β -sitosterol y, posteriormente, se procede a la determinación de los EV por el método propuesto.

El porcentaje de recuperación se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = ((C - C_i) \times 100) / C_{ad}$$

Donde C= Contenido encontrado en las muestras adicionadas de EV; C_i = Contenido en las muestras sin adicionar; C_{ad} = Contenido de EV adicionados.

- Suero

a) Precisión:

Se toman tres alícuotas de un mismo suero, y se aplica el método descrito. La precisión intra-día se calcula como coeficiente de variación (CV) expresado en porcentaje. Para calcular la precisión inter-día, se determinan los EV en tres alícuotas de un mismo suero en dos días diferentes y se calcula el CV.

- *b) Exactitud:*

Se evalúa mediante ensayos de recuperación de un patrón adicionado a la matriz. Para ello, se preparan 6 alícuotas de un suero. A tres de ellas se les adicionan cantidades conocidas de EV y a todas ellas se les aplica el método descrito en el apartado anterior. El porcentaje de recuperación se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = ((C - C_i) \times 100) / C_{ad}$$

Donde C= Contenido encontrado en las muestras adicionadas de EV; C_i = Contenido en las muestras sin adicionar; C_{ad} = Contenido de EV adicionados.

- *c) Límite de detección:*

Se estima por dilución de la concentración del patrón más bajo utilizado en la recta de calibrado.

Una vez puestos a punto los métodos, se aplicaron a la determinación de los EV presentes en la bebida láctea suministrada en el ensayo clínico de intervención y a la determinación de los EV en sueros procedentes de los individuos participantes en el estudio de intervención.

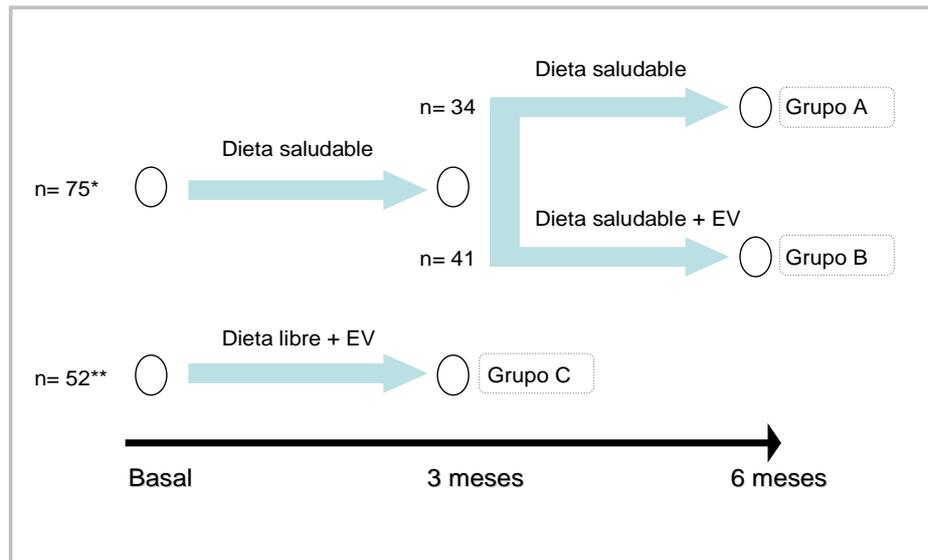
B. Diseño del estudio clínico de intervención para valorar el efecto de la ingesta de una bebida láctea enriquecida en EV.

Se ha realizado un estudio de intervención dietética en sujetos con hipercolesterolemia moderada o normocolesterolemia.

El estudio consistió en un ensayo paralelo aleatorizado con un diseño de tres brazos y tuvo lugar durante un período de 6 meses. En primer lugar, a fin de estabilizar los hábitos alimentarios en los grupos que iban a seguir una terapia dietética (dieta saludable o dieta saludable más EV), a los individuos seleccionados se les administró una dieta saludable, recomendada por la Sociedad Española de Arteriosclerosis durante tres meses (indicada en B.2.).

Después de este período de adaptación, se evaluaron tres grupos de intervención: a) un grupo con dieta saludable, la cual incluye 500 ml/día de leche baja en grasa (grupo A: dieta saludable), b) otro grupo que siguió una dieta saludable y además recibió 2 g de EV/día en 500 ml de leche baja en grasa (grupo B: dieta saludable+EV), y c) un grupo que siguió una dieta libre, cuyos miembros consumieron 2 g de EV/día en 500 ml de leche baja en grasa y se les animó a mantener sus hábitos dietéticos (grupo C: dieta libre +EV).

En la figura nº 7 se esquematiza el diseño del estudio clínico.



* Individuos con hipercolesterolemia moderada sin tratamiento farmacológico

** Individuos de la población general sin tratamiento farmacológico

RD: recomendaciones dietéticas de la Sociedad Española de Aterosclerosis

DL: Dieta libre

EV: Esteroles vegetales (2 g/día)

O: Toma de muestra sanguínea

Figura nº 7. Diseño del estudio clínico de intervención para evaluar la eficacia de 2 g/día de EV.

Se compararon los parámetros lipídicos, EV, y parámetros de estrés oxidativo en suero en situación basal y tras los tres meses de intervención y, además, se determinó el genotipo de la Apolipoproteína E de cada uno de los individuos.

Las muestras para bioquímica se extrajeron y procesaron en el Hospital Universitario Doctor Peset (Sección de Bioquímica y Sección de Endocrinología) al inicio, a los 3 meses y a los seis meses de la intervención. Los pacientes estuvieron en ayunas desde, al menos, doce horas antes de efectuarse las

extracciones. Éstas se efectuaron entre las 8:00 y las 10:00 a.m. por venopuntura antecubital mediante un sistema de extracción con vacío ("Vacutainer"), con estasis mínima. Se utilizaron tubos secos de 5 ml no conteniendo ningún anticoagulante para las determinaciones bioquímicas.

Los tubos secos destinados a las determinaciones bioquímicas se centrifugaron a 2000 g durante 15 minutos, a 4 °C, para separar el suero, procesándose las muestras para bioquímica en el día, y almacenándose las muestras para el resto de determinaciones en partes alícuotas en criotubos a -80 °C hasta su procesamiento. La inclusión tanto de pacientes como de voluntarios fue sucesiva durante 2 años, para minimizar la influencia de los cambios estacionales.

B.1. Sujetos del estudio

Los sujetos del estudio fueron pacientes con hipercolesterolemia moderada y sin tratamiento terapéutico de la misma, con edades comprendidas entre 18 y 76 años, seleccionados de forma consecutiva entre los pacientes que acudían a la Sección de Endocrinología del Hospital Universitario Doctor Peset hasta completar el número necesario.

Los criterios de inclusión para participar en el estudio fueron:

- Concentración sérica de c-LDL: a) entre 160-190 mg/dl en pacientes con menos de 2 factores de riesgo cardiovascular, b) 130-160 mg/dl en los pacientes que presentaron 2, o más factores, de riesgo cardiovascular.
- Concentración de triglicéridos <400 mg/dl.

Los factores de riesgo cardiovascular se definieron como: edad (≥ 45 años en hombres y ≥ 55 años en las mujeres), con hábito de fumar, hipertensión arterial ($\geq 140/90$ mm Hg), diabetes mellitus, concentración de c-

HDL <40 mg/dl, e historia familiar de enfermedad cardiovascular (Conroy *et al.* 2003; Marrugat *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2007).

A su vez, se seleccionaron voluntarios, preferiblemente con hipercolesterolemia moderada (c-LDL <190 mg/dl) y sin tratamiento terapéutico de la misma, pertenecientes a la población general de Valencia y con edades superiores a 18 e inferiores a 76, sin haber padecido previamente enfermedad cardiovascular alguna.

Los criterios de exclusión para ambos grupos fueron: padecer enfermedades infecto-contagiosas, procesos agudos que eleven los parámetros bioquímicos seleccionados, insuficiencia hepática, enfermedades tiroideas, o enfermedades renales. También se excluyeron todas aquellas personas con intolerancia a la lactosa o que no mostraran voluntad para asegurar el cumplimiento de la ingesta diaria de 500 ml de leche enriquecida.

El estudio se realizó de acuerdo a las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki, y todos los procedimientos en seres humanos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital. Se solicitó de cada paciente su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio (ver Anexo II).

B.2. Recomendaciones dietéticas

Se realizó un seguimiento clínico de cada paciente al inicio, tras los 3 meses de adhesión a la dieta propuesta y posteriormente tras los últimos 3 meses del estudio, para reforzar el seguimiento de la dieta y comprobar la ausencia de efectos secundarios de la misma. Así pues, los pacientes que siguieron una dieta saludable, baja en colesterol y grasas saturadas, fueron monitorizados durante el estudio por una dietista experimentada y recibieron instrucciones detalladas escritas y orales sobre su dieta, incluyendo las

cantidades precisas que habían de comer y la calidad de los productos alimenticios destinados a ser consumidos.

La dieta recomendada incluyó: un aporte diario de energía próximo a 8360 KJ (2000 Kcal) para los hombres y 7106 KJ (1700 Kcal) para las mujeres, de los cuales, del 18-19% de la energía debía ser aportado por las proteínas, 52-53% como hidratos de carbono y 29-30% como grasa entre ellas: $\leq 20\%$ como ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) (aportados principalmente por el aceite de oliva), $<7\%$ de grasa saturada y aporte de ácidos grasos ω -3, a través del consumo de pescado a razón de 4 raciones/semana. La ingesta total de colesterol debía ser <200 mg/día y $<10\%$ de la energía total diaria de azúcares simples. Además se recomendó el consumo de 2-3 piezas de fruta/día y el de verdura (sin límite), lo que ayudó a cubrir el consumo diario de fibra (entre 20-30 g).

La adherencia a la dieta fue comprobada a través de los registros de alimentos de 3 días (recopilación de lunes a viernes) y un recordatorio de alimentos de 24 horas, al inicio, después del período de adaptación y al final del estudio (realizado durante las citas con el dietista). A partir de los datos de ingesta de alimentos recogidos, se calculó la energía y los nutrientes con la ayuda de la Tabla de Composición de Alimentos editada por la Universidad de Granada (Mataix *et al.*, 2003). La base de datos fue creada con el software de análisis de dietas AYS44 obtenido por ASDE, SA (Valencia, España). A los pacientes se les indicó que durante el estudio deberían mantener su patrón normal de actividad física.

B.3. Descripción de la bebida láctea utilizada en el estudio

Se contactó con una industria láctea fabricante de productos enriquecidos en EV para la elaboración de un producto líquido conteniendo 0,4 g de EV/100 ml y envasado en Tetra-brick de 500 ml, cantidad de bebida que proporciona 2 g de EV (cantidad incluida en el intervalo de cantidad diaria estimada eficaz para

reducir colesterolemia (Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, 2001)).

Los ingredientes de la misma fueron: leche desnatada (98%), aceites vegetales (girasol y maíz) (1,5%), ésteres de EV (0,67%, que expresados como EV corresponde a 0,4%), emulgente (E-435), estabilizadores (fosfatos y polifosfatos de sodio), vitaminas E, A, D.

En la tabla nº 6 se recoge la composición nutricional indicada por el fabricante.

Para la caracterización de los fitosteroles presentes en la bebida láctea, se tomaron muestras de tres lotes de fabricación distintos, analizándose tres alícuotas de cada uno de los lotes.

Tabla nº 6. Bebida láctea enriquecida en EV. Información nutricional por 100 ml.

Energía	201KJ/48 Kcal
Proteína	3,2 g
Carbohidratos	4,7 g
De los cuales azúcares	4,7 g
Grasas*	1,80 g
Saturadas	0,25 g
Monoinsaturadas	0,50 g
Poliinsaturadas	1,05 g
Colesterol	Trazas
Fibra	0 g
Sodio	0,06 g

* excluyendo 0,4 g de EV, los cuales no contribuyen al valor energético

El grupo de individuos que siguió únicamente las recomendaciones dietéticas (Grupo A) recibió una leche semidesnatada disponible en el mercado con una composición similar de macronutrientes y energía a la que consumen el grupo de individuos suplementados con EV. A todos los pacientes se les recomendó consumir la leche suministrada en dos tomas al día, a ser posible

con las comidas. El cumplimiento se evaluó mediante entrevistas a los pacientes y del conteo de los envases sin abrir devueltos a la consulta, y fue evaluado como porcentaje de porciones consumidas programado. El incumplimiento se definió como el consumo de <80% de las raciones programadas durante el período de estudio.

B.4. Determinación de parámetros antropométricos

Se determinó el peso de los individuos sin zapatos, mediante una báscula (con estimación de 0,1 kg), así como la talla (con estimación de 0,5 cm), sin zapatos y con la cabeza alineada siguiendo la línea trago-comisural. A partir de ambos valores se calculó el índice de masa corporal ($IMC = \text{peso en kg} / (\text{talla en cm})^2$). También, se determinaron el perímetro de la cintura en la línea media entre el margen costal inferior y la cresta ilíaca, a nivel de la espina ilíaca antero-superior (con ayuda de una cinta métrica, con estimación de 0,5 cm), y el perímetro de la cadera a nivel de los trocánteres mayores (con estimación de 0,5 cm), calculando a partir de ambos valores el índice cintura/cadera (ICC). Se calculó la tensión arterial realizando la media de tres mediciones basales en decúbito supino, con un esfigmomanómetro. La esfigmomanometría se realizó según las recomendaciones del "The *Sixth Report of Joint National Committee*" (1997).

B.5. Determinación de parámetros bioquímicos

Tanto de las muestras de suero obtenidas al inicio, como a los tres y seis meses de la intervención se determinan los siguientes parámetros bioquímicos: colesterol total y triglicéridos por método enzimático (Allain *et al.*, 1974; Bucolo y David *et al.*, 1973), y c-HDL por precipitación directa (Sugiuchi *et al.*, 1995) mediante un autoanalizador Beckman LX-20 (Beckman Coulter, La

Brea, CA, USA). El coeficiente de variación intraensayo fue inferior a 3,5% para todas las determinaciones. La concentración de c-LDL se calculó por la fórmula de Friedewald ($c\text{-LDL} = \text{colesterol total} - c\text{-HDL} - (\text{triglicéridos}/5)$) (Friedewald *et al.*, 1972), siempre que los niveles de triglicéridos fueran inferiores a 300 mg/dl. La concentración de colesterol no HDL fue obtenida calculando la diferencia entre el colesterol total y el c-HDL. Las apolipoproteínas (Apo) A-I y B fueron determinadas por inmunonefelometría (Dade Behring BNII, Marburg, Germany), para las cuales el coeficiente de variación intraensayo fue inferior a 5,5%.

El tamaño de las partículas LDL se determinaron por electroforesis en gradiente en gel de poliacrilamida (2-16%) de acuerdo con el método descrito por Nichols *et al.* (1986), con ligeras modificaciones. Las muestras de suero (10 μl) se tiñeron con una solución de etilenglicol y 0,1 (p/v) de negro Sudán (Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, MO, EE.UU.) y se cargaron en el gel a una concentración final del 10% de sacarosa. La electroforesis se realizó en una celda refrigerada (4-8 °C) durante una pre-electroforesis de 60 minutos a 120 V, seguido de 30 minutos a 20 V, 30 minutos a 70 V, transcurrido la cual las muestras se sometieron 15 horas a 90 V. Como controles se utilizaron dos sueros medidos por resonancia magnética nuclear que contenían tres fracciones cuyos diámetros eran de 28,4 nm, 26,2 nm y 24,4 nm. Los geles fueron escaneados, y se midieron las distancias de migración (de la parte superior del gel a la banda más importante). El diámetro de las partículas LDL predominante de cada muestra se calculó a partir de una recta de calibrado. Las subclases de partículas LDL fueron clasificadas como LDL pequeñas y densas, o patrón B (diámetro <25,5 nm) y LDL grandes, o patrón A (diámetro \geq 25,5 nm) (Austin *et al.*, 1988). El coeficiente de variación intra-e inter-gel fue inferior a 1. En la figura nº 8 se muestra una imagen del gel de poliacrilamida obtenido.

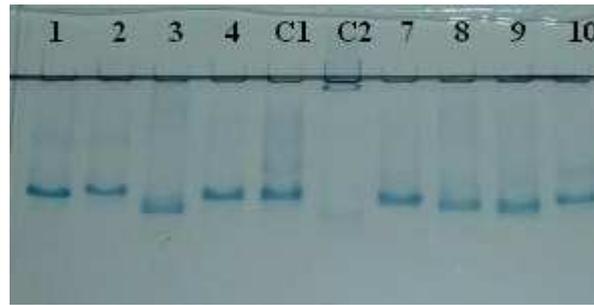


Figura nº 8. Imagen representativa de las bandas de c-LDL utilizando un gel de poliacrilamida en gradiente (2-16%). Las bandas 1, 2, 4, 7 y 10 corresponden a muestras con un patrón A, mientras que las bandas 3, 8 y 9 corresponden a muestras con un patrón B y las bandas 5 y 6 corresponden a dos controles con 3 bandas de diámetros conocidos (C1: 28,4 nm y 26,2 nm y C2: 24,4 nm).

B.6. Determinación del genotipo de la apolipoproteína E

Para evaluar el efecto de Apo E en su respuesta al tratamiento, los sujetos fueron clasificados en tres grupos:

- a) E2: E2/E2, E2/E3 y E2/E4
- b) E3: E3/E3
- c) E4: E3/E4 y E4/E4

En primer lugar se extrajo el ADN según el método de Miller *et al.* (1988), almacenándose a -80 °C hasta su análisis. El genotipo de la Apo E fue identificado después de la amplificación por PCR de un fragmento de 244 pb utilizando como oligonucleótidos: forward-5' # ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3' # y reverse-5' #TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3' #. Se realizó una reacción de PCR en un volumen total de 25 µl que contenía 0,3 mM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1x buffer Taq, 2 mM MgCl₂, 100 ng de DNA genómico y 2,5 U Taq polimerasa (Netzyme, Valencia, España), utilizando un termociclador Master-Cycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, EE.UU.). Cada mezcla de

reacción se calentó a 94 °C durante 30 segundos, 64 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 35 segundos. En total, se realizaron cuarenta ciclos. Se realizó un último ciclo a 72 °C durante 5 min. Se tomaron 8 µl del producto de la PCR y se realizó una digestión con enzimas de restricción (0,4 U de la endonucleasa de restricción Hha I) durante 4 horas a 37 °C. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (8%) para separar los fragmentos resultantes de la digestión. Después de la electroforesis, se trató el gel con una tinción de plata para visualizar los fragmentos de ADN.

B.7. Evaluación del estrés oxidativo tras una ingesta prolongada de EV

B.7.1. Susceptibilidad a la oxidación de las LDL in vitro

La oxidación del c-LDL fue evaluada mediante la monitorización de la formación de dienos conjugados tras la oxidación catalizada por Cu^{2+} *in vitro* según Esterbauer *et al.* (1989). En resumen, primero se aisló el c-LDL usando una columna de adsorción de LDL con dextran sulfato (Liposorber® LA-15 System Facts, Kaneka America Corp, NY, EE.UU.). A continuación se eliminaron las sales, haciendo pasar las muestras de c-LDL a través de una columna de poliacrilamida (Bio-Gel P6, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Las muestras se diluyeron con un tampón fosfato salino (pH 7,4) a una concentración final de 100 µg LDL Apo B/ml y se incubaron con 5 µM Cu^{2+} a 37 °C durante 5 horas. La formación de dienos conjugados se determinó mediante una monitorización espectrofotométrica continua cada 2 minutos a 234 nm.

En la oxidación se distinguen tres fases: a) fase inicial de latencia (consumo de antioxidantes endógenos), b) fase de propagación (rápida oxidación de ácidos grasos insaturados a hidroperóxidos lipídicos) y c) fase de descomposición (formación de compuestos secundarios de la oxidación ej. aldehídos reactivos como malondialdehído, 4-hidroxinonenal) (Mertens y Holvoet, 2001). Durante las fases inicial, de propagación y al inicio de la fase de

descomposición, el curso temporal de la formación de dienos refleja plenamente el perfil de lípidos hidroperóxidos en el tiempo (figura nº 9) (Esterbauer *et al.*, 1992). Esta técnica *in vitro* no mide la presencia de productos de oxidación en las lipoproteínas, sino que proporciona una medida de la susceptibilidad intrínseca (tiempo de retardo) de la lipoproteína de ser oxidada (Esterbauer *et al.*, 1992). El tiempo de latencia fue estimado como el tiempo de incubación correspondiente con la intersección de 2 líneas que representaban los cambios en la densidad óptica; una a través del inicio, curva aumentando ligeramente, que representa el consumo de antioxidantes endógenos, y la otra, curva aumentando rápidamente, que representa la fase de propagación de la oxidación de las LDL (Esterbauer *et al.*, 1989).

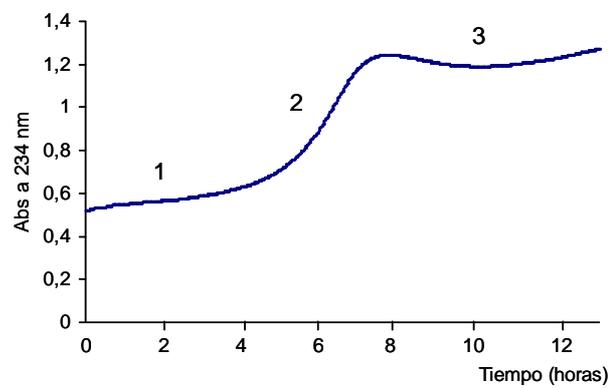


Figura nº 9. Curva continua de medida de oxidación de LDL por absorción de dienos conjugados a 234 nm. 1. Fase de latencia; 2. Fase de propagación; y 3. Fase de descomposición.

B.7.2. Evaluación de la capacidad antioxidante total

- Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox)

Se realizó mediante un kit comercial (Antioxidant Assay Kit, ref. 709001) basado en técnicas enzimático-colorimétricas suministrado por Laboratorios Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

En esta técnica se hace reaccionar la ferrimioglobina y el ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolín sulfonato]) para obtener el radical catión ABTS^{•+}, que presenta color verde-azulado, cuya intensidad de color puede medirse en espectrofotómetro a 750 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra inhibe la formación de este catión, de modo que se producirá una reducción en la intensidad de la coloración, proporcional a la concentración de antioxidantes de la muestra (Miller *et al.*, 1993; Miller y Rice-Evans, 1997). La capacidad de los antioxidantes en la muestra para evitar la oxidación de ABTS^{•+} se compara con la de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), que es el antioxidante patrón de uso más generalizado, y se cuantifica como equivalentes de Trolox (mM).

La determinación de los antioxidantes totales se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A cada uno de los pocillos de la placa (96 pocillos) se añaden 150 µl de cromógeno (disolución de ABTS^{•+}), 10 µl de metamioglobina y a continuación 10 µl del patrón Trolox, blanco y muestra, convenientemente diluida con tampón fosfato salino para que la medida de absorbancia se encuentre dentro del intervalo de linealidad. La dilución seleccionada para los sueros es de 1/25. Se añaden 40 µl de la solución de trabajo de peróxido de hidrógeno a todos los pocillos, se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 750 nm. Las determinaciones se realizan por duplicado.

La cuantificación de la velocidad de reacción se realiza mediante una recta de calibrado determinando la absorbancia promedio de los patrones en función de la concentración de Trolox final (0; 0,044; 0,088; 0,135; 0,18; 0,225; 0,330 mM).

La concentración de antioxidantes de las muestras se calcula mediante la ecuación obtenida a partir de la regresión lineal de la curva estándar mediante la interpolación de los valores de absorbancia media para cada

muestra en la ecuación. La capacidad antioxidante se expresa en equivalentes de Trolox (mmol/L).

B.7.3. Evaluación de la actividad oxidante

- Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La actividad oxidante se evaluó mediante la determinación del malonildialdehído (MDA) como producto de la peroxidación lipídica, siguiendo la técnica del ácido tiobarbitúrico y sustancias que reaccionan con él (TBARS) (Janero, 1990; Jentzsch, 1996; Lefevre *et al.*, 1998). Se preparan, en tubos eppendorf, los patrones de concentraciones crecientes de MDA, a partir de la disolución madre de MDA (1,1,3,3-Tetraetoxipropano, SIGMA) (0, 1, 3, 5 y 10 μM).

Una vez preparados, se pasan 50 μl de cada uno de los patrones a tubos de vidrio, en los que se realiza el resto de la técnica.

Las muestras a analizar se mantienen almacenadas en criotubos. De ellos, se toma un volumen de 50 μl que se travasan a tubos de vidrio. Una vez los distintos patrones y muestras están en estos tubos de vidrio, se añaden 80 μl de Sodium Dodecil Sulfate 7% (SDS), 800 μl de HCl 0,1 N, 120 μl de ácido fosfotúngstico 1% y finalmente se añaden 400 μl de TBA 0,67%, de tal forma que se obtiene el complejo MDA-TBA. Se mezcla, se tapa y se calienta a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora (en oscuridad). A continuación, se añaden 800 μl de n-butanol, se centrifuga a 2800g durante 10 minutos y por último se cargan 250 μl en una placa microtiter y se lee la fluorescencia (Fluoroscán Ascent FL) a una longitud de onda de excitación de 544 nm y de emisión de 593 nm.

C. Evaluación de la biodisponibilidad de esteroides vegetales

C.1. Biodisponibilidad *in vitro*

C.1.1. Cultivo celular (Línea celular Caco-2)

Las células Caco-2 son una línea de células tumorales. Fue establecida en 1977 por Fogh y sus colaboradores a partir de adenocarcinoma de colon humano obtenido de un paciente de raza caucasiana de 72 años.

Se caracterizan por ser capaces de diferenciarse adquiriendo las características del enterocito maduro (organización de las células en una monocapa polarizada, uniones intracelulares estrechas y formación de domas cuando crecen adheridas a soportes impermeables). Son por ello herramientas útiles para el estudio *in vitro* de la función y diferenciación de las células intestinales, concretamente para estudios de captación y transporte de componentes de alimentos (Pinto *et al.*, 1983).

Las células Caco-2, utilizadas en este estudio, proceden de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; número 86010202, Salysbury, UK). Todos los cultivos se utilizan entre los pases 53 a 71. El mantenimiento de las células se lleva a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adiciona 15 ml de Medio mínimo Esencial (MEM) enriquecido con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 1% (v/v) de antibióticos, 1% (v/v) de L-glutamina, 1%(v/v) de HEPES, 1% (v/v) de piruvato sódico y 0,4% (v/v) de fungizona. Las células se incuban a 37 °C, en atmósfera con 95% de humedad relativa y con un flujo de CO₂ de 5%. El medio de cultivo se cambia cada 2 días. Una vez el cultivo alcanza el 70% de confluencia, se elimina el MEM por aspiración y la monocapa celular se lava con 10 ml de una disolución fosfato tamponada (PBS) para eliminar restos de medio de cultivo y las células no viables.

Para despegar la monocapa celular, se adicionan 10 ml de una disolución de Tripsina-EDTA, previamente atemperada a 37 °C. Se deja actuar

durante 1-2 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se elimina por aspiración. El frasco se incuba durante 10 minutos a 37 °C, en atmósfera con 95% de humedad relativa y con un flujo de CO₂ de 5%. Transcurrido ese tiempo, se recogen las células resuspendidas en MEM. Se toma una alícuota de la suspensión celular donde se lleva a cabo el recuento y se determina la viabilidad celular.

Para los ensayos de citoprotección, las células se siembran a una densidad de 5×10^4 células viables cm⁻² en placas de 24 pocillos y se incuban a 37° C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, cambiando el medio cada 2-3 días hasta alcanzar la diferenciación celular (15-18 días postsiembra), estado en que presenta la máxima actividad enzimática de los enzimas del borde en cepillo (Jovani *et al.*, 2001).

C.1.2. Viabilidad celular

La viabilidad se determina mediante tinción con azul tripán (técnica de exclusión de colorante). Este ensayo permite determinar viabilidad y proliferación celular evaluando la integridad de membrana celular. Distingue entre células vivas y muertas, ya que el azul tripán sólo penetra en células muertas/no viables.

Se retira el medio de cultivo y las células se despegan con disolución de Tripsina-EDTA. A continuación, se agita bien la suspensión celular y se pipetea volúmenes iguales de la suspensión celular y de la disolución de azul tripán en un tubo Eppendorf. Tras agitar la mezcla, se transfiere una alícuota a uno de los compartimentos de una cámara Neubauer. Se cuentan, mediante microscopio invertido, células totales (vivas y muertas), así como células teñidas (muertas). Para un recuento más exacto pueden contarse las cuatro regiones de la cámara y obtener la media aritmética de los recuentos.

Los porcentajes de viabilidad celular y de inhibición de la proliferación celular se calculan mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Viabilidad (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ células viables} / \text{n}^\circ \text{ células totales}) \times 100$$

C.1.3. Funcionalidad mitocondrial (test MTT)

La funcionalidad de las mitocondrias se evalúa con el test MTT (ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) que proporciona una medida parcial del metabolismo celular. La reducción de MTT a formazán insoluble en las células viables está catalizada por deshidrogenasas mitocondriales acopladas al proceso de fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria (Ekmekcioglu *et al.*, 1999).

Se adiciona MTT (concentración final de 0,5 mg/ml en PBS), y se incuba (37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa) durante 2 horas. Se elimina el sobrenadante y la monocapa celular se lava con PBS. Se adicionan 2 ml de una disolución de isopropanol ácido y Tritón 10% (v/v), y se agita durante 5 minutos para disolver el formazán insoluble. Se mide la absorbancia a 570 nm frente a aire y el valor obtenido se corrige con la sustracción de fondo a 690 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia con respecto al control.

C.1.4. Ciclo celular: análisis del contenido de ADN

El ciclo celular es la secuencia cíclica de etapas por las cuales una célula coordina el proceso de duplicación de ADN y división celular. Generalmente, podemos diferenciar cuatro fases denominadas G₁, S, G₂ y Mitosis. El período G₁, llamado primera fase de crecimiento, se inicia con una célula hija que proviene de la división de la célula madre. La célula aumenta de tamaño, se sintetiza nuevo material citoplasmático, sobre todo proteínas y ARN. El período S o de síntesis, en el que tiene lugar la duplicación del ADN, el contenido total del

ADN se incrementa del valor diploide de $2n$ al valor completamente replicado de $4n$. El período G_2 , o segunda fase de crecimiento, se sigue sintetizando ARN y proteínas; el final de este período queda marcado por la aparición de cambios en la estructura celular que nos indica el principio de la mitosis o división celular. El período de tiempo que transcurre entre dos mitosis, y que comprende los períodos G_1 , S y G_2 , se le denomina Interfase. El análisis mediante citometría de flujo de la tinción selectiva de los ácidos nucleicos ADN y ARN con los fluorocromos Hoeschst 33342 y Pironina Y respectivamente, permite evaluar el contenido total de los mismos y estudiar la proporción celular en las distintas etapas del ciclo celular (Halicka *et al.*, 2000; Thornley *et al.*, 2001; Janumyan *et al.*, 2003).

Se despega la monocapa celular con una disolución de Tripsina-EDTA (2,5 g/l) y se recogen las células con 1 ml de una disolución de PBS:etanol 1:3 (v/v), se mantiene durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos. A continuación, se elimina el sobrenadante por decantación, se adicionan 0,7 ml de la disolución de Hoescht 33342 (1 $\mu\text{g/ml}$) y se incuba durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionan 0,7 ml de la disolución de Pironina Y (2 $\mu\text{g/ml}$) y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se homogeniza y se analiza mediante citometría de flujo (Hoechst $\lambda_{\text{excitación}}$: 346 nm – $\lambda_{\text{emisión}}$: 460 nm; Pironina Y $\lambda_{\text{excitación}}$: 555 nm – $\lambda_{\text{emisión}}$: 580 nm).

C.1.5. Ensayos de captación y transporte

Las células se siembran en pocillos bicamerales sobre membranas de policarbonato (24 mm diámetro, tamaño de poro de 0,4 μm ; Transwell®, Costar Corp., NY, EEUU), con 2 ml de MEM en la cámara basal y 1,5 ml de la

suspensión celular en la cámara apical. En la figura nº 10 se muestra el sistema bicameral empleado para los estudios de captación y transporte.

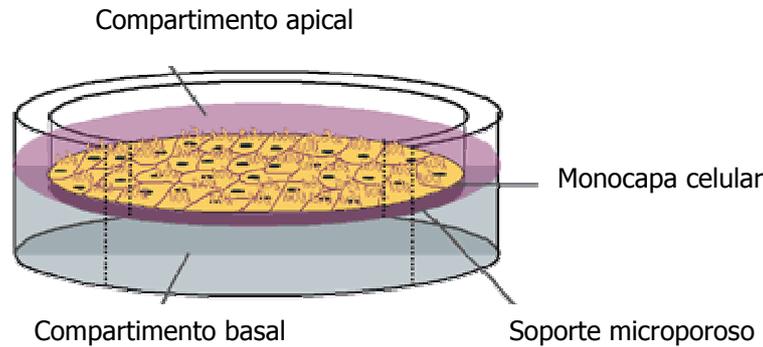


Figura nº10. Sistema bicameral empleado para los estudios de captación y transporte en células Caco-2.

Una vez alcanzada la diferenciación celular (15-18 días postsiembra), el medio de cultivo se aspira y la monocapa celular se lava con PBS. En la cámara basal se adiciona 2 ml de MEM como medio aceptor, y en la cámara apical 1,5 ml entre las disoluciones patrón y el medio de cultivo. Basándonos en el estudio de Fahy et al. (2004) según el cual la concentración máxima de exposición a sitosterol sin daño celular es de 20 μM , se han adicionado los μl pertinentes de disoluciones patrón para no superar esta concentración, así como se han añadido patrones de carotenoides (0,03 μM) junto con los fitosteroles para evaluar si influyen en la biodisponibilidad de los EV. Las disoluciones patrón se adicionan con medio de cultivo (1,5 ml, en total, en la cámara apical).

Se utilizan placas de 6 pocillos para cada muestra, dejando uno de los pocillos con adición solo de medio de cultivo en la cámara apical que se toma como blanco. Los cultivos se incuban durante 24 horas a 37 °C, 5% CO_2 y 95% de humedad relativa. Transcurrido este tiempo se recoge por aspiración el

contenido de las cámaras apical. La monocapa celular se lava 3 veces con PBS, se despega con una disolución de SDS y se recogen en tubo de Pyrex de 10 ml.

Los medios basales se recogen en tubos de Pyrex de 25 ml. Por un lado se recoge el blanco y por otro se reúne el contenido de los basales de los 5 pocillos restantes. En la monocapa celular se determina el contenido de campesterol y β -sitosterol. El porcentaje de retención de EV se estima a partir de la relación entre los contenidos de campesterol y β -sitosterol hallados en la monocapa celular y los adicionados al cultivo. El porcentaje de transporte se estima a partir de la relación entre el contenido de esteroides hallados en el medio basal y el contenido al que se expone el cultivo.

C.1.6. Determinación de esteroides vegetales por CG

Extracción de esteroides vegetales de la monocapa celular y medio basal

A la monocapa celular recogida en tubos Pyrex de 10 ml de fondo redondo con tapón de rosca se adicionan 3 ml de metanol y se agita en vortex durante 3 minutos. Tanto a la monocapa celular así como a los medios basales se les adicionan 2 μ g de patrón interno.

El método aplicado para la determinación de EV corresponde al que se ha descrito anteriormente para el suero en el apartado A.3.

C.1.7. Determinación de proteínas en el cultivo celular

Los resultados se expresan como μ g/mg proteína, por lo tanto es necesario determinar el contenido proteico de la monocapa celular, utilizando para ello el método de Lowry *et al.* (1951). El método se basa en la formación de un complejo entre el cobre y los enlaces peptídicos de las proteínas. A continuación, se añade el reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (ácido fosfomolibdotúngstico), el cual reacciona con los residuos de aminoácidos aromáticos (tirosina), lo que sumado al complejo anterior proporciona intensa

coloración azul (con máximo de absorción a 750 nm). La determinación de proteínas se realiza según se indica en la tabla nº 7 utilizando albúmina de suero bovino (ASB) como patrón.

Tabla nº 7. Determinación de proteínas totales

	B	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Muestra
ASB 0,2 mg/ml (ml)	--	0,05	0,10	0,30	0,40	0,50	0,70	--
Homogeneizado celular(ml)	--	--	--	--	--	--	--	0,05
H ₂ O (ml)	0,70	0,65	0,60	0,40	0,30	0,20	--	0,65
Lowry A+B (1:1 v/v) (ml)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50

B= blanco; P1-P6 = disoluciones patrón de ASB

Tras la adición de cada una de las disoluciones se agita por inversión y se deja a temperatura ambiente 10 minutos. Se adicionan 0,25 ml del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y se agita por inversión. Se deja a temperatura ambiente, durante 30 minutos y se mide la absorbancia a 750 nm.

C.2. Biodisponibilidad *in vivo*

El incremento en las concentraciones séricas de EV tras la ingestión de la bebida rica en EV constituye una estimación de la biodisponibilidad (BD) de estos EV.

El porcentaje de cambio de un determinado EV en suero respecto al valor basal en los distintos grupos de pacientes analizados tras el tratamiento dietético se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\Delta EV (\%) = \left[\frac{\text{concentración final} - \text{concentración inicial}}{\text{concentración inicial}} \right] \times 100$$

D. Tratamiento estadístico

Para el tratamiento estadístico de los resultados, se utilizó el programa SPSS 15.0. Se calcularon la media aritmética y desviación estándar como medidas de estadística descriptiva. Se aplicó el test de Kolmogorov- Smirnov a los datos para comprobar la distribución normal de las variables. Dicho test mostró que todas las variables siguieron una distribución normal, excepto la variable triglicéridos. Se realizó la transformación logarítmica de la misma, y la nueva variable obtenida siguió una distribución normal. Para la comparación de medias, se aplicó el test-t de Student para grupos independientes al comparar las medias de casos y controles, y el test-t de Student para grupos apareados para comparar los casos antes y después de la intervención dietética, ANOVA y ANOVA de 2 factores para comparar las medias entre tres grupos. Para el análisis de la correlación entre variables continuas se utilizó el estadístico p de Pearson.

El tamaño muestral varió dependiendo del objetivo a alcanzar así pues, éste fue como mínimo de 20 sujetos por grupo con el fin de proporcionar una potencia estadística del 80% y, por tanto, detectar diferencias entre los dos grupos en los valores del criterio de eficacia primario (variación de c-LDL) igual o superior a 15 mg/dl, asumiendo una desviación estándar de 23 mg/dl.

RESULTADOS

A. Optimización de la determinación de EV en bebida láctea y en suero por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)

A.1. Parámetros analíticos

A.1.1. Determinación de EV en bebida láctea

- Evaluación de la precisión del método

En la tabla nº 8 se indican los coeficientes de variación obtenidos.

Tabla nº 8. Determinación de EV en bebida láctea. Precisión del método (n= 3).

Fitosterol	Intra-ensayo CV (%)	Inter-ensayo CV (%)
Campesterol	2,1	8,1
β-sitosterol	5,6	12,3

- Evaluación de la exactitud del método

Las ecuaciones correspondientes a las curvas de calibrado de los esteroides analizados y los porcentajes de recuperación obtenidos se indican en las tablas nº 9 y 10, respectivamente.

Tabla nº 9. Determinación de EV en bebida láctea. Curvas de calibrado.

Fitosterol	Ecuación	r
Campesterol	$y = - 0,0582 + 1,1123 x$	0,9893
β-sitosterol	$y = - 0,0406 + 1,2889 x$	0,9986

y = área fitosterol / área p.i.; x = μg fitosterol / μg p.i.; r, coeficiente de correlación

Tabla nº 10. Determinación de EV en bebida láctea. Exactitud del método (n=3).

Fitosterol	Presente (µg)	Añadido (µg)	Encontrado (µg)	Recuperación (%)
Campesterol	216,3 ± 9,0	149,1 ± 9,8	365,1 ± 7,2	99,8 ± 4,8
β-sitosterol	930,9 ± 54,5	345,5 ± 23,2	1294,6 ± 26,7	105,2 ± 7,7

A.1.2. Determinación de EV en suero

Se opta por cuantificar β-sitosterol y campesterol al ser los EV mayoritarios presentes en suero.

Las ecuaciones de las curvas de calibrado correspondientes a los esteroleos analizados se indican en la tabla nº 11.

Tabla nº 11. Determinación de EV en suero. Curvas de calibrado.

Fitosterol	Ecuación	r
Campesterol	$y = 0,0399 + 1,0825 x$	0,9299
β-sitosterol	$y = 0,0318 + 0,8040 x$	0,9760

$y = \text{área fitosterol} / \text{área p.i.}; x = \mu\text{g fitosterol} / \mu\text{g p.i.}; r$, coeficiente de correlación

- Evaluación de la precisión del método

En la tabla nº 12 se expresa la precisión intra e inter-día como coeficientes de variación, en porcentajes.

Tabla nº 12. Determinación de EV en suero. Precisión del método (n= 3).

Fitosterol	Intra-ensayo CV (%)	Inter-ensayo CV (%)
Campesterol	9,6	10,5
β-sitosterol	5,7	5,9

- Evaluación de la exactitud del método

Los resultados del ensayo de recuperación se indican en la tabla nº 13.

Tabla nº 13. Determinación de EV en suero. Exactitud del método (n= 3).

Fitosterol	Presente (µg)	Añadido (µg)	Encontrado (µg)	Recuperación (%)
Campesterol	0,43 ± 0,01	1,25 ± 0,12	1,75 ± 0,07	105,3 ± 5,9
B-sitosterol	0,48 ± 0,01	0,9 ± 0,08	1,45 ± 0,05	107,8 ± 6,2

- Límite de detección

El límite de detección se obtiene a partir de la dilución 1/10 del patrón más bajo utilizado en la recta de calibrado (tabla nº 14). La relación de aéreas encontrada para el campesterol respecto al patrón interno es de 0,0089 y para el β -sitosterol es de 0,0015.

Tabla nº 14. Determinación de EV en suero. Límite de detección.

	Campesterol	β-sitosterol
L.D. (mg/dl)	0,008	0,013

A.2. Identificación y cuantificación de EV en la bebida láctea.

Por comparación con patrones de fitosteroles, y confirmación con los espectros de masas obtenidos, se llegan a identificar en la bebida láctea suministrada en el ensayo clínico los siguientes EV: brasicasterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, β -sitosterol y β -sitostanol.

En la tabla nº 15 se indican los porcentajes encontrados de cada uno de ellos en los tres lotes analizados y en la figura nº 11 se muestra un cromatograma correspondiente a los EV de bebida láctea.

Tabla nº 15. Porcentajes de EV (respecto al total de EV) presentes en la bebida láctea suministrada en el estudio clínico.

EV (%)	Lotes			Media \pm DE
	1	2	3	
Brasicasterol	2,59 \pm 0,04	2,61 \pm 0,24	2,69 \pm 0,04	2,63 \pm 0,05
Campesterol	15,38 \pm 0,11	15,50 \pm 0,12	15,57 \pm 0,15	15,49 \pm 0,10
Campestanol	0,88 \pm 0,07	0,91 \pm 0,09	1,04 \pm 0,01	0,94 \pm 0,08
Estigmasterol	0,74 \pm 0,04	0,98 \pm 0,11	0,94 \pm 0,02	0,89 \pm 0,13
β -Sitosterol	72,45 \pm 0,72	71,47 \pm 0,22	71,23 \pm 0,35	71,72 \pm 0,65
β -Sitostanol	7,99 \pm 0,63	8,57 \pm 0,31	8,51 \pm 0,29	8,36 \pm 0,32

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n= 3).

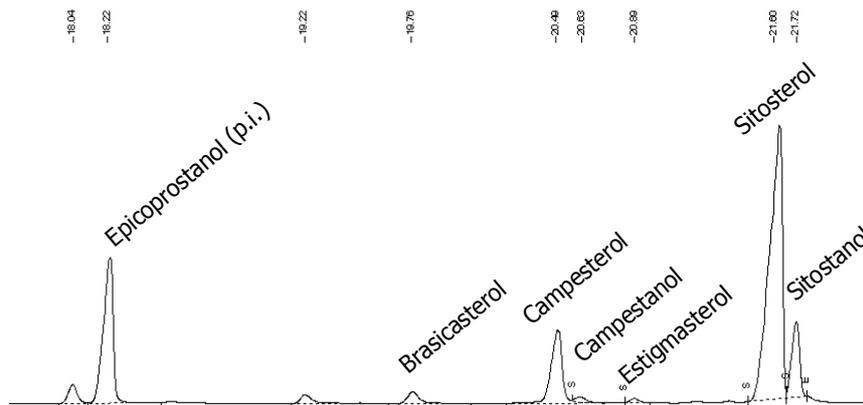


Figura nº 11. Cromatograma de una muestra de bebida láctea objeto de estudio.

B. Estudio clínico de intervención para valorar el efecto de la ingesta de una bebida láctea enriquecida en EV

B.1. Efecto del consumo de 2 g de EV/día en población general (grupo C del estudio de intervención)

B.1.1. Variables antropométricas

En total, en el grupo C del estudio de intervención, participaron 22 hombres y 30 mujeres con edades comprendidas entre 18 y 71 años (edad media 41 ± 12 años). En el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Doctor Peset se realizaron las correspondientes medidas antropométricas (peso, talla, perímetro de cintura y cadera) y medida de la presión arterial por métodos estandarizados y se les realizó una extracción de sangre venosa periférica tras ayuno de 12 horas.

En la tabla nº 16 se recogen los datos correspondientes a las medidas antropométricas al comienzo (nivel basal) y al final del estudio (3 meses). No se encontraron diferencias en ninguno de estos parámetros tras la suplementación con 2 g EV/día a su dieta habitual durante 3 meses.

Tabla nº 16. Voluntarios participantes del estudio de intervención (grupo C): medidas antropométricas.

	Basal	3 meses
Hombres/Mujeres (n)	22/30	---
Edad (años)	$40,6 \pm 11,7$	---
Fumadores (%)	20	---
IMC (Kg/m^2)	$25,6 \pm 3,5$	$25,3 \pm 5,5$
ICC	$0,86 \pm 0,07$	$0,87 \pm 0,10$
PA sistólica (mm Hg)	121 ± 17	119 ± 16
PA diastólica (mm Hg)	78 ± 11	78 ± 10

Los datos se representan como media \pm desviación estándar

IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura-cadera; PA: presión arterial

B.1.2. Variables bioquímicas sanguíneas

En la tabla nº 17 se recogen los resultados obtenidos de los distintos parámetros lipídicos analizados al comienzo (nivel basal) y al final del estudio (3 meses). A pesar de encontrar diferencias significativas en el colesterol total y c-LDL, así como en la Apo B, el diámetro de las partículas LDL no se modificó, ni tampoco el porcentaje del patrón aterogénico de partículas LDL pequeñas y densas.

Tabla nº 17. Parámetros lipídicos en población general (n=52) (grupo C) a nivel basal y tras la suplementación con 2 g EV/día en su dieta habitual.

	Basal	3 meses
Colesterol total (mg/dl)	209,8 ± 31,6	198,6 ± 38,4*
c-LDL (mg/dl)	138,5 ± 26,5	129,5 ± 32,2*
c-HDL (mg/dl)	52,5 ± 16,6	50,2 ± 17,9
Triglicéridos (mg/dl)	85,6 ± 42,8	91,3 ± 85,7
Apo A-I (mg/dl)	164,3 ± 30,4	160,6 ± 28,8
Apo B (mg/dl)	99,2 ± 24,1	90,5 ± 24,3*
Apo B/Apo A	0,63 ± 0,19	0,58 ± 0,18*
Diámetro LDL (nm)	26,1 ± 0,8	26,2 ± 0,8
Patrón B de LDL (%)	23,1	17,3

Los datos se representan como media ± desviación estándar. Los valores de la concentración de triglicéridos se normalizaron mediante una transformación logarítmica.

* p<0,05 cuando se compara con una t-test de Student de datos pareados

A pesar que el diámetro de las partículas LDL y las concentraciones de triglicéridos no se modificaron tras la administración de EV, se observó una correlación negativa entre el diámetro de las partículas LDL y la concentración de triglicéridos (figura nº 12).

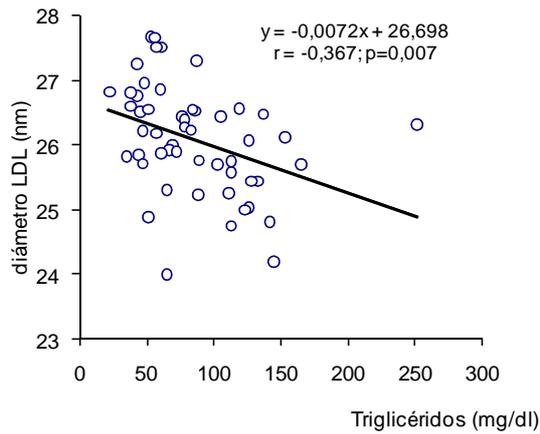


Figura nº 12. Población general (Grupo C). Correlación entre triglicéridos y diámetro de las partículas LDL al comienzo del estudio.

Para evaluar más en detalle el cambio en la concentración de c-LDL, se analizaron los cambios de c-LDL a nivel individual. En la figura nº 13 puede observarse que, en general, existe una tendencia a disminuir la concentración de c-LDL.

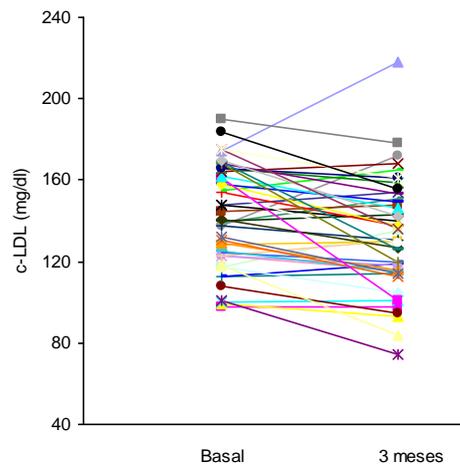


Figura nº 13. Población general (grupo C). Concentraciones de c-LDL antes y después de tres meses de suplementación con 2 g EV/día.

Además, se analizó la reducción de c-LDL, según los terciles de c-LDL que presentaron los individuos a nivel basal (Tercil 1: concentración de c-LDL inferior a 124 mg/dl; Tercil 2: concentración de c-LDL entre 124 y 154 mg/dl; Tercil 3: concentración de c-LDL superior a 154 mg/dl), observándose que a mayor nivel basal de c-LDL se alcanza una mayor reducción (figura nº 14).

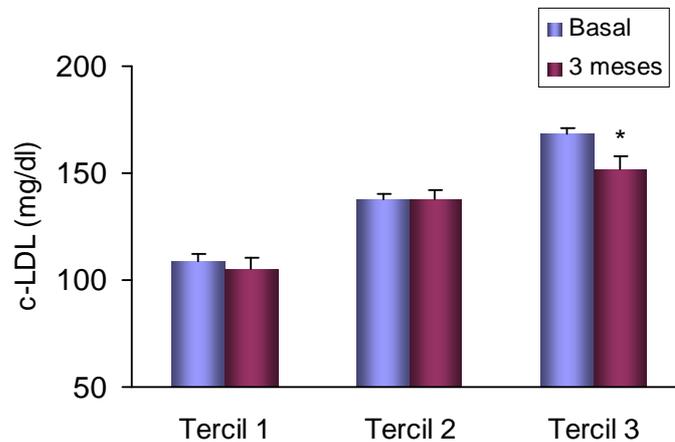


Figura nº 14. Población general (grupo C). Concentración de c-LDL antes y después de tres meses de suplementación con 2g EV/día, según terciles de c-LDL al comienzo del estudio. * $p < 0,05$ cuando se compara con una t-test de Student de datos pareados. (Tercil 1: c-LDL <124 mg/dl; Tercil 2: c-LDL: 124-154 mg/dl; Tercil 3: c-LDL >154 mg/dl)

B.2. Factores que pueden influir sobre la eficacia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica

B.2.1. Influencia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica (grupo A, B y parte del C) en función del aporte en grasa de la dieta

B.2.1.1. Variables antropométricas e ingesta nutricional

De un total de 130 individuos participantes en el estudio, se detectaron 84 individuos que completaron el estudio y que, en su inicio, presentaban hipercolesterolemia moderada. El intervalo de edad de estos individuos fue de 18 a 76 años. Los parámetros antropométricos de los pacientes se representan en la tabla nº 18. Los hombres y las mujeres se distribuyeron de manera similar entre los tres grupos, constituyendo un porcentaje de hombres del 25% en el grupo que siguió una dieta saludable (grupo A), un 29% en el grupo de dieta saludable más EV (grupo B) y un 35% en el grupo de la dieta libre más EV (parte del grupo C). Al inicio del estudio no se observaron diferencias significativas entre los parámetros antropométricos de los pacientes correspondientes a los tres grupos del estudio de intervención (Tabla nº 18). Por otra parte, a nivel basal se observan que el 6,0% de los sujetos presentaban hipertrigliceridemia (triglicéridos > 200 mg/dl), el 33,3% exhibían glucosa \geq 100 mg/dl en ayunas, 3,6% eran diabéticos y el 19,0% fueron diagnosticados con síndrome metabólico (datos no mostrados).

Tabla nº 18. Características basales de los pacientes con hipercolesterolemia moderada.

	Dieta saludable (n=24)	Dieta saludable +EV (n=31)	Dieta libre +EV (n=29)
Hombres / Mujeres (n)	6 / 18	9 / 22	10 / 19
Edad (años)	46,0 ± 15,4	48,8 ± 8,9	46,1 ± 8,4
Fumadores, n (%)	6 (25,0)	7 (22,6)	8 (27,6)
Peso (kg)	73,8 ± 13,0	75,5 ± 16,8	72,0 ± 9,8
IMC (kg/m ²)	27,7 ± 4,4	28,5 ± 4,4	26,5 ± 2,8
ICC	0,903 ± 0,059	0,883 ± 0,090	0,890 ± 0,052
PA sistólica (mm Hg)	125 ± 15	129 ± 14	123 ± 16
PA diastólica (mm Hg)	82 ± 12	83 ± 16	78 ± 8

Los datos se representan como media ± desviación estándar.

EV: esteroides vegetales; IMC: índice masa corporal; ICC: índice cintura-cadera; PA: presión arterial

Los registros dietéticos, representados como porcentaje de calorías totales de cada uno de los macronutrientes recopilados a partir de los recordatorios de 3 días y de 24 horas, no mostraron desviaciones de las pautas dietéticas que siguieron durante el estudio (Tabla nº 19).

Tabla nº 19. Estimación de la composición en nutrientes de la dieta saludable y la dieta libre que siguieron cada uno de los grupos de intervención.

	Dieta saludable (n=24)	Dieta saludable + EV (n=31)	Dieta libre + EV (n=29)
Carbohidratos (%)	51,6 ± 6,9	52,2 ± 7,4	48,5 ± 8,1
Proteínas (%)	18,5 ± 5,3	17,7 ± 6,5	17,3 ± 5,4
Grasas (%)	29,9 ± 6,0 ^a	30,1 ± 5,7 ^a	34,2 ± 7,9 ^b
Saturadas	6,9 ± 2,6 ^a	6,7 ± 3,5 ^a	12,7 ± 3,7 ^b
Polinsaturada	6,1 ± 2,6	6,3 ± 2,2	6,1 ± 3,1
Monoinsaturada	16,9 ± 4,7	17,1 ± 4,1	15,4 ± 5,3
Colesterol (mg)	193,1 ± 51,7 ^a	195,5 ± 67,1 ^a	268,1 ± 70,3 ^b

Los datos se representan como media ± desviación estándar. Ingestión media diaria representada como porcentaje de calorías totales de cada uno de los macronutrientes recopilados a partir de los recordatorios de 3 días y de 24 horas. Letras superíndices distintas en una misma fila, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante ANOVA de una vía. EV: esteroles vegetales

B.2.1.2. Variables bioquímicas sanguíneas

Después de tres meses de tratamiento, los pacientes suplementados con EV, tanto los que siguieron una dieta libre, como los que siguieron una dieta saludable, mostraron una reducción significativa del colesterol total, c-LDL y colesterol no-HDL, con un efecto hipolipemiente similar en ambos grupos (Tabla nº 20). La concentración de Apo B y la relación Apo B/Apo A-I, considerado un marcador aún mejor de la enfermedad cardíaca coronaria que la concentración de lípidos en sí (Ridker *et al.*, 2005), también se redujeron en la misma medida en los pacientes que recibieron la bebida láctea baja en grasa y enriquecida en EV (Tabla nº 20). Por el contrario, estos parámetros lipídicos no se alteraron en los pacientes sometidos tan solo a tratamiento dietético. No se encontraron cambios con respecto al c-HDL, triglicéridos (todos los valores de triglicéridos fueron inferiores a 300 mg/dl) o Apo A-I en cualquiera de los grupos (Tabla nº 20).

Tabla nº 20. Perfil lipídico de los pacientes con hipercolesterolemia moderada al inicio y tras los 3 meses de la intervención correspondiente.

	Dieta saludable (n=24)	Dieta saludable + EV (n=31)	Dieta libre + EV (n=29)
Colesterol total (mg/dl)			
Basal	234,2 ± 21,0	236,2 ± 18,4	230,1 ± 19,1
3 meses	233,4 ± 25,6 ^a	218,8 ± 21,2 ^{b*}	216,3 ± 22,8 ^{b*}
c-LDL (mg/dl)			
Basal	162,3 ± 14,6	163,0 ± 16,3	157,9 ± 15,7
3 meses	162,0 ± 24,6 ^a	146,4 ± 18,7 ^{b*}	145,3 ± 18,4 ^{b*}
c-HDL (mg/dl)			
Basal	50,0 ± 12,9	51,6 ± 14,4	52,1 ± 17,1
3 meses	49,6 ± 16,9	53,5 ± 14,2	51,2 ± 19,2
Triglicéridos (mg/dl)			
Basal	109,6 ± 62,3	108,5 ± 63,4	100,5 ± 34,4
3 meses	109,7 ± 65,0	94,9 ± 50,9	87,8 ± 49,7
Colesterol no-HDL (mg/dl)			
Basal	184,2 ± 20,8	184,6 ± 20,0	178,0 ± 17,4
3 meses	183,8 ± 24,5 ^a	165,3 ± 21,8 ^{b*}	165,1 ± 22,7 ^{b*}
Apo A-I (mg/dl)			
Basal	154,0 ± 28,0	161,2 ± 23,5	162,8 ± 32,3
3 meses	151,2 ± 20,2	167,7 ± 24,7 [*]	159,1 ± 28,2
Apo B (mg/dl)			
Basal	115,8 ± 15,8	111,4 ± 14,1	116,8 ± 13,2
3 meses	114,4 ± 15,6 ^a	104,1 ± 13,5 ^{b*}	103,7 ± 14,6 ^{b*}
Apo B/Apo A-I			
Basal	0,770 ± 0,145	0,721 ± 0,168	0,746 ± 0,164
3 meses	0,772 ± 0,167 ^a	0,635 ± 0,132 ^{b*}	0,674 ± 0,158 ^{b*}

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Los valores de la concentración de triglicéridos se normalizaron mediante una transformación logarítmica. Letras superíndices diferentes para una misma fila representan $p < 0,05$ mediante ANOVA de una vía.* $p < 0,05$ cuando se compara con una t-test de Student de datos pareados (datos basales vs 3 meses). EV: esteroides vegetales

B.2.2. Influencia de la eficacia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica en función del genotipo de la apolipoproteína E

B.2.2.1. Variables antropométricas y bioquímicas

Las características basales de los participantes de acuerdo a sus alelos Apo E se muestran en la tabla nº 21. No se observaron diferencias en los parámetros antropométricos, ni en el perfil lipídico, en relación con cualquiera de los parámetros estudiados.

Tabla nº 21. Características basales de las lipoproteínas séricas en los sujetos participantes en el estudio de intervención según el genotipo de la Apo E.

	E2	E3	E4	Todos
Sujetos (n)	6	47	22	75
Hombre/Mujer (n)	2/4	13/34	7/15	22/53
Edad (años)	49,0 ± 12,3	50,1 ± 11,3	49,6 ± 13,7	49,9 ± 12,0
IMC (Kg/m ²)	27,9 ± 4,6	28,5 ± 4,4	27,7 ± 6,2	28,2 ± 5,0
ICC	0,89 ± 0,12	0,88 ± 0,10	0,90 ± 0,12	0,88 ± 0,11
PA sistólica (mmHg)	127 ± 12	129 ± 15	131 ± 18	130 ± 15
PA diastólica (mmHg)	80 ± 15	82 ± 10	80 ± 15	81 ± 13
Fumadores (%)	25,0	30,3	33,3	29,5
Colesterol total (mg/dl)	237,5 ± 25,7	236,9 ± 30,6	237,0 ± 27,8	237,0 ± 29,0
c-LDL (mg/dl)	165,6 ± 20,1	164,4 ± 25,9	166,3 ± 20,0	165,1 ± 23,6
c-HDL (mg/dl)	49,2 ± 9,0	50,2 ± 14,3	49,0 ± 13,3	49,8 ± 13,5
Colesterol no-HDL (mg/dl)	188,3 ± 24,2	186,8 ± 28,7	187,9 ± 26,4	187,2 ± 27,3
Triglicéridos (mg/dl)	113,7 ± 54,3	111,6 ± 61,9	107,9 ± 66,5	113,3 ± 61,9
Diámetro LDL (nm)	26,25 ± 0,74	26,21 ± 0,75	26,06 ± 0,84	26,17 ± 0,76
Apo B/Apo A-I	0,713 ± 0,096	0,728 ± 0,166	0,827 ± 0,191	0,757 ± 0,174

Los datos se representan como media ± desviación estándar

IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura-cadera; PA: presión arterial

Transcurridos los tres meses de intervención, los pacientes que recibieron la dieta saludable suplementada con EV mostraron una reducción significativa en el colesterol total, c-LDL, colesterol no-HDL y Apo B/Apo A-I en comparación con sus niveles basales. Por el contrario, estos parámetros lipídicos no se modificaron en los pacientes sometidos únicamente a terapia dietética. No se encontraron cambios con respecto al c-HDL, triglicéridos (todos los valores fueron <300 mg/dl) o el tamaño de LDL en cualquiera de los grupos (tabla nº 22). Cuando los pacientes fueron analizados de acuerdo a sus alelos Apo E, se observa que el efecto de los EV en el perfil lipídico fue independiente del fenotipo de Apo E, con reducciones similares en el colesterol total, c-LDL, colesterol no-HDL y Apo B/Apo A-I de pacientes con fenotipos E3 o E4 (tabla nº 22). Los datos relacionados con el genotipo E2 no están representados debido al número no representativo de este tipo de pacientes en la población estudiada (2 sujetos en el grupo que siguió una dieta saludable y 4 sujetos en el grupo que recibió terapia combinada). La eficacia de los EV, independiente del polimorfismo de Apo E, también está representada en la figura nº 15. No se observaron diferencias entre los pacientes con fenotipo de Apo E3 y aquellos con fenotipo Apo E4 en el porcentaje de disminución del colesterol total, c-LDL, colesterol no-HDL o Apo B/Apo A-I después de la adición de EV a la dieta.

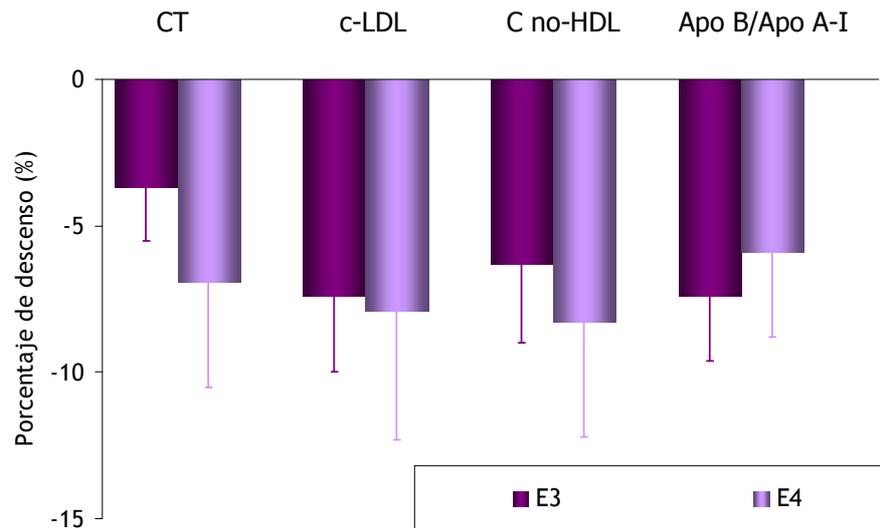


Figura nº 15. Porcentaje de cambio en los parámetros lipídicos después de la intervención en sujetos que recibieron dieta más EV, clasificados según el genotipo de la Apo E.

Los datos se representan como media y error estándar de la media de 41 sujetos para el grupo que recibió dieta más EV (n=24 para E3 y n=13 para E4). CT: colesterol total; c-LDL: colesterol LDL; C no-HDL: colesterol no-HDL; Apo: Apolipoproteína

Tabla nº 22. Perfil lipídico en suero de los grupos que recibieron dieta o dieta más EV clasificados por el genotipo de la Apo E a nivel basal y al final de la intervención.

	Dieta				Dieta + EV		
	E3	E4	Todos	E3	E4	Todos	Todos
n	23	9	34	24	13	41	41
Colesterol total (mg/dl)							
Basal	239,7 ± 36,3	245,8 ± 25,7	240,7 ± 32,4	234,4 ± 24,7	230,9 ± 28,6	234,0 ± 26,1	234,0 ± 26,1
Final	232,7 ± 32,3	244,2 ± 24,4	236,1 ± 29,9	224,9 ± 26,3*	213,0 ± 27,2*	221,1 ± 27,0**	221,1 ± 27,0**
c-LDL (mg/dl)							
Basal	164,3 ± 30,6	175,9 ± 16,4	161,9 ± 38,9	164,6 ± 21,4	159,7 ± 20,0	163,7 ± 20,8	163,7 ± 20,8
Final	158,7 ± 30,4	176,8 ± 18,7	163,5 ± 25,8	150,9 ± 19,8**	145,3 ± 22,3*	149,1 ± 20,8***	149,1 ± 20,8***
c-HDL (mg/dl)							
Basal	49,8 ± 12,0	52,1 ± 14,0	50,0 ± 12,2	50,5 ± 16,4	46,9 ± 13,0	49,6 ± 14,7	49,6 ± 14,7
Final	50,1 ± 10,6	47,4 ± 7,0	49,4 ± 9,5	53,5 ± 15,6	46,0 ± 12,6	51,4 ± 14,5	51,4 ± 14,5
C no-HDL (mg/dl)							
Basal	189,9 ± 34,7	193,7 ± 23,1	190,7 ± 30,5	183,9 ± 22,2	183,9 ± 28,6	184,5 ± 24,6	184,5 ± 24,6
Final	182,8 ± 30,3	196,8 ± 20,1	186,8 ± 27,3	171,4 ± 27,4*	167,0 ± 30,0*	169,7 ± 27,6***	169,7 ± 27,6***
Triglicéridos (mg/dl)							
Basal	127,9 ± 72,5	108,8 ± 35,4	126,3 ± 64,8	96,5 ± 46,9	121,4 ± 78,1	103,8 ± 58,6	103,8 ± 58,6
Final	119,4 ± 71,4	100,0 ± 38,5	116,1 ± 64,1	102,6 ± 69,4	108,5 ± 67,7	102,7 ± 64,7	102,7 ± 64,7
Diámetro LDL (nm)							
Basal	26,11 ± 0,63	26,07 ± 0,56	26,12 ± 0,60	26,20 ± 0,62	25,90 ± 0,88	26,10 ± 0,74	26,10 ± 0,74
Final	26,40 ± 1,01	26,26 ± 0,40	26,30 ± 0,92	26,22 ± 0,74	26,06 ± 1,48	26,18 ± 1,01	26,18 ± 1,01
Apo B/Apo A-I							
Basal	0,754 ± 0,163	0,864 ± 0,163	0,786 ± 0,163	0,702 ± 0,168	0,801 ± 0,211	0,733 ± 0,181	0,733 ± 0,181
Final	0,759 ± 0,174	0,817 ± 0,158	0,774 ± 0,167	0,644 ± 0,180**	0,744 ± 0,168*	0,669 ± 0,175***	0,669 ± 0,175***

Los datos se representan como media ± desviación estándar. * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. EV: esteroles vegetales

B.3. Evaluación del estrés oxidativo tras una ingesta prolongada de EV

B.3.1. Variables antropométricas

Un total de cuarenta sujetos en el intervalo de edad entre 24 y 69 años fueron seleccionados aleatoriamente para el desarrollo de este subestudio. Los parámetros antropométricos de los sujetos antes y después de la suplementación de la dieta con EV se muestran en la tabla nº 23. Puesto que no hubo diferencias significativas en la edad, peso, índice de masa corporal, índice cintura-cadera, o presión arterial sistólica / diastólica entre el grupo que siguió dieta y el grupo al que se le enriqueció la dieta con los 2 g de EV se representan los valores medios de los cuarenta sujetos a nivel basal y tras el periodo previo de adaptación a la dieta. El número de hombres y mujeres se distribuyeron de manera similar entre los dos grupos: 30% de hombres en el grupo de la dieta y 25% en el grupo suplementado con EV (datos no mostrados). Durante los primeros tres meses del estudio, los sujetos siguieron las recomendaciones dietéticas para homogeneizar sus parámetros séricos antes de introducir los EV en su dieta. La dieta redujo significativamente el peso y el IMC en la población total (Tabla nº 23). Transcurridos los tres primeros meses de homogenización, los individuos se aleatorizaron en dos grupos de 20 sujetos, que continuaron con la dieta saludable (grupo A) o bien suplementaron la dieta con 2 g EV/día (grupo B). No se observaron cambios significativos entre los parámetros antropométricos de los sujetos tras los 3 meses de intervención, ni en el grupo suplementado con EV, ni el grupo que siguió solamente la dieta (Tabla nº 23).

Tabla nº 23. Parámetros antropométricos de los pacientes antes y después del seguimiento de dieta saludable y suplementación de la dieta con EV.

	Basal	3 meses dieta	Post-randomización	6 meses
Edad (años)	50,0 ± 10,2	-----	A: ----- B: -----	A: ----- B: -----
Peso (Kg)	74,6 ± 16,1	73,7 ± 15,7*	A: 73,2 ± 11,6 B: 73,8 ± 20,3	A: 74,0 ± 12,0 B: 73,8 ± 21,7
IMC (Kg/m ²)	28,3 ± 4,7	27,7 ± 4,5*	A: 27,8 ± 4,6 B: 27,6 ± 4,9	A: 28,0 ± 4,8 B: 27,6 ± 5,2
ICC	0,905 ± 0,105	0,895 ± 0,060	A: 0,900 ± 0,055 B: 0,81 ± 0,04	A: 0,910 ± 0,065 B: 0,905 ± 0,065
PA sistólica (mm Hg)	131 ± 20	126 ± 15	A: 129 ± 16 B: 130 ± 13	A: 131 ± 15 B: 130 ± 19
PA diastolica (mm Hg)	82 ± 11	81 ± 14	A: 86 ± 10 B: 85 ± 10	A: 85 ± 10 B: 86 ± 14

Los datos se representan como media ± desviación estándar. Después de los tres primeros meses de la terapia dietética, cuarenta individuos fueron aleatorizados en dos grupos (20 personas cada grupo): un grupo continuó con la terapia dietética (Grupo A) y el otro grupo se le enriqueció la dieta con 2 g EV/día (Grupo B). * P <0,05, cuando se compara con una t-test de Student de datos apareados en los tres primeros meses del estudio o un ANOVA de 2-vías de medidas repetidas seguido de t-test de Student pareada después de la suplementación con EV. IMC: índice masa corporal; ICC: índice cintura-cadera; PA: presión arterial

B. 3.2. Variables bioquímicas

En relación al perfil lipídico, durante los primeros tres meses de seguimiento de la dieta saludable, los sujetos mostraron una reducción significativa de 4-5% en el colesterol total, c-LDL (tabla nº 24) y colesterol no-HDL (figura nº 16). La suplementación con EV indujo una reducción adicional de

6,4%, 9,9% y 7,1%, respectivamente, lo que representó una caída total, desde el inicio del estudio de 10,5%, 14,6% y 14,1%, respectivamente (tabla nº 24, figura nº 16). Sin embargo, los parámetros lipídicos indicados se mantuvieron en los sujetos sometidos a tratamiento dietético exclusivamente (tabla nº 24, figura nº 16). El ratio Apo B/Apo A-I se redujo en los sujetos que recibieron la bebida láctea baja en grasa enriquecida con EV (figura nº 16). No se encontraron cambios en el c-HDL, triglicéridos y Apo B en cualquiera de los grupos (Tabla nº 24).

Tabla nº 24. Perfil lipídico de los sujetos antes y después del seguimiento de dieta saludable y suplementación de la dieta con EV.

	Basal	3 meses dieta	Post- randomización	6 meses
Colesterol total (mg/dl)	247 ± 24	237 ± 27*	A: 238 ± 30 B: 236 ± 24	A: 233 ± 30 B: 221 ± 29*
c-LDL (mg/dl)	171 ± 22	163 ± 22*	A: 164 ± 26 B: 162 ± 19	A: 161 ± 28 B: 146 ± 18*
c-HDL (mg/dl)	55 ± 12	54 ± 13	A: 51 ± 12 B: 58 ± 14	A: 50 ± 11 B: 56 ± 15
Triglicéridos (mg/dl)	107 ± 58	99 ± 52	A: 111 ± 57 B: 86 ± 44	A: 116 ± 65 B: 95 ± 69
Apo B (mg/dl)	117 ± 16	114 ± 16	A: 120 ± 17 B: 108 ± 11	A: 117 ± 16 B: 105 ± 14

Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

Después de los tres primeros meses de la terapia dietética, los cuarenta individuos fueron aleatorizados en dos grupos (20 personas cada grupo): un grupo continuó con terapia dietética (A) y la dieta del otro grupo se enriqueció con 2 g de EV/día (B), * p <0,05, mediante una t-test de Student para datos pareados.

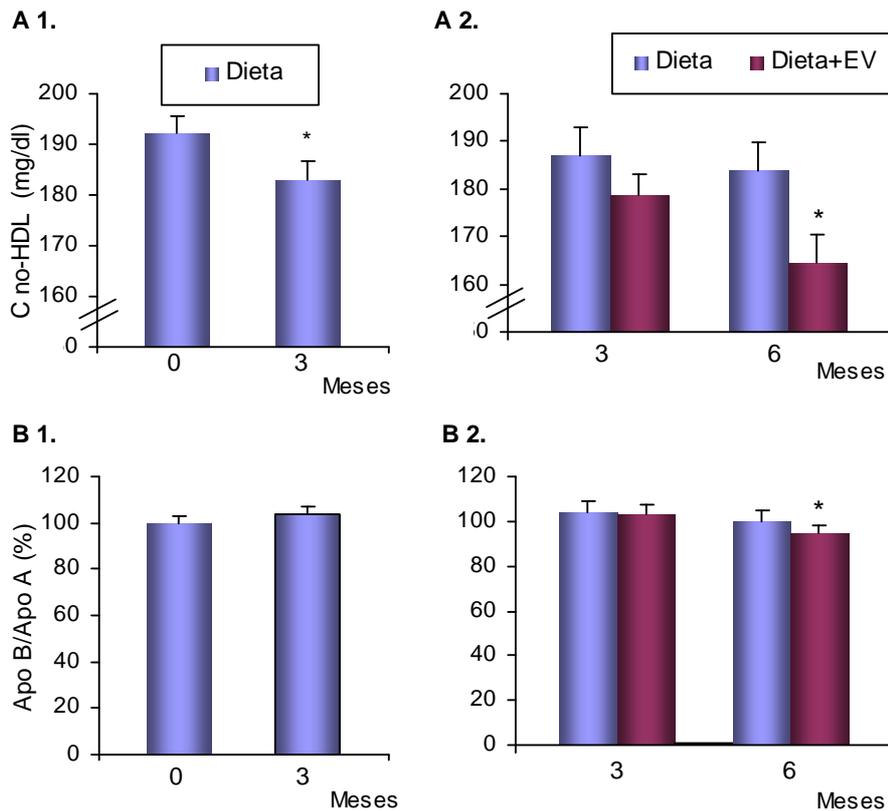


Figura nº 16. Parámetros de riesgo cardiovascular en sujetos antes y después de la adición de EV a la dieta.

A1: Concentración de colesterol no-HDL en el período de homogenización de la dieta.

A2: Concentración de colesterol no-HDL durante los siguientes 3 meses, con o sin incorporación de EV a la dieta.

B1: Relación apolipoproteína B/Apolipoproteína A-I en el período de homogenización de la dieta.

B2: Relación apolipoproteína B/Apolipoproteína A-I durante los siguientes 3 meses, con o sin incorporación de EV a la dieta.

Las barras representan la media \pm error estándar de la media de 40 sujetos en la primera fase y 20 sujetos en la segunda fase después de la adición de EV a la dieta saludable.

* $P < 0,05$ si se compara con una t-test de Student para datos pareados en los tres primeros meses del estudio, o t-test de Student para datos pareados después de la adición de EV.

C no-HDL: Colesterol no-HDL; Apo: Apolipoproteína; EV: esteroides vegetales

B. 3.3. Parámetros de estrés oxidativo

En la figura nº 17 se observa la susceptibilidad a la oxidación de las partículas LDL. La dieta por sí sola mejoró el tiempo de latencia en un 4,6%, pero no ejerció el mismo efecto en el grupo que tomó los EV. Sin embargo, la mejora de la antioxidantes endógenos observado como resultado de la adherencia a la dieta no alteró el estado antioxidante total de los sujetos, como puede verse en la figura nº 18, o la peroxidación lipídica, un indicador de estrés oxidativo, como se muestra en la figura nº 19.

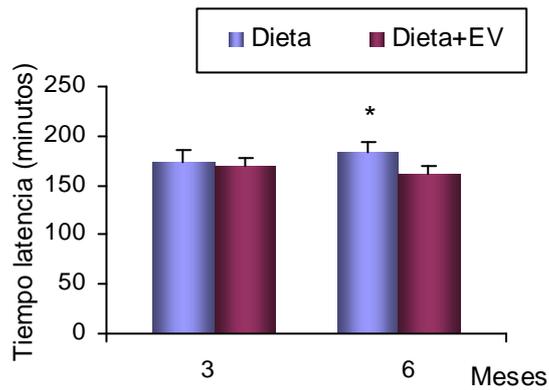


Figura nº 17. Susceptibilidad a la oxidación de las partículas LDL representado como tiempo de latencia en sujetos tras 3 meses de seguimiento de una dieta saludable o suplementación de la dieta saludable con 2 g de EV/día. Las barras representan media \pm error estándar de la media de 9 sujetos. $p < 0,05$ cuando comparamos los resultados usando una test t-Student de datos apareados.

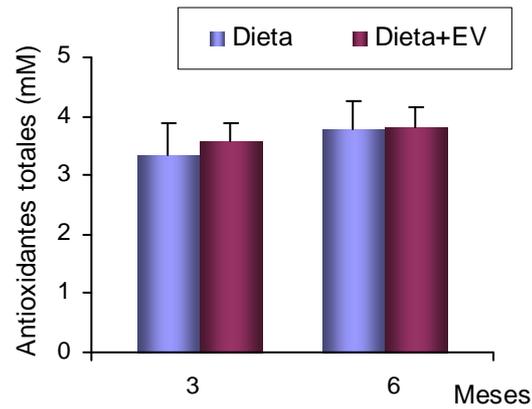


Figura nº 18. Estado antioxidante representado como antioxidantes totales, en sujetos tras 3 meses de seguimiento de una dieta saludable o suplementación de la dieta saludable con 2 g de EV/día. Las barras representan media \pm error estándar de la media de 12-16 sujetos.

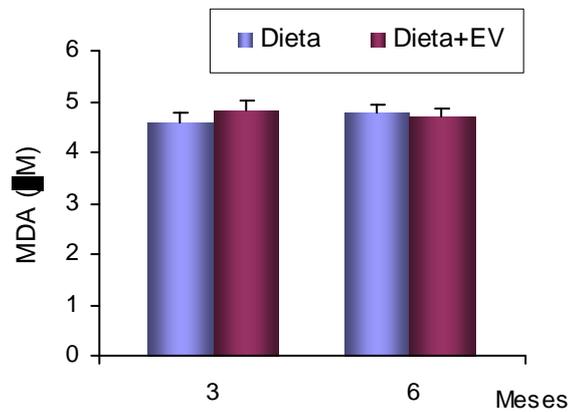


Figura nº 19. Oxidación lipídica TBARS expresado como MDA en sujetos tras 3 meses de seguimiento de una dieta saludable o suplementación de la dieta saludable con 2 g de EV/día. Las barras representan media \pm error estándar de la media de 18 sujetos.

C. Estudio de la biodisponibilidad de los esteroides vegetales

C.1. Biodisponibilidad *in vitro* de EV (células Caco-2)

- Viabilidad celular

La viabilidad celular (determinada mediante azul tripán) de las células Caco-2 expuestas a los diferentes patrones de EV durante 24 horas es superior al 90% (figura nº 20).

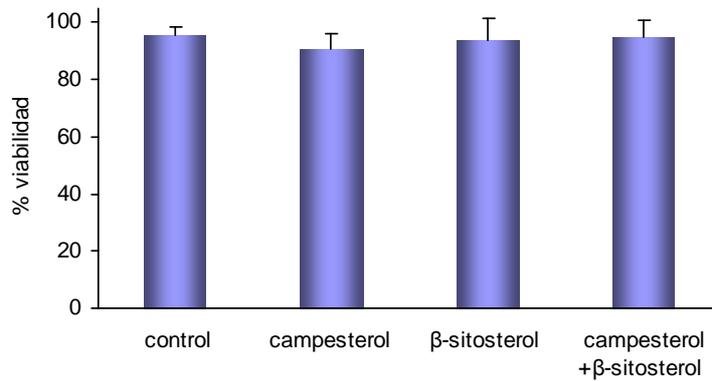


Figura nº 20. Viabilidad celular en células Caco-2 expuestas a los diferentes patrones de EV durante 24 horas (control; campesterol 10 μ M; β -sitosterol 20 μ M; campesterol+ β -sitosterol 10 + 20 μ M). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=3).

- Funcionalidad

Para comprobar que las células son metabólicamente activas, tras exposición durante 24 horas a los diferentes patrones de EV, se aplicó el test MTT (figura nº 21). No se observaron diferencias significativas en las actividades

de los enzimas mitocondriales al exponer las células a los diferentes patrones de EV durante 24 horas, indicando ausencia de citotoxicidad.

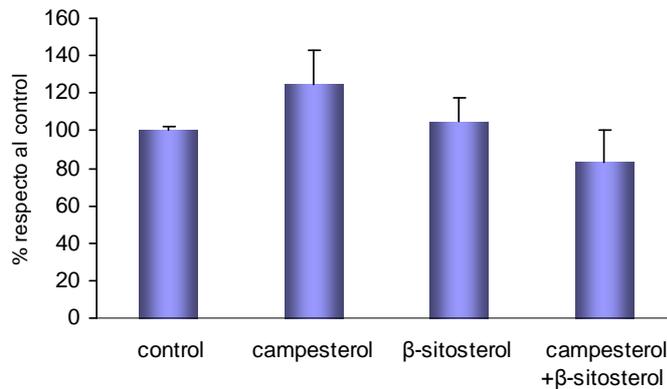


Figura nº 21. Reducción de MTT en células Caco-2 expuestas a diferentes disoluciones patrón de EV durante 24 horas (control; campesterol 10 μ M; β -sitosterol 20 μ M; campesterol+ β -sitosterol 10 + 20 μ M). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=3).

- Ciclo celular

El análisis mediante citometría de flujo de la tinción selectiva de los ácidos nucleicos ADN y ARN con los fluorocromos Hoechst 33342 y Pironina Y respectivamente, permitió evaluar el contenido total de los mismos y estudiar la proporción celular en las distintas etapas del ciclo celular en función del contenido de ADN (tabla nº 25).

Los resultados obtenidos mostraron una tendencia similar para ambas muestras estudiadas, observándose el acumulo de células en fase G₁ que parece sugerir una mayor proliferación celular. El incremento observado en esta etapa del ciclo celular va acompañado, en ambos casos, de un descenso en las fases S y G₂/M. En ningún caso se observó variación, con respecto al control, de la

población celular subdiploide que con un contenido de ADN fraccionado podría ser indicativa del fenómeno de apoptosis celular. Sin embargo, el contenido de ARN en la población celular en fase G₁ pone de manifiesto el diferente efecto de los fitosteroles adicionados sobre la proliferación celular. Mientras en los cultivos expuestos a β -sitosterol existe un contenido mínimo de ARN, similar al de los cultivos control, en aquellos expuestos a la disolución conjunta de estigmasterol y campesterol el contenido de ARN llega a duplicarse, hecho indicativo de una mayor proliferación celular en estos cultivos.

Tabla nº 25. Efectos de los fitosteroles en la distribución de las distintas etapas del ciclo celular en los cultivos de la línea Caco-2 tras 24 horas de incubación.

Muestra adicionada	Fase de ciclo celular			
	Subdiploides	G ₁	S	G ₂ /M
Control	4,11 ± 1,07	64,94 ± 4,40	13,14 ± 0,77	15,98 ± 1,51
β -sitosterol	4,78 ± 3,26	69,44 ± 0,83	11,36 ± 0,86	13,11 ± 5,06
Campesterol + estigmasterol	5,17 ± 2,57	71,25 ± 0,65	11,42 ± 0,75	10,79 ± 3,63

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 2-3).

- Determinación de proteínas en células Caco-2

La síntesis de proteínas en cultivos celulares, se encuentra asociada al crecimiento celular. Las proteínas son el principal componente estructural de las células.

La determinación del contenido total de proteína celular y expresión de los resultados referida a éste, es un método útil en la comparación de estos, al eliminar la variabilidad por pocillo, debido al diferente crecimiento celular en cada uno de ellos. En la tabla nº 26 se indica el contenido de proteínas en los cultivos celulares.

Tabla nº 26. Contenido de proteínas en los ensayos con cultivos celulares.

Muestras	Recta de calibrado	mg de proteína/pocillo
A	$y = 0,0133x + 0,0233$ $r = 0,9966$	$0,934 \pm 0,004$
B	$y = 0,0133x + 0,0233$ $r = 0,9966$	$1,165 \pm 0,058$
C	$y = 0,015x + 0,0173$ $r = 0,9972$	$1,036 \pm 0,092$
D	$y = 0,0133x + 0,0233$ $r = 0,9966$	$1,033 \pm 0,088$
Valor promedio		$1,042 \pm 0,095$

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar

La determinación proteica en este estudio se realizó a los 14-16 días postsiembra. Se observó que el contenido en proteínas de los cultivos celulares fue similar, en torno a 1 mg de proteína celular por pocillo.

- Ensayos de retención, transporte y captación

En la tabla nº 27 se muestran los resultados correspondientes a la adición, retención, transporte y captación de campesterol y β -sitosterol expresado como $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína.

Como puede apreciarse, la cantidad retenida y captada es muy inferior respecto a la adicionada. Se observa que el porcentaje de retención para el campesterol es ligeramente inferior que β -sitosterol.

En cuanto al transporte, cabe destacar que hay un mayor transporte de β -sitosterol que de campesterol.

Cuando los resultados se expresan como porcentajes de captación (retención + transporte) se observa que dicho porcentaje es superior para el

campesterol que para el β -sitosterol (12,5 vs 8,1%, respectivamente) mientras que el porcentaje captado cuando ambos EV se incorporan conjuntamente es del orden de 2 veces inferior.

Se pone de manifiesto la mayor biodisponibilidad (% de captación) del campesterol frente al β -sitosterol. La adición conjunta de campesterol y β -sitosterol disminuyó (~50%) la biodisponibilidad de ambos. La adición de carotenoides (β -caroteno y licopeno) en la proporción 1/1000 respecto a la ingesta de EV, no influyó en la biodisponibilidad del campesterol y el β -sitosterol.

Tabla nº 27. Células Caco-2: retención, transporte y captación de β - Sitosterol y Campesterol.

Fitoesteroles adicionados	Retención^a ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	Transporte^b ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	Captación^c ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	Biodisponibilidad^d (% captación)
β -Sitosterol 20 μM = 12,44 μg	0,761 \pm 0,182	0,246 \pm 0,014	1,006 \pm 0,196	8,1 \pm 1,6
Campesterol 10 μM = 6,19 μg	0,623 \pm 0,055	0,129 \pm 0,029	0,752 \pm 0,083	12,5 \pm 1,4
β -Sitosterol 20 μM + Campesterol 10 μM	0,474 \pm 0,077	0,060 \pm 0,050	0,534 \pm 0,127	4,3 \pm 0,7
	0,314 \pm 0,100	0,053 \pm 0,036	0,367 \pm 0,136	6,1 \pm 0,7
β -Sitosterol 20 μM + Campesterol 10 μM + carotenoides ^e	0,456 \pm 0,050	0,123 \pm 0,052	0,579 \pm 0,005	4,7 \pm 0,1
	0,280 \pm 0,020	0,047 \pm 0,033	0,327 \pm 0,040	5,4 \pm 0,6

Los resultados se expresan como valor medio \pm desviación estandar (n = 3-5)

^a Retención = contenido en monocapa celular

^b Transporte = contenido en el medio basal

^c Captación = retención + transporte

^d Porcentaje respecto al total adicionado ((captación (μg)/ EV adicionado (μg)) *100)

^e 0,03 μM licopeno + 0,03 μM β -caroteno

C.2. Biodisponibilidad *in vivo* de EV

Determinación de EV en suero de los participantes del estudio de intervención (Grupo A, B y C)

En este caso, aunque el estudio de intervención, como se ha indicado, se realizó en una población más amplia, la determinación de EV en suero se realizó sobre una selección aleatoria de 20 individuos de cada uno de los grupos descritos anteriormente (grupo A: dieta saludable, grupo B: dieta saludable+EV y grupo C: dieta libre +EV). En las tablas nº 28, 29, 30, 31, 32 y 33 se recogen las concentraciones individuales de campesterol y β -sitosterol correspondientes a los sujetos de cada uno de los grupos integrantes del estudio, al principio y final del mismo, así como la estimación de su biodisponibilidad, expresado como incremento de su concentración en suero.

En la figura nº 22 se observa un cromatograma de una muestra de suero tras tres meses de suplementación con EV.

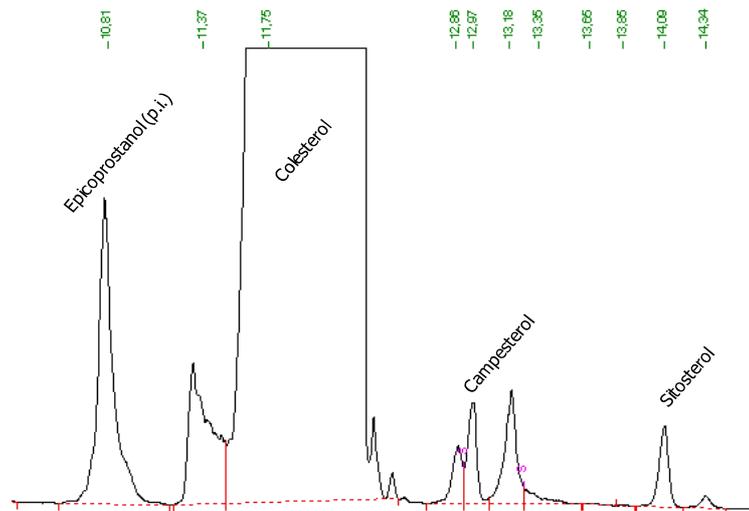


Figura nº 22. Cromatograma de una muestra de suero tras tres meses de suplementación con EV.

Tabla nº 28. Estudio clínico de intervención (grupo A: dieta saludable).
Biodisponibilidad de campesterol.

Individuo	Campesterol (mg/dl)		Δ EV* (%)
	Basal	6 meses	
1	0,193 ± 0,030	0,362 ± 0,071	87,6
2	0,099 ± 0,016	0,081 ± 0,004	-18,2
3	0,270 ± 0,003	0,087 ± 0,039	-67,8
4	0,099 ± 0,054	0,203 ± 0,034	105,1
5	0,270 ± 0,012	0,224 ± 0,014	-17,0
6	0,183 ± 0,009	0,165 ± 0,023	-9,8
7	0,236 ± 0,031	0,161 ± 0,019	-31,8
8	0,099 ± 0,032	0,079 ± 0,013	-20,2
9	0,138 ± 0,046	0,093 ± 0,019	-32,6
10	0,300 ± 0,053	0,207 ± 0,019	-31,0
11	0,218 ± 0,045	0,188 ± 0,075	-13,8
12	0,573 ± 0,116	0,333 ± 0,055	-41,9
13	0,230 ± 0,026	0,216 ± 0,128	-6,1
14	0,230 ± 0,009	0,379 ± 0,073	64,8
15	0,356 ± 0,028	0,264 ± 0,057	-25,8
16	0,226 ± 0,013	0,332 ± 0,010	46,9
17	0,316 ± 0,012	0,440 ± 0,042	39,2
18	0,578 ± 0,131	0,253 ± 0,046	-56,2
19	0,220 ± 0,022	0,203 ± 0,055	-7,7
20	0,379 ± 0,048	0,333 ± 0,054	-12,1
Promedio	0,261 ± 0,133	0,230 ± 0,106	-2,4 ± 46,6

*Incremento de EV en suero (%)= [(concentración final- concentración inicial en suero)/concentración inicial] x 100.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla nº 29. Estudio clínico de intervención (grupo A: dieta saludable). Biodisponibilidad de β -sitosterol.

Individuo	β -sitosterol (mg/dl)		Δ EV* (%)
	Basal	6 meses	
1	0,349 \pm 0,032	0,607 \pm 0,106	73,9
2	0,187 \pm 0,026	0,195 \pm 0,020	4,3
3	0,268 \pm 0,068	0,122 \pm 0,015	-54,5
4	0,288 \pm 0,026	0,320 \pm 0,047	11,1
5	0,407 \pm 0,077	0,358 \pm 0,028	-12,0
6	0,401 \pm 0,011	0,303 \pm 0,029	-24,4
7	0,450 \pm 0,170	0,330 \pm 0,018	-26,7
8	0,132 \pm 0,024	0,100 \pm 0,025	-24,2
9	0,144 \pm 0,029	0,172 \pm 0,010	19,4
10	1,109 \pm 0,039	0,548 \pm 0,032	-50,6
11	0,396 \pm 0,107	0,314 \pm 0,116	-20,7
12	0,896 \pm 0,096	0,683 \pm 0,267	-23,8
13	0,286 \pm 0,076	0,211 \pm 0,063	-26,2
14	0,335 \pm 0,046	0,565 \pm 0,081	68,7
15	0,313 \pm 0,078	0,322 \pm 0,055	2,9
16	0,394 \pm 0,106	0,318 \pm 0,042	-19,3
17	0,242 \pm 0,033	0,324 \pm 0,030	33,9
18	0,572 \pm 0,056	0,393 \pm 0,079	-31,3
19	0,364 \pm 0,043	0,425 \pm 0,061	16,8
20	0,543 \pm 0,145	0,434 \pm 0,065	-20,1
Promedio	0,404 \pm 0,237	0,352 \pm 0,158	-5,1 \pm 34,5

*Incremento de EV en suero (%)= [(concentración final- concentración inicial en suero)/concentración inicial] x 100.

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=3).

Tabla nº 30. Estudio clínico de intervención (grupo B: dieta saludable +EV). Biodisponibilidad de campesterol.

Individuo	Campesterol (mg/dl)		Δ EV* (%)
	Basal	6 meses	
1	0,136 ± 0,021	0,230 ± 0,066	69,1
2	0,517 ± 0,034	0,989 ± 0,050	91,3
3	0,070 ± 0,032	0,300 ± 0,033	328,6
4	0,257 ± 0,021	0,329 ± 0,078	28,0
5	0,138 ± 0,006	0,274 ± 0,025	98,6
6	0,180 ± 0,020	0,339 ± 0,019	88,3
7	0,067 ± 0,010	0,093 ± 0,006	38,8
8	0,490 ± 0,076	0,571 ± 0,068	16,5
9	0,123 ± 0,008	0,172 ± 0,007	39,8
10	0,174 ± 0,009	0,200 ± 0,013	14,9
11	0,428 ± 0,085	0,430 ± 0,061	0,5
12	0,189 ± 0,042	0,722 ± 0,044	282,0
13	0,284 ± 0,080	0,448 ± 0,037	57,7
14	0,241 ± 0,044	0,550 ± 0,065	128,2
15	0,166 ± 0,044	0,229 ± 0,007	38,0
16	0,264 ± 0,120	0,414 ± 0,047	56,8
17	0,382 ± 0,037	1,731 ± 0,106	353,1
18	0,500 ± 0,106	0,946 ± 0,151	89,2
19	0,379 ± 0,073	1,130 ± 0,179	198,2
20	0,138 ± 0,011	0,167 ± 0,038	21,0
Promedio	0,256 ± 0,145	0,513 ± 0,409	101,9 ± 105,5

*Incremento de EV en suero (%)= [(concentración final- concentración inicial en suero)/concentración inicial] x 100.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla nº 31. Estudio clínico de intervención (grupo B: dieta saludable+EV). Biodisponibilidad de β -sitosterol.

Individuo	β -sitosterol (mg/dl)		Δ EV* (%)
	Basal	6 meses	
1	0,231 \pm 0,023	0,386 \pm 0,155	67,1
2	0,699 \pm 0,055	1,260 \pm 0,118	80,3
3	0,276 \pm 0,048	0,394 \pm 0,033	42,8
4	0,372 \pm 0,021	0,512 \pm 0,127	37,6
5	0,271 \pm 0,027	0,420 \pm 0,026	55,0
6	0,358 \pm 0,019	0,520 \pm 0,028	45,3
7	0,096 \pm 0,006	0,120 \pm 0,006	25,0
8	0,853 \pm 0,118	1,150 \pm 0,199	34,8
9	0,208 \pm 0,030	0,219 \pm 0,019	5,3
10	0,184 \pm 0,027	0,227 \pm 0,007	23,4
11	0,530 \pm 0,129	0,808 \pm 0,065	52,5
12	0,336 \pm 0,097	0,839 \pm 0,038	149,7
13	0,509 \pm 0,022	0,583 \pm 0,027	14,5
14	0,380 \pm 0,045	0,635 \pm 0,094	67,1
15	0,307 \pm 0,066	0,317 \pm 0,045	3,3
16	0,256 \pm 0,117	0,592 \pm 0,071	131,3
17	0,545 \pm 0,004	1,808 \pm 0,101	231,7
18	0,657 \pm 0,133	1,076 \pm 0,212	63,8
19	0,512 \pm 0,026	1,651 \pm 0,040	222,5
20	0,230 \pm 0,028	0,365 \pm 0,055	58,7
Promedio	0,391 \pm 0,195	0,694 \pm 0,472	70,6 \pm 64,8

*Incremento de EV en suero (%)= [(concentración final- concentración inicial en suero)/concentración inicial] x 100.

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=3).

Tabla nº 32. Estudio clínico de intervención (grupo C: dieta libre+EV).
Biodisponibilidad de campesterol.

Individuo	Campesterol (mg/dl)		Δ EV* (%)
	Basal	3 meses	
1	0,273 ± 0,110	0,414 ± 0,107	51,6
2	0,120 ± 0,015	0,180 ± 0,043	50,0
3	0,109 ± 0,029	0,372 ± 0,079	241,3
4	0,309 ± 0,016	0,697 ± 0,061	125,6
5	0,564 ± 0,036	0,680 ± 0,127	20,6
6	0,443 ± 0,030	0,715 ± 0,057	61,4
7	0,320 ± 0,113	0,698 ± 0,075	118,1
8	0,256 ± 0,047	0,388 ± 0,026	51,6
9	0,252 ± 0,045	0,500 ± 0,066	98,4
10	0,188 ± 0,061	0,348 ± 0,041	85,1
11	0,177 ± 0,043	0,499 ± 0,096	181,9
12	0,178 ± 0,032	0,299 ± 0,032	68,0
13	0,406 ± 0,023	0,501 ± 0,195	23,4
14	0,102 ± 0,016	0,213 ± 0,003	108,8
15	0,549 ± 0,036	0,577 ± 0,053	5,1
16	0,223 ± 0,014	0,607 ± 0,025	172,2
17	0,183 ± 0,039	0,408 ± 0,016	123,0
18	0,061 ± 0,008	0,129 ± 0,034	111,5
19	0,123 ± 0,015	0,225 ± 0,024	82,9
20	0,176 ± 0,011	0,538 ± 0,056	205,7
Promedio	0,251 ± 0,144	0,449 ± 0,182	99,3 ± 63,3

*Incremento de EV en suero (%) = [(concentración final - concentración inicial en suero) / concentración inicial] x 100.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla nº 33. Estudio clínico de intervención (grupo C: dieta libre+EV). Biodisponibilidad de β -sitosterol.

Individuo	β -sitosterol (mg/dl)		Δ EV* (%)
	Basal	3 meses	
1	0,266 \pm 0,070	0,460 \pm 0,109	72,9
2	0,064 \pm 0,030	0,243 \pm 0,055	279,7
3	0,168 \pm 0,014	0,463 \pm 0,087	175,6
4	0,392 \pm 0,020	0,891 \pm 0,102	127,3
5	0,807 \pm 0,049	0,983 \pm 0,178	21,8
6	0,604 \pm 0,042	0,720 \pm 0,015	19,2
7	0,453 \pm 0,114	0,888 \pm 0,105	96,0
8	0,418 \pm 0,066	0,561 \pm 0,033	34,2
9	0,583 \pm 0,071	0,745 \pm 0,111	27,8
10	0,226 \pm 0,074	0,434 \pm 0,069	92,0
11	0,323 \pm 0,110	0,699 \pm 0,144	116,4
12	0,276 \pm 0,042	0,418 \pm 0,054	51,4
13	0,819 \pm 0,115	0,588 \pm 0,172	-28,2
14	0,126 \pm 0,010	0,207 \pm 0,005	64,3
15	0,758 \pm 0,039	0,721 \pm 0,050	-4,9
16	0,511 \pm 0,083	0,932 \pm 0,044	82,4
17	0,222 \pm 0,037	0,396 \pm 0,017	78,4
18	0,067 \pm 0,010	0,103 \pm 0,021	53,7
19	0,122 \pm 0,013	0,274 \pm 0,036	124,6
20	0,264 \pm 0,021	0,572 \pm 0,054	116,7
Promedio	0,373 \pm 0,240	0,565 \pm 0,255	80,1 \pm 68,4

*Incremento de EV en suero (%)= [(concentración final- concentración inicial en suero)/concentración inicial] x 100.

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n=3).

A la vista de los resultados, tras la ingestión de una bebida enriquecida con 2 g de EV/día, el campesterol mostró una mayor biodisponibilidad que el β -sitosterol (incrementos en suero de 101,9% y 99,3% vs 70,6% y 80,1% en el grupo B y C, respectivamente) siendo el contenido de campesterol en la bebida láctea del orden de 5 veces inferior respecto al β -sitosterol.

La dieta saludable no afectó a los niveles de EV en suero durante el período de seguimiento de tres meses. Sin embargo, el consumo de la bebida láctea enriquecida en EV aumentó los niveles séricos de campesterol y β -sitosterol de forma similar, independientemente del tipo de dieta seguida (figura nº 23 y 24).

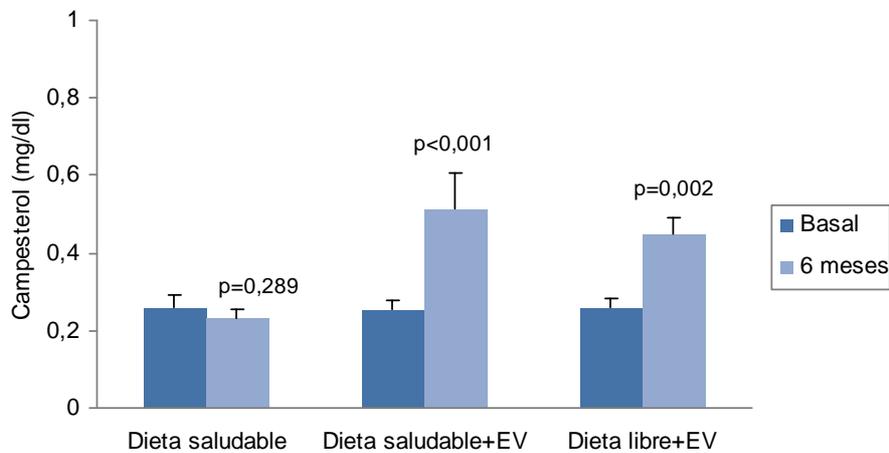


Figura nº 23. Concentración de campesterol (mg/dl) en suero a nivel basal y tras seis meses de intervención.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar.* $p < 0,05$ cuando se compara con una t-test de Student de datos pareados (datos basales vs 3 meses). EV: esteroides vegetales.

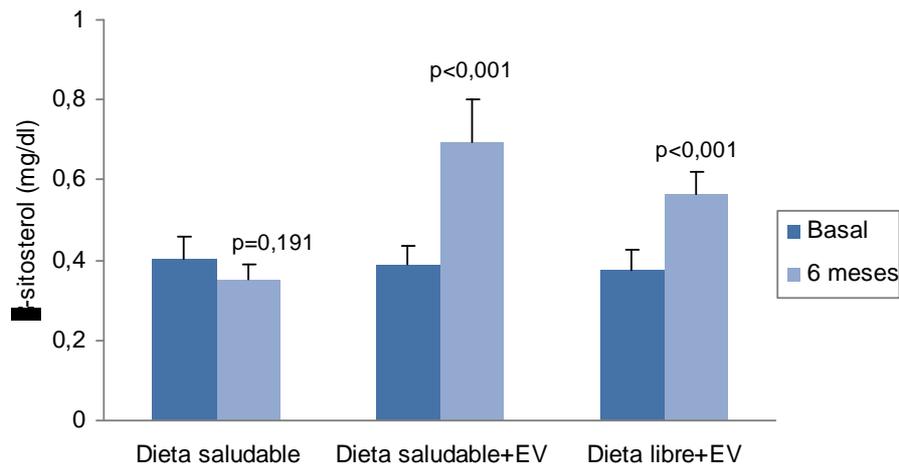


Figura nº 24. Concentración de β -sitosterol (mg/dl) en suero a nivel basal y tras seis meses de intervención.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar.* $p < 0,05$ cuando se compara con una t-test de Student de datos pareados (datos basales vs 3 meses). EV: esteroles vegetales.

DISCUSIÓN

A. Parámetros analíticos de la determinación de EV en bebida láctea y en suero por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG(FID))

- Bebida láctea

La precisión del método aplicado para la determinación de EV en bebida láctea (CV (%) = 2,1–12,3) es adecuada para el fin propuesto.

La exactitud del método aplicado, evaluada mediante ensayos de recuperación, muestra que es adecuada, tanto en la determinación del campesterol como del β -sitosterol (99,8% y 105,2%, respectivamente).

El porcentaje de cada uno de los EV estudiados, respecto del total de esteroides presentes en el producto lácteo analizado es del: 71,72% para el β -sitosterol, 15,49% para el campesterol, 8,36% para el β -sitostanol, 2,63% para el brasicasterol, 0,94% para el campestanol y 0,89% para el estigmasterol. El colesterol presente en el producto no supera el 2% del total de esteroides.

Como se puede observar, el orden de riqueza en fitosteroides es β -sitosterol > campesterol > brasicasterol > estigmasterol, que es la proporción más habitual en los productos enriquecidos con fitosteroides, dado que el β -sitosterol y campesterol son también los más abundantes en los vegetales que los presentan de forma natural. En el caso de los fitostanoles se observa que ocurre exactamente lo mismo en estos productos, lo que es lógico si se tiene en cuenta que mayoritariamente los fitostanoles se obtienen industrialmente por reducción química de los respectivos fitosteroides.

La composición en EV en el alimento se encuentra regulada en la Unión Europea, así, en el año 2004, se publica la Decisión 2004/333/CE, en cuanto a los productos autorizados para comercializarse con fitosteroides añadidos, y la Decisión 2004/335/CE, relativa a la autorización de comercialización de productos tipo leche, leche semidesnatada y leche desnatada, yogur y tipo leche/yogur en los que la grasa de la leche se haya sustituida total, o

parcialmente, por grasa vegetal donde se indican el porcentaje máximo que puede haber de cada uno de ellos. En el caso de los EV del producto analizado, todos ellos se encuentran dentro de lo indicado por la legislación, ya que no se supera el máximo permitido de 80% de β -sistosterol, 40% para el campesterol, 30% de stigmasterol y 3% de brasicasterol. En el caso de los fitostanoles las proporciones en campestanol y β -sitostanol que tienen estos productos tampoco exceden los porcentajes máximos permitidos: < 15% β -sitostanol y < 5% campestanol.

- Suero

La precisión del método aplicado para la determinación de EV en suero (CV (%) = 5,7–10,5) es adecuada para el fin propuesto. La exactitud del método aplicado, evaluada mediante ensayos de recuperación, muestra que tanto para el campesterol como para el β -sitosterol es adecuada (105,3% y 107,8%, respectivamente). El límite de detección obtenido para el campesterol (0,008 mg/dl) y el β -sitosterol (0,013 mg/dl) muestra la sensibilidad del método permite la determinación en las muestras analizadas. Las concentraciones halladas a nivel basal para los sueros analizados en este estudio están comprendidos entre 0,067 y 0,578 mg/dl (valor promedio $0,256 \pm 0,139$ mg/dl) para el campesterol y entre 0,064 y 1,109 (valor promedio $0,389 \pm 0,222$ mg/dl) para el β -sitosterol. En todos los casos, las concentraciones de EV han sido superiores al límite de detección establecido para el método.

Debe tenerse en cuenta que, en cualquiera de los casos, se trabaja con muestras biológicas complejas, lo que contribuye en gran medida a la variabilidad de los resultados.

B. Estudio clínico de intervención para valorar el efecto de la ingesta de una bebida láctea enriquecida en EV

B.1. Efecto del consumo de 2 g de EV/día en población general (grupo C del estudio de intervención)

Dado que los EV consumidos en la dieta por la población española no alcanza la cantidad de 2 g/día considerados como la cifra más adecuada para ejercer sus efectos beneficiosos, se procede a comprobar si la suplementación de esta cantidad de EV, a partir de un alimento funcional, tiene algún efecto sobre los parámetros del metabolismo lipídico. Como puede observarse en la tabla nº 17 se trata de un grupo de individuos muy heterogéneo, con un intervalo de colesterol total comprendido entre 138 a 294 mg/dl y de 78 a 190 mg/dl para el c-LDL, es decir se incluyen tanto individuos normocolesterolémicos, como padeciendo hipercolesterolemias moderadas. Cuando se analiza este grupo de 52 individuos, los descensos (estadísticamente significativos) en colesterol total y c-LDL tras la ingesta de 2 g de EV/día son de 5,3% y 6,5% respectivamente. No se observan cambios estadísticamente significativos en las concentraciones de triglicéridos ni de c-HDL.

En el estudio australiano de Clifton *et al.* (2004), se administran durante 3 semanas 500 ml/día de leche (2% materia grasa) enriquecida con 1,6 g de EV/día, a 40 individuos ligeramente hipercolesterolémicos ($239,3 \pm 27,0$ mg/dl), con edad media de 54 ± 8 años. En este estudio se observa un descenso estadísticamente significativo de c-LDL (de $155,6 \pm 27,5$ mg/dl a $144,4 \pm 26,6$ mg/dl, 7,2%) y de colesterol total (de $240,9 \pm 28,6$ mg/dl a $227,7 \pm 27,4$ mg/dl, 5,5%).

En el estudio de Noakes *et al.* (2005), tras 12 semanas de intervención dietética sobre un grupo de 21 hombres y 18 mujeres con ligera hipercolesterolemia (media de colesterol total $262,5 \pm 31,7$ mg/dl), de edad media $51,5 \pm 11,2$ años, y que consumiendo 300 ml/día de un tipo de leche (1,4% materia grasa) enriquecida con 2 g de EV, se observa un descenso

significativo del c-LDL de un 7,0% (de $186,4 \pm 30,5$ mg/dl a $173,3 \pm 28,6$ mg/dl) y del colesterol total de un 5,1% (de $263,6 \pm 31,7$ mg/dl a $250,1 \pm 31,7$ mg/dl).

Según los criterios de la ATP III (Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, 2001), se considera que los individuos moderadamente hipercolesterolémicos con algún factor de riesgo (fumadores, hipertensión $\geq 140/90$ mm Hg, c-HDL < 40 mg/dl, historia familiar de enfermedad cardiovascular prematura, edad (hombre ≥ 45 años, mujer ≥ 55 años)) deben mantener concentraciones de c-LDL entre 130 y 160 mg/dl cuando presentan dos o más factores de riesgo y entre 160-190 mg/dl para un factor de riesgo; por lo tanto, como en el presente estudio se incluyen individuos voluntarios, tanto normocolesterolémicos como moderadamente hipercolesterolémicos, si se agrupan según los terciles de c-LDL que presentan al inicio del estudio (Tercil 1: c-LDL < 124 mg/dl; Tercil 2: c-LDL: 124-154 mg/dl; Tercil 3: c-LDL > 154 mg/dl) y se comparan los parámetros lipídicos, se observa un descenso estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el c-LDL (7,3%) solo para el grupo de individuos que presentan unas concentraciones de c-LDL superiores a 154 mg/dl. Estos resultados coinciden con los encontrados por Seppo *et al.* (2007) los cuales concluyen que los productos lácteos de bajo contenido en grasa enriquecidos con EV, consumidos a lo largo de cinco semanas, disminuyen significativamente el c-LDL (8,4%) respecto al control en individuos con concentraciones basales de c-LDL superiores a 135 mg/dl.

Numerosos estudios han demostrado que el predominio de las partículas de c-LDL pequeñas y densas se asocia con un aumento del riesgo cardiovascular (Packard, 2006). De hecho, las partículas de LDL pequeñas y densas presentan una menor afinidad por el receptor de LDL (Nigon *et al.*, 1991) y una marcada susceptibilidad a la oxidación, provocando alteraciones en la función endotelial. Los resultados del presente estudio apoyan la idea de que una disminución en el

colesterol total y c-LDL no tiene efectos beneficiosos sobre el tamaño de c-LDL. Se sugiere que los EV no afectan al tamaño de las partículas c-LDL como parte de su mecanismo de acción, lo que está de acuerdo con estudios previos (Matvienko *et al.*, 2002; Charest *et al.*, 2005; Gignoux *et al.*, 2007). Se podría argumentar que esta respuesta es de esperar, ya que los cambios en el triglicéridos se sabe que son la principal causa de la modificación del tamaño de las partículas de c-LDL, y el tratamiento con EV no altera los niveles séricos de triglicéridos. El hecho de que otros hayan descrito un aumento del diámetro de c-LDL después de la terapia la combinación de EV con la fibra soluble o aceites culinarios (St-Onge *et al.*, 2003; Sheresta *et al.*, 2007) o EV con el ejercicio físico (Varady *et al.*, 2005), sugiere que el efecto positivo sobre el tamaño de c-LDL es inducida por otros estímulos que pueden modificar la concentración de triglicéridos más que los EV.

A la vista de los resultados y, aunque se dispone de un tamaño muestral reducido, parece ser que los EV poseen un marcado efecto hipocolesterolémico en individuos con concentraciones de lípidos elevadas, a pesar de no tener controlada su dieta.

B.2. Factores que pueden influir sobre la eficacia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica

B.2.1. Influencia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica (grupo A, B y parte del C) en función del aporte en grasa de la dieta

Según la bibliografía consultada, este es el primer estudio clínico en humanos donde se comparan los efectos de los EV esterificados cuando se administran como parte de una dieta en la que los aportes de grasa saturada y colesterol pueden estar, o no, restringidos. Se trata de un ensayo paralelo aleatorizado con un diseño de tres brazos en el cual se controló la dieta por un dietista experimentado a lo largo del estudio. Los resultados del presente estudio muestran que los aportes de colesterol a través de la dieta no afectan a la eficacia de los EV sobre el descenso del colesterol en sujetos con hipercolesterolemia moderada.

Con el fin de reducir el c-LDL y, por tanto, el riesgo de complicaciones cardiovasculares (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002), a los pacientes con hipercolesterolemia se les aconseja limitar el consumo de alimentos ricos en grasas saturadas y colesterol, en particular productos lácteos. En el grupo de pacientes que siguieron la dieta saludable durante seis meses, al valorar el tramo comprendido entre 3 y 6 meses (estudio paralelo al de los individuos que ingirieron EV) no se detectaron cambios significativos en ninguno de los parámetros lipídicos (incluyendo colesterol total y c-LDL). A primera vista, estos resultados pueden ser sorprendentes, sin embargo, debe tenerse en cuenta que, a fin de estabilizar los hábitos alimentarios antes de la intervención, los pacientes fueron sometidos previamente a una dieta saludable estándar durante 3 meses por lo tanto los cambios en el colesterol total y el c-LDL se llevaron a cabo sólo durante estos primeros tres meses de dieta (ver tabla nº 24). Este resultado está de acuerdo

con un estudio de Bae *et al.* (1991) quienes presentaron un patrón similar de respuesta después de 6 semanas de intervención dietética, pero no observó disminución importante en las siguientes 12 semanas. Este diseño experimental nos permite evaluar los efectos de los EV en función del tipo de dieta que siguen los pacientes (libre o saludable) evitando el efecto positivo que una dieta sana estándar tiene en la disminución de colesterol total y c-LDL. Los EV están incluidos en las directrices del National Cholesterol Education Program (NCEP) (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002) y la "American Heart Association" / "American College of Cardiology" (De Backer *et al.*, 2004) para la prevención secundaria de ECV, ya que por cada unidad de reducción en el porcentaje del c-LDL, se reduce en un 2-3% el riesgo de enfermedad coronaria. De acuerdo con estudios previos (Katan *et al.*, 2003; Abumweis *et al.*, 2008; Demonty *et al.*, 2009), se observó que la ingestión de aproximadamente 2 g de EV/día se asoció con una reducción del 7,0 -10,0% en los niveles de c-LDL. Además, se observó que la ingesta diaria, durante tres meses, de un producto lácteo bajo en grasa (1,5 g/100 ml) enriquecido con EV produjo una disminución similar en la concentración de colesterol total y c-LDL (el 5,5% y 6,7% para el colesterol total y el 7,0% y 9,6% para el c-LDL en la dieta libre, o saludable, respectivamente). Son pocos los estudios que han analizado la eficacia de los EV en relación a la ingesta de colesterol de la dieta. Kassis *et al.* (2008) no encontraron variaciones en la eficacia de los esteroides libres (22 mg/por kg de peso corporal) cuando se administraron junto con distintas ingestas de colesterol con la dieta, que está de acuerdo con nuestros resultados. Por otra parte, otros estudios (Denke, 1995; Mussner *et al.*, 2002) demuestran que los bajos aportes de colesterol con la dieta atenúan la eficacia de una dosis baja de EV (1,8-3 g/día) o no tienen ningún efecto. Por lo tanto, parece que, en individuos moderadamente hipercolesterolémicos, la eficacia de los EV no está influenciada por la cantidad de grasa saturada o colesterol de la dieta, por lo menos en las condiciones del

diseño experimental del presente estudio. Este hallazgo podría ser de especial relevancia, ya que estos pacientes son propensos a continuar con su dieta habitual, que puede ser complementada con alimentos enriquecidos con EV. Sobre la base de estos resultados, puede concluirse que la adición de EV a una bebida láctea baja en grasa puede ser tan efectiva para bajar el c-LDL como matrices tradicionales con alto contenido en grasa, como son untables y aderezos (Judd *et al.*, 2002; Noakes *et al.*, 2002; Colgan *et al.*, 2004), y que el contenido de materia grasa del producto enriquecido o de la dieta en sí no interfiere con la eficacia de los EV.

Datos recientes sugieren que un aumento de la Apo B y el ratio Apo B/Apo A-I y una disminución de la Apo A-I son importantes predictores de enfermedad coronaria, demostrando ser aún más relevante que la concentración de lípidos en sí (Ridker *et al.*, 2005). La mayoría de estudios han mostrado que un consumo diario de aproximadamente 2 g de EV no tiene ningún efecto sobre la Apo A-I, pero afecta significativamente a los niveles de Apo B, lo que está en la línea con nuestros hallazgos (Colgan *et al.*, 2004; Madsen *et al.*, 2007). En el presente estudio puede observarse que el ratio Apo B/Apo A-I se redujo en los grupos que consumieron EV (ver tabla nº 20), con independencia de la intervención dietética seguida (11,5% en dieta libre y 11,6% en dieta saludable). Esto sugiere que con la ingesta continuada de EV se consigue disminuir el riesgo cardiovascular.

No obstante, debe señalarse que estos resultados pueden cambiar con la ingesta de EV durante largos períodos de tiempo, lo que representa una limitación con respecto a las conclusiones del presente estudio. Además, no se excluye un mayor efecto en las dietas ricas en colesterol y grasa saturada que la seguida por la población del presente estudio; aunque debe indicarse que este tipo de dieta no es recomendada para pacientes con hipercolesterolemia moderada.

En resumen, este estudio demuestra que el efecto beneficioso de los EV sobre el perfil lipídico de pacientes moderadamente hipercolesterolémicos no está influenciado por la composición de grasas saturadas o colesterol de la dieta.

B.2.2. Influencia de la eficacia de los EV en población moderadamente hipercolesterolémica en función del genotipo de la apolipoproteína E

Los resultados del presente estudio sugieren que el genotipo de Apo E no tiene un impacto en la respuesta lipídica a los EV como agente hipocolesterolemiante en pacientes con hipercolesterolemia leve o moderada. Además, nos muestran que el tamaño de las partículas c-LDL no se modifica cuando los EV se combinan con una dieta saludable.

El primer paso hacia la disminución de c-LDL en pacientes con hipercolesterolemia leve a moderada es una modificación del estilo de vida y la dieta, en particular, una reducción de la ingesta total de grasa saturada (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002). Como se ha comentado en el apartado anterior, en el presente estudio, no se observa modificación en ninguno de los parámetros evaluados del perfil de lipoproteínas (incluyendo colesterol total o c-LDL) después de tres meses de adhesión a una dieta saludable. A primera vista, estos resultados pueden ser sorprendentes, sin embargo, debe tenerse en cuenta que los pacientes fueron sometidos a previamente al seguimiento de una dieta saludable durante 3 meses con el fin de estabilizar los hábitos alimentarios antes de la intervención. Por lo tanto, es probable que haya tenido lugar un efecto positivo de estas medidas dietéticas preparatorias antes del inicio del período de intervención, que está en la línea con estudios previos en que los cambios en el colesterol total y el c-LDL se produjeron sólo durante las primeras semanas de una dieta saludable (Bae *et al.*, 1991).

El polimorfismo de la Apo E puede influir en la absorción de colesterol en el intestino y, en consecuencia, en la respuesta del colesterol de la dieta. Sin embargo, el diseño experimental empleado en este estudio no permite evaluar este aspecto ya que los posibles efectos de una dieta saludable ya han tenido su efecto.

Aunque el aporte de diferentes cantidades de EV se contempla en la literatura, la dosis recomendada para pacientes con hipercolesterolemia está en el intervalo de 1-2 g/día (Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, 2001). Debe destacarse, y está en línea con los resultados aportados por varios estudios publicados (Katan *et al.*, 2003), que se confirma que la ingesta de aproximadamente 2 g de EV/día produce una disminución de 7,0 a 10,0% en los niveles de c-LDL. De hecho, en el presente estudio, se ha conseguido una disminución total del 5,1% en el colesterol total, 8,1% en el c-LDL, 7,4% en el colesterol no-HDL y 7,7% en el ratio Apo B/Apo A-I después de la adición de EV a una dieta estándar. Ridker *et al.* (2005) indican que un aumento de la Apo B, el ratio Apo B/Apo A-I y el colesterol no-HDL es un importante factor de riesgo de enfermedad coronaria, lo que demuestra ser aún más relevante que la concentración de lípidos en sí. En el presente estudio, se han observado descensos del 7,4% y 5,9% en el ratio Apo B/Apo A-I y del 6,3% y 8,3% en el colesterol no-HDL en pacientes con Apo E3 y E4 tras el consumo de EV, respectivamente, lo que sugiere que el consumo de EV en pacientes con ambos fenotipos induce una reducción en el riesgo de cardiovascular que se encuentra en la línea con los resultados de otros autores (Escuriol *et al.*, 2010).

Son numerosos los estudios que han demostrado un predominio de las partículas LDL pequeñas y densas asociado a un aumento del riesgo cardiovascular (Packard, 2006). Como se ha discutido anteriormente, los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan la idea de que una disminución en el colesterol total y c-LDL no tiene efectos beneficiosos sobre el tamaño de las partículas LDL. Por lo tanto, se sugiere que los EV no afectan al

tamaño de las partículas LDL como parte de su mecanismo de acción, lo que está de acuerdo con estudios previos (Matvienko *et al.*, 2002; Charest *et al.*, 2005; Gisleux *et al.*, 2007). El hecho de que otros autores hayan descrito un aumento del diámetro de c-LDL después de la terapia combinada de EV o bien con fibra soluble o bien con aceites culinarios (St-Onge *et al.*, 2003; Sheresta *et al.*, 2007) o EV con el ejercicio físico (Varady *et al.*, 2005), sugiere que el efecto positivo sobre el tamaño de las partículas de LDL se induce por otros estímulos que pueden modificar la concentración de triglicéridos más que los EV en sí.

A pesar de que la mayoría de los estudios anteriores confirman el efecto hipolipemiante de los EV, no está tan claro si este efecto está influenciado o no por el genotipo de Apo E. Varios estudios han evaluado las respuestas lipídicas tras la suplementación con EV en el contexto del genotipo de la Apo E, y la mayoría han demostrado que los esteroides y estanoles disminuyen el c-LDL independientemente de los alelos de la Apo E (Kempen *et al.*, 1991; Geelen *et al.*, 2002; Ishiwata *et al.*, 2002; Lottenberg *et al.*, 2002; Plat y Mensink, 2002b; Tammi *et al.*, 2002), aunque un estudio reciente concluyó que la terapia de EV fue de poco valor para los sujetos E4 con hipercolesterolemia debido a la falta de beneficios importantes en relación con las concentraciones de colesterol total y c-LDL (Sánchez-Muñiz *et al.*, 2009). Los resultados del presente estudio están en concordancia con los de estudios anteriores en los que la terapia con EV no estuvo influida por el genotipo de la Apo E. Entre estos estudios, se realizaron varios en población normocolesterolemica (Kempen *et al.*, 1991; Geelen *et al.*, 2002; Ishiwata *et al.*, 2002; Plat y Mensink, 2002b; Tammi *et al.*, 2002) y otros en población hipercolesterolemica (Lottenberg *et al.*, 2002; Sánchez-Muñiz *et al.*, 2009) con diferentes dosis y diferentes tipos de EV (fitosteroides y fitostanoles libres o sus ésteres). En todos los casos, con la excepción del estudio del grupo de Sánchez-Muñiz *et al.* (2009), no se observaron variaciones significativas entre las respuestas de las lipoproteínas de individuos de acuerdo a su genotipo de Apo E.

En resumen, los resultados obtenidos confirman y extienden los efectos positivos de un suplemento de EV cuando se administra como parte de las medidas dietéticas para el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia moderada. Los EV redujeron lipoproteínas asociadas a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, aunque este efecto no estaba mediado por el fenotipo de la Apo E o reducciones en el tamaño de las partículas LDL.

B.3. Evaluación del estrés oxidativo tras una ingesta prolongada de EV

Una de las fortalezas de este estudio aleatorizado paralelo es su duración y el hecho de que a los participantes se les diera unas recomendaciones dietéticas, controladas por un dietista experimentado a lo largo del estudio. La dieta seguida por los sujetos durante 3 meses, antes de la incorporación de los EV en la dieta, produjo un descenso en el colesterol total, c-LDL y colesterol no-HDL, así como la mejora de la capacidad antioxidante de las partículas de c-LDL. En la segunda fase de la intervención, el aporte de EV indujo una disminución adicional de colesterol total, c-LDL, colesterol no-HDL y Apo B/Apo A-I. Además, el consumo de 2 g EV/día no produjo cambios en la capacidad antioxidante de las partículas de c-LDL, el estado antioxidante total o el grado de oxidación lipídica.

A los pacientes con hipercolesterolemia se les aconseja, en primer lugar, limitar el consumo de grasas totales y saturadas, particularmente la aportada por los productos lácteos (Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, 2001). En el presente estudio, el mayor cambio en el colesterol total y c-LDL tras el seguimiento de la dieta saludable, se produjo durante los primeros tres meses. No se registró ninguna disminución adicional en la concentración de colesterol total o c-LDL después de este período. La disminución observada, de aproximadamente el 5% en el c-LDL está de acuerdo con lo estimado por Hunninghake *et al.* (1993). De hecho, Bae *et al.* (1991) también mostraron un patrón similar de respuesta después de 6 semanas de la intervención dietética, pero no observaron una disminución importante en las siguientes 12 semanas.

En línea con los resultados de varios estudios (Katan *et al.* 2003; Law, 2000), la ingestión, en el presente estudio, de aproximadamente 2 g de EV por día, se asocia con una reducción del 7,0 al 10,0% en los niveles de c-LDL. Los EV están incluidos en las guías americanas para la prevención secundaria de cardiopatía

coronaria (Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, 2001; De Backer *et al.*, 2004). Por cada unidad de reducción en el porcentaje de c-LDL, el riesgo de enfermedad coronaria se reduce en un 3,2%. En la segunda fase de la intervención de este estudio, la ingestión de una bebida láctea baja en grasa enriquecida con EV redujo significativamente ($p < 0,05$) la concentración de colesterol total y c-LDL en un 6,4% y 9,9%, respectivamente, mientras que el seguimiento de las medidas dietéticas durante 3 meses adicionales redujeron estos valores sólo el 2,1% y 1,8% (sin significancia estadística), respectivamente. Por lo tanto, parece que, en sujetos con hipercolesterolemia moderada, la combinación de terapia dietética con la ingesta de 2 g de EV/día puede disminuir la necesidad de la terapia con medicamentos para conseguir el descenso de la colesterolemia.

Actualmente, se disponen de datos que sugieren que un aumento de la Apo B, así como una disminución de la Apo A son importantes factores de riesgo de enfermedad coronaria (Ridker *et al.*, 2005). De la revisión efectuada, parece que pocos estudios sobre EV han evaluado estos parámetros (Abumweis *et al.*, 2006; Madsen *et al.*, 2007). Sus resultados son controvertidos, por ejemplo, una ingesta diaria de ~ 2 g de EV no tuvo ningún efecto sobre la Apo A-I, pero afectó significativamente a los niveles de Apo B. En el presente estudio, los niveles séricos de Apo B se mantuvieron inalterados. Esta conclusión está de acuerdo con estudios previos (Abumweis *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2007), aunque es cierto que otros autores han observado una disminución (Colgan *et al.*, 2004; Madsen *et al.*, 2007). Se observó una reducción del 4,9% en el ratio Apo B/Apo A-I. Curiosamente, esta relación ha sido recientemente propuesta como un marcador de riesgo para la enfermedad coronaria, incluso más que la propia concentración de lípidos (Ridker *et al.*, 2005).

Considerados en conjunto, los resultados del presente trabajo, sugieren que la suplementación con EV a razón de 2 g/día a una dieta saludable ofrece

una mayor protección contra los factores de riesgo de enfermedad coronaria que únicamente la administración de una dieta saludable.

El mecanismo exacto por el que los EV disminuyen la concentración sérica de carotenoides, y sus posibles consecuencias a largo plazo para la salud están aún por determinar. En el estudio realizado con los pacientes de este estudio, sólo la concentración sérica de criptoxantina disminuyó significativamente después del consumo de EV (Bañuls et al, 2010). Los datos sobre las concentraciones de β -criptoxantina tras la adición de EV en una dieta saludable son contradictorios; algunos estudios no encuentran efectos (Colgan *et al.*, 2004; Thomsen *et al.*, 2004) y otros observan una disminución en los niveles plasmáticos (Plat et al., 2000b). Estas discrepancias podrían explicarse por el consumo estacional de las frutas cítricas (principal fuente de β -criptoxantina) (Granado *et al.*, 1996), las diferencias de género (ha sido observada una disminución más marcada en mujeres que en hombres después de la ingestión de EV) (Judd et al., 2002) y la implicación del genotipo de Apo E en la variabilidad de las concentraciones de β -criptoxantina (Sanchez-Muniz et al., 2009). Por el contrario, la concentración de β -caroteno aumentó en el grupo que siguió la dieta saludable, pero se mantuvo inalterado en el grupo suplementado con EV. Colgan *et al.* (2004) demostraron que la concentración de β -caroteno tendía a aumentar en sujetos con hipercolesterolemia después del seguimiento de una dieta según el NCEP, mientras que disminuía después de tres semanas de consumo de 1,6 g de EV. Las discrepancias entre los resultados de estos autores y los de este estudio son probablemente debidas a diferencias en la duración de los tratamientos dietéticos. Resultados similares a los del presente estudio fueron descritos por Sánchez-Muniz *et al.* (2009), quienes observaron que las concentraciones plasmáticas de β -caroteno se mantuvieron cuando los sujetos consumieron varias raciones diarias de vegetales o frutas con alto contenido en carotenoides, además de un aporte de ésteres de esteroles o estanol en untables (1,1-2,2 g/día). Son numerosos los estudios que han

demostrado que cuando las concentraciones de β -caroteno están normalizadas de acuerdo a la concentración de c-LDL, no hay efecto significativo de los EV sobre los niveles de β -caroteno normalizados con los lípidos (Colgan *et al.*, 2004; Thomsen *et al.*, 2004; Hansel *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de la aterosclerosis y otras patologías crónicas (Noakes *et al.*, 2002). Se ha sugerido que la disminución en la concentración sérica de β -caroteno incluso si esta es pequeña puede ser pro-aterogénico (Victor y Rocha, 2007). Sin embargo, los antioxidantes (distintos compuestos, vitaminas liposolubles y enzimas) pueden interactuar sinérgicamente. El análisis de un componente, independientemente de los demás, no considera el efecto sinérgico y, por tanto, el estrés oxidativo sistémico no parece ser evaluado con precisión de esta manera. Por esa razón, se evaluó el efecto de los EV sobre la capacidad antioxidante total, la capacidad "in vitro" de los antioxidantes presentes en suero para proteger a las partículas de c-LDL a la oxidación, y sobre la oxidación lipídica. La resistencia a la oxidación "in vitro" del c-LDL fue mayor entre los sujetos que no recibieron el suplemento de EV; hecho que está de acuerdo con la mayor concentración de β -caroteno asociada a la dieta saludable, rica en frutas y hortalizas. En un estudio previo, una dieta vegetariana mejoró el tiempo de latencia a la oxidación a valores similares a los obtenidos en nuestro estudio (D'Odorico *et al.*, 2000), mientras que Korpela *et al.* (1999) no obtuvieron efecto alguno con una dieta baja en grasa, conteniendo aceites vegetales. En el presente estudio, la incorporación de EV no modificó la resistencia a la oxidación del c-LDL, con respecto a las condiciones basales del inicio del estudio, como se observó en una publicación anterior (Schwab *et al.*, 1998). Parece ser que el presente estudio, es el primero en el que se evalúa la capacidad antioxidante total después de la incorporación de EV en una dieta saludable. A pesar de los cambios indicados en la concentración sérica de antioxidantes liposolubles (Bañuls *et al.*, 2010) y la capacidad "in vitro" de los antioxidantes para proteger a las partículas de c-LDL a la oxidación, no se detectaron cambios en la

capacidad antioxidante total del suero o en el estrés oxidativo (evaluado como MDA). Hay pocos estudios que evalúen el efecto de los EV sobre marcadores de oxidación lipídica, y los resultados que existen son controvertidos. Estudios que abarcan períodos de tiempo relativamente cortos (4-8 semanas) han encontrado una disminución en los parámetros de la peroxidación lipídica (Brufau *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2007; Mannarino *et al.*, 2009), mientras De Jong *et al.* (2008b) no observaron cambios cuando se consumieron EV a razón de 2,5 g/día durante más de 16 semanas, hecho que está en consonancia con los resultados del presente trabajo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la ligera disminución en la concentración de antioxidantes liposolubles (β -criptoxantina) observada tras la ingesta de EV no afectó a la capacidad antioxidante total, la capacidad antioxidante de las partículas de c-LDL, ni al grado de oxidación lipídica.

En resumen, los resultados del presente trabajo confirman y extienden los efectos positivos de la inclusión de un suplemento de EV entre las medidas dietéticas para individuos con hipercolesterolemia moderada; demostrándose que disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular mediado por lipoproteínas. La disminución de β -criptoxantina, mediada por el consumo de EV, no conduce a un deterioro global de las defensas antioxidantes o a un incremento del estrés oxidativo, a pesar de que impide la mejora en la resistencia de las partículas de c-LDL a la oxidación, asociada con la terapia dietética.

Después de 3 meses de consumo diario de EV dentro de una matriz de bajo contenido graso no se apreció en los sujetos ningún efecto adverso. Por lo tanto, cuando el objetivo es reducir el riesgo cardiovascular esta pauta dietética parece presentar una medida terapéutica útil adicional a la clásica dieta baja en colesterol.

C. Estudio de la biodisponibilidad de los EV

C.1. Biodisponibilidad *in vitro* de EV

A la vista de los resultados, no se encontraron efectos significativos sobre la viabilidad y toxicidad celular tras la incubación de las células Caco-2 durante 24 horas con los distintos patrones de EV evaluados. En un trabajo previo donde se evaluó la viabilidad y crecimiento de la línea celular Caco-2 a diferentes condiciones de trabajo (concentración fisiológica: 5-30 μM , suplementación 30-50 μM , y farmacológico/sitosterolemia >100 μM) durante 48 horas de incubación concluyeron que los EV eran capaces de reducir el crecimiento y viabilidad celular a concentraciones > a 200 μM (Daly *et al.*, 2009). En otro estudio (Fahy *et al.*, 2004) también se evidenció, mediante ensayos de integridad de membrana, que a concentraciones no excesivamente altas (12,5 μM), los EV no fueron tóxicos para las células Caco-2, sin embargo se observó una reducción en la actividad metabólica a estas concentraciones (12,5 μM) de campesterol y β -sitosterol.

En este estudio, se pone de manifiesto la mayor biodisponibilidad (% de captación) del campesterol frente al β -sitosterol, hecho acorde con otros estudios *in vitro* (Fahy *et al.*, 2004) e *in vivo* (Ostlund *et al.*, 2002b). Por otra parte, la adición conjunta de campesterol y β -sitosterol disminuye (~50%) la biodisponibilidad de ambos. Parece ser que, independientemente de la concentración de EV en el medio, la célula no es capaz de aumentar la concentración total de EV, lo que parece indicar la existencia de un mecanismo de regulación que impide el aumento de las concentraciones de éstos en la célula, manteniéndose la proporción en el porcentaje de biodisponibilidad entre ambos EV.

Existe cierta controversia acerca de la seguridad de los EV en alimentos suplementados con los mismos en referencia a su impacto en la absorción de

algunas vitaminas liposolubles. Algunos estudios sugieren que los ésteres de fitosteroles no interfieren con la absorción de α -tocoferol o β -caroteno (Hallikainen *et al.*, 1999; Relas *et al.*, 2001) sin embargo otros autores muestran una reducción en sus niveles (Noakes *et al.*, 2002). Ningún estudio ha evaluado hasta el momento si la suplementación con EV y carotenoides conjuntamente podría estar afectando sobre la biodisponibilidad de los EV. Los resultados del presente estudio demuestran que la biodisponibilidad de los EV en células Caco-2 no se altera cuando se incorporan carotenoides al medio junto con los EV.

Sin embargo, algunos estudios *in vitro* han evaluado la biodisponibilidad de carotenoides en presencia de los EV. Fahy *et al.* (2004) demostraron que la absorción de α -tocoferol no se vio afectada cuando se suplementó el medio con EV (20 μ M de β -sitosterol) sin embargo observaron una reducción en la absorción de β -caroteno cuando el medio se suplementó con una concentración 20 μ M de β -sitosterol sugiriendo una posible competición entre el β -sitosterol y el β -caroteno en el lugar de absorción.

C.2. Biodisponibilidad *in vivo* de EV

La determinación de EV en suero es una herramienta útil para la investigación de pacientes con alteraciones metabólicas en la síntesis y/o absorción de colesterol. En el presente estudio se determinó la concentración de EV en sujetos con hipercolesterolemia moderada y en población general (grupos A, B y C del estudio de intervención).

Las concentraciones de fitosteroles (campesterol y β -sitosterol) habituales en suero de individuos no consumidores de suplementos de EV, representan entre 0,10 y 0,14 % del colesterol presente (Miettinen *et al.*, 1990). Chan *et al.* (2006) analizó las concentraciones basales de campesterol y β -sitosterol en población general a partir de 45 estudios publicados entre 1986 y

2005 encontrando niveles de campesterol entre 0,276 y 1,118 mg/dl (6,9-27,9 $\mu\text{mol/l}$) y para el β -sitosterol de 0,116 y 0,663 mg/dl (2,8-16,0 $\mu\text{mol/l}$). Por otra parte, cuando se suplementa la dieta con 1,8-2 g EV/día durante 4 a 8 semanas, las concentraciones séricas de β -sitosterol y campesterol experimentan un aumento comprendido entre 23-99% (De Graaf *et al.*, 2002; Vanstone *et al.*, 2002; Clifton *et al.*, 2004; Varady *et al.*, 2004), encontrándose la mayoría de los valores dentro del intervalo de normalidad (Weststrate *et al.*, 1998; Hallikainen *et al.*, 2000).

En el presente estudio, a pesar del incremento estadísticamente significativo ($p < 0,01$), las concentraciones de EV encontradas en suero tras la suplementación de la dieta con una bebida láctea enriquecida con la que se aporta 2 g de EV/día, son similares al intervalo encontrado en sujetos normales que no reciben suplementación alguna. Aun así, los intervalos encontrados son bastante amplios (ver tabla nº 28, 29, 30, 31, 32 y 33), lo que sugiere una variabilidad considerable entre individuos. Es de destacar que no se ha detectado ningún caso de sitosterolemia, enfermedad asociada a elevadas concentraciones de EV en suero.

Los incrementos encontrados en los niveles séricos de EV en los grupos suplementados con los 2 g EV/día para el campesterol (100,6%) y el β -sitosterol (75,4%) son semejantes a los encontrados por De Graaf *et al.* (2002) donde muestran que el consumo de 1,8 g de fitosteroles (chocolate) en 70 individuos con hipercolesterolemia primaria incrementan significativamente los niveles séricos de campesterol (95,8%) y sitosterol (64,1%). Vanstone *et al.* (2002) también encuentran en 15 individuos con hipercolesterolemia que consumieron mantequilla enriquecida con EV, a razón de 1,8 g/día, incrementos del 99,3% para el campesterol y de 38,6% para el β -sitosterol.

Sin embargo, Plana *et al.* (2008), en un estudio de intervención a 83 sujetos hipercolesterolémicos, en el que se administran 1,6 g de EV/día mediante una bebida tipo yogurt (1,2% grasa), aporte de EV muy similar al del

presente estudio, encuentran incrementos más bajos de fitosteroles 33,08% para el campesterol y 41,25% para el β -sitosterol.

El mayor incremento del campesterol presente en el suero no guarda relación con el hecho de que el esteroles mayoritario en la bebida láctea administrada es el β -sitosterol (constituye el 71,7% del total de esteroides del producto). Atendiendo a la información del fabricante (2 g de EV por 100 ml) y a la distribución entre los distintos esteroides, la ingestión de 500 ml del producto al día proporciona: 1,43 g de β -sitosterol y 0,31 g de campesterol. Pero el que estas cifras no se correspondan debidamente con los incrementos de fitosteroides encontrados en suero se explica por la distinta biodisponibilidad de estos fitosteroides.

El presente estudio coincide con lo encontrado por Sudhop *et al.* (2002) donde el campesterol es absorbido en mayor grado que el β -sitosterol, aun siendo la cantidad de campesterol presente en la leche aproximadamente tres veces menor que el β -sitosterol. Esto sugiere que el campesterol tiene una cinética diferente a la del β -sitosterol. Ostlund *et al.* (2002b) estudian la absorción de 600 mg de EV utilizando isótopos de los mismos y miden mediante espectroscopia de masas la biodisponibilidad *in vivo* del campesterol y el β -sitosterol, y también encuentran una mayor biodisponibilidad del campesterol sobre el β -sitosterol: $1,9 \pm 0,3 \%$ y $0,51 \pm 0,04 \%$, respectivamente.

La determinación de EV en suero ha revelado que las concentraciones de campesterol y β -sitosterol aumentan durante el consumo de los mismos, con independencia de la dieta seguida (campesterol: 101,9% con dieta saludable más EV y 99,3% con dieta libre más EV; β -sitosterol: 70,6% con dieta saludable más EV y 80,1% con dieta libre más EV), lo que sugiere que el colesterol dietético no tiene ningún efecto sobre la absorción de los EV. Debido a que los EV se absorben por la misma vía que el colesterol (Trautwein *et al.*, 2003), podría esperarse que a mayor ingesta de colesterol menor fuera la absorción de los EV y, por tanto menor su incremento sérico. Sin embargo, se ha demostrado que el colesterol exógeno tiene una contribución relativamente pequeña sobre la

concentración circulante de colesterol en sangre, siendo un 20% procedente del aporte exógeno y un 80% sintetizado de forma endógena. Por otra parte, la absorción del colesterol y de los EV varía según los tramos del intestino que se consideren (Trautwein *et al.*, 2003). Por lo tanto, es poco probable que un cambio en el aporte de colesterol con la dieta provoque un cambio en la biodisponibilidad de los EV.

De los resultados obtenidos, se deduce que el campesterol y el β -sitosterol presentan cinética diferente. El campesterol parece ser absorbido en mayor grado que el β -sitosterol; aunque el aporte de este primero es cuatro veces inferior al β -sitosterol en la bebida láctea, su incremento en el suero es de aproximadamente el doble que el incremento experimentado por el β -sitosterol.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, se concluye que:

1. Los parámetros analíticos obtenidos para los métodos de determinación de EV en bebida láctea y en suero, respectivamente, permiten afirmar que ambos métodos son válidos para el fin propuesto.

2. La suplementación de la dieta con 2 g de EV/día durante un periodo de tres meses, administrados en 500 ml de un producto lácteo semidesnatado, produce un descenso significativo ($p < 0,05$) en la colesterolemia (5,3% en colesterol total y 6,5% en c-LDL) en individuos de la población general sin restricciones en su dieta, observándose que a mayor nivel basal de c-LDL se alcanza una mayor reducción.

3. El efecto beneficioso de los EV sobre el perfil lipídico de pacientes moderadamente hipercolesterolémicos no se vió afectado por un mayor aporte en grasa saturada o colesterol.

4. El aporte de EV, a razón de 2 g/día y la intervención dietética, disminuyen las concentraciones séricas de lipoproteínas asociadas a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Este efecto no está mediado por el genotipo de la Apolipoproteína E.

5. El consumo de EV no disminuye la capacidad antioxidante total en suero, ni incrementa el estrés oxidativo.

6. La biodisponibilidad *in vitro* de campesterol y β -sitosterol (en células Caco-2) indica que el campesterol se absorbe en mayor proporción (12,5 % vs 8,1 %, respectivamente). Además, la adición de carotenoides (β -caroteno y licopeno) en la proporción 1/1000, respecto a la ingesta de EV, no influye en la BD del campesterol y β -sitosterol. La mayor BD *in vitro* de campesterol frente al β -sitosterol se corresponde con los resultados obtenidos *in vivo*.

7. Tras tres meses de suplementación con una bebida láctea enriquecida en EV (a razón de 2 g/día), las concentraciones séricas de campesterol y β -sitosterol se incrementan significativamente de forma similar en el grupo que además sigue recomendaciones dietéticas (101,9% y 70,6%, respectivamente)

como en el grupo que no modifica su hábitos dietéticos (99,3 % y 80,1%, respectivamente).

Como conclusión general del estudio realizado debe señalarse que:

Los sujetos no manifestaron efecto adverso alguno después de 3 meses de consumo diario de EV incorporados en una matriz de bajo contenido graso. Por lo tanto, cuando el objetivo es reducir el riesgo cardiovascular, el aporte de EV, incorporados a una matriz láctea baja en grasa, resulta una medida terapéutica útil, adicional a la recomendación clásica de ingerir una dieta baja en colesterol.

BIBLIOGRAFÍA

A

- AbuMweis SS, Vanstone CA, Ebine N, Kassis A, Ausman LM, Jones PJ, Lichtenstein AH. **2006**. Intake of a single morning dose of standard and novel plant sterol preparations for 4 weeks does not dramatically affect plasma lipid concentrations in humans. *J Nutr* 136: 1012-1016.
- AbuMweis SS, Barake R, Jones P. **2008**. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res* 52.
- AbuMweis SS, Vanstone CA, Lichtenstein AH, Jones PJ. **2009**. Plant sterol consumption frequency affects plasma lipid levels and cholesterol kinetics in humans. *Eur J Clin Nutr* 63: 747-755.
- Acimovic J, Lövgren-Sandblom A, Monostory K, Rozman D, Golicnik M, Lutjohann D, Björkhem I. **2009**. Combined gas chromatographic/mass spectrometric analysis of cholesterol precursors and plant sterols in cultured cells. *J Chromatogr B* 877: 2081-2086.
- Ahmida HSM, Bertucci P, Franzò L, Massoud R, Cortese C, Lala A, Federici G. **2006**. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B* 842: 43-47.
- Algorta Pineda J, Chinchetru Ranedo MJ, Aguirre Anda J, Francisco Terreros S. **2005**. Hypocholesteremic effectiveness of a yogurt containing plant stanol esters. *Rev Clin Esp* 205: 63-66.
- Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. **1974**. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470-475.
- Altmann SW, Davis HR, Zhu JI, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. **2004**. Niemann-Pick C1 Like1 Protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 3003: 1201-1204.
- Amundsen AL, Ntanios F, Put N, Ose L. **2004**. Long-term compliance and changes in plasma lipids, plant sterols and carotenoids in children and parents

with FH consuming plant sterol ester-enriched spread. *Eur J Clin Nutr* 58: 1612-1620.

- Armstrong MJ, Carey MC. **1987**. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *J Lipid Res* 28: 1144-1155.

- Athyros VG, Kakafika AI, Papageorgiou AA, Tziomalos K, Peletidou A, Vosikis C, Karagiannis A, Mikhailidis DP. **2011**. Effect of a plant stanol ester-containing spread, placebo spread, or Mediterranean diet on estimated cardiovascular risk and lipid, inflammatory and haemostatic factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21: 213-221.

- Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. **1988**. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 260: 1917-1921.

- Awad AB, Roy R, Fink CS. **2003**. Beta-sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Oncol Rep* 10: 497-500.

B

- Bae CY, Keenan JM, Wenz J, McCaffrey DJ. **1991**. A clinical trial of the American Heart Association step one diet for treatment of hypercholesterolemia. *J Fam Pract* 33: 249-254.

- Baker VA, Hepburn PA, Kennedy SJ, Jones PA, Lea LJ, Sumpter JP, Ashby J. **1999**. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays. *Food Chem Toxicol* 37: 13-22.

- Bañuls C, Martínez-Triguero ML, López-Ruiz A, Morillas C, Lacomba R, Víctor VM, Rocha M, Hernández-Mijares A. **2010**. Evaluation of cardiovascular risk and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic subjects on a standard healthy diet including low-fat milk enriched with plant sterols. *J Nutr Biochem* 21: 881-886.

-
- Barberá R, Farré R. **1992**. Biodisponibilidad de los elementos traza. *Rev Esp Cienc Tecnol Aliment* 32: 381-399.
 - Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC. **2002**. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 43: 486-494.
 - Berges RR, Kassen A, Senge T. **2000**. Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with beta-sitosterol: an 18-month follow-up. *Br J Urol Int* 85: 842-846.
 - Berneis KK, Krauss RM. **2002**. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 43: 1363-1379.
 - Bjorkhelm LD, Beil UF, von Bergmann K. **1995**. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res* 36: 1763-1773.
 - Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE Jr. **1999**. Percent cholesterol absorption in normal men and women quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res* 40: 302-308.
 - Bradford PG, Awad AB. **2007**. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* 51: 161-170.
 - Brufau G, Quílez J, Angel Canela M, Salas-Salvadó J, Bulló MM, Rafecas M. **2004**. Evaluation of lipid oxidation after ingestion of bakery products enriched with phytosterols, beta-carotene and alpha-tocopherol. *Clin Nutr* 23: 1390-1397.
 - Bucolo G, David H. **1973**. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19: 476-482.

C

- Cella LK, Vancauter E, Schoeller DA. **1995**. Effect of meal timing on diurnal rhythm of human cholesterol synthesis. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 32: E878-E883.

-
- Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J, Jones PJ. **2006**. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev* 64: 385-402.
 - Chan YM, Demonty I, Pelled D, Jones PJ. **2007**. Olive oil containing olive oil fatty acid esters of plant sterols and dietary diacylglycerol reduces low-density lipoprotein cholesterol and decreases the tendency for peroxidation in hypercholesterolaemic subjects. *Br J Nutr* 98: 563-570.
 - Chapman MJ, Guérin M, Bruckert E. **1998**. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J* 19 (Suppl A): A24-A30.
 - Charest A, Vanstone C, St-Onge MP, Parson W, Jones PJ and Lamarche B. **2005**. Phytosterols in nonfat and low-fat beverages have no impact on the LDLc size phenotype. *Eur J Clin Nutr* 59: 801-804.
 - Chen HC. **2001**. Molecular mechanisms of sterol absorption. *J Nutr* 131: 2603-2605.
 - Chen JT, Wesley R, Shamburek RD, Pucino F, Csako G. **2005**. Meta-analysis of natural therapies for hyperlipidemia: plant sterols and stanols versus policosanol. *Pharmacotherapy* 25: 171-183.
 - Chen SC, Judd JT, Kramer M, Meijer GW, Clevidence BA, Baer DJ. **2009**. Phytosterol intake and dietary fat reduction are independent and additive in their ability to reduce plasma LDL cholesterol. *Lipids* 44: 273-281.
 - Christiansen LI, Lähteenmäki PL, Mannelin MR, Seppänen-Laakso TE, Hiltunen RV, Yliruusi JK. **2001**. Cholesterol-lowering effect of spreads enriched with microcrystalline plant sterols in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Nutr* 40: 66-73.
 - Clement LM, Hansen SL, Costin CD, Perri GL. **2010**. Quantitation of sterols and steryl esters in fortified foods and beverages by GC/FID. *J Am Oil Chem Soc* 87: 973-980.

-
- Clifton P. **2002**. Plant sterol and stanols- comparison and contrasts. Sterols versus stanols in cholesterol-lowering: Is there a difference? *Atheroscler Suppl* 3: 5-9.
 - Clifton PM, Noakes M, Sullivan D, Erichsen N, Ross D, Annison G, Fassoulakis A, Cehun M, Nestel P. **2004**. Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *Eur J Clin Nutr* 58: 503-509.
 - Colgan HA, Floyd S, Noone EJ, Gibney MJ, Roche HM. **2004**. Increased intake of fruit and vegetables and a low-fat diet, with and without low-fat plant sterol-enriched spread consumption: effects on plasma lipoprotein and carotenoid metabolism. *J Hum Nutr Diet* 17: 561-569.
 - Compassi S, Werder M, Weber FE, Boffelli D, Hauser H, Schulthess, G. **1997**. Comparison of cholesterol and sitosterol uptake in different brush border membrane models. *Biochemistry* 36: 6643-6652.
 - Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. **2003**. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 24: 987-1003.
 - Contarini G, Povolo M, Bonfitto E, Berardi S. **2002**. Quantitative analysis of sterols in dairy products: experiences and remarks. *Int Dairy J* 12: 573-578.

D

- Daly TJ, Aherne A, O'Connor TP, O'Brien NM. **2009**. Lack of genoprotective effect of phytosterols and conjugated linoleic acids on Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 47: 1791-1796.
- Davidson MH, Maki KC, Umporowicz DM, Ingram KA, Dicklin MR, Schaefer E, Lane RW, McNamara JR, Ribaya-Mercado JD, Perrone G, Robins SJ, Franke WC. **2001**. Safety and tolerability of esterified phytosterols administered in reduced-fat spread and salad dressing to healthy adult men and women. *J Am Coll Nutr* 20: 307-319.

-
- De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Cats VM, Orth-Gomér K, Perk J, Pyörälä K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D; European Society of Cardiology. American Heart Association. American College of Cardiology. **2004**. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Atherosclerosis* 173: 381-391.
 - De Graaf J, De Sauvage Nolting PR, Van Dam M, Belsey EM, Kastelein JJ, Haydn Pritchard P, Stalenhoef AF. **2002**. Consumption of tall oil-derived phytosterols in a chocolate matrix significantly decreases plasma total and low-density lipoprotein-cholesterol levels. *Br J Nutr* 88: 479-488.
 - De Jong A, Plat J, Mensink RP. **2003**. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem* 14: 362-369.
 - De Jong A, Plat J, Lutjohann D, Mensink RP. **2008a**. Effects of long-term plant sterol or stanol ester consumption on lipid and lipoprotein metabolism in subjects on statin treatment. *Br J Nutr* 100: 937-941.
 - De Jong A, Plat J, Bast A, Godschalk RW, Basu S, Mensink RP. **2008b**. Effects of plant sterol and stanol ester consumption on lipid metabolism, antioxidant status and markers of oxidative stress, endothelial function and low-grade inflammation in patients on current statin treatment. *Eur J Clin Nutr* 62: 263-273.
 - Decisión de la Comisión 2004/333/CE de 31 de marzo de **2004**, relativa a la autorización de comercialización de grasas amarillas para untar, aliños para ensaladas, productos de tipo leche, productos de tipo leche fermentada, bebidas de soja y productos tipo queso con fitoesteroles/fitoestanoles añadidos como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) no 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo.

-
- Decisión de la Comisión 2004/335/CE de 31 de marzo de **2004** relativa a la autorización de comercialización de productos tipo leche y productos tipo yogur con ésteres de fitoesterol añadidos como nuevo ingrediente alimentario, con arreglo al Reglamento (CE) no 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo.
 - Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Duchateau GS, Meijer L, Zock PL, Geleijnse JM, Trautwein EA. **2009**. Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J Nutr* 139: 271-284.
 - Denke MA. **1995**. Lack of efficacy of low-dose sitostanol therapy as an adjunct to a cholesterol-lowering diet in men with moderate hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 61: 392-396.
 - Devaraj S, Jialal I, Vega-Lopez S. **2004**. Plant sterol-fortified orange juice effectively lowers cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: e25-e28.
 - Devaraj S, Autret BC, Jialal I. **2006**. Reduced-calorie orange juice beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers. *Am J Clin Nutr* 84: 756-761.
 - D'Odorico A, Martines D, Kiechl S, Egger G, Oberhollenzer F, Bonvicini P, Sturniolo GC, Naccarato R, Willeit J. **2000**. High plasma levels of alpha- and beta-carotene are associated with a lower risk of atherosclerosis: results from the Bruneck study. *Atherosclerosis* 153: 231-239.
 - Domeño C, Ruiz B, Nerín C. **2005**. Determination of sterols in biological samples by SPME with on-fiber derivatization and GC/FID. *Anal Bioanal Chem* 381: 1576-1583.
 - Dutta PC, Appelqvist LA. **1996**. Saturated sterols (stanols) in unhydrogenated and hydrogenated edible vegetable oils and in cereal lipids. *J Sci Food Agric* 71: 383-391.

E

- Ekmekcioglu C, Strauss-Blasche G, Leibetseder V J, Marktl W. **1999**. Toxicological and biochemical effects of different beverages on human intestinal cells. *Food Res Int* 32: 421-427.
- Ekmekcioglu C. **2002**. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chem* 76: 225-230.
- Ellegard LH, Andersson SW, Normen AL, Andersson HA. **2007**. Dietary plant sterols and cholesterol metabolism. *Nutr Rev* 65: 39-45.
- Escuriol V, Cofan M, Moreno-Iribas C, Larranaga N, Martinez C, Navarro C, Rodríguez L, González CA, Corella D, Ros E. **2010**. Phytosterol plasma concentrations and coronary heart disease in the prospective Spanish EPIC cohort. *J Lipid Res* 51: 618-624.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. **1989**. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 6: 67-75.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl h, Jurgens G. **1992**. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13: 341-390.
- Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. **2001**. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: 2486-2497.

F

- Fahy DM, O'Callaghan YC, O'Brien NM. **2004**. Phytosterols: lack of cytotoxicity but interference with β -carotene uptake in Caco-2 cells in culture. *Food Add Contam* 21: 42-51.

-
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. **1977**. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59: 221-226.
 - Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. **1957**. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
 - Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. **1972**. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
 - Fuentes F, López-Miranda J, García A, Pérez-Martínez P, Moreno J, Cofan M, Caballero J, Paniagua JA, Ros E, Pérez-Jiménez F. **2008**. Basal plasma concentrations of plant sterols can predict LDL-C response to sitosterol in patients with familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Nutr* 62: 495-501.

G

- Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. **1998**. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. *J Lipid Res* 39: 1263-1273.
- Galman C, Angelin B, Rudling M. **2005**. Bile acid synthesis in humans has a rapid diurnal variation that is asynchronous with cholesterol synthesis. *Gastroenterology* 129: 1445-1453.
- Geelen A, Zock PL, de Vries JH, Katan MB. **2002**. Apolipoprotein E polymorphism and serum lipid response to plant sterols in humans. *Eur J Clin Invest* 32: 738-742.
- Gisleux I, Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Faulkner DA, Wong JM, de Souza R, Emam A, Parker TL, Trautwein EA, Lapsley KG, Connelly PW, Lamarche B. **2007**. Comparison of a dietary portfolio diet of cholesterol-lowering foods and a statin on LDLc particle size phenotype in hypercholesterolaemic participants. *Br J Nutr* 98: 1229-1236.

-
- Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ. **1986**. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzimol* 128: 3-41.
 - Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knapton M, Perk J, Priori SG, Pyorala K, Reiner Z, Ruilope L, Sans-Menendez S, Scholte op Reimer W, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano JL, Walma E, Fitzgerald T, Cooney MT, Dudina A; European Society of Cardiology (ESC) Committee for Practice Guidelines (CPG). **2007**. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 28: 2375-2414.
 - Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. **1996**. Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr* 50: 246-250.
 - Guyton AC. **1991**. Tratado de Fisiología médica. Octava edición. Interamericana McGraw-Hill. Madrid.
 - Gylling H, Miettinen TA. **1999**. Cholesterol reduction by different plant stanol mixtures and with variable fat intake. *Metabolism* 48: 575-580.
 - Gylling H, Miettinen TA. **2002**. Baseline intestinal absorption and synthesis of cholesterol regulate its response to hypolipidaemic treatments in coronary patients. *Atherosclerosis* 160: 477-481.
 - Gylling H, Hallikainen M, Raitakari OT, Laakso M, Vartiainen E, Salo P, Korpelainen V, Sundvall J, Miettinen TA. **2009**. Long-term consumption of plant stanol and sterol esters, vascular function and genetic regulation. *Br J Nutr* 101: 1688-1695.
 - Gylling H, Hallikainen M, Nissinen MJ, Simonen P, Miettinen TA. **2010**. Very high plant stanol intake and serum plant stanols and non-cholesterol sterols. *Eur J Nutr* 49: 111-117.

H

- Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. **2000**. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 260: 248-256.
- Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Uusitupa MIJ. **1999**. Effects of low-fat stanol ester enriched margarines on concentrations of serum carotenoids in subjects with elevated serum cholesterol concentrations. *Eur J Clin Nutr* 53: 966-969.
- Hallikainen MA, Uusitupa MI. **1999**. Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 69: 403-410.
- Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Gylling H, Erkkila AT, Uusitupa MIJ. **2000**. Comparison of the effects of plant sterol ester and plant stanol ester-enriched margarines in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet. *Eur J Clin Nutr* 54: 715-725.
- Hansel B, Nicolle C, Lalanne F, Tondu F, Lassel T, Donazzolo Y, Ferrières J, Krempf M, Schlienger JL, Verges B, Chapman MJ, Bruckert E. **2007**. Effect of low-fat, fermented milk enriched with plant sterols on serum lipid profile and oxidative stress in moderate hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 86: 790-796.
- Hayes KC, Pronczuk A, Wijendran V, Beer M. **2002**. Free phytosterols effectively reduce plasma and liver cholesterol in gerbils fed cholesterol. *J Nutr* 132: 1983-1988.
- Heggen E, Granlund L, Pedersen JI, Holme I, Ceglarek U, Thiery J, Kirkhus B, Tonstad S. **2010**. Plant sterols from rapeseed and tall oils: effects on lipids, fat-soluble vitamins and plant sterol concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20: 258-265.
- Hendriks HF, Weststrate JA, van Vliet T, Meijer GW. **1999**. Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 53: 319-327.

-
- Hendriks HF, Brink EJ, Meijer GW, Princen HM, Ntanos FY. **2003**. Safety of long-term consumption of plant sterol esters-enriched spread. *Eur J Clin Nutr* 57: 681-692.
 - Hirai K, Shimazu C, Takezoe R, Ozeki Y. **1986**. Cholesterol, phytosterol and polyunsaturated fatty acid levels in 1982 and 1957 Japanese diets. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 32: 363-372.
 - Houweling AH, Vanstone CA, Trautwein EA, Duchateau GS, Jones PJ. **2009**. Baseline plasma plant sterol concentrations do not predict changes in serum lipids, C-reactive protein (CRP) and plasma plant sterols following intake of a plant sterol-enriched food. *Eur J Clin Nutr* 63: 543-551.
 - Howard BV, Gidding SS, Liu K. **1998**. Association of Apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults: The CARDIA Study. *Am J Epidemiol* 148: 859-868.
 - Huff MW. **2003**. Dietary cholesterol, cholesterol absorption, postprandial lipemia and atherosclerosis. *Can J Clin Pharmacol* 10 (Suppl A): 26A-32A.
 - Hunninghake DB, Stein EA, Dujovne CA, Harris WS, Feldman EB, Miller VT, Tobert JA, Laskarzewski PM, Quiter E, Held J. **1993**. The efficacy of intensive dietary therapy alone or combined with lovastatin in outpatients with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 328: 1213-1219.

I

- Igel M, Giesa U, Lutjohann D, von Bergmann K. **2003**. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J Lipid Res* 44: 533-538.
- Ishiwata K, Homma Y, Ishikawa T, Nakamura H, Handa S. **2002**. Influence of apolipoprotein E phenotype on metabolism of lipids and apolipoproteins after plant stanol ester ingestion in Japanese subjects. *Nutrition* 18: 561-565.

J

- Janero DR. **1990**. Malondialdehyde and thiobarbituric aci-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9: 515-540.
- Janumyan YM, Sansam CG, Chattopadhyay A, Cheng N, Soucie EL, Penn LZ, Andrews D, Knudson CM, Yang E. **2003**. Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J* 22: 5459-5470.
- Jentzsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. **1996**. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol* 20: 251-256.
- Jiménez-Escrig A, Santos-Hidalgo AB, Saura-Calixto F. **2006**. Common Sources and Estimated Intake of Plant Sterols in the Spanish Diet. *J Agric Food Chem* 54: 3462-3471.
- Jones PJ, MacDougall DE, Ntanios F, Vanstone CA. **1997**. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 217-227.
- Jones PJ, Raeini-Sarjaz M, Ntanios FY, Vanstone CA, Feng JY, Parsons WE. **2000**. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *J Lipid Res* 41: 697-705.
- Jovani M, Barberá R, Farré R, Martín de Aguilera E. **2001**. Calcium, iron and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 49: 3480-3485.
- Judd JT, Baer DJ, Chen SC, Clevidence BA, Muesing RA, Kramer M, Meijer GW. **2002**. Plant sterol esters lower plasma lipids and most carotenoids in mildly hypercholesterolemic adults. *Lipids* 37: 33-42.

K

- Kassis AN, Vanstone CA, AbuMweis SS, Jones PJ. **2008**. Efficacy of plant sterols is not influenced by dietary cholesterol intake in hypercholesterolemic individuals. *Metabolism* 57: 339-346.

-
- Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R, Stresa Workshop participants. **2003**. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 78: 965-978.
 - Katragadda S, Rai F, Arora R. **2010**. Dual inhibition, newer paradigms for cholesterol lowering. *Am J Ther* 17: e88-99.
 - Kempen HJ, de Knijff P, Boomsma DI, van der Voort HA, Gevers Leuven JA, Havekes L. **1991**. Plasma levels of lathosterol and phytosterols in relation to age, sex, anthropometric parameters, plasma lipids, and apolipoprotein E phenotype, in 160 Dutch families. *Metabolism* 40: 604-611.
 - Klingberg S, Ellegard L, Johansson I, Hallmans G, Weinehall L, Andersson H, Winkvist A. **2008**. Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden. *Am J Clin Nutr* 87: 993-1001.
 - Kochhar SP. **1983**. Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. *Prog Lipid Res* 22: 161-188.
 - Korpela R, Seppo L, Laakso J, Lilja J, Karjala K, Lähteenmäki T, Solatunturi E, Vapaatalo H, Tikkanen MJ. **1999**. Dietary habits affect the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation. *Eur J Clin Nutr* 53: 802-807.

L

- Laakso P. **2005**. Analysis of sterols from various food matrices. *Eur J Lipid Sci Technol* 107: 402-410.
- Lagarda, MJ, García-Llatas G, Farré R. **2006**. Analysis of phytosterols in foods. *J Pharm Biomed Anal* 41: 1486-1496.
- Law M. **2000**. Plant sterol and stanol margarines and health. *Br Med J* 320: 861-864.
- Lees AM, Mok HYI, Lees RS, Mc Cluskey MA, Grundy SM. **1977**. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 28: 325-338.

-
- Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Thérond P, Torreilles J. **1998**. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin (Paris)* 56: 305-319.
 - Lin X, Racette SB, Lefevre M, Spearie CA, Most M, Ma L, Ostlund RE Jr. **2010**. The effects of phytosterols present in natural food matrices on cholesterol metabolism and LDL-cholesterol: a controlled feeding trial. *Eur J Clin Nutr* 64: 1481-1487.
 - Lin YT, Wu SS, Wu HL. **2007**. Highly sensitive analysis of cholesterol and sitosterol in foods and human biosamples by liquids chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1156: 280-287.
 - Ling WH, Jones PJH. **1995**. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 57: 195-206.
 - Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **2010**. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121: 948-954.
 - Lottenberg AM, Nunes VS, Nakandakare ER, Neves M, Bernik M, Santos JE, Quintao EC. **2002**. Food phytosterol ester efficiency on the plasma lipid reduction in moderate hypercholesterolemic subjects. *Arq Bras Cardiol* 79: 139-142.
 - Lutjohann D, Bjorkhem I, Beil UF, von Bergmann K. **1995**. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res* 36: 1763-1773.
 - Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL, Randall RJ. **1951**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

M

- MacMurray TA, Morrison WR. **1970**. Composition of wheat-flour lipids. *J Sci Food Agric* 21: 520-528.
- Madsen MB, Jensen AM, Schmidt EB. **2007**. The effect of a combination of plant sterol-enriched foods in mildly hypercholesterolemic subjects. *Clin Nutr* 26:792-798.
- Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM. **2004**. *J Food Sci Nutr* 55: 171-178.
- Mahley RW. **1988**. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630.
- Maki KC, Davidson MH, Umporowicz DM, Schaefer EJ, Dicklin MR, Ingram KA, Chen S, McNamara JR, Gebhart BW, Ribaya-Mercado JD, Perrone G, Robins SJ, Franke WC. **2001**. Lipid responses to plant-sterol-enriched reduced-fat spreads incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I diet. *Am J Clin Nutr* 74: 33-43.
- Mannarino E, Pirro M, Cortese C, Lupattelli G, Siepi D, Mezzetti A, Bertolini S, Parillo M, Fellin R, Pujia A, Averna M, Nicolle C, Notarbartolo A. **2009**. Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: A multicenter Italian study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19: 84-90.
- MAPA. **2001**. Alimentación. Análisis de productos. La Alimentación en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: Madrid, Spain; pp 309-373.
- Marais AD. **2000**. Therapeutic modulation of low-density lipoprotein size. *Curr Opin Lipidol* 11: 597-602.
- Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, Sullivan L, Ordovas J, Cerdón F, Ramos R, Sala J, Masià R, Rohlfes I, Elosua R, Kannel WB. **2003**. Estimación del riesgo coronario en España mediante la función de Framingham calibrada. *Rev Esp Cardiol* 56: 253-261.
- Mataix J, Mañas M, Llopis J, Martínez de Victoria E. **2003**. Tablas de composición de alimentos españoles (Spanish Food Composition Tables). 4ª

edición, Servicio de publicaciones de la Universidad de Granada. Granada, España.

- Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. **2000**. Biochemistry. San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, Inc.
- Matvienko OA, Lewis DS, Swanson M, Arndt B, Rainwater DL, Stewart J, Alekel DL. **2002**. A single daily dose of soybean phytosterols in ground beef decreases serum total cholesterol and LDL cholesterol in young, mildly hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 76: 57-64.
- Mertens A, Holvoet P. **2001**. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 15: 2073-2084.
- Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. **1990**. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 131: 20-31.
- Miettinen TA, Puska P, Gylling H, Vanhanen H, Vartiainen E. **1995**. Reduction of serum-cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N Engl J Med* 333: 1308-1312.
- Miettinen TA, Vanhanen H. **1994**. Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis* 105: 217-226.
- Miettinen TA, Gylling H, Strandberg T, Sarna S. **1998**. Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in subgroup of Scandinavian simvastatin survival study. Finnish 4S Investigators. *BMJ* 316: 1127-1130.
- Miettinen TA, Gylling H. **2006**. Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases: a review. *Int J Clin Pharmacol Ther* 44: 247-250.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. **1993**. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 84: 407-412.
- Miller NJ, Rice-Evans C. **1997**. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. *Free Rad Res* 26: 195-199.

- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. **1988**. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. **2002**. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 41: 457-500.
- Morton GM, Lee SM, Buss DH, Lawrance P. **1995**. Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet. *J Hum Nutr Diet* 8: 429-440.
- Moruisi KG, Oosthuizen W, Opperman AM. **2006**. Phytosterols/stanols lower cholesterol concentrations in familial hypercholesterolemic subjects: a systematic review with meta-analysis. *J Am Coll Nutr* 25: 41-48.
- Musa-Veloso K, Poon TH, Elliot JA, Chung C. **2011**. A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: Results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85: 9-28.
- Mussner MJ, Parhofer KG, von Bergmann K, Schwandt P, Broedl U, Otto C. **2002**. Effects of phytosterol ester-enriched margarine on plasma lipoproteins in mild to moderate hypercholesterolemia are related to basal cholesterol and fat intake. *Metabolism* 51: 189-194.

N

- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **2002**. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106: 3143-3421.
- Naumann E, Plat J, Mensink RP. **2003**. Changes in serum concentrations of noncholesterol sterols and lipoproteins in healthy subjects do not depend on the ratio of plant sterols to stanols in the diet. *J Nutr* 133: 2741-2747.

-
- Naumann E, Plat J, Kester AD, Mensink RP. **2008**. The baseline serum lipoprotein profile is related to plant stanol induced changes in serum lipoprotein cholesterol and triacylglycerol concentrations. *J Am Coll Nutr* 27: 117-126.
 - Nguyen LB, Schefer S, Salen G, Tint SG, Batta AK. **1998**. Competitive inhibition of hepatic sterol 27-hydroxylase by sitosterol: decreased activity in sitosterolemia. *Proc Asso Am Phys* 110: 32-39.
 - Nguyen TT. **1999**. The cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *J Nutr* 129: 2109-2112.
 - Nichols AV, Krauss RM and Musliner TA. **1986**. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 128: 417-431.
 - Nigon F, Lesnik P, Ronis M and Chapman M. **1991**. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J Lipid Res* 32: 1741-1753.
 - Nissinen M, Gylling H, Vuoristo M, Miettinen TA. **2002**. Micellar distribution of cholesterol and phytosterols after duodenal plant stanol ester infusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G1009-G1015.
 - Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA. **2008**. Effects of dietary cholesterol and fat on serum non-cholesterol sterols according to different apolipoprotein E subgroups among healthy men. *Br J Nutr* 100: 373-379.
 - Noakes M, Clifton P, Ntanos F, Shrapnel W, Record I, McInerney J. **2002**. An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. *Am J Clin Nutr* 75: 79-86.
 - Noakes M, Clifton PM, Doornbos AM, Trautwein EA. **2005**. Plant sterol ester-enriched milk and yoghurt effectively reduce serum cholesterol in modestly hypercholesterolemic subjects. *Eur J Nutr* 44: 214-222.
 - Ntanos FY, Duchateau GS. **2002**. A healthy diet rich in carotenoids is effective in maintaining normal blood carotenoid levels during the daily use of plant sterol-enriched spreads. *Int J Vitam Nutr Res* 72: 32-39.

O

- O'Neill FH, Sanders TAB, Thompson GR. **2005**. Comparison of Efficacy of Plant Stanol Ester and Sterol Ester: Short-Term and Longer-Term Studies. *Am J Cardiol* 96: 29-36.
- Ordovas JM. **2009**. Genetic influences on blood lipids and cardiovascular disease risk: tools for primary prevention. *Am J Clin Nutr* 89: 1509S–1517S.
- Ostlund RE Jr. **2002**. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 22: 533-549.
- Ostlund RE Jr, Racette SB, Okeke A, Stenson WF. **2002a**. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 75: 1000-1004.
- Ostlund RE Jr, McGill J, Zeng C-M, Covey DF, Stearns J, Stenson WF, Spilburg CA. **2002b**. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Δ 5-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E911-E916.
- Ostlund RE Jr, Racette SB, Stenson WF. **2003**. Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *Am J Clin Nutr* 77: 1385-1389.
- Ostlund RE Jr. **2007**. Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids* 42: 41-45.

P

- Packard CJ. **2006**. Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 17: 412-417.
- Packard CJ, Shepherd J. **1997**. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3542-3556.
- Paick MJ, Yu J, Hu MB, Kim SJ, Kim KR, Ahn YH, Choi S, Lee G. **2008**. Gas chromatographic-mass spectrometric analyses of cholesterol and its precursors in rat plasma as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *Clin Chim Acta* 396: 62-65.

-
- Palmgrén JJ, Töyräs A, Mauriala T, Mönkkönen J, Auriola S. **2005**. Quantitative determination of cholesterol, sitosterol, and sitostanol in cultured Caco-2 cells by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B* 821: 144-152.
 - Palou A, Oliver P, Pico C. **2007**. Los esteroides vegetales en la alimentación funcional. *Alim Nutr Salud* 14: 102-107.
 - Palou A, Picó C, Bonet ML, Oliver P, Serra F, Rodríguez AM, Ribot J. **2005**. El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación. Barcelona: Instituto Flora; Barcelona, 173 p.
 - Patel M, Thompson P. **2006**. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis* 186: 12-19.
 - Pelletier X, Belbraouet S, Mirabel D, Mordret F, Perrin JL, Pages X, Debry G. **1995**. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann Nutr Metab* 39: 291-295.
 - Peng L, Kawagoe Y, Hogan P, Delmer D. **2002**. Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* 295: 147-150.
 - Phillips KM, Ruggio DM, Bailey JA. **1999**. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr B* 732: 17-29.
 - Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. **1983**. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture. *Biology of the Cell* 47: 323-330.
 - Plana N, Nicolle C, Ferre R, Camps J, Cos R, Villoria J, Masana L, DANACOL group. **2008**. Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Nutr* 47: 32-39.
 - Plat J, Kerckhoffs DA, Mensink RP. **2000a**. Therapeutic potential of plant sterols and stanols. *Curr Opin Lipidol* 11: 571-576.
 - Plat J, van Onselen EN, van Heugten MM, Mensink RP. **2000b**. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of

consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr* 54: 671-677.

- Plat J, Mensink RP. **2002a**. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *FASEB J* 16: 1248-1253.

- Plat J, Mensink RP. **2002b**. Relationship of genetic variation in genes encoding apolipoprotein A-IV scavenger receptor BI, HMG-CoA reductase, CETP and apolipoprotein E with cholesterol metabolism and the response to plant stanol ester consumption. *Eur J Clin Invest* 32: 242-250.

Q

- Quílez J, Rafecas M, Brufau G, García-Lorda P, Megías I, Bulló M, Ruiz JA, Salas-Salvadó J. **2003**. Bakery products enriched with phytosterol esters, α -tocopherol and β -carotene decrease LDL-cholesterol and maintain plasma β -carotene concentrations in normocholesterolemic men and women. *J Nutr* 133: 3103-3109.

R

- Racette SB, Lin X, Lefevre M, Spearie CA, Most MM, Ma L, Ostlund RE Jr. **2009**. Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr* 91: 32-38.

- Raeini-Sarjaz M, Ntanios FY, Vanstone CA, Jones PJH. **2002**. No changes in serum fat-soluble vitamin and carotenoid concentrations with the intake of plant sterol/stanol esters in the context of a controlled diet. *Metabolism* 51: 652-656.

- Rajman I, Eacho PI, Chowienczyk PJ, Ritter JM. **1999**. LDL particle size: an important drug target? *Br J Clin Pharmacol* 48: 125-133.

- Read SM, Bacic T. **2002**. Plant biology. Prime time for cellulose. *Science* 295: 59-60.

- Reddy MB, Cook JD. **1991**. Assessment of dietary determinants on non-heme iron absorption in humans and rats. *Am J Clin Nutr* 54: 723-728.

-
- Relas H, Gylling H, Miettinen TA. **2001**. Acute effect of dietary stanyl ester dose on post-absorptive alpha-tocopherol, beta-carotene, retinol and retinyl palmitate concentrations. *Br J Nutr* 85:141-147.
 - Repa JJ, Mangelsdorf DJ. **1999**. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 10: 557-563.
 - Richelle M, Enslin M, Hager C, Groux M, Tavazzi I, Godin JP, Berger A, Métairon S, Quaille S, Piguet-Welsch C, Sagalowicz L, Green H, Fay LB. **2004**. Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am J Clin Nutr* 80: 171-177.
 - Ridker PM, Rifai N, Cook NR, Bradwin G, Buring JE. **2005**. Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *J Am Med Assoc* 294: 326-333.
 - Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinaz G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J. **2009**. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Transl Res* 153: 217-223.
 - Robins S, Fasulo J. **1997**. High density lipoprotein, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *J Clin Invest* 99: 380-384.
 - Rogers EJ, Rice SM, Nicolosi RJ, Carpenter DR, McClelland CA, Romanczyk LJ. **1993**. Identification and quantification of gamma-oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. *J Am Oil Chem Soc* 70: 301-307.

S

- Salen G, Ahrens EH, Grundy S. **1979**. Metabolism of beta-sitosterol in man. *Clin Invest* 49: 952-967.
- Salen G, Tint GS, Shefer S, Shore V, Nguyen L. **1992**. Increased sitosterol absorption is offset by rapid elimination to prevent accumulation in heterozygotes with sitosterolemia". *Arteriosclerosis* 12: 563-568.

-
- Sanchez-Muñiz FJ, Maki KC, Schaefer EJ, Ordovas JM. **2009**. Serum lipid and antioxidant responses in hypercholesterolemic men and women receiving plant sterols vary by apolipoprotein E genotype. *J Nutr* 139: 13-19.
 - Santos R, Limas E, Sousa M, Castilho MC, Ramos F, Silveira MIN. **2007**. Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of phytosterols in enriched milk and yoghurt. *Food Chemistry* 102: 113-117.
 - Saraiva D, Castilho MC, Martins MR, Noronha da Silveira MI, Ramos F. **2011**. Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Anal Methods* 4:28-34.
 - Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, Ordovas JM, Schaefer MM, Castelli WP, Wilson PW. **1994**. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb* 14: 1105-1113.
 - Schelmmmer U. **1995**. Bioavailability of nutrients. Conceptual aspects of definition and problems of determination. *British Journal of Nutrition* 73: 150-151.
 - Schuhmann P, Schneller R. **1996**. Methode zur qualitativen and quantitativen Bestimmung von phytosterinen in pflanzenolen mittels LC-GC off line. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 87: 709-715.
 - Schwab US, Vogel S, Lammi-Keefe CJ, Ordovas JM, Schaefer EJ, Li Z, Ausman LM, Gualtieri L, Goldin BR, Furr HC, Lichtenstein AH. **1998**. Varying dietary fat type of reduced-fat diets has little effect on the susceptibility of LDL to oxidative modification in moderately hypercholesterolemic subjects. *J Nutr* 128:1703-1709.
 - Seppo L, Jauhiainen T, Nevala R, Poussa T, Korpela R. **2007**. Plant stanol esters in low-fat milk products lower serum total and LDL cholesterol. *Eur J Nutr* 46: 111-117.
 - Shrestha S, Freake HC, McGrane MM, Volek JS, Fernandez ML. **2007**. A combination of psyllium and plant sterols alters lipoprotein metabolism in

hypercholesterolemic subjects by modifying the intravascular processing of lipoproteins and increasing LDL uptake. *J Nutr* 137: 1165-1170.

- Sierksma A, Weststrate JA, Meijer GW. **1999**. Spreads enriched with plant sterols, either esterified 4, 4-dimethylsterols or free 4-desmethylsterols, and plasma total- and LDL-cholesterol concentrations. *Br J Nutr* 82: 273-282.

- St-Onge MP, Lamarche B, Mauger JF and Jones PJ. **2003**. Consumption of a functional oil rich in phytosterols and medium-chain triglycerides oil improves plasma lipid profiles in men. *J Nutr* 133: 1815-1820.

- St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Després JP, Lamarche B. **2001**. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation* 104: 2295-2299.

- Sudhop T, Y Sahin, B Lindenthal, C Hahn, C Luers, HK Berthold, and K von Bergmann. **2002**. Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut* 51: 860-863.

- Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, Miyauchi K. **1995**. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alphacyclodextrin. *Clin Chem* 41: 717-723.

T

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

- Tammi A, Rönnemaa T, Miettinen TA, Gylling H, Rask-Nissilä L, Viikari J, Tuominen J, Marniemi J, Simell O. **2002**. Effects of gender, apolipoprotein E phenotype and cholesterol-lowering by plant stanol esters in children: the STRIP

- study. Special Turku Coronary Risk Factor Intervention Project. *Acta Paediatr* 91: 1155-1162.
- Tang JL, Armitage JM, Lancaster T, Silagy CA, Fowler GH, Neil HA. **1998**. Systematic review of dietary intervention trials to lower blood total cholesterol in free-living subjects. *BMJ* 316: 1213-20.
 - Taskinen MR, Caslake M, Packard C. **2001**. Lipoprotein metabolism in FCHL. *Eur J Clin Invest* 31:4-4.
 - The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. **1997**. *Arch Intern Med* 157: 2413-2446.
 - Thomsen AB, Hansen HB, Christiansen C, Green H, Berger A. **2004**. Effect of free plant sterols in low-fat milk on serum lipid profile in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 58: 860-870.
 - Thornley I, Sutherland DR, Nayar R, Sung L, Freedman MH, Messner HA. **2001**. Replicative stress after allogeneic bone marrow transplantation: changes in cycling of CD34⁺CD90⁺ and CD34⁺CD90⁺ hematopoietic progenitors. *Blood* 97: 1876-1878.
 - Thuluva SC, Igel M, Giesa U, Lütjohann D, Sudhop T, von Bergmann K. **2005**. Ratio of lathosterol to campesterol in serum predicts the cholesterol-lowering effect of sitostanol-supplemented margarine. *Int J Clin Pharmacol Ther* 43: 305-310.
 - Thurnham DI. **1999**. Functional foods: cholesterol-lowering benefits of plant sterols. *Br J Nutr* 82: 255-256.
 - Tilvis RS, Miettinen TA. **1986**. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 43: 92-97.
 - Trautwein EA, Duchateau GS, Lin YG et al. **2003**. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol* 105: 171-185.
 - Tribble DL, Krauss RM, Lansberg MG, Thiel PM, van den Berg JJ. **1995**. Greater oxidative susceptibility of the surface monolayer in small dense LDL may

contribute to differences in copper-induced oxidation among LDL density subfractions. *J Lipid Res* 36: 662-671.

- Turnbull D, Frankos V, Leeman WR, Jonker D. **1999**. Short-term test of estrogenic potential of plant stanols and plant stanol esters. *Reg Toxicol Pharmacol* 29: 211-215.

V

- Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. **1997**. Digestión, Absorción y transporte de los ácidos grasos: una perspectiva diferente en la interpretación de sus efectos nutricionales. *Grasas y Aceites* 36: 6643-6652.

- Valenzuela B, Ronco M. **2004**. Fitoesteroles y Fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Rev chil nutr* 31: 161-169.

- Van Campen DR, Glahn RP. **1999**. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. *Field Crops Research* 60: 93-113.

- Van Horn L, McCoin M, Kris-Etherton PM, Burke F, Carson JA, Champagne CM, Karmally W, Sikand G. **2008**. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *J Am Diet Assoc* 108: 287-331.

- Vanhanen HT, Blomqvist S, Ehnholm C, Hyvönen M, Jauhiainen M, Torstila I, Miettinen TA. **1993**. Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apoE phenotypes during dietary sitostanol ester treatment. *J Lipid Res* 34: 1535-1544.

- Vanstone CA, Raeini-Sarjaz M, Parsons WE, Jones PJH. **2002**. Unesterified plant sterols and stanols lower LDL-cholesterol concentrations equivalently in hypercholesterolemic persons. *Am J Clin Nutr* 76: 1272-1278.

- Varady KA, St-Pierre AC, Lamarche B and Jones PJ. **2005**. Effect of plant sterols and endurance training on LDL particle size and distribution in previously sedentary hypercholesterolemic adults. *Eur J Clin Nutr* 59: 518-525.

- Victor VM, Rocha M. **2007**. Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 13: 845-863.

-
- Volin P. **2001**. Analysis of steroidal lipids by gas and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 935: 125-140.
 - Volpe R, Niittynen L, Korpela R, Sirtori C, Bucci A, Fraone N, Pazzucconi F. **2001**. Effects of yoghurt enriched with plant sterols on serum lipids in patients with moderate hypercholesterolaemia. *Br J Nutr* 86: 233-239.

W

- Weaver CM, Heany RP, Proulx WR, Hinders SM, Packard PT. **1993**. Absorbability of calcium from common beans. *Journal of Food Science* 58: 1041-1043.
- Weststrate JA, Meijer GW. **1998**. Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur Clin Nutr* 52: 334-343.
- Wienk KJ, Marx JJM, Beynen AC. **1999**. The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition* 38: 51-75.
- Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. **1996**. Apolipoprotein E Alleles and Risk of Coronary Disease: A Meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1250-1255.
- Wolfs M, de Jong N, Ocke MC, Verhagen H, Monique Verschuren WM. **2006**. Effectiveness of customary use of phytosterol/-stanol enriched margarines on blood cholesterol lowering. *Food Chem Toxicol* 44: 1682-1688.
- Wolthers BG, Walrecht HT, van der Molen JC, Nagel GT, Van Doormaal JJ, Wijnandts PN. **1991**. Use of determinations of 7-lathosterol (5 α -cholest-7-en-3 β -ol) and other cholesterol precursors in serum in the study and treatment of disturbances of sterol metabolism, particularly cerebrotendinous xanthomatosis. *J Lipid Res* 32: 603-612.
- Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJH. **2009**. Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr* 63: 813-820.

- Wu T, Fu J, Yang Y, Zhang L, Han J. **2009**. The effects of phytosterols/stanols on blood lipid profiles: a systematic review with meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr* 18: 179-186.

ANEXOS

ANEXO I- ABREVIATURAS

ABC	ATP Binding Casette
ACAT	Acil-CoA-colesterol aciltransferasa
ANOVA	Análisis de la varianza
Apo	Apolipoproteína
ASB	Albúmina de suero bovino
BD	Biodisponibilidad
BSTFA	Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
C	Carbonos
CETP	Proteína de transferencia para ésteres de colesterol
CG	Cromatografía de gases
c-HDL	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
CLAR	Cromatografía líquida de alto rendimiento
c-LDL	colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
C.V.	Coefficiente de variación
ECV	Enfermedad cardiovascular
EM	Espectrometría de masas
EV	Esteroles vegetales
FID	Detector de ionización de llama
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ICC	Índice cintura-cadera
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Lipasa hepática
LPL	Lipoprotein lipasa
MEM	Medio mínimo esencial
MSTFA	N-metil-N-trimetil-sililtrifluoroacetamida
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2-3-difenil tetrazolio

NCEP	National Cholesterol Education Program
PA	Presión arterial
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p.i.	Patrón interno
PL	Fosfolípidos
QM	Quilomicrones
r	Coefficiente de correlación
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsililados
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

ANEXO II- CONSENTIMIENTO INFORMADO

GENERALITAT VALENCIANA
 CONSELLERIA DE SANITAT

AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
 Dpto. de Salut 10 Hospital Universitario Dr. Peset
HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información, y en tales condiciones:

Doy mi consentimiento, tras haber sido informado por el médico Dr/Dra..... para que los datos que se recojan en mi historia clínica sean utilizados para el proyecto de investigación "EFECTO HIPOLIPEMIANTE Y SEGURIDAD DE USO DE LOS FITOSTEROLES EN RELACIÓN CON SU ABSORCIÓN Y POSIBLE MEDIACIÓN POR GENES CANDIDATOS".

Doy mi consentimiento para que se pongan en contacto conmigo para recoger información sobre mi estado de salud.

Fdo: D/Dña (firma del paciente o familiar autorizado, nombre y apellidos)

Firma

En presencia del Dr./Dra. (nombre y apellidos).....

Firma

En Valencia, a de de 20.....

A efectos de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre de Protección de Datos Carácter Personal, autorizo a que mis datos personales sean incluidos en un fichero automatizado con la finalidad del normal seguimiento del estudio.

ANEXO III- REACTIVOS

- 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (MDA). Sigma
- Ácido bórico. Panreac
- Ácido clorhídrico fumante (HCl), 37% p/v. Sigma
- Ácido fosfotúngstico. Sigma
- Ácido nítrico 65%. Panreac
- Acrilamida $\geq 99\%$. Sigma
- Agarososa. Sigma
- Albúmina de suero bovino fetal, solución 0,2 mg/ml. Sigma
- Aminoácidos no esenciales. Gibco®
- Antibióticos (penicilina/estreptomicina). Gibco®
- APS (Peroxodisulfato de amonio). Merck
- Azul de bromofenol. Panreac
- Azul tripán. Sigma. Disolución de colorante (0,4% p/v en PBS)
- Bis-acrilamida (N,N-Metilen-bis-acrilamida) $\geq 98\%$. Sigma
- Bromuro de etidio. Boehringer Mannheim
- Buffer Taq 1x. Netzyme
- Butilhidroxitolueno (BHT). Sigma
- Carbonato sódico (Na_2CO_3) 99%. Sigma
- Cebador (primers: oligo F+R). Netzyme
- Cloruro de cobre (CuCl_2). Panreac
- Cloruro de magnesio (MgCl_2). Netzyme
- Cloruro de sodio (NaCl). VWR, Prolabo
- Colorante Hoescht 33242. Sigma
- Disolución de isopropanol ácido (HCl 0,1 M (Merck) en isopropanol anhidro (Merck))
- Disolución de Tritón (Panreac) 10% (v/v)
- Disolución fosfato tamponada (PBS). Gibco®

- Disolución madre de licopeno (20 mg/ml): 1 mg de licopeno se disuelve en 50 ml de THF con BHT 0,01%.
- Disolución madre de β -caroteno (50 μ g/ml): 5 mg de b-caroteno se disuelven en 100 ml con THF con BHT 0,01%.
- Disolución tripsina (2,5 g/l) – EDTA (0,2 g/l). Gibco®
- dNTPs (2,5mM). Netzyme
- EDTA (Ácido tetraacético etilenodinitrilo) 99,4-100%. Sigma
- Enzima de restricción (endonucleasa de restricción Hha I). Promega
- Etanol. VWR, Prolabo
- Etilenglicol. Sigma
- Folin-Ciocalteu 1 N. Panreac
- Formaldehido 35-40% p/v estabilizado con metanol QP. Panreac
- Fungizona. Gibco®
- HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico). Gibco®
- Kit "Estado antioxidante total" de Laboratorios RANDOX:

Consta de los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato salino 80 mmol/L, pH= 7,4
- Metamioglobina 6,1 μ mol/l
- Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 610 μ mol/L
- Peróxido de hidrógeno 250 μ mol/l
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- Kit extracción ADN SSS. Real, Durviz S.L.
- L-glutamina. Gibco®
- Licopeno del tomate. Sigma
- Lowry A: 4% p/v Na₂CO₃ (Panreac) en NaOH (Guinama) 0,2 N
- Lowry B: 0.02% p/v CuSO₄·5H₂O (Panreac) en tartrato-Na⁺K 4 hidrato (Panreac) al 0,04% p/v
- Marcador peso molecular Gene Ruler 50 pb DNA ladder agarose. Takara
- Marcador peso molecular Φ X174 DNA/HaeIII. Promega
- Medio Mínimo Esencial (MEM). Gibco®, Invitrogen

- MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil bromuro de tetrazolio). Sigma
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Panreac
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Panreac
- n-butanol 99%. Sigma
- Negro Sudán. Sigma
- Nitrato de plata (AgNO_3). Carlo Ebra reagents, Laboratorio Conda
- Oligonucleótidos: forward-5' # ACAGAATTTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3' # y reverse-5' #TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3' #. Metabion
- Pironina Y. Sigma.
- Piruvato sódico. Gibco®
- Reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma) 50% (v/v) en agua desionizada
- Sacarosa. Guinama
- SDS (sulfato duodecil sódico) 99%. Sigma
- Suero bovino fetal. Gibco®
- Tampón fosfato 0,01M (NaCl 0,16 M; EDTA-Na_2 1 μM) pH 7,4
- Tampón fosfato salino (pH 7,4)
- Taq polimerasa. Netzyme
- TBA (ácido 2-tiobarbitúrico). Sigma
- TEMED (tetrametiletildiamina). Sigma
- Tetrahidrofurano (THF) para CLAR. JT Baker
- Trizma (Trishidroximetilaminometano) 99,9%. Sigma
- β -caroteno tipo II, riqueza \geq 95%. Sigma