

Tesis Doctoral

Papel de los esteroides vegetales presentes de
forma natural en la dieta sobre la absorción
intestinal de colesterol y sus niveles plasmáticos

Autora

Sanclemente Hernández, Teresa M^a

Director/es

Marques Lopes, Iva
Puzo Foncillas, José

Facultad de Medicina.
Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología
2010



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, PSIQUIATRÍA Y DERMATOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

An abstract landscape painting with soft, blended colors of green, yellow, and pink, suggesting a natural setting with hills and vegetation.

**PAPEL DE LOS ESTEROLES
VEGETALES PRESENTES DE FORMA
NATURAL EN LA DIETA SOBRE LA
ABSORCIÓN INTESTINAL DE
COLESTEROL Y SUS NIVELES
PLASMÁTICOS**

TERESA MARÍA SANCLEMENTE HERNANDEZ

2010

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA, PSIQUIATRÍA Y
DERMATOLOGÍA**



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LOS ESTEROLES VEGETALES
PRESENTES DE FORMA NATURAL EN LA
DIETA SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL
DE COLESTEROL Y SUS NIVELES
PLASMÁTICOS**

TERESA MARÍA SANCLEMENTE HERNANDEZ

Agosto, 2010

D. JOSÉ PUZO FONCILLAS, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Zaragoza y Profesor Asociado del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Universidad de Zaragoza

y

Dña. IVA MARQUES LOPES, Doctora en Farmacia por la Universidad de Navarra y Profesora Titular del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza

codirectores de esta Tesis Doctoral

CERTIFICAN:

que la Memoria de Tesis Doctoral titulada "*Papel de los esteroides vegetales presentes de forma natural en la dieta sobre la absorción intestinal de colesterol y sus niveles plasmáticos*" presentada por Dña. Teresa María Sanclemente Hernández ha sido realizada en el Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección y que reúne los requisitos necesarios para ser presentada por su autora para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Huesca, 30 de Agosto de 2010

D. José Puzo Foncillas

Dña. Iva Marques Lopes

A Jorge

A mi familia

La realización de este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de muchas personas a las que desde aquí quiero dar las gracias.

Mi más sincero agradecimiento a mis dos directores de tesis, los doctores José Puzo e Iva Marques, porque sin ellos esta tesis doctoral nunca hubiese sido posible. Gracias por vuestros expertos consejos, vuestra dedicación y, sobre todo, por animarme continuamente durante esta aventura.

Al Dr. Angel-Luis García Otín, investigador principal del proyecto en el que se enmarca esta investigación, por contar conmigo en su equipo.

A todo el equipo que me apoyó en la inclusión y recogida de datos de los individuos estudiados en este trabajo. A las personas que, de forma voluntaria, aceptaron a participar desinteresadamente en el estudio. A todo el servicio de Bioquímica del Hospital San Jorge de Huesca y al grupo de Hipertensión, Lípidos y Riesgo Cardiovascular del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer, IDIBAPS, y del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, CIBERObn, en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clinic de Barcelona por su aportación con el análisis de las muestras de sangre. Por último, al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Navarra por su labor con la encuesta dietética.

A Marta por su inestimable ayuda con el tratamiento estadístico pero, sobre todo, por haberme contagiado el entusiasmo a la hora de llevarlo a cabo.

Al Dr. Miettinen quien tan amablemente respondió a mis correos ofreciéndome su experto consejo sobre la aplicación de los marcadores indirectos del metabolismo del colesterol.

Con todo el cariño del mundo a mis compañeros del área de Nutrición y Bromatología donde hace ya "mil años" empecé a soñar con la investigación y hace algo menos llevé a cabo los estudios de tercer ciclo. Gracias Susana por "prestarme" tus microorganismos para empezar, gracias Cristina por tutorizarme y gracias Regina por "presentarme" a ORAC. Gracias Agustín, Domingo, Javier, Juanjo, Carmina, Consuelo, Pilar,... por todo lo que he aprendido pero, especialmente, por las risas y los buenos momentos en ese gran pasillo. No puedo olvidar a la otra Susana. ¡Enhorabuena, doctora!

Siempre recordaremos el año 2010. Finalmente, gracias Antonio porque si esto está terminado es porque tú un día dijiste itienes que hacerlo!.

Gracias a mis vecinos de despacho, Antonio y Ana, por vuestros continuos ánimos y consejos.

A las muchas personas que he conocido durante la elaboración de esta tesis porque, sin que ellas probablemente lo imaginen, me han aportado grandes cosas. Espero tener muchas más ocasiones para encontrarme con todas ellas.

A todos mis amigos por comprender mis periodos de reclusión que esta tesis ha supuesto. De todos, que por suerte son muchos, quisiera agradecer dos de forma especial. A Tomy, porque aún con lo que tenía encima nunca se le escapó preguntarme ¿cómo va la tesis?, y a María, porque tengo la fortuna que siempre está allí.

A M^a Luz, por prestarme su acuarela para la portada de esta tesis y por ser una más de mi familia.

Finalmente, las personas a las que quiero dar las gracias de forma especial son mi familia. A mis padres, Paco y Tere, que por fortuna me siguen acompañando cada día porque son el mejor ejemplo que puedo tener. A Fran que me ha transmitido la calma necesaria en los momentos oportunos. A los "pamplonicas", Fer, Lola e Ignacio, lejos pero cerca como siempre que me escuchan, me animan, me aconsejan, me hacen reír,... A Charo, porque siempre seré su Teresuca. Y también a mi otra familia, Marina, Paco, Josan, Yolanda, Mateo, Andrés y la "bis", gracias.

Pero si esta tesis merece una dedicatoria es a Jorge, la persona que decidió compartir la vida conmigo y ha vivido cada minuto de este trabajo. Un millón de gracias por todo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y DIETA	
1.1. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA .	3
1.2. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	4
1.3. FACTORES DIETÉTICOS QUE AFECTAN AL COLESTEROL PLASMÁTICO	5
2. METABOLISMO DEL COLESTEROL	
2.1. EL COLESTEROL EN EL ORGANISMO	6
2.2. SÍNTESIS ENDÓGENA DE COLESTEROL	9
2.3. ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL	9
2.4. PAPEL DEL HÍGADO EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL Y DE LAS LDL	13
2.5. FACTORES QUE AFECTAN AL METABOLISMO DEL COLESTEROL	14
2.6. MECANISMOS PARA DISMINUIR LOS NIVELES DE c-LDL: INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS Y LA ABSORCIÓN	15
3. ESTEROLES Y ESTANOLAS VEGETALES COMO AGENTES HIPOCOLESTEROLEMIANTES	
3.1. HISTORIA	16
3.2. DEFINICION BIOQUÍMICA. FUENTES ALIMENTARIAS	17
3.3. INGESTA DIARIA DE FITOESTEROLAS	20
3.4. ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE LOS FITOESTEROLAS	22
3.5. EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE DE LOS ALIMENTOS SUPLEMENTADOS CON FITOESTEROLAS	25
3.6. MECANISMOS DE ACTUACIÓN DE LOS FITOESTEROLAS SOBRE EL METABO- LISMO DEL COLESTEROL	27
3.7. EFECTO DE LOS FITOESTEROLAS PRESENTES DE FORMA NATURAL EN LA DIETA SOBRE LA ABSORCIÓN DE COLESTEROL Y SUS NIVELES PLASMÁTICOS	29
4. MÉTODOS DE MEDIDA DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL	
4.1. MÉTODOS ISOTÓPICOS	34
4.2. MÉTODOS BASADOS EN LA MEDIDA DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE ESTEROLES	35
4.2.1. Marcadores indirectos de síntesis	36
4.2.2. Marcadores indirectos de absorción	37
5. PAPEL DE LOS FITOESTEROLAS EN EL EFECTO BENEFICIOSO DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA	
5.1. ANÁLISIS DE PATRONES DIETÉTICOS EN EPIDEMIOLOGÍA NUTRICIONAL	39
5.2. DEFINICION DE PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA	40
5.3. MEDIDA DEL GRADO DE ADHERENCIA AL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA	41
5.4. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA	42

HIPOTESIS Y OBJETIVOS	43
1. HIPÓTESIS	45
2. OBJETIVOS	46
METODOLOGÍA	47
1. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO	
1.1. MARCO DE LA INVESTIGACION	49
1.2. ASPECTOS ETICOS	49
1.3. FASES DEL ESTUDIO	50
2. RECLUTAMIENTO DE LOS SUJETOS A ESTUDIO	
2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	50
2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	51
3. ENTREVISTA PERSONAL	
3.1. CONSENTIMIENTO INFORMADO	51
3.2. HISTORIA CLÍNICA	52
3.2.1. Datos personales, antecedentes de enfermedad y consumo de medicación y alimentos funcionales	52
3.2.2. Hábito tabáquico	53
3.2.3. Medida de la presión arterial	53
3.3. ANTROPOMETRIA	54
3.3.1. Índices generales de peso y talla	54
3.3.2. Índice de distribución de la grasa corporal	54
3.3.3. Valoración de sobrepeso y obesidad	54
3.4. ENCUESTA DIETÉTICA	
3.4.1. Cuestionario de frecuencia de consumo semicuantitativo	56
3.4.2. Cuantificación de la ingesta de alimentos	56
3.4.3. Cuantificación de la ingesta de energía, nutrientes y otros componentes de la dieta	57
3.4.4. Cuantificación de la ingesta de fitoesteroles	57
4. EVALUACIÓN DEL PERFIL BIOQUÍMICO Y MARCADORES DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL EN SUERO	62
4.1. DETERMINACIONES DE MARCADORES BIOQUIMICOS	62
4.1.1. Determinaciones con el autoanalizador SYNCHRON® DX800	63
4.1.2. Determinaciones con el autoanalizador IMMULITE 2000	69
4.1.3. Determinaciones con el autoanalizador nefelométrico IMAGE®	70
4.1.4. Determinación del c-LDL	72
4.2. DETERMINACIONES DE LOS MARCADORES INDIRECTOS DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL	72

4.2.1. Marcadores indirectos utilizados	73
4.2.2. Fundamento del método	73
4.2.3. Protocolo experimental	74
5. ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS CON LAS VARIABLES DEL ESTUDIO	
5.1. VARIABLES CLÍNICAS Y ANTROPOMÉTRICAS	76
5.2. VARIABLES DIETÉTICAS	
5.2.1. Grupos de alimentos	76
5.2.2. Energía, nutrientes y otros componentes de la dieta	77
5.2.3. Fitoesteroles	78
5.2.4. Adherencia al patrón de Dieta Mediterránea	79
5.3. VARIABLES BIOQUÍMICAS	
5.3.1. Variables bioquímicas generales	80
5.3.2. Perfil lipídico y cocientes lipídicos	80
5.3.3. Marcadores indirectos de la tasa de síntesis de colesterol	81
5.3.4. Marcadores indirectos de la tasa de absorción de colesterol	81
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	82
RESULTADOS	85
1. DESCRIPCIÓN DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	87
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO	88
1.2. PERFIL BIOQUÍMICO GENERAL DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO	89
1.3. PERFIL LIPÍDICO DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO	89
1.4. MARCADORES INDIRECTOS DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL	95
2. DESCRIPCIÓN DE LA DIETA	96
2.1. DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DIETÉTICO	
2.1.1. Descripción de la ingesta de los principales grupos de alimentos	96
2.1.2. Cálculo del grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea	99
2.2. DESCRIPCIÓN DE LA INGESTA DE ENERGÍA, MACRONUTRIENTES Y OTROS COMPONENTES DE LA DIETA	100
2.3. DESCRIPCIÓN DE LA INGESTA DE VITAMINAS Y MINERALES	102
2.4. DESCRIPCIÓN DE LA INGESTA DE FITOESTEROLES	104
3. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE COLESTEROL Y LIPOPROTEÍNAS	107
3.1. DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DIETÉTICO	
3.1.1. Descripción del consumo de alimentos	107
3.1.2. Grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea	110
3.1.3. Dieta Mediterránea e ingesta de fitoesteroles	111
3.2. DESCRIPCIÓN DE LOS FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR AL PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO	113

3.3. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS	117
4. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL	
4.1. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL	119
4.2. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL	121
4.3. CORRELACIONES ENTRE MARCADORES INDIRECTOS DE SÍNTESIS Y ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL	125
5. EFECTO DE LA INGESTA DE FITOESTEROLES PRESENTES DE FORMA NATURAL EN LA DIETA SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO Y LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL	126
DISCUSIÓN	127
1. DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DIETÉTICO	
1.1. CONSUMO DE ALIMENTOS	130
1.2. INGESTA DE ENERGÍA, NUTRIENTES Y OTROS COMPONENTES DE LA DIETA	132
1.3. INGESTA DE FITOESTEROLES	133
2. FACTORES DIETÉTICOS QUE AFECTAN AL PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO	136
3. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE COLESTEROL Y LIPOPROTEÍNAS	140
4. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL	143
4.1. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL	143
4.2. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL	147
5. PAPEL DE LOS FITOESTEROLES EN EL EFECTO BENEFICIOSO DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA	148
6. INTERÉS DEL ESTUDIO REALIZADO	150
7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	151
8. FORTALEZAS DEL ESTUDIO	153
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFIA	159
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	183
INDICE DE TABLAS	187
INDICE DE FIGURAS	191

ANEXOS	195
ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO	197
ANEXO II. INFORME PARTICIPANTES	203
ANEXO III. IMPRESO INFORMACIÓN HISTORIA CLÍNICA	207
ANEXO IV. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS	211
ANEXO V. PUBLICACIONES	217

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y DIETA

1.1. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. Los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud apuntan que, anualmente, mueren más personas en el mundo por enfermedades cardiovasculares que por cualquier otra causa y se calcula que en 2015 morirán cerca de 20 millones de personas a causa de estas enfermedades [1].

En España, la enfermedad cardiovascular es también la principal causa de muerte en ambos sexos; constituyendo el 31.7% de la mortalidad total en 2008 [2] aunque, desde 1975, se viene observando una disminución de esta mortalidad [3]. Por otro lado, las enfermedades del sistema circulatorio se posicionan como la tercera causa de años potenciales de vida perdidos y las tasas de morbilidad hospitalaria para este tipo de enfermedades siguen una tendencia ascendente tanto en hombres como en mujeres [4]. Si nos centramos en la Comunidad Autónoma de Aragón los datos presentados para el año 2008 indican una tendencia igual a la descrita a nivel nacional [5]. Por todo ello, las enfermedades cardiovasculares son un importante problema de salud pública en España y también en Aragón.

Sin embargo, al igual que ocurre en otros países del Sur de Europa, la tasa de mortalidad cardiovascular española ajustada por edad es relativamente menor que la de otros países del centro y norte del continente así como de Norteamérica [6]. Esta menor incidencia de enfermedad coronaria se ha atribuido parcialmente a los hábitos dietéticos propios de los países mediterráneos [7-9]. Así, recientes trabajos en estudios de cohortes europeas sugieren que un alto grado de adherencia a la Dieta Mediterránea (DM) se asocia con una reducción de la mortalidad cardiovascular y, en consecuencia, de la mortalidad total [10-14].

1.2. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

La enfermedad cardiovascular es una compleja enfermedad multifactorial en la que están implicados muchos genes e importantes interacciones gen-entorno [15]. Así, aunque la genética juega un papel destacado en el desarrollo de estas patologías, los resultados de numerosos estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han contribuido a la identificación de un gran número de factores de riesgo potencialmente modificables donde destacan la obesidad y estilo de vida sedentario, la hipertensión, la intolerancia a la glucosa, el consumo de tabaco y las dislipemias. Se entienden por dislipemias aquellos desordenes en las concentraciones de colesterol total (c-total), colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), colesterol ligado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) y triglicéridos (TG) [16,17].

Centrándonos en este último factor, una amplia evidencia científica sostiene que la relación entre altas concentraciones de colesterol plasmático, particularmente c-LDL, y mayor riesgo cardiovascular es continua, potente y gradual [18,19] mientras que concentraciones de c-HDL altas pueden resultar protectoras [20]. En esta línea, resultados de recientes meta-análisis demuestran que abordajes terapéuticos dirigidos a reducir estas concentraciones de c-LDL son efectivos en la prevención de eventos cardiovasculares [21-23]. Por todo ello, existe consenso científico para afirmar que la reducción del c-LDL es importante para la reducción del riesgo coronario, i.e. Grundy [24] estima que una reducción de 30 mg/dL en los niveles de c-LDL está relacionada con un descenso en el riesgo relativo de enfermedad coronaria de un 30%. Además, este beneficio no sólo existe para las personas con riesgo de enfermedad coronaria o con concentraciones de colesterol elevadas sino también en personas saludables con elevaciones del colesterol sanguíneo de pequeñas a moderadas [25]. En consecuencia, un mayor conocimiento sobre los aspectos que

determinan concentraciones plasmáticas de c-LDL elevadas puede incidir directamente en la prevención o detención del desarrollo de enfermedad cardiovascular.

1.3. FACTORES DIETÉTICOS QUE AFECTAN AL COLESTEROL PLASMÁTICO

La cantidad de colesterol que fluye en el plasma es el resultado de una compleja homeostasis, es decir, del balance entre la biosíntesis, el uso metabólico, la excreción biliar y la absorción en el intestino delgado de colesterol [26]. Un desajuste en estos procesos puede llevar a concentraciones plasmáticas de colesterol elevadas. En muchas ocasiones, los desequilibrios que se producen en determinados individuos son debidas a desordenes genéticos como la hipercolesterolemia familiar, entre otros [27]. De hecho, se acepta que hasta un 80% del colesterol circulante en el plasma está determinado por el genotipo del individuo [28]. Sin embargo, el estilo de vida del individuo y, en especial, la composición de su dieta [29] son determinantes de los niveles plasmáticos de colesterol y de las distintas lipoproteínas. En consecuencia, la composición de la dieta es un factor modificable que juega un importante papel y, hoy en día, se ha establecido como uno de los componentes más importantes en las recomendaciones para la prevención de dislipemias [25,30,31].

Aunque en un principio las recomendaciones se centraron en disminuir el aporte dietético de grasa, a partir de los años 50 se empezó a considerar al perfil de ácidos grasos de la dieta como el principal determinante de las concentraciones plasmáticas de colesterol [32]. Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado que los ácidos grasos saturados (AGS), los ácidos grasos *trans* (AGT) y el colesterol dietético incrementan las concentraciones de c-total y c-LDL. Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) disminuyen los niveles de c-total y c-LDL mientras que los monoinsaturados (AGMI) tienen principalmente un efecto neutro. De

este modo, al reemplazar isocalóricamente los AGS con AGMI y AGPI se disminuyen los niveles de c-total y c-LDL [33]. El efecto de disminuir el colesterol dietético es más difícil de estimar en cuanto que existe un alto grado de variabilidad en la respuesta entre individuos [32].

Paralelamente, muchos de los estudios realizados acerca del papel de la alimentación sobre el riesgo cardiovascular se han centrado en el estudio del efecto beneficioso de determinados patrones dietéticos como la DM y otras propuestas basadas en altos aportes de alimentos de origen vegetal [33]. En este sentido, en los últimos años se ha reconocido la capacidad hipocolesterolemiantes de componentes específicos de este tipo de dietas como la fibra dietética [34-36] y los esteroides y estanoles vegetales [37]. Parte de este efecto hipocolesterolemiantes es consecuencia de su capacidad para hacer ineficiente la absorción intestinal de colesterol [33,36,38,39] ya que existe una significativa correlación positiva entre la eficiencia de este proceso y los niveles plasmáticos de c-LDL [40].

Así, las recomendaciones dietéticas actuales para reducir las cifras de c-LDL y, por tanto, para reducir el riesgo cardiovascular incluyen cambios en la composición de ácidos grasos de la dieta, reduciendo la ingesta de AGS y de colesterol, así como una adecuada ingesta de inhibidores parciales de la absorción intestinal de colesterol [25,30]. Estas propuestas nutricionales para prevenir las enfermedades cardiovasculares son más seguras y pueden tener una relación coste-eficacia mayor que las propuestas farmacológicas [25].

2. METABOLISMO DEL COLESTEROL

2.1. EL COLESTEROL EN EL ORGANISMO

El colesterol es una molécula imprescindible para el organismo humano con un importante número de funciones biológicas. Es un componente esencial de las membranas celulares donde tiene la

función de modular su fluidez y su permeabilidad y en consecuencia, su función. Además, sirve como precursor de otras biomoléculas importantes como son las hormonas esteroideas, la vitamina D y los ácidos biliares y es necesario para la síntesis y secreción de las lipoproteínas. Finalmente, el colesterol está implicado en la embriogénesis y la diferenciación celular [41].

El colesterol que no forma parte de las membranas celulares está fundamentalmente en forma esterificada y, debido a la hidrofobicidad de esta molécula, debe ser transportado formando parte de las lipoproteínas. Estas lipoproteínas son agregados esféricos que contienen una capa externa de moléculas anfipáticas, proteínas (denominadas apoproteínas), colesterol libre y fosfolípidos, que rodea a los lípidos hidrofóbicos, ésteres de colesterol y TG, permitiendo su circulación en el medio acuoso corporal. Basándose en la separación por gradiente de densidad, las lipoproteínas se clasifican en cinco tipos principales: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) [42]. El metabolismo de estas lipoproteínas se describe en la Figura 1.

Así pues, cuando las células del organismo necesitan colesterol pueden obtenerlo por tres vías:

- A través de los remanentes de QM que transportan el colesterol absorbido en el intestino delgado. Fundamentalmente son captados en los hepatocitos.
- Captación de colesterol que forma parte del resto de lipoproteínas: de las LDL circulantes, pero también de las IDL y de las HDL por receptores específicos.
- Biosíntesis endógena en los diferentes tejidos.

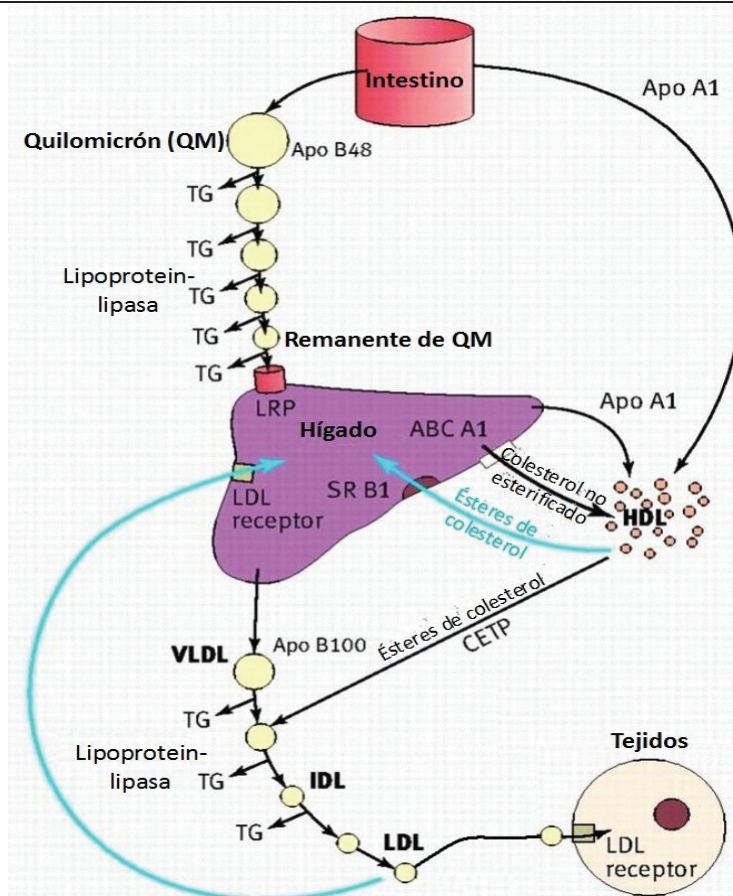


Figura 1. Metabolismo de las lipoproteínas. Adaptado de Bhatnagar D et al [43]

Los QM procedentes del intestino van descargando sus TG en los tejidos por la acción de la enzima lipoproteína-lipasa. Los remanentes de QM formados se encargan de llevar el colesterol dietético que contienen al hígado. En el hígado, el colesterol de la dieta más el sintetizado *de novo* es empaquetado junto con TG y secretado como VLDL. Al igual que los QM, estas partículas ceden sus TG a los tejidos convirtiéndose en IDL y, posteriormente, en LDL. Las LDL transportan las dos terceras partes del colesterol circulante en el plasma y son las principales proveedoras de colesterol al hígado y a los demás tejidos del organismo. El exceso de colesterol es retirado de las células por las HDL y es devuelto al hígado bien directamente o bien transfiriéndolo previamente a las LDL. Ambas partículas son captadas por el hígado mediante receptores específicos. A éste último se le conoce como "transporte reverso de colesterol" (representado por la línea azul en la figura) [41,44].

2.2. SÍNTESIS ENDÓGENA DE COLESTEROL

Todas las células del organismo tienen la capacidad de sintetizar colesterol estimándose que, bajo las condiciones dietéticas de los países occidentales, la síntesis en los tejidos extrahepáticos supone el 80% del total y el 20% restante del colesterol es sintetizado en el hígado [45]. Sin embargo, la síntesis hepática tiene una gran relevancia, como veremos, en la homeostasis del colesterol.

La síntesis de colesterol es un proceso metabólico ampliamente estudiado que se resume en la Figura 2.

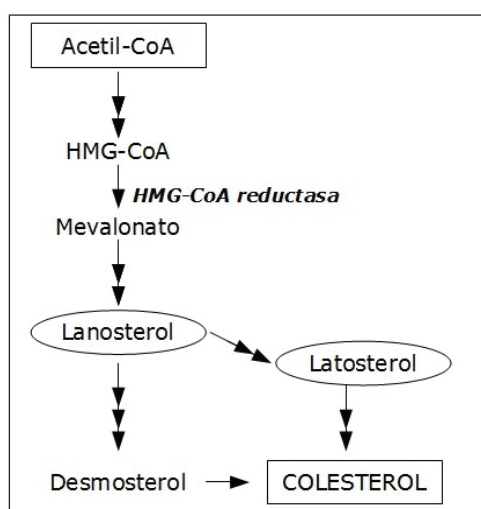


Figura 2. Proceso de síntesis endógena de colesterol.
Modificado de: Fernández C et al [46]

Esta síntesis se produce a partir del acetil-CoA y está bajo control de la enzima limitante hidroximetil-glutaril-CoA-reductasa (HMG-CoA reductasa) que, a su vez, disminuye su actividad en presencia de colesterol [47], es decir, cuando las necesidades de colesterol de la célula están cubiertas, la síntesis de colesterol se inhibe.

2.3. ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL

Las vías de biosíntesis y aclaramiento plasmático del colesterol están bien definidas pero, por el contrario, los mecanismos que controlan la absorción son menos comprendidos.

El colesterol que llega al intestino delgado para ser absorbido deriva principalmente de la dieta y de la bilis. La ingesta media de colesterol en la dieta occidental es de aproximadamente 400 mg/día y se estima que la bilis contribuye en unos 1000 mg/día al *pool* intraluminal. Una tercera fuente procede de la rotación o *turnover* del epitelio de la mucosa intestinal que proporciona alrededor de 300 mg/día, sin embargo, teniendo en cuenta que el principal punto donde se produce la absorción es el yeyuno proximal del intestino delgado y que la descamación intestinal se produce a lo largo de todo el tracto, esta tercera fuente no contribuye de forma importante al *pool* de colesterol susceptible de ser absorbido [26,40,48].

Conceptualmente, la absorción intestinal de colesterol tiene que distinguirse de la retirada o *uptake* de colesterol luminal por parte del enterocito. La primera se define más exactamente como la transferencia del colesterol intraluminal al conducto linfático torácico mientras que el *uptake* intestinal de colesterol se refiere a su entrada desde el lumen a las células absorptivas intestinales. Como se infiere de estas definiciones, el proceso de absorción intestinal está compuesto por varias etapas que, a su vez, están reguladas por múltiples genes a nivel del enterocito y cualquier factor que cambie el transporte de colesterol desde el lumen intestinal hasta la linfa puede influir sobre la eficiencia del proceso [40,48].

En el lumen intestinal, el colesterol debe estar en forma libre para poder ser absorbido, por ello, el colesterol esterificado de la dieta es primero hidrolizado por la carboxil-éster lipasa pancreática. A partir de aquí, el proceso consta de varias etapas que se ilustran en la Figura 3.

La absorción de este colesterol libre más el colesterol biliar depende ahora de las micelas mixtas: mezclas de colesterol libre, mono y diacilglicerol, ácidos grasos, fosfolípidos y sales biliares. La transferencia de colesterol libre desde las micelas mixtas, a través de la membrana apical del borde en cepillo, hasta el enterocito constituye

la primera etapa del proceso de absorción. Se trata de una etapa que no se comprende completamente. Estudios recientes [50] han revelado la existencia de una proteína localizada en la membrana apical del enterocito, denominada Niemann-Pick C1-like1 (NPC1L1), que juega un papel crucial en el transporte de colesterol hasta el interior de la célula [51]. La existencia de otros transportadores a este nivel están siendo cuestionados pero su importancia funcional no está aclarada [52,53].

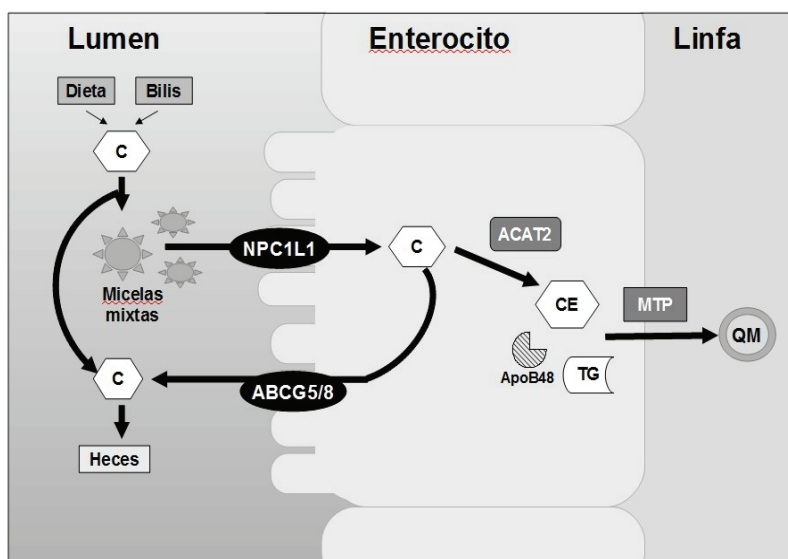


Figura 3. Proceso de absorción intestinal de colesterol.
Modificado de: Sanclemente T et al [49]

C, Colesterol libre; CE, Éster de colesterol; QM, Quilomicron; NPC1L1, Niemann-Pick C1-like 1; ACAT2, Acil-CoA-colesterol-aciltransferasa, isoforma2; ABCG5/8, ATP-binding cassette transporters G5/G8; MTP, Microsomal transfer protein; TG, Triglicérido

Una vez en el interior del enterocito, el colesterol es esterificado por la acil-CoA-colesterol-acil-transferasa isoforma2 (ACAT2), enzima altamente específica para esta molécula [54,55], y se incorpora a los procesos de ensamblaje intracelular de los QM con apolipoproteína B48 y otros lípidos, principalmente TG, mediante la *microsomal transfer protein* (MTP) [56]. Estas lipoproteínas postprandiales son

secretadas a la linfa, desde donde se incorporan a la circulación sanguínea.

El colesterol que no es esterificado en el enterocito puede ser transportado de nuevo al lumen intestinal por medio de los transportadores de membrana denominados *ATP-binding cassette* G5 y G8 (ABCG5 y ABCG8) [57,58]. Además de éstos, existen indicios crecientes que apoyan el papel de otros transportadores aunque su trascendencia no está todavía claramente definida [53,59-64].

Por tanto, aunque otras posibilidades continúan abiertas, el efecto regulador combinado de NPC1L1, ABCG5 y ABCG8 juega un papel crucial en la modulación de la cantidad de colesterol que alcanza la linfa desde el lumen intestinal [40]. Además, la actividad esterificadora del enterocito puede ser también un importante regulador puesto que aumenta el gradiente de difusión para la entrada de colesterol intraluminal en la célula intestinal [26,40].

El colesterol y los ácidos biliares que escapan de la absorción intestinal, como ya hemos indicado, se excretan como esteroides fecales representando la principal ruta para la eliminación corporal de esteroides [26].

En conclusión, la absorción intestinal de colesterol es incompleta y la cantidad absorbida media oscila entre el 40 y el 60% del colesterol dietético [26]. Sin embargo, se ha observado que existe una alta variabilidad entre individuos [15,65,66], con un rango entre 30 y 80% y con una distribución que sigue un esquema típicamente normal, con muy pocos individuos hipo e hiperabsorbedores [66]. Estas diferencias dependen de factores genéticos [15] pero también existe una variabilidad intraindividual que puede ser modulada por condiciones fisiológicas (edad, velocidad de tránsito intestinal, calidad de los ácidos biliares, obesidad) y dietéticas (comidas bajas en grasa, altas

cantidades de colesterol dietético, esteroides y estanoles vegetales y marinos, fibra soluble) [26].

2.4. PAPEL DEL HÍGADO EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL Y DE LAS LDL

Tal y como se ha indicado anteriormente, un exceso de colesterol circulante, especialmente en forma de c-LDL, es un importante factor de riesgo cardiovascular por lo que la correcta homeostasis del esteroide es fundamental para el organismo. Para ello, como se ha dicho, el cuerpo humano equilibra la absorción intestinal y la síntesis endógena de colesterol con su uso metabólico y su excreción biliar junto a los ácidos biliares. Sin embargo, puesto que los ácidos biliares y el colesterol que los acompaña son reabsorbidos eficazmente en el intestino (aproximadamente, un 98% vuelven al hígado a través de la denominada "recirculación enterohepática"), el balance de colesterol corporal se mantiene principalmente igualando la síntesis de colesterol con las pérdidas fecales, las cuales son dependientes de la eficiencia de absorción intestinal de colesterol [67].

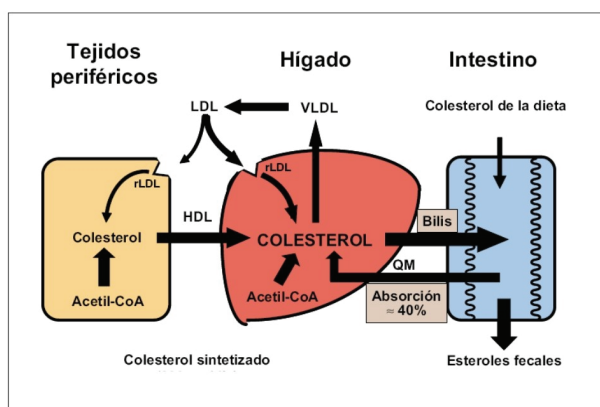


Figura 4. Homeostasis del colesterol en el organismo. Fuente: Ros E [68]

Como se describe en la Figura 4, el hígado juega un papel central en el mantenimiento de esta homeostasis porque, no sólo es el órgano que recibe la mayoría del colesterol absorbido del intestino delgado a través de los remanentes de QM, sino que también es el lugar donde

se produce la degradación y la excreción del colesterol a través de la bilis. El hígado también sintetiza colesterol en cantidad variable, dependiendo de múltiples factores, en particular, de la cantidad que es enviada hasta él desde el intestino delgado. Cuando existe un aumento de colesterol dietético, la síntesis hepática se ve parcialmente suprimida mientras que la síntesis en los tejidos extrahepáticos no se ve modificada. A su vez, es el principal regulador de los niveles de c-LDL circulantes, no sólo porque es el sitio donde se forman las VLDL, las cuales se pueden convertir en LDL, sino también porque el grueso de la eliminación mediada por receptores específicos de LDL (r-LDL) normalmente tiene lugar aquí [45].

2.5. FACTORES QUE AFECTAN AL METABOLISMO DEL COLESTEROL

A continuación se describen los factores que afectan al metabolismo del colesterol.

1. Genética. La eficiencia de absorción intestinal de colesterol y la síntesis son fenómenos parcialmente heredados [69] en los que están implicados muchos genes.

En el caso de las variaciones entre individuos en la eficiencia de absorción intestinal de colesterol, se sabe que son los factores genéticos a nivel del enterocito los que la determinan de forma crucial [40,48]. En este sentido, varios estudios con modelos humanos han investigado la implicación de los genes ABCG5/G8 [69].

Otros genes estudiados por su implicación en el metabolismo del colesterol son los que codifican la apolipoproteína E (apoE) [26,69].

2. Edad. En dos estudios en humanos no se observaron diferencias relacionadas con la edad [66,70], sin embargo, estudios en animales muestran que la absorción intestinal de colesterol se incrementa marcadamente con la edad [71,72] a la par que se reduce su síntesis hepática [71].

3. Sexo. La mayoría de los estudios en humanos se han llevado a cabo en hombres [26]. En dos trabajos con suficiente número de hombres y de mujeres no se observaron diferencias relacionadas con el sexo [66,70]. Sin embargo, estudios posteriores en animales indican una mayor eficiencia de absorción en el sexo femenino, principalmente debido a diferencias hormonales [73]. Además, en presencia de estrógenos, la enzima reguladora de la síntesis de colesterol, HMG-CoA reductasa presenta una menor actividad [74].

4. Menopausia. Las mujeres premenopáusicas presentan un perfil lipídico más cardiosaludable que los hombres de la misma edad; sus niveles de c-HDL son mayores y los de c-LDL menores. Con la llegada de la menopausia, los valores del c-LDL aumentan por encima de los valores de los varones de la misma edad [75] debido a que la homeostasis del colesterol en mujeres menopáusicas parece estar alterada [76]. Las variaciones en los niveles de hormonas sexuales asociadas a esta etapa tienen un papel primordial sin que se pueda descartar el efecto de otros factores [77].

5. Obesidad y sobrepeso. Es común que individuos con sobrepeso y obesos presenten dislipemias. Estos perfiles lipídicos anormales pueden ser debidos a que el metabolismo del colesterol se encuentra alterado en las poblaciones con exceso de peso [78,79]. La obesidad estimula la síntesis de colesterol, lo que parece estar asociado con una menor absorción intestinal de colesterol [79,80]. Este aumento de la síntesis de colesterol se corrobora con la mayor actividad de las enzimas participantes en el proceso, incluida la HMG-CoA reductasa, observada en individuos obesos [81].

2.6. MECANISMOS PARA DISMINUIR LOS NIVELES DE c-LDL: INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS Y LA ABSORCIÓN

Considerando todo lo visto, los mecanismos por los que se pueden disminuir los niveles circulantes de c-LDL son dos: inhibiendo la síntesis e inhibiendo la absorción intestinal.

Las estatinas son los fármacos más comúnmente administrados para disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol. Su principal mecanismo de acción es fomentar el aclaramiento de partículas LDL del plasma ya que reducen la tasa de síntesis. Las estatinas inhiben la HMG-CoA reductasa lo que tiene como respuesta una mayor actividad de los r-LDL que captan un mayor número de partículas LDL para suplir el déficit de colesterol intracelular mediado por la disminución de la síntesis [82].

Por otro lado, los inhibidores de absorción disminuyen la eficiencia de absorción de colesterol lo que reduce el flujo de colesterol intestinal al hígado a través de los remanentes de QM y un incremento de la cantidad excretada con las heces. Para compensar este hecho, la síntesis hepática de colesterol se ve aumentada así como la actividad de los receptores hepáticos para lipoproteínas apoB lo que supone que se atrapan más partículas IDL, limitando su conversión a LDL, así como partículas LDL, aumentando su aclaramiento del plasma [83]. El resultado neto de todos estos procesos es una disminución de los niveles circulantes de c-LDL [67,69]. Fármacos como la ezetimiba o componentes de los alimentos como los fitoesteroles ejercen su función hipocolesterolemiaante a este nivel [84].

3. ESTEROLES Y ESTANOLES VEGETALES COMO AGENTES HIPOCOLESTEROLEMIANTES

3.1. HISTORIA

El efecto de los esteroides vegetales sobre el colesterol sanguíneo fue descrito en 1953 por Pollak [85] quien utilizó esteroides vegetales aislados de la soja para reducir los niveles de colesterol sérico de pacientes hipercolesterolémicos. Debido a la baja solubilidad y biodisponibilidad de estos primeros preparados, la dosis requeridas para alcanzar un efecto eran muy elevadas (más de 25-50 g/día) y los resultados obtenidos no siempre fueron consistentes [86]. En

consecuencia, hacia los años 70, se abandonó el estudio y utilización de estos compuestos como posibles agentes hipocolesterolemiantes.

La esterificación de esteroides y estanoles vegetales con ácidos grasos o su emulsificación con fosfolípidos incrementa su solubilidad lo que hizo posible la adición de estos compuestos, en dosis de gramos, en alimentos procesados [87]. Estudios en los años 90 con este tipo de productos enriquecidos indicaron reducciones de hasta el 14% en c-LDL con dosis de ≥ 2 g/día [88].

Estos resultados tan prometedores hicieron que el interés por estos compuestos resurgiera, no sólo como componentes de alimentos funcionales sino también como parte importante de los alimentos de la dieta habitual.

3.2. DEFINICIÓN BIOQUÍMICA. FUENTES ALIMENTARIAS

Los esteroides y estanoles vegetales son componentes estructurales y funcionales de las membranas celulares de las plantas con una estructura similar al colesterol (4-Desmetil esteroides).

Sin embargo, se diferencian en la cadena alifática lateral. Los esteroides y estanoles vegetales incluyen un grupo metilo o etilo en el C²⁴. La diferencia entre estos dos grupos de compuestos es que los esteroides presentan un doble enlace en los C⁵-C⁶ y su hidrogenación da lugar a la formación de estanoles [86]. Comúnmente se utiliza el término fitoesteroides para denominar ambos tipos de moléculas [89].

Aunque se han identificado más de 200 formas químicas, los más comunes en la naturaleza son los esteroides: sitosterol, campesterol y estigmasterol. Los estanoles, como sitostanol y campestanol, se encuentran en proporciones mucho menores en el reino vegetal [86]. En la Figura 5 se representan las moléculas de los fitoesteroides más habituales.

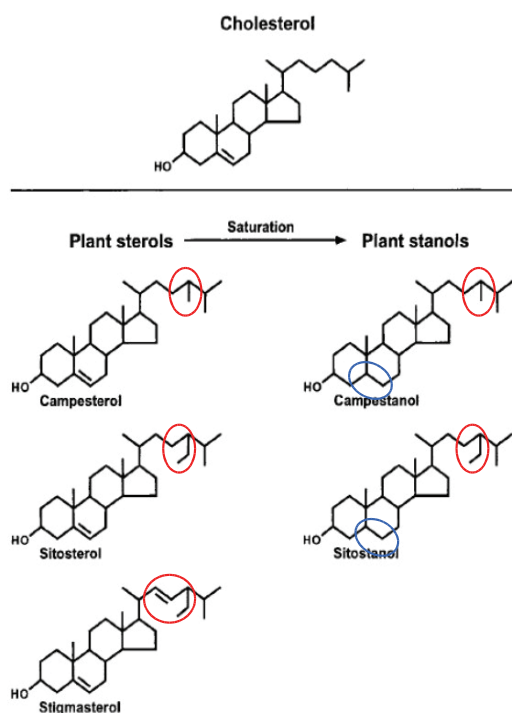


Figura 5. Estructura química de los principales fitoesteros. Modificado de Kerckhoffs DA *et al* [38]

Respecto a la molécula de colesterol, el campesterol presenta un grupo metilo en el C²⁴ mientras que sitosterol y estigmasterol presentan un grupo etilo en esta posición; este último, además, cuenta con un doble enlace en las posiciones C²²-C²³.

La hidrogenación de las formas insaturadas conlleva la formación de estanoles (nótese que tanto la saturación de estigmasterol como de sitosterol da lugar al mismo tipo de molécula, sitostanol).

Estos compuestos pueden encontrarse en los alimentos como alcoholes libres o como fitoesteros conjugados. Estos últimos se forman cuando el grupo hidroxilo es esterificado por un ácido graso o por un ácido fenólico, como el ácido ferúlico, (ésteres de estero o estanol) o bien cuando este grupo hidroxilo se une a un grupo glucídico (glucósidos de estero) [86].

Todos los alimentos de origen vegetal contienen apreciables cantidades de fitoesteros. En los últimos años, han sido varios los países, como es el caso de Estados Unidos [90] o Finlandia [91], en los que se han confeccionado tablas de composición de alimentos que ya incluyen este dato para un número considerable de alimentos. A la par, son crecientes las publicaciones en las que se muestran datos sobre el contenido de fitoesteros de alimentos [92-96]. En el caso de España, los primeros datos sobre las cantidades de fitoesteros presentes en alimentos nacionales se publican en el año 2006 [97]

donde se incluyen los resultados de los análisis realizados por Jimenez-Escrig *et al* para aquellos alimentos más comúnmente consumidos.

En todas estas referencias, las fuentes alimentarias más concentradas son los aceites vegetales (especialmente ricos son los aceites de maíz y de girasol aunque también hay cantidades importantes en los de soja, oliva y cártamo) y los frutos secos. Los cereales y derivados, legumbres, frutas y hortalizas presentan cantidades por 100 g de parte comestible mucho más pequeñas. Sin embargo, si se tiene en cuenta que la cantidad en la que se consumen es elevada es importante tenerlos en cuenta cuando se estima la ingesta total de fitoesteroles [89,98,99].

Tabla 1. Contenido de fitoesteroles, en mg/100 g peso fresco y crudo, en una selección de alimentos. Datos obtenidos de Jimenez-Escrig A *et al* [97] excepto * obtenido de la base de datos de USDA [90]

Alimento	Contenido de fitoesteroles totales
Aceite de maíz	968*
Aceite de girasol	492
Aceite de oliva virgen	260
Pistacho	242
Nuez	131
Avellana	128
Garbanzos	121
Lentejas	117
Alcachofa	48
Coliflor	44
Tomate	10
Patata	4
Naranja	30
Plátano	20
Manzana	16
Pan blanco	42

En la Tabla 1 se muestran las cantidades por 100 g en fresco de parte comestible de algunos alimentos que destacan o bien por su alto

contenido en estos compuestos o bien por tratarse de alimentos que contribuyen de forma importante a la ingesta total por su alto consumo en la población española [100].

Es importante añadir que, aunque los datos están descritos para alimentos en crudo, las cantidades presentes no parecen estar afectadas por la preparación o el almacenamiento de los alimentos. Aunque existen pocos datos disponibles sobre cómo afecta el cocinado, parece ser que sólo existen pérdidas significativas a altas temperaturas como las usadas para la fritura profunda [87] ya que ni la cocción de frutas y hortalizas [92] ni el calentamiento de aceites en microondas o a temperaturas convencionales dan lugar a contenidos diferentes respecto a los productos en crudo [101]. En cuanto al almacenamiento, tampoco es probable que ocurran cambios en las cantidades de fitoesteroles si no es durante almacenamientos prolongados donde se pueden producir algunas pérdidas por oxidación [87].

Además de los alimentos naturales, debido a los avances ocurridos en la mejora de la solubilidad de estos compuestos mediante su esterificación, hoy en día los fitoesteroles se están incorporando a una amplia variedad de productos alimenticios tales como margarinas, leche, yogures y otras leches fermentadas, aliños para ensaladas, bebidas de soja y de frutas, barritas para tomar como *snacks* y un largo etcétera, en cantidades muy superiores a las encontradas en los alimentos y que pertenecen al grupo de los alimentos funcionales [102].

3.3. INGESTA DIARIA DE FITOESTEROLES

El cuerpo humano no puede sintetizar fitoesteroles y, por lo tanto, estos componentes derivan solamente de la dieta. Tradicionalmente, el consumo de fitoesteroles presentes de forma natural en los alimentos de las dietas occidentales se ha estimado entre 170 y 360

mg/día [103-106], muy similar a la ingesta de colesterol [89]. En las estimaciones realizadas recientemente para diversas poblaciones europeas, los valores medios obtenidos corroboran estas cifras [97,98,107-114], aunque los rangos encontrados en las poblaciones son considerablemente amplios, habiendo individuos con ingestas que multiplican por dos o más veces las de otros [108-114]. En este sentido, es necesario tener en cuenta que cuando se habla de la ingesta de fitoesteroles en sujetos con un alto consumo de alimentos vegetales, como por ejemplo los veganos, los valores aumentan de forma considerable llegando hasta, aproximadamente, 1 g/día [39,87,115].

Para poder explicar la amplia variación existente entre los valores indicados hay que tener en cuenta que las estimaciones se ven afectadas por varios factores como son la metodología utilizada para cuantificar la ingesta dietética [116], la tabla de composición de alimentos seleccionada [107,116] y, de forma importante, el diferente patrón dietético que tiene la población puesto que, como ya hemos indicado, altos valores reflejan una dieta rica en productos de origen vegetal [106,117,118]. Cuando los valores son mucho más altos, alrededor de 2 g/día, únicamente pueden ser obtenidos mediante el consumo de alimentos suplementados [25].

En relación con los valores de ingesta en la población española, el primer dato existente es del año 2006 [97]. En ese momento, utilizando los contenidos de fitoesteroles en alimentos españoles y basándose en los datos de consumo aparente de alimentos dados por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA) -Encuesta de Presupuestos Familiares del año 2000-, Jimenez-Escrig *et al* estiman una ingesta media de 276 mg/día, cuando se tienen en cuenta únicamente los datos de fitoesteroles identificados en sus análisis, o de 375 mg/día, si se consideran también la fracción de fitoesteroles no identificados (se trata de ciertos picos no identificados que

aparecen en el cromatograma después del pico de colesterol y que, provisionalmente, se identifican como fitoesteroles). No es hasta el año 2009 cuando se publican varios trabajos que, utilizando los valores de composición en fitoesteroles de Jimenez-Escrig *et al*, estiman la ingesta de los individuos pertenecientes a la cohorte española del estudio *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) y obtienen valores medios en el rango entre 224 y 338 mg/día [111,113,114].

3.4. ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE LOS FITOESTEROLES

El proceso de absorción y metabolismo de los fitoesteroles en humanos es muy similar al del colesterol pero difiere en algunos aspectos.

En primer lugar, como ya se ha dicho, no existe biosíntesis de estos compuestos en el organismo [104].

Por otro lado, la eficiencia de absorción intestinal de estos compuestos es mucho menor que la de colesterol, oscilando entre 0.04% y 16% [119-122], rango que depende del método utilizado pero también del fitoesterol que se considere [122] (ver Figura 6). La hidrofobicidad de los fitoesteroles es mayor que la del colesterol debido al diferente número de átomos de carbono; los fitoesteroles con 28 y 29 átomos frente a los 27 del colesterol son más hidrofóbicos por lo que se puede concluir que las diferencias estructurales influyen en la diferente eficiencia de absorción de estas moléculas [122].

Por último, muy probablemente, los fitoesteroles no son metabolizados a ácidos biliares y son excretados mucho más rápido del hígado a la bilis en comparación con el colesterol [123].

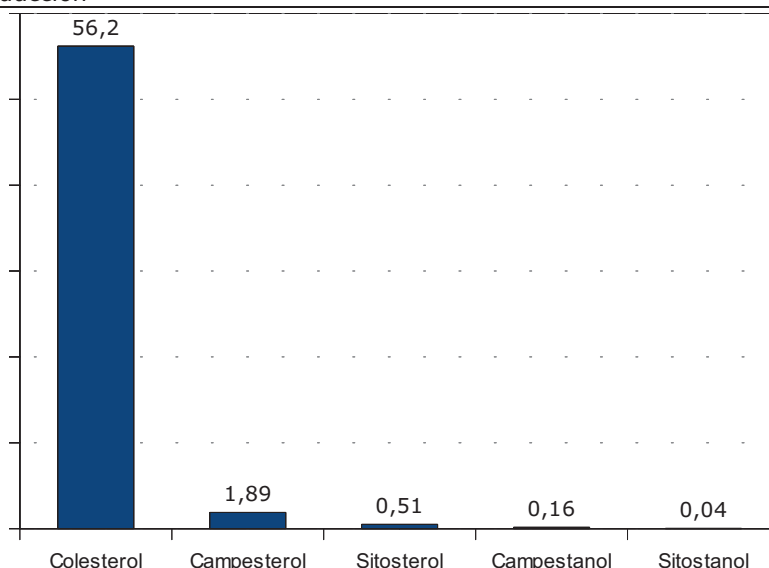


Figura 6. Porcentajes de absorción* de distintos fitoesteroles en comparación con el colesterol medidos con la misma técnica analítica.

* Los datos de absorción de fitoesteroles obtenidos por Ostlund RE *et al* [122] y el de colesterol por Bosner MS *et al* [66]

El proceso digestivo comienza con la liberación de los fitoesteroles presentes en forma conjugada puesto que la forma libre es, muy probablemente, la biológicamente activa. Esto se deduce de que los ésteres de fitoesteroles son rápidamente hidrolizados por las enzimas intestinales, rindiendo formas libres [87]. De hecho, un reciente estudio *in vivo* [124] confirma que alrededor del 90% de los ésteres de estanoles son hidrolizados en el intestino delgado. Respecto a los glucósidos, aunque tradicionalmente no han sido considerados puesto que estudios *in vitro* mostraban la ineficacia de las enzimas pancreáticas para hidrolizarlos [39], resultados preliminares de estudios recientes indican que estas formas también pueden ser bioactivas [125].

Tras la hidrólisis, los fitoesteroles libres, debido a su hidrofobicidad, necesitan incorporarse a las micelas mixtas, como ocurría con el colesterol, para poder ser absorbidos. Una vez allí, son transportados hasta la membrana del borde en cepillo con la que interaccionan para

entrar en el enterocito. El mecanismo exacto tampoco está bien definido pero se cree que, al igual que para el colesterol, el transporte al interior del enterocito está mediado por la proteína transportadora NPC1L1 [51]. Una vez dentro, sólo una pequeña proporción es esterificada por la ACAT2, la cual se incorpora a los QM y se secreta a la linfa, mientras que la mayor parte son expulsados al lumen intestinal por los transportadores ABCG5/G8 [57,123]. Según un estudio llevado a cabo en animales, este último punto parece ser el principal proceso discriminatorio en favor de la absorción del colesterol sobre los fitoesteros [126]. Los fitoesteros que no son absorbidos pueden ser transformados por la microflora intestinal produciendo metabolitos como coprostanol y coprostanona [127]. El resto llegan al hígado a través de los remanentes de QM. Allí, la mayor parte son excretados vía biliar, de nuevo a través de los transportadores ABCG5/G8 [57,123], mientras que una pequeña proporción sale a la circulación sanguínea incorporada a las VLDL.

Así pues, aunque exista un aporte considerable de fitoesteros con la dieta la absorción intestinal de estos compuestos es muy pobre [122] y su excreción biliar es rápida [128] por lo que sus valores séricos, en condiciones normales, son inferiores a 1 mg/dL (~ 0.025 mmol/L) [40,65,122,127]. No es el caso de los individuos afectados de sitosterolemia (o fitosterolemia), un raro desorden genético originalmente descrito por Bhattacharyya & Connor en 1974 [129] que se caracteriza por hiperabsorción y reducida excreción de fitoesteros y que conlleva el desarrollo de una severa aterosclerosis a edades muy tempranas. En estos individuos las concentraciones de fitoesteros plasmáticas son mucho más elevadas (del orden de 50 veces más [127,130]). El descubrimiento de la causa de este desorden metabólico, las mutaciones en los genes que expresan las proteínas de membrana ABCG5/G8, no sólo ha permitido conocer más la enfermedad sino que ha dado las pistas necesarias para comprender mejor el metabolismo de los esteroides en el organismo humano [131].

3.5. EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE DE LOS ALIMENTOS SUPLEMENTADOS CON FITOESTEROLES

Está bien documentado que los productos comerciales suplementados con fitoesteroles reducen los niveles séricos de colesterol [37,88,132-135]. El análisis de los estudios realizados indica que su efectividad está demostrada en sujetos sanos normo- e hipercolesterolémicos [133], en individuos con hipercolesterolemia familiar [136] y en pacientes con diabetes tipo II [137].

Durante la pasada década, se realizaron varios meta-análisis para intentar establecer cuál es la eficacia de estos alimentos suplementados en diferentes poblaciones. El primero de ellos fue llevado a cabo por Law en el año 2000 [88] e incluyó 14 ensayos aleatorizados que utilizaban margarinas enriquecidas. El resultado obtenido fue que una dosis terapéutica óptima de 2 g/día suponía reducciones de las concentraciones séricas de c-LDL entre el 9% y el 14%, siendo estos valores dependientes de la edad de los individuos ya que las reducciones máximas se observaban en el rango de edad 50-59 años. Tres años más tarde, Katan *et al* [132] publicó los resultados de un segundo meta-análisis que incluyó 41 ensayos clínicos. Esta actualización de los resultados de Law mostró que esa dosis de fitoesteroles de 2 g/día reducían los niveles de c-LDL en un 10% con pequeñas reducciones adicionales cuando se incrementaba la dosis. Además, indicó que la eficacia era similar para esteroides y estanoles aunque el tipo de alimento en el que se vehiculaban podía afectar sustancialmente la reducción de c-LDL obtenida. Otros factores propuestos para explicar las diferentes respuestas observadas entre poblaciones, además de la dosis y la matriz alimentaria, eran el momento del día en el que se administraban estos alimentos [138] y las concentraciones séricas basales de c-LDL [37,134]. Por este motivo, Demonty *et al* [37] llevó a cabo en 2008 -aunque publicado en 2009- un tercer meta-análisis con dos objetivos

fundamentales: Intentar resolver la aparente controversia en relación con el tipo de alimento utilizado para aportar los fitoesteroles, con la frecuencia y momento en el que se producía la ingesta y con los valores de c-LDL iniciales, así como, actualizar los resultados incluyendo aquellos estudios llevados a cabo hasta julio de 2007. El análisis de un total de 84 ensayos clínicos aleatorizados permitió concluir que la reducción media de los niveles de c-LDL que se producía tras la ingesta de alimentos suplementados era de 0.34 mmol/L (un 8.8% de descenso relativo). Asimismo, el efecto de las concentraciones séricas basales de c-LDL era significativo, de manera que aquellos con altas concentraciones obtenían reducciones significativamente mayores que los que presentaban niveles óptimos o límites. Sin embargo, no hubo diferencias entre los distintos tipos de matrices alimentarias ni variaciones en los resultados obtenidos tomando los suplementos en varias raciones o en sólo una toma. Si bien estas dos últimas conclusiones difieren de las arrojadas por otro meta-análisis coetáneo [134], ambos concuerdan en la cuantificación del efecto sobre los niveles séricos de c-LDL y sobre la importancia de los valores iniciales de estas concentraciones.

En ninguno de estos últimos trabajos se refieren a las posibles variaciones existentes en las concentraciones de c-HDL y/o TG. Desde que Law [88] apuntara que no se observaban diferencias en los valores de estos lípidos, sólo en un reciente meta-análisis [135], que también indica reducciones significativas de c-total y c-LDL, se concluye que no existen efectos sobre los niveles de c-HDL, algo que está en concordancia con lo indicado anteriormente en revisiones realizadas sobre los fitoesteroles [86,104,139,140].

Tampoco se investiga el impacto potencial de la dieta de base, especialmente importante el contenido en colesterol, sobre la eficacia hipocolesterolemiantes de los fitoesteroles. Sin embargo, un reciente ensayo clínico [141] sugiere que esta eficacia no está afectada por

variaciones en los niveles de colesterol ingeridos. Probablemente el importante aporte de colesterol por parte de la bilis al *pool* intestinal frente al aporte dietético explique estos resultados [142].

3.6. MECANISMOS DE ACTUACIÓN DE LOS FITOESTEROLES SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

Para comprender este beneficio potencial de los fitoesteroles sobre los niveles plasmáticos de c-LDL es importante examinar los mecanismos que sustentan sus efectos como inhibidores de la absorción y sobre el metabolismo de las lipoproteínas. Se trata de un tema que no está completamente establecido, pero se postula que los fitoesteroles puedan actuar en diferentes etapas del proceso absorptivo [39,53,104,139,142-146], tal y como se ve en la Figura 7.

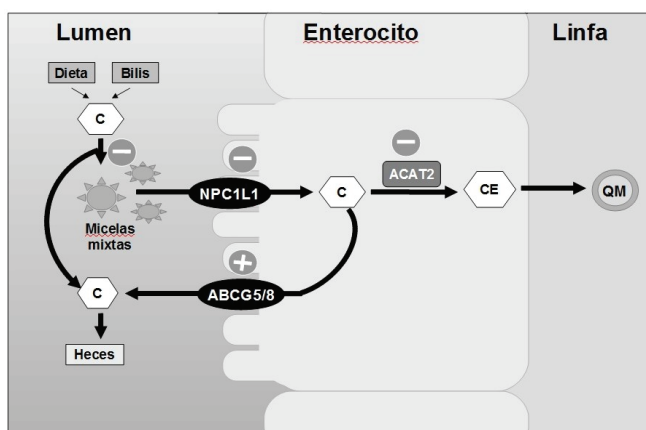


Figura 7. Mecanismos de actuación de los fitoesteroles sobre la absorción de colesterol. Fuente: Sanclemente T et al [49].

C, Colesterol libre; CE, Éster de colesterol; QM, Quilomicron; NPC1L1, Niemann-Pick C1-like 1; ACAT2, Acil-coenzima A colesterol aciltransferasa isorforma2; ABCG5/8, ATP-binding cassette transporters G5/G8.

En primer lugar, y debido a su similitud estructural con el colesterol pero mayor hidrofobicidad, existen evidencias científicas que prueban que los fitoesteroles actúan principalmente en el lumen intestinal desplazando al colesterol de las micelas mixtas [104,139,145,147]. Este

reemplazo produce una reducción de la solubilización del colesterol y, consecuentemente, una menor posibilidad de ser captado por el enterocito.

Este mecanismo propuesto implica que los fitoesteroles deberían consumirse con cada comida que contuviera colesterol para alcanzar la máxima eficacia. Sin embargo, tal y como se ha indicado anteriormente, el descenso del colesterol sérico, y por tanto de la absorción intestinal de colesterol, consumiendo los fitoesteroles una vez al día parece ser similar al presentado cuando se consume la misma cantidad servida en tres raciones [37]. Una posible explicación de este efecto sería que su retención a nivel intestinal pudiera ejercer una acción beneficiosa a otros niveles [53,139,142], especialmente a nivel del enterocito.

Como ya se ha explicado, parece ser que los fitoesteroles son fácilmente transportados del lumen intestinal al interior del enterocito, vía NPC1L1, pero que también son rápidamente devueltos, vía los transportadores de membrana ABCG5/G8, al lumen intestinal. El hecho de que puedan estar utilizando los mismos transportadores que el colesterol genera la hipótesis de que el *uptake* de colesterol por parte del enterocito se pueda ver afectado [145]. Así, podrían afectar atenuando la expresión del gen NPC1L1 [148], lo que resultaría en una menor entrada de colesterol desde el lumen al enterocito, y/o un aumento de la expresión de los transportadores de membrana ABCG5/G8 en las células intestinales por diferentes mecanismos [149,150], lo que implicaría una excreción incrementada de colesterol no esterificado desde el enterocito de nuevo al lumen intestinal.

De todos modos, recientes estudios en animales han mostrado que los fitoesteroles disminuyen los niveles sanguíneos de colesterol independientemente de los transportadores de esteroides ABC y de la expresión del gen de la proteína NPC1L1 [151]. Por lo tanto, se piensa que otros mecanismos están involucrados en la reducción sérica de

colesterol como podría ser la disminución de la tasa de esterificación por la ACAT2 y, en consecuencia, la cantidad de colesterol excretada vía los QM [53]. Este hecho, a su vez, estimularía la salida de colesterol de nuevo al lumen intestinal.

En cualquiera de los casos, el colesterol no absorbido se excreta con las heces, incrementando su concentración a este nivel [152] y, por lo tanto, su eliminación del organismo.

Según los resultados obtenidos al estudiar el efecto de dosis altas de fitoesteroles como consecuencia de la ingesta de alimentos suplementados, este aumento de la excreción de colesterol con las heces, consecuencia de la inhibición parcial de la absorción intestinal, lleva a un estado de relativa deficiencia de colesterol en el organismo. Para compensar este déficit, se produce un incremento de la síntesis endógena [83,145,153], en torno al 38-53% [153], pero también un aumento en la expresión de los r-LDL [145,154], entre el 25 y el 43% [154]. El efecto neto de ambos procesos compensatorios es que las concentraciones de c-LDL circulante son menores tras la ingesta de fitoesteroles como ha sido suficientemente probado en humanos.

Por el contrario, como ya se ha indicado, los fitoesteroles no tienen efecto sobre los niveles de TG o c-HDL ni existen datos sobre efectos directos sobre el metabolismo biliar [53,139].

3.7. EFECTO DE LOS FITOSTEROLES PRESENTES DE FORMA NATURAL EN LA DIETA SOBRE LA ABSORCIÓN DE COLESTEROL Y SUS NIVELES PLASMÁTICOS

En contraste con estos estudios realizados con productos suplementados, se conoce mucho menos sobre los efectos de la ingesta dietética de fitoesteroles. Tradicionalmente, no se ha considerado que la ingesta de fitoesteroles con la dieta habitual tenga un efecto significativo sobre los niveles séricos de colesterol. Sin embargo, este punto de vista ha sido cuestionado recientemente tanto por su importancia potencial como compuestos bioactivos en

alimentos naturales [39] como por la necesidad de tenerlos en cuenta a la hora de cuantificar el efecto producido por el consumo de alimentos suplementados [155]. Centrándonos en el primer aspecto, varios estudios han demostrado que los fitoesteroles naturalmente presentes en los alimentos pueden jugar un papel importante en el control de los niveles séricos de colesterol.

Pelletier *et al* [156] llevó a cabo un ensayo cruzado aleatorizado con 12 individuos sanos a los que suministró durante cuatro semanas una dieta añadiendo y sin añadir fitoesteroles de soja de manera que los ratios fitoesteroles/colesterol en las dietas fueron 1.88 y 0.7, respectivamente. El colesterol sanguíneo fue un 10% menor después de que los sujetos consumieran la dieta enriquecida en fitoesteroles en comparación con la dieta control, debido a un descenso del c-LDL del 15%. Así, concluyeron que existía un significativo descenso del c-total y c-LDL plasmático con una ingesta moderada de fitoesteroles.

Entre finales de los años 90 y principios del siglo XXI, existe una importante cantidad de estudios de intervención que intentan explicar el diferente efecto de los AGMI, AGPI y AGS sobre los niveles lipídicos mediante el intercambio de las cantidades y tipos de aceites y grasas. Algunos autores se plantean que estas variaciones en el tipo de alimentos pueden llevar implícitas alteraciones en las concentraciones de varios fitoquímicos, entre ellos de fitoesteroles, que podrían explicar parte de los cambios atribuidos al perfil lipídico de las dietas [157-164].

La comparación de los efectos del aceite de maíz frente al de oliva [157] o frente a una mezcla de aceite de oliva y de girasol [161] permitió concluir que el consumo del primero conllevaba una sensible reducción de las concentraciones plasmáticas de c-LDL respecto al resto. Esta reducción parecía estar conectada con la mayor cantidad de fitoesteroles que presentaba el aceite de maíz.

También se observaron efectos más favorables sobre los lípidos sanguíneos tras el consumo de dietas que contenían aceite de colza o de girasol con respecto a aquéllas que contenían aceite de oliva [160] y cuando se comparó el aceite de germen de soja con el de cártamo [162]. En ambos casos se apuntó, de nuevo, como posibles responsables de estas diferencias a los distintos contenidos en fitoesteroles de los aceites.

Finalmente, en un reciente estudio se comparó otro aceite rico en fitoesteroles, el aceite de cáñola o colza, con el aceite de oliva [164] y se vio como los niveles séricos de colesterol se veían disminuidos cuando se consumía el primero. Lo interesante de este estudio es que, además, se comprobó que este efecto se observaba sin existir diferencias en el perfil lipídico de la grasa y en la cantidad de colesterol de ambas dietas.

Ante la aparente bioactividad de los fitoesteroles presentes en los aceites, varios ensayos se han centrado en estudiar su posible efecto sobre el proceso de absorción intestinal de colesterol. Tanto los trabajos llevados a cabo por Ostlund *et al*, con aceite de maíz [165] y aceite de germen de trigo [166], como por Ellegard *et al*, con aceite de colza vs. aceite de oliva [164], mostraron que los fitoesteroles en las bajas cantidades presentes en alimentos comunes reducían la absorción de colesterol y, consecuentemente, influían sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol.

En conclusión, los resultados de todos estos ensayos experimentales sugirieron la hipótesis de que los fitoesteroles presentes de forma natural en los alimentos de la dieta habitual tienen un efecto sobre las concentraciones séricas de colesterol debido a que reducen su tasa de absorción intestinal.

Hasta la fecha, dos estudios epidemiológicos han mostrado que existe una relación entre la ingesta de fitoesteroles dietéticos y menores niveles de colesterol plasmático.

El primero de ellos fue un estudio epidemiológico a gran escala sobre población británica (22256 individuos) [108] donde se midieron la ingesta dietética habitual de fitoesteroles y las concentraciones sanguíneas de lípidos. En esta población ambulatoria, tanto los hombres como las mujeres que consumían moderadas cantidades de fitoesteroles (> 400 mg/día) tenían menores concentraciones séricas de c-total y c-LDL, después de ajustar por edad, índice de masa corporal (IMC) e ingesta energética total, que aquellos que consumían bajas cantidades (< 180 mg/día).

Unos años después, un segundo estudio con el mismo planteamiento se realizó sobre población sueca [110]. En este caso, se analizó la dieta y el perfil lipídico de 37150 hombres y 40502 mujeres y el resultado obtenido fue similar al estudio precedente: los individuos con mayores ingestas de fitoesteroles (unos 330 mg/día para hombres y 270 mg/día para mujeres) tenían menores concentraciones séricas de c-total y c-LDL, después de ajustar por edad, IMC y, en el caso de mujeres, por estatus menopáusico, que aquellos que consumían bajas cantidades (185 mg/día para hombres y 160 mg/día para mujeres, aproximadamente).

Ambos estudios, por tanto, mostraron que existía una significativa relación inversa entre la cantidad de fitoesteroles naturalmente presentes en la dieta y las concentraciones séricas de c-total y c-LDL.

En el caso del ensayo clínico llevado a cabo por Racette *et al* [167], el objetivo fue evaluar si dosis moderadas de fitoesteroles podían tener efectos fisiológicos y, por tanto, si deberían considerarse en los estudios de efectividad de alimentos suplementados. Se trata de un ensayo cruzado controlado por placebo en el que se incluyeron 18

adultos sanos. En periodos de cuatro semanas, estos individuos recibieron, de forma aleatoria, una dieta deficitaria en fitoesteroles (50 mg/2000 Kcal) a la que se añadieron bebidas suplementadas con 0, 400 y 2000 mg de fitoesteroles por día. La conclusión principal del ensayo fue que los fitoesteroles, tanto en dosis moderadas (459 mg/día) como altas (2059 mg/día), incrementaban significativamente la excreción de colesterol (tanto dietético como biliar) y reducían la eficiencia de absorción intestinal de colesterol en relación con una dieta deficiente en fitoesteroles. Además, los autores resaltaban que esta ingesta moderada podía alcanzarse con una dieta saludable compuesta por cereales integrales, frutas, hortalizas, aceites vegetales y frutos secos y semillas, por lo que cuestionaban la precisión de aquellos estudios de valoración de la eficacia de los alimentos funcionales ricos en fitoesteroles que no habían tenido en cuenta las contribuciones de la dieta basal de los individuos. Sin embargo, aunque existía ya una ligera disminución de los niveles de c-total y c-LDL con las ingestas moderadas, esta disminución sólo era significativa cuando se comparaba la dieta con 59 mg frente a la de 2059 mg.

En el caso de España, sólo recientemente se ha investigado sobre el posible papel de los fitoesteroles naturalmente presentes en los alimentos sobre las concentraciones de colesterol. Se trata de un subestudio de un ensayo clínico aleatorizado de intervención dietética para prevención primaria cardiovascular (Estudio PREDIMED – PREvención con DIeta MEDiterránea) [112]. Los 106 participantes se asignaron a tres grupos a los que se les recomendó tres tipos de dietas diferentes: "DM suplementada con aceite de oliva virgen", "DM suplementada con frutos secos" o "Recomendaciones de una dieta baja en grasa". Al cabo de un año de intervención nutricional, los participantes adscritos a los dos grupos de dietas mediterráneas que habían aumentado la concentración de sitosterol plasmático, reflejo de un mayor consumo de fitoesteroles con la dieta rica en aceite de oliva

o frutos secos, mejoraron el perfil lipídico puesto que se observó una disminución de las cifras circulantes de c-total y c-LDL.

Así pues, hasta la fecha son pocos los estudios realizados que han investigado el contenido natural de fitoesteroles en los alimentos de la dieta habitual como agentes inhibidores de la absorción intestinal de colesterol y, en consecuencia, como agentes hipocolesterolemiantes.

4. MÉTODOS DE MEDIDA DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL

Existen varios métodos desarrollados para evaluar el metabolismo del colesterol que, de forma amplia, se pueden clasificar entre aquellos que utilizan isótopos y aquellos que utilizan marcadores indirectos.

4.1. MÉTODOS ISOTÓPICOS

Como su nombre indica, todos estos métodos se basan en la administración de compuestos químicos marcados isotópicamente. Se trata de técnicas de difícil aplicación a grandes grupos y se limitan a su utilización en estudios metabólicos en individuos hospitalizados puesto que requieren la monitorización de la administración de los isótopos así como la recopilación constante de las muestras para los análisis correspondientes.

Para la valoración de la síntesis de colesterol se utiliza el método de incorporación de deuterio que determina la síntesis de colesterol como el ratio de incorporación de deuterio procedente del agua corporal en el colesterol libre de la membrana del eritrocito durante un periodo de 24 horas [69].

Entre los métodos que valoran la absorción de colesterol es necesario distinguir entre aquellos que miden cantidad de colesterol absorbida y aquellos que cuantifican porcentaje o fracción de colesterol absorbida [168]. El *gold standard* para medir la absorción de colesterol es el método de balance de esteroides [69,168]. En cuanto a métodos de

valoración de la fracción de colesterol absorbida durante un periodo de tiempo, son varias las técnicas utilizadas diferenciándose en la forma de administrar los isótopos y, por tanto, en las medidas posteriores realizadas y también en el tipo de isótopos utilizados, i.e. radioactivos o estables [168].

4.2. MÉTODOS BASADOS EN LA MEDIDA DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE ESTEROLES

Se trata de una técnica más simple de aplicar que los métodos isotópicos con la ventaja añadida de que los individuos no necesitan estar hospitalizados para poder aplicarla siendo únicamente necesaria una muestra de sangre sobre la que realizar los análisis correspondientes. Por estas razones, la valoración del metabolismo del colesterol con esta técnica es el único método validado actualmente disponible para poder ser usado, en un sentido práctico, en ensayos clínicos a gran escala y en estudios poblacionales cuando las cuestiones a responder estén relacionadas con cambios en la síntesis o en la absorción entre subgrupos o entre diferentes tratamientos [168].

Por este motivo, esta técnica ha sido aplicada en estudios del metabolismo del colesterol en varias situaciones fisiológicas y patológicas: para estudiar el comportamiento del metabolismo en dislipemias como la hiperlipidemia familiar combinada [169] o la hipercolesterolemia familiar [170]; para estudiar alteraciones del metabolismo del colesterol en mujeres menopáusicas con enfermedad coronaria [171,172], en niños y adultos con diabetes tipo 1 [173,174], en individuos con diabetes tipo 2 [175], asociadas al síndrome metabólico [176,177] o asociadas a la obesidad [79]; para ver cómo influye el ejercicio físico en la homeostasis del colesterol [178]; para comprobar si existen modificaciones en el metabolismo durante la adolescencia [179] y entre la adolescencia y la edad adulta [180]; o para investigar si un deterioro en la homeostasis del colesterol puede

ser predictor de prevalencia de enfermedad cardiovascular [181,182], entre otras. También se ha considerado muy útil para la clasificación de los individuos según su metabolismo a la hora de decidir el tipo de tratamiento farmacológico más adecuado [183,184]. Por último, ha sido el método de elección cuando se ha querido valorar el efecto de diversos componentes de la dieta sobre el metabolismo del colesterol [118,141,158,184,185].

El principal inconveniente de estos métodos es que no proporcionan datos cuantitativos sino que la información que aportan es únicamente si se producen variaciones, es decir, si la absorción y/o la síntesis de colesterol ha aumentado o ha disminuido [69,168].

Los esteroides utilizados como marcadores indirectos para valorar la síntesis y la absorción de colesterol se describen a continuación.

4.2.1. Marcadores indirectos de síntesis

A lo largo de la historia se han propuesto diversos precursores de colesterol como posibles marcadores para monitorizar la síntesis corporal de colesterol como son los metil-esteroides libres (i.e. lanosterol), el escualeno y el ácido mevalónico así como el latosterol y el desmosterol [65,186] (ver Figura 2).

El fundamento para usar los niveles plasmáticos de estos compuestos como indicadores se basa en la aceptación de que estos compuestos pasan a las lipoproteínas plasmáticas a un ritmo proporcional al de su formación en la vía de síntesis de colesterol [69]. De todos ellos, los más utilizados son lanosterol, desmosterol y latosterol, siendo este último el que se ha establecido como mejor indicador de la tasa de síntesis de colesterol [187].

Puesto que estos compuestos se transportan incluidos en las lipoproteínas, sus concentraciones plasmáticas están influidas por variaciones en las concentraciones de estas partículas. Por tanto, los valores utilizados como índices de síntesis corporal se obtienen

dividiendo estas concentraciones plasmáticas por la correspondiente concentración plasmática de c-total. De este modo, los datos que se comparan para valorar la síntesis de colesterol son los ratios precursores-colesterol [65,186].

4.2.2. Marcadores indirectos de absorción

Basándose en la ya descrita similitud entre el metabolismo del colesterol y los esteroides vegetales así como en algunos estudios previos llevados a cabo por su grupo, Miettinen *et al* [65] llevaron a cabo un ensayo donde compararon el porcentaje de absorción medido isotópicamente con las concentraciones plasmáticas de β -sitosterol y campesterol (previamente corregidas por las concentraciones correspondientes de c-total como se ha indicado para los indicadores de síntesis). La conclusión obtenida fue que estos ratios fitoesteroides-colesterol eran indicadores válidos de variaciones en la eficiencia de absorción de colesterol. Sin embargo, también indicaron como resultados de este ensayo que existían factores que podían influir en la validez de estos marcadores. Así, el contenido sérico de campesterol estaba determinado por la eficiencia de absorción de colesterol (%), la ingesta de fitoesteroides dietéticos y la secreción de colesterol biliar (en este orden) y el de sitosterol por la ingesta dietética de fitoesteroides, la síntesis de colesterol, la eficiencia de absorción de colesterol (%) y la secreción de colesterol biliar (en este orden).

Conforme se ha ido conociendo mejor el proceso de absorción de fitoesteroides, se ha podido establecer de una manera más rigurosa cuáles son los factores responsables de las variaciones en las concentraciones de fitoesteroides circulantes (de forma similar para las concentraciones absolutas como para los ratios). En una revisión reciente, Chan *et al* [188] analizaron las concentraciones plasmáticas (o en su caso los ratios fitoesteroides-colesterol) en la población general descritas en 45 ensayos llevados a cabo desde 1986 hasta

2005 para describir y cuantificar aquellos factores cuya influencia era más importante.

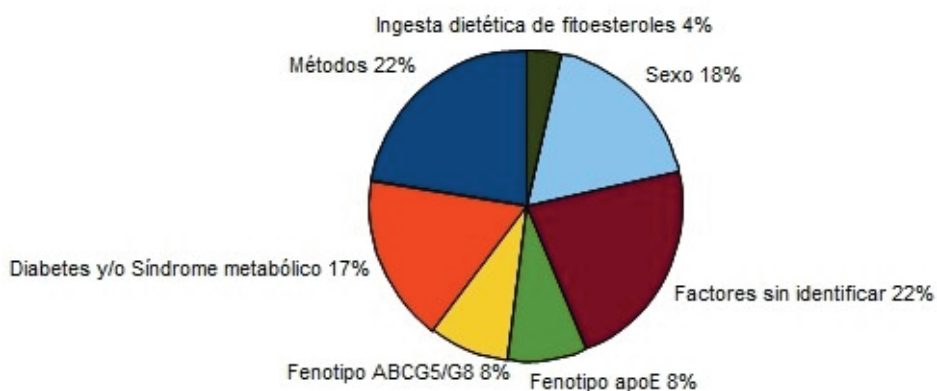


Figura 8. Impacto estimado de diferentes factores sobre los ratios fitoesteroles-colesterol. Datos obtenidos de Chan YM *et al* [188]

En la Figura 8 se puede observar como, de los factores identificados, el que más impacto tiene es el método analítico utilizado en la determinación de las concentraciones seguido por el sexo. Los factores genéticos también juegan un papel destacado, de hecho, está comprobado que los niveles plasmáticos de esteroides en humanos son altamente heredables [189]. Sigue muy de cerca en importancia determinadas situaciones que conllevan una alteración del metabolismo como son la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico. Sólo un 4% aproximadamente está asociado a variaciones en la ingesta diaria de fitoesteroides.

Sin embargo, cuando el resto de factores están controlados, el factor dieta adquiere un gran protagonismo y sólo bajo condiciones constantes de ingesta de fitoesteroides las concentraciones séricas de estos compuestos (o los ratios fitoesteroides-colesterol) se relacionan positivamente con la eficiencia de absorción de colesterol [190]. Por lo tanto, estos marcadores no pueden usarse cuando las concentraciones séricas fluctúan como consecuencia de una diferente ingesta de fitoesteroides entre las situaciones que se están comparando [191]. Por

ejemplo, cuando existe una alta ingesta, como consecuencia del consumo de alimentos funcionales, la eficiencia de absorción de colesterol disminuye pero las concentraciones séricas de fitoesteroles realmente aumentan. Sin embargo, otras variaciones de la dieta como la ingesta de diferentes cantidades de grasa o de colesterol no parecen afectar a la utilización de este método [190].

En relación con lo que se acaba de describir, puesto que las concentraciones plasmáticas de fitoesteroles son un reflejo de las cantidades ingeridas, estos marcadores también pueden ser utilizados para medir la adherencia a dietas en las que estos compuestos tienen una presencia destacada [112,167].

5. PAPEL DE LOS FITOESTEROLES EN EL EFECTO BENEFICIOSO DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA

5.1. ANÁLISIS DE PATRONES DIETÉTICOS EN EPIDEMIOLOGÍA NUTRICIONAL

Aunque tradicionalmente los estudios epidemiológicos han evaluado la relación entre enfermedad y uno o varios compuestos químicos o alimentos, en los últimos años la metodología empleada ha girado hacia el estudio de patrones dietéticos. Se considera que estos últimos representan una aproximación más completa para evaluar las relaciones entre hábitos dietéticos y salud y, además, permiten eliminar algunas de las limitaciones que presentan los primeros [192]. En este sentido, el análisis de patrones dietéticos permite superar algunos de los problemas que surgen a la hora de analizar datos altamente correlacionados, es decir, tener en cuenta posibles interacciones o sinergias entre nutrientes y/o no-nutrientes así como valorar las influencias entre consumos de grupos alimentarios diferentes [192,193]. Por otro lado, otro de los motivos que avalan esta forma de abordar los estudios es el hecho de que un patrón dietético puede ser más fácilmente asumido por la población general,

lo que constituye una característica muy importante a tener en cuenta en la elaboración de recomendaciones que competen a la Salud Pública [192].

Sin embargo, este tipo de estudios que contemplan la dieta como un todo no se consideran óptimos para evaluar si el efecto observado está causado por un componente específico, de allí que ambas metodologías utilizadas para examinar la relación entre dieta y riesgo de enfermedad se deban considerar complementarias [192].

5.2. DEFINICIÓN DE PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA

Entre los patrones dietéticos evaluados respecto a su papel preventivo en la enfermedad cardiovascular, el patrón de DM es uno de los mejor avalados por estudios epidemiológicos y clínicos. Como ya se ha comentado al inicio de la Introducción, un elevado grado de adherencia a este patrón se asocia con una reducción de la mortalidad cardiovascular.

Hay dificultades para definir con precisión cuál es la composición de la DM, dado que entre los distintos países del área mediterránea y entre regiones de un mismo país existen ciertas diferencias. Por ello, en la Conferencia Internacional sobre las Dietas del Mediterráneo en 1993 [194] se consensuó definir el término "patrón de DM" como el patrón dietético encontrado en las áreas olivareras de la región mediterránea a principios de los 60 y que se caracteriza por: alto consumo de aceite de oliva, de legumbres, de cereales no refinados, de frutas y de hortalizas; moderado consumo de productos lácteos, en su mayoría queso y yogur; moderado-alto consumo de pescado; bajo consumo de carne y productos cárnicos; y moderado consumo de vino.

El mayor o menor cumplimiento de estas premisas acerca en mayor o menor medida la dieta de un individuo o de una población al patrón de DM. Sin embargo, no existe un método directo para medir o cuantificar patrones dietéticos, siendo necesario aplicar

aproximaciones indirectas. Una de ellas es la denominada "patrones dietéticos empíricos" y se basa en técnicas estadísticas como son el análisis de componentes principales o el análisis de conglomerados. La otra se basa en la construcción de "índices de calidad de la dieta" predefinidos utilizando la evidencia científica disponible [192,193]. Esta última metodología se ha empleado ampliamente para valorar el efecto del grado de adherencia a un determinado patrón dietético sobre la salud [193].

5.3. MEDIDA DEL GRADO DE ADHERENCIA AL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA

Centrándonos en el patrón de DM, en la última década se han desarrollado varios índices con objeto de medir el grado de adherencia que presenta la dieta de una determinada población, aunque muchos de ellos se trata de meras modificaciones de otros índices previamente existentes [193].

Uno de los más utilizados es el índice propuesto por Trichopoulou *et al* en 1995 [195]. Este índice denominado *Mediterranean Diet Scale* tenía en cuenta 8 componentes (i.e. ingesta de cereales y patatas, hortalizas, frutas y frutos secos, leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos, legumbres y alcohol así como el ratio AGMI/AGS). Las puntuaciones 0 (alejado de la DM) y 1 (próximo a la DM) se asignaban a cada componente usando como punto de corte la mediana de la ingesta específica por sexo de los individuos que participaban en el estudio excepto para el caso del alcohol que se consideró un consumo moderado (10-50 g/día para hombres y 5-25 g/día para mujeres). Sumando las puntuaciones asignadas a cada componente, la puntuación oscilaba entre 0 (baja adherencia) y 8 (alta adherencia). Durante el año 2003, Trichopoulou *et al* revisaron este índice para incluir la ingesta de pescado como un componente adicional [10]. La forma de asignar las puntuaciones fue la misma pero los valores oscilaban entre 0 y 9.

Estudios recientes sobre población española utilizan este índice, algunos directamente [14] y otros previa introducción de pequeñas modificaciones tanto en los alimentos incluidos en cada grupo como en la forma de asignar las puntuaciones [12,196,197] pero manteniendo la filosofía del mismo.

5.4. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA

Cuando se intenta establecer cuáles de los componentes alimentarios de la DM son los responsables de su efecto beneficioso para la salud, las conclusiones no son consistentes. Por ello, Saura-Calixto y Goñi [198] han propuesto recientemente una definición complementaria de la DM basada en indicadores dietéticos, los cuales fueron seleccionados atendiendo a la existencia de suficiente evidencia científica que sustentaba sus efectos beneficiosos para la salud y a que su presencia en la DM tenía características específicas puesto que estaban presentes en alimentos cuya ingesta en este patrón dietético era elevada. Los indicadores utilizados y los rangos considerados como característicos de un patrón de DM se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Indicadores dietéticos esenciales en la Dieta Mediterránea. Modificado de: Saura-Calixto y Goñi [198]

Indicador	Rango	Principales alimentos
AGMI/AGS	1.6-2.0	Aceite de oliva
Ingesta de fibra dietética (g/día)	41-62	Cereales, frutas y hortalizas, frutos secos y legumbres
Capacidad antioxidante de la dieta (μ mol equivalentes-Trolox/día)	3500-5300	Café, vino, frutas y hortalizas y legumbres
Ingesta de fitoesteroles (mg/día)	370-555	Aceites vegetales, legumbres, cereales, frutas y hortalizas y frutos secos

Así pues, teniendo en cuenta esta propuesta, conocer los efectos que sobre el organismo humano puede tener una dosis de fitoesteroles obtenida a partir de la ingesta de alimentos podría explicar parte de los beneficios de la DM.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

La cantidad de fitoesteroles presentes de forma natural en la dieta habitual influye sobre los niveles plasmáticos de colesterol debido a su efecto sobre la absorción intestinal de colesterol.

2. OBJETIVOS

1. Caracterizar el patrón dietético de los sujetos objeto de estudio y determinar su grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea.
2. Cuantificar la ingesta dietética de fitoesteroles y establecer la relación entre esta ingesta y el perfil de la dieta.
3. Evaluar la influencia de la ingesta de fitoesteroles sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL y triglicéridos.
4. Valorar el efecto de la ingesta de fitoesteroles sobre la síntesis y la absorción intestinal de colesterol.

METODOLOGÍA

1. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO

1.1. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se encuentra enmarcada en el proyecto FIS (Proyecto nº PI 06/1402) titulado "Estudio fenotípico y genético de la influencia de la eficiencia de absorción intestinal de colesterol en los niveles plasmáticos de colesterol y en el desarrollo de arteriosclerosis subclínica", cuyo objetivo es estudiar aspectos genéticos de la absorción intestinal de colesterol y analizar su posible relación con los valores de c-LDL y con parámetros indicadores del desarrollo de arteriosclerosis subclínica en población general (definida como personas sin enfermedad cardiovascular conocida ni bajo tratamiento farmacológico o consumo de suplementos dietéticos que afecten a los niveles lipídicos).

En concreto, esta investigación forma parte de la primera fase del proyecto que, según el diseño del estudio, consiste en la realización de un estudio transversal poblacional en el que se estudia la relación entre la eficiencia de absorción intestinal y la concentración plasmática de c-LDL.

1.2. ASPECTOS ÉTICOS

Todos los sujetos que accedieron a participar en el proyecto fueron informados y firmaron un consentimiento (Ver Anexo I) por el que permitían a los investigadores realizar las exploraciones clínicas incluidas en el estudio, una encuesta dietética y una extracción de sangre para obtener los datos bioquímicos utilizados. En este mismo documento se les informaba de la confidencialidad y anonimato de los datos que se utilizarían en el estudio. El estudio y el consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Aragón, CEICA.

1.3. FASES DEL ESTUDIO

El estudio llevado a cabo consta de las fases que se describen en la Figura 1.

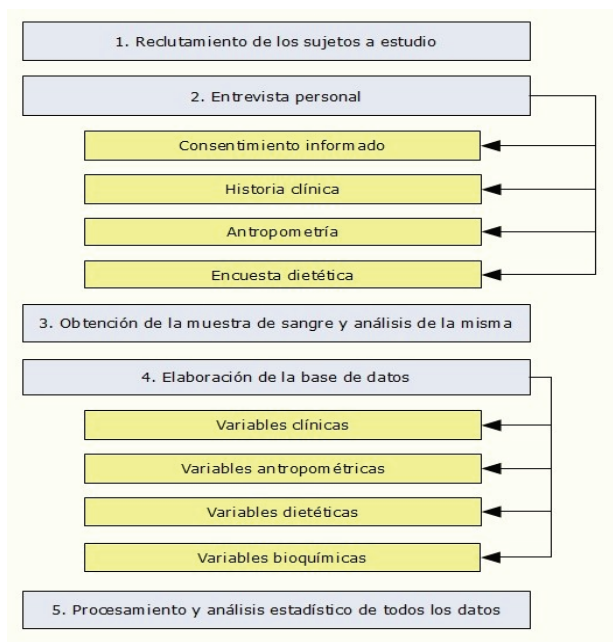


Figura 1. Fases del estudio

2. RECLUTAMIENTO DE LOS SUJETOS A ESTUDIO

2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

En este trabajo se incluyeron voluntarios pertenecientes al medio hospitalario (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, y Hospital General San Jorge, Huesca) y al medio universitario (Universidad de Zaragoza) invitados a través de campañas de propaganda o de forma personal a través de investigadores. El periodo de reclutamiento duró desde Junio de 2007 hasta Junio de 2008.

Se incluyeron aquellos individuos mayores 18 y menores de 80 años que no refirieron antecedentes personales de enfermedad cardiovascular, hipertensión y/o dislipemias así como tampoco causas

de dislipemias secundarias conocidas (diabetes, nefropatías, enfermedad hepática e hipotiroidismo). Por último, sólo se incluyeron si no consumían fármacos que pudieran alterar el perfil lipídico o alimentos suplementados con fitoesteroles.

Como agradecimiento a su participación, a todos los sujetos se les entregó un informe con el resultado de su encuesta dietética y de las comparaciones de sus ingestas con las recomendaciones dietéticas correspondientes (Ver Anexo II).

2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Entre los sujetos reclutados se excluyeron aquellos que presentaban obesidad así como a las mujeres menopaúsicas. Se definieron como individuos obesos aquellos con un IMC superior a 30 Kg/m² y perímetro de cintura superior a 88 cm para mujeres y a 102 cm para hombres [199]. En el caso de las mujeres, se consideraron como menopaúsicas aquellas con una edad superior a 55 años.

Además, durante el análisis estadístico de los datos se eliminaron aquellos casos que tuvieran valores perdidos en alguna/s variable/s de interés para el estudio así como los casos extremos en cuanto a ingesta energética y a concentraciones plasmáticas de fitoesteroles determinados mediante la representación de los correspondientes diagramas de caja (*box-plot*).

3. ENTREVISTA PERSONAL

Cada uno de los individuos reclutados participó en una entrevista personal llevada a cabo por dietistas entrenadas que tuvo lugar en la consulta de lípidos del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y del Hospital General San Jorge de Huesca.

3.1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Al comienzo de la entrevista, cada uno de los individuos recibieron la información oportuna respecto a los objetivos del estudio y los

procedimientos a llevar a cabo así como sobre sus derechos y responsabilidades tras lo cual se obtuvo el correspondiente consentimiento informado.

3.2. HISTORIA CLÍNICA

En la misma visita se realizó una historia clínica con el objeto de incluir únicamente a los participantes que no presentasen antecedentes personales de enfermedad cardiovascular, hipertensión y/o dislipemias ni causas de dislipemias secundarias conocidas (diabetes, nefropatías, enfermedad hepática e hipotiroidismo) así como a aquellos que no consumieran fármacos que pudieran alterar el perfil lipídico ni alimentos suplementados con fitoesteroles.

Asimismo, en esta historia clínica se recopilaron datos necesarios para llevar a cabo el estudio como son: datos personales, el hábito tabáquico y medidas de la presión arterial.

El formato utilizado para recopilar la información se adjunta como Anexo III.

3.2.1. Datos personales, antecedentes de enfermedad y consumo de medicación y alimentos funcionales

Se anotó la fecha de recogida de datos y el sexo del sujeto y se preguntó por la fecha de nacimiento para obtener la edad en el momento de la inclusión en el estudio.

A continuación se preguntó por la existencia de antecedentes personales de enfermedad cardiovascular, dislipemias, diabetes e hipertensión arterial así como si existían en familiares directos. En el apartado de medicación habitual, se preguntó sobre el consumo de fármacos con y sin prescripción médica, especialmente por aquellos que tienen influencia sobre el perfil lipídico. Por el mismo motivo, se pidió que se informara de si existía consumo de alimentos funcionales, especialmente aquellos suplementados con fitoesteroles.

3.2.2 Hábito tabáquico

Se pidió a los individuos que se clasificaran como no fumadores, fumadores o ex-fumadores.

En estos dos últimos casos, se recopiló el número de cigarrillos consumidos al día en el momento de la entrevista y la evolución de dicho consumo a lo largo de la vida del sujeto (media del número de cigarrillos fumados diariamente y el número de años fumando) con el fin de poder evaluar la cantidad fumada en paquetes de cigarrillos/año (*pack year*). La forma de realizar el cálculo fue la siguiente:

$$(n^{\circ} \text{ de cigarrillos diarios} / 20 \text{ cigarrillos}) \times n^{\circ} \text{ años} = n^{\circ} \text{ paquetes de cigarrillos/año}$$

Esta cifra representa el número de paquetes de cigarrillos diario que habría consumido el individuo si los hubiera fumado en un año, es decir, es una medida acumulada de todo el consumo de tabaco del individuo a lo largo de la historia declarada [200].

3.2.3. Medida de la presión arterial

En este momento, puesto que el individuo ya había permanecido en reposo más de 15 minutos, se obtuvo la presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD) con un oscilómetro semi-automático (RIESTER) validado. Se realizaron dos medidas a partir de las cuales se obtuvo la media aritmética. Los valores para interpretar los resultados se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Definición y clasificación de la presión arterial.
Fuente: Lobos JM et al [31]

Categoría	Sistólica		Diastólica
Óptima	< 120	y	< 80
Normal	120-129	y/o	80-84
Normal alta	130-139	y/o	85-89
Hipertensión de grado 1	140-159	y/o	90-99
Hipertensión de grado 2	160-179	y/o	100-109
Hipertensión de grado 3	≥ 180	y/o	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	y	< 90

3.3. ANTROPOMETRIA

La antropometría estudia las proporciones y medidas del cuerpo humano, valorando los depósitos grasos y magros del organismo. La comparación de la información obtenida, bien de forma directa o tras la realización de los cálculos correspondientes, con valores de referencia poblacional permite valorar de forma sencilla la composición corporal y el estado nutricional del individuo.

Las medidas antropométricas directas realizadas en este estudio incluyeron el peso, la talla y el perímetro de cintura.

3.3.1. Índices generales de peso y talla

Para la determinación del peso y de la talla se utilizó una báscula calibrada, con precisión de 100g, con tallímetro incluido, de precisión 1mm, (SECA®, modelo 700/220). Las medidas se realizaron con ropa ligera y sin zapatos, en bipedestación, en posición erecta, con los brazos relajados y de espaldas al registro de medida así como con los talones, los glúteos y región occipital en contacto con el plano vertical del tallímetro, aproximando a la unidad siguiente.

Con estos datos se calculó el IMC o Índice de Quetelet como el cociente entre el peso, en kilogramos, y la talla, en metros, al cuadrado.

3.3.2. Índice de distribución de la grasa corporal

El perímetro de la cintura se determinó con una cinta métrica flexible y milimetrada por debajo de la ropa en el borde superior de las crestas ilíacas al final de una espiración normal.

3.3.3. Valoración de sobrepeso y obesidad

La obesidad es una enfermedad que se caracteriza por el exceso de grasa corporal. Aunque el IMC no es un buen indicador en determinadas situaciones (individuos muy musculados, por ejemplo deportistas, o en ancianos) es el índice más utilizado en estudios

epidemiológicos y el recomendado por diferentes sociedades médicas y organizaciones de salud internacionales para el uso clínico dada su reproducibilidad, facilidad de utilización y capacidad para reflejar la adiposidad en la mayoría de la población. Según, los criterios de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) [199] para definir la obesidad según el IMC en adultos, el punto de corte se sitúa en 30 Kg/m^2 (ver Tabla 2).

Tabla 2. Criterios SEEDO para definir la obesidad según el IMC en adultos.
Fuente: Rubio MA et al [199]

Categoría	Valores límite del IMC (kg/m^2)
Peso insuficiente	$< 18,5$
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0-29,9
Obesidad de tipo I	30,0-34,9
Obesidad de tipo II	35,0-39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥ 50

Por otro lado, el valor del perímetro de cintura es un buen indicador de la grasa visceral u obesidad central así como del riesgo cardiovascular [199]. Como hemos indicado, el IMC tiene una buena correlación con la masa grasa total pero el aumento de la grasa intraabdominal, medido mediante el perímetro de cintura, se relaciona mejor con la presencia de determinados factores de riesgo y de enfermedad cardiovascular [201].

Según los criterios de la SEEDO [199], para definir el riesgo relativo de presentar comorbilidades mayores que confiere el exceso de peso y la distribución del tejido adiposo a partir del perímetro de cintura en adultos, el punto de corte se sitúa en 102 cm para los hombres y en 88 cm para las mujeres.

3.4. ENCUESTA DIETÉTICA

3.4.1. Cuestionario de frecuencia de consumo semicuantitativo

La ingesta dietética de los participantes se evaluó utilizando el cuestionario de frecuencia de consumo (CFC) semicuantitativo de 136 items desarrollado por el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Navarra (Ver Anexo IV). Este cuestionario está validado y aceptado en España [202] y, recientemente, se ha comprobado su reproducibilidad [203].

El formato de las preguntas está basado en respuestas múltiples cerradas, siendo nueve el número total de posibilidades de respuesta tal y como se muestra en la Figura 2. Para cada alimento o grupo de alimentos se pide estimar la frecuencia de consumo de una ración, en cantidad en gramos o medida casera. Los tamaños de las raciones especificadas para cada uno de los alimentos están establecidas teniendo en cuenta los patrones típicos de consumo de España.

Una pieza o ración	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
		1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
57. Naranja (una), pomelo (uno), o mandarinas (dos)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Figura 2. Formato de respuesta cerrada para indicar la frecuencia de consumo

La cumplimentación del CFC se realizó mediante entrevista y se solicitó a cada individuo que para cada item por el que se le preguntaba, considerara la frecuencia de consumo alimentario en el año precedente [204].

3.4.2. Cuantificación de la ingesta de alimentos

El CFC, al tratarse de un cuestionario de lectura óptica automatizada, se procesó en el Departamento citado. Posteriormente, se obtuvieron las cantidades ingeridas de cada uno de los alimentos teniendo en cuenta la frecuencia de consumo de la ración correspondiente considerada en el CFC.

3.4.3. Cuantificación de la ingesta de energía, nutrientes y otros componentes de la dieta

Las cantidades ingeridas de energía, nutrientes, fibra y alcohol se obtuvieron utilizando programas ya elaborados específicamente para tal efecto. Dichas ingestas se calcularon multiplicando la cantidad consumida de cada uno de los alimentos por el contenido del parámetro correspondiente.

Los valores de energía, nutrientes, fibra y alcohol utilizados en los cálculos anteriores se obtuvieron de las tablas de composición de alimentos españolas de Mataix Verdú [205] y Moreiras *et al* [206].

3.4.4. Cuantificación de la ingesta de fitoesteroles

Para cuantificar la ingesta de fitoesteroles, principalmente se utilizaron los valores publicados para alimentos españoles por Jimenez-Escrig *et al* [97]. Estos autores aportan datos tanto de fitoesteroles totales como de cada uno de los fitoesteroles individuales, es decir, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, estigmastanol y el denominado "otros fitoesteroles" que incluye todos los fitoesteroles no identificados (se trata de aquella fracción que se detecta en el análisis de los alimentos como un pico del cromatograma pero que no se identifica como moléculas concretas). Además, puesto que para algunos alimentos incluidos en el CFC no se disponía de datos españoles, se utilizaron también algunos valores extraídos de bases de datos extranjeras: *Fineli® - Finnish Food Composition Database* [91] o *USDA National Nutrient Database* [90]. En estos casos, la información aportada es exclusivamente sobre valores de fitoesteroles totales.

Los datos finales utilizados en la cuantificación de los fitoesteroles aportados con la dieta se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Contenido de fitoesteroides de los alimentos utilizados en la cuantificación de la ingesta^a

ALIMENTO	Campesterol	Estigmasterol	β-sitosterol	Estigmasteranol	Otros	Fitoesteroides totales	Fuente
HORTALIZAS							
Acelgas, espinacas	0,5	8,1	4,2	0,7	2,9	16,40	1
Col, coliflor, brócoli	6,5	2,2	19,8	0,5	2	31,00	1
Lechuga, endibias, escarola	1,1	4,1	7,1	1,2	3,3	16,80	1
Tomate crudo	0,8	2,1	3,5	0,7	2,8	9,90	1
Zanahoria, calabaza	2,7	3,1	12,6	0,2	0	18,60	1
Judías verdes	1,2	4,7	9,3	1,5	2,2	18,90	1
Berenjenas, calabacines, pepinos	0,2	1,23	2,46	0	1,13	5,02	1
Pimientos (verdes + rojos)	1,6	0,3	4,75	0,25	1,5	8,40	1
Espárragos	2,2	1	5,4	0	1,9	10,50	1
Gazpacho andaluz	1,51	2,15	22,96	1,01	13,62	41,25	1
Otras verduras (alcachofa, puerro, cardo, apio)	1,1	5,67	7,8	1	5,57	21,14	1
Cebolla	0,3	1,3	2,6	0	2,8	7,00	1
Ajo	2,7	0	2,6	12,9	0	18,20	1
Perejil	0,2	2,3	3,1	0	1,8	7,40	1
Setas, níscalos, champiñones						35,00	2
PATATAS							
Patatas fritas comerciales						122,50	2
Patatas fritas caseras						33,00	2
Patatas asadas o cocidas						4,80	2,3
Patatas crudas	0,1	0,6	3,4	0	4,1	8,20	1
FRUTAS							
Naranja, pomelo, mandarina	3,6	1,25	18,65	0,2	2,9	26,60	1
Plátano	1,8	2,3	13,3	0,1	2,7	20,20	1
Manzana, pera	0,6	0,95	12,2	0	0,55	14,30	1
Fresas, fresones	0,7	0,2	8,2	0,1	2,1	11,30	1
Cerezas, picotas, ciruelas	1,35	0,6	15,6	0,05	1,95	19,55	1

^a mg por 100 g de porción comestible

Tabla 3. Contenido de fitosteroles de los alimentos utilizados en la cuantificación de la ingesta^a -cont.-

ALIMENTO	Campesterol	Estigmasterol	β-sitosterol	Estigmasteranol	Otros	Fitoesteros totales	Fuente
FRUTAS -cont.-							
Melocotón, albaricoque, nectarina	0,6	2,2	7,35	0,2	2	12,35	1
Sandía	0,6	0,4	2,4	0,2	1	4,60	1
Melón	0,3	0,8	2,3	0,2	1,1	4,70	1
Kiwi	0,2	0,7	4,9	0	1,2	7,00	1
Uvas	2,1	0,3	22,8	0	7,4	32,60	1
Aceitunas	1,3	0,4	27,2	2,5	6,5	37,90	1
Frutas en almíbar o en su jugo						8,50	2
Frutas desecadas (dátiles, uvas pasas, higos secos)						36,90	2
FRUTOS SECOS							
Almendras, cacahuetes, avellanas, pistachos, piñones	10,62	4,65	134,4	4,55	10,97	165,19	1
Nueces	5,3	0	100,2	0,7	25,1	131,30	1
LEGUMBRES							
Lentejas	10	10,8	80,8	8,4	7,2	117,20	1
Alubias (pintas, blancas o negras)	4	35,2	56,3	1	11,5	108,00	1
Garbanzos	12,4	8,3	84,1	10,5	5,4	120,70	1
Guisantes, habas						29,70	3
CEREALES							
Pan blanco	7,7	1,1	26,1	3,9	3,3	42,10	1
Pan negro, integral o cereales						49,80	
Cereales desayuno (maíz, trigo, mezcla de varios)						60,40	4
Cereales integrales (muesli, avena, all-bran)						70,80	
Arroz blanco	4,6	3	19,8	0	1,3	28,70	1
Pasta (fideos, macarrones, espaguetis, otras)						49,30	4

^a mg por 100 g de porción comestible

Tabla 3. Contenido de fitosteroles de los alimentos utilizados en la cuantificación de la ingesta^a -cont.-

ALIMENTO	Campesterol	Estigmasterol	β-sitosterol	Estigmastanol	Otros	Fitoesteroles totales	Fuente
ACEITES Y GRASAS							
Aceite de oliva	6,2	5,2	121	4,2	99,5	236,10	1
Aceite de oliva virgen	6,3	2,4	158,5	3,1	89,6	259,90	1
Aceite de oliva orujo	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1
Aceite de maíz						875,75	5,6
Aceite de girasol	36,4	8,2	219,3	10,6	217,9	492,40	1
Aceite de soja						275,00	5,6
Mezcla de anteriores						427,78	
Margarina (80% grasa, mezcla varios aceites)						334,00	2,6
SALSAS							
Mayonesa comercial						163,90	2
Salsa de tomate frito, ketchup						9,20	2
BEBIDAS							
Zumo naranja natural						9,10	2
Zumos natural otras frutas						7,90	2
Zumos frutas embotellados						12,00	2
PRECOCINADOS							
Croquetas, empanadillas, precocinados						32,60	2
Sopas y cremas de sobre						15,40	2
Pizza (media 6 tipos)						28,76	
SNACKS							
Snacks (palomitas)						183,50	2
BOLLERIA Y PASTERIA							
Galletas tipo María						39,00	2
Galletas integrales o de fibra (media varias)						66,95	2

^a mg por 100 g de porción comestible

Tabla 3. Contenido de fitosteroles de los alimentos utilizados en la cuantificación de la ingesta^a -cont.-

ALIMENTO	Campesterol	Estigmasterol	β-sitosterol	Estigmastanol	Otros	Fitoesteroles totales	Fuente
BOLLERIA Y PASTERLERIA -cont.-							
Galletas con chocolate						91,20	2
Repostería y bizcocho casero (media varios)						53,10	2
Croissant, ensaimada, pastas de té, etc (media varios)						27,00	2
Donuts						84.8	2
Magdalenas (media varias)						49,50	2
Pasteles (media chocolate, nata, frutas)						12,16	2
Churros, porras y similares					sin datos		—
Chocolates y bombones (media blanco, con leche, frutos secos)						87,40	2
Cacao en polvo o soluble						67,20	2
Turrón					sin datos		—
Mantecados, mazapán					sin datos		—
Mermeladas						7,40	2

^a mg por 100 g de porción comestible

FUENTES:

1. Jimenez-Escrig A, Santos-Hidalgo AB, Saura-Calixto F. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. J Agric Food Chem. 2006;54(9):3462-3471.
2. National Institute for Health and Welfare. Fineli®-Finnish Food Composition Database. <http://www.fineli.fi/foodlist.php?lang=en>.
3. Piironen V, Toivo J, Puupponen-Pimiä R, Lampi AM. Plant sterols in vegetables, fruits and berries. J Sci Food Agric. 2003;83:330-337.
4. Piironen V, Toivo J, Lampi AM. Plant sterols in cereals and cereal products. Cereal Chemistry. 2002;79:148-154.
5. Salminen R. Kasvisterolit sekä kolesterolit ravintorasvoissa. Helsingin yliopisto, EKT-sarja. 1997;1098.
6. United States Department of Agriculture. National Nutrient Database. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.

4. EVALUACIÓN DEL PERFIL BIOQUÍMICO Y MARCADORES DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL EN SUERO

Para completar los datos necesarios para el estudio, de cada paciente se obtuvo una muestra de sangre por punción de vena antecubital no traumática en posición sentada durante más de 5 minutos y tras haber permanecido en ayunas al menos 12 horas. Se utilizaron sistemas de extracción al vacío, realizando la separación mediante centrifugación de los elementos celulares. Una vez codificadas las muestras de suero, se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis. Se minimizaron los factores de variación preanalítica teniendo en cuenta las medidas adecuadas para su control recomendadas por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica.

4.1. DETERMINACIONES DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Los análisis de parámetros bioquímicos de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital San Jorge de Huesca. Todas las técnicas utilizadas en este laboratorio están sometidas a un programa de calidad que incluye el procesamiento de controles de calidad internos y externos de carácter nacional e internacional.

Los parámetros analizados fueron los siguientes: glucosa, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), creatinina, ácido úrico, colesterol total (c-total), colesterol ligado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), triglicéridos (TG), hormona estimulante del tiroides (TSH), insulina, apolipoproteína A1 (apoA1), apolipoproteína B (apoB), lipoproteína (a) (Lp(a)), homocisteína y proteína C reactiva ultrasensible (HsPCR).

Las determinaciones de glucosa, ALT, AST, creatinina, ácido úrico, c-total, c-HDL y TG se realizaron en un autoanalizador SYNCHRON®

DX800 (Beckman Instruments) mediante kits de reactivos comerciales específicos proporcionados por Beckman Instruments. Por otro lado, las determinaciones de TSH e insulina se llevaron en un autoanalizador de inmunoensayo IMMULITE 2000 (Siemens) mediante kits de reactivos comerciales específicos proporcionados por Siemens mientras que las determinaciones de apoA1 y apoB, Lp(a), homocisteína y HsPCR se efectuaron en un autoanalizador nefelométrico IMAGE® (Beckman Instruments) utilizando nefelometría cinética y anticuerpos comerciales específicos suministrados por Beckman Instruments.

4.1.1. Determinaciones con el autoanalizador SYNCHRON® DX800

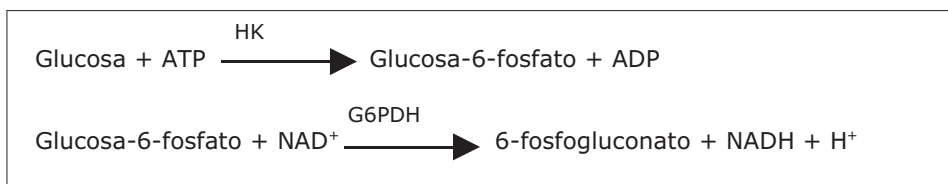
El procedimiento es el mismo para todos los parámetros bioquímicos. Utilizando kits de reactivos comerciales específicos, el sistema dispensa de forma automática los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en una cubeta. Tras producirse la reacción, el sistema controla el cambio de absorbancia a una determinada longitud de onda que es dependiente del compuesto químico analizado. Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la concentración del mismo.

A continuación se describen los componentes de los kits de reactivos comerciales específicos de estas determinaciones así como sus fundamentos según la información que les acompaña.

4.1.1.1. Determinación de glucosa

Los valores de glucosa se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de trastornos del metabolismo de los carbohidratos tales como diabetes mellitus, hipoglicemia neonatal e hipoglicemia idiopática y del carcinoma de los islotes pancreáticos.

El kit comercial contiene adenosin-trifosfato (3.8 mmol/L), β -nicotinamida adenina dinucleótido (2.7 mmol/L), hexoquinasa (2.0 KUI/L) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (3.0 KUI/L). Este kit mide la concentración de glucosa mediante un método de punto final a tiempo fijo. En la reacción, la hexoquinasa (HK) cataliza la transferencia de un grupo fosfato del adenosin-trifosfato (ATP) a glucosa y forma adenosin-difosfato (ADP) y glucosa-6-fosfato. Luego, la glucosa-6-fosfato se oxida a 6-fosfogluconato con la reducción concomitante de β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) a β -nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) por la acción catalítica de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).



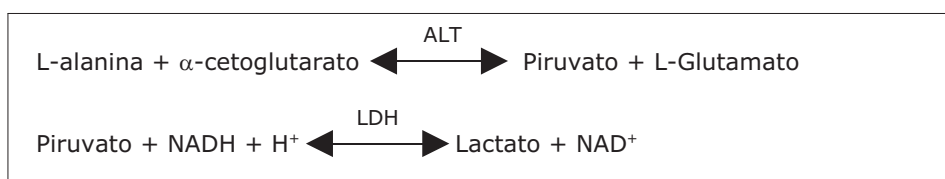
El cambio de absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

4.1.1.2. Determinación de alanina aminotransferasa (ALT)

Los valores de ALT se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades hepáticas y cardíacas.

El kit comercial contiene α -cetoglutarato (16 mmol/L), lactato deshidrogenasa (> 2300 UI/L), L-alanina (500 mmol/L), tampón Tris (97 mmol/L) y NADH (0.18 mmol/L). Este kit mide la actividad de la ALT mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la ALT cataliza la transaminación reversible de L-alanina y α -cetoglutarato a piruvato y L-glutamato. Luego, el piruvato se reduce a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) con la oxidación concomitante de NADH a NAD^+ .

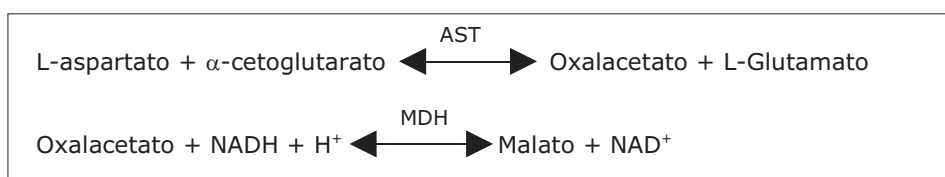
El cambio de absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de ALT en la muestra.



4.1.1.3. Determinación de aspartato aminotransferasa (AST)

Los valores de AST se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades hepáticas y cardíacas.

El kit comercial contiene α -cetoglutarato (16 mmol/L), malato deshidrogenasa (> 600 UI/L), L-aspartato (218 mmol/L) y NADH (0.18 mmol/L). Este kit mide la actividad de la AST mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la AST cataliza la transaminación reversible de L-aspartato y α -cetoglutarato a oxaloacetato y L-glutamato. Luego, el oxaloacetato se reduce a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) con la oxidación concomitante de NADH a NAD^+ .



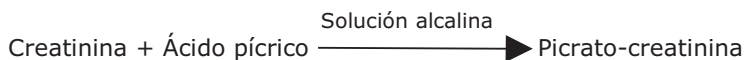
El cambio de absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de ALT en la muestra.

4.1.1.4. Determinación de creatinina

Los valores de creatinina se usan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades renales.

El kit comercial contiene ácido pícrico (8.1 mmol/L) tamponado a $\text{pH} > 13.3$. Este kit mide la concentración de creatinina mediante un

método cinético de Jaffé. En la reacción, la creatinina se combina con picrato en una solución alcalina y forma un complejo picrato-creatinina de color rojo.

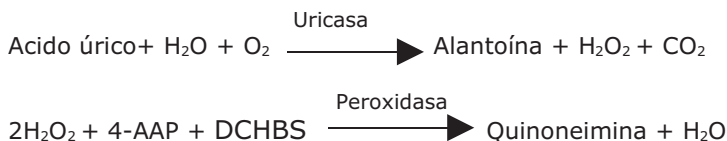


El cambio de absorbancia a 520 nm es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

4.1.1.5. Determinación de ácido úrico

Los valores de ácido úrico se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de numerosos trastornos renales y metabólicos, entre los cuales se encuentran la insuficiencia renal, la gota, la leucemia, la psoriasis, la desnutrición, la falta de alimento u otras enfermedades consuntivas, y en pacientes que reciben drogas citotóxicas.

El kit comercial contiene 4-aminoantipirina (0.85 mmol/L), sulfonato de 3,5 dicloro 2-hidroxi-benzo (3.4 mmol/L), uricasa (240 UI/L) y peroxidasa (961 UI/L). Este kit mide la concentración de ácido úrico mediante un método de punto final a tiempo fijo. En la reacción, el ácido úrico es oxidado por uricasa y forma alantoína y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 reacciona con 4-aminoantipirina (4-AAP) y 3,5-dicloro-2-hidroxibenzo sulfonato (DCHBS) en una reacción catalizada por peroxidasa y produce un producto de color (quinoneimina).

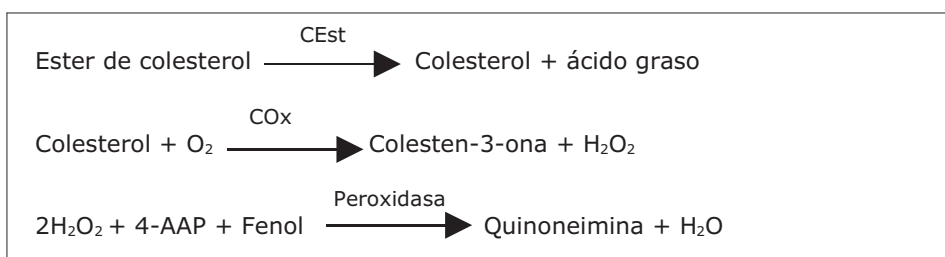


El cambio de absorbancia a 520 nm es directamente proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra.

4.1.1.6. Determinación de colesterol total (c-total)

Los valores de c-total se usan en la evaluación del riesgo de enfermedad coronaria aterosclerótica. Los valores de c-total también se utilizan en el diagnóstico y seguimiento de trastornos metabólicos relacionados con el metabolismo de lípidos y lipoproteínas.

El kit comercial contiene 4-APP (0.28 mmol/L), fenol (8.06 mmol/L), colesterol esterasa (211 UI/L), colesterol oxidasa (216 UI/L) y peroxidasa (6667 UI/L). Este kit mide la concentración de c-total mediante un método de punto final a tiempo fijo. En la reacción, la colesterol esterasa (CEst) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre es oxidado a colesteno-3-ona y H_2O_2 por la colesterol oxidasa (COx). La peroxidasa cataliza la reacción del H_2O_2 con 4-AAP y fenol y produce un producto de color (quinoneimina).



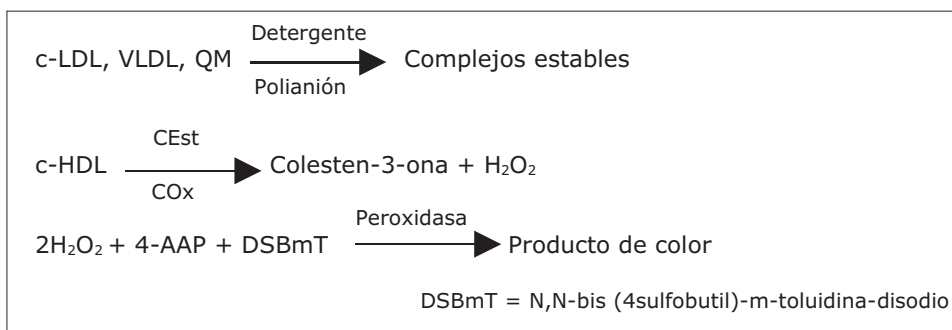
El cambio de absorbancia a 520 nm es directamente proporcional a la concentración de c-total en la muestra.

4.1.1.7. Determinación de colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL)

El c-HDL es inversamente proporcional al riesgo de desarrollar enfermedades de las arterias coronarias.

El kit comercial para el método directo de c-HDL contiene CEst (1250 UI/L), COx (1600 UI/L), peroxidasa (5000 UI/L), polianión (0.1%) y detergente (1.0%). Este método directo es un ensayo homogéneo que no requiere centrifugación ni ningún tratamiento previo fuera de línea.

El método depende de un detergente especial que solubiliza únicamente las partículas de lipoproteína HDL y libera c-HDL para que reaccione con la CEst y la COx en presencia de cromógenos para producir un producto de color. El mismo detergente también inhibe la reacción de las enzimas de colesterol con las lipoproteínas LDL, VLDL y los QM mediante la adsorción a sus superficies. Un polianión contenido en el reactivo mejora la selectividad del ensayo de c-HDL estableciendo enlaces con LDL, VLDL y QM.



El cambio de absorbancia a 560 nm es directamente proporcional a la concentración de c-HDL en la muestra.

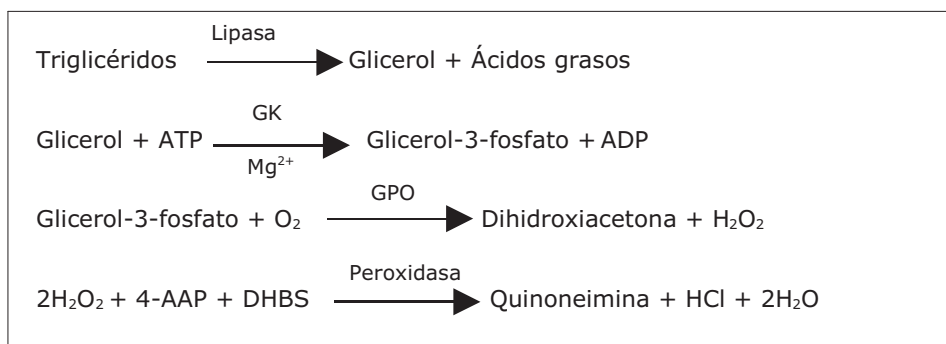
4.1.1.8. Determinación de triglicéridos (TG)

Los valores de TG se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con diabetes mellitus, nefrosis, obstrucción hepática, otros trastornos del metabolismo de lípidos o diversos trastornos endocrinos.

El kit comercial contiene lipasa (93 U/L), ATP (2.52 mmol/L), glicerol quinasa (4 KUI/L), glicerofosfato oxidasa (1.1 KUI/L), 4-AAP (0.71 mmol/L), DCHBS (1.54 mmol/L) y peroxidasa (9 KUI/L). Este kit mide la concentración de TG mediante un método de punto final a tiempo fijo.

Los TG en la muestra son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipasa. Una secuencia de tres pasos enzimáticos

acoplados usando glicerol quinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO) y peroxidasa causa el acoplamiento oxidante del DCHBS con 4-AAP y forma un producto de color (quinoneimina).



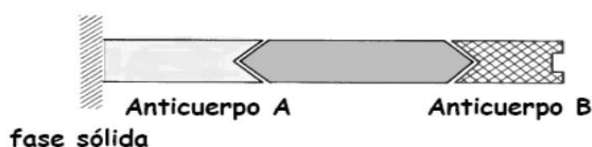
El cambio de absorbancia a 520 nm es directamente proporcional a la concentración de TG en la muestra.

4.1.2. Determinaciones con el autoanalizador IMMULITE 2000®

4.1.2.1. Determinación de la hormona estimulante del tiroides (TSH)

La medida de la TSH circulante se utiliza como un test primario para el diagnóstico diferencial del hipotiroidismo y como ayuda en el seguimiento de la eficacia de la terapia sustitutiva con hormona tiroidea.

El "IMMULITE 2000 TSH Tercera Generación" es un ensayo inmunométrico con dos sitios de unión quimioluminiscente en fase sólida. Utiliza anticuerpos anti-TSH que reaccionan con las muestras y, tras un periodo de incubación, se genera una señal que permite al equipo proporcionar las concentraciones de la TSH.



4.1.2.2. Determinación de insulina

La insulina humana es una hormona producida por las células β del páncreas y cuya función es ser el principal regulador del almacenamiento y la producción de hidratos de carbono. Su secreción se estimula por un aumento de la cantidad de glucosa en sangre a lo que le sigue un descenso de su nivel al mismo tiempo que disminuye el nivel de glucosa. En muchas situaciones, especialmente en casos de insulinoma y diabetes, esta relación se deteriora.

El "Insulina IMMULITE 2000" es un inmunoanálisis quimioluminiscente inmunométrico en fase sólida marcado con enzima. Utiliza anticuerpos anti-insulina que reaccionan con las muestras y, tras un periodo de incubación, se añade el sustrato quimioluminiscente generándose una señal proporcional a la enzima unida que permite al equipo proporcionar las concentraciones de insulina.

4.1.3. Determinaciones con el autoanalizador nefelométrico IMAGE®

El procedimiento es el mismo para todos los parámetros bioquímicos. Utilizando kits de reactivos comerciales específicos, el sistema dispensa de forma automática los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en una cubeta y mide la tasa de incremento de la dispersión de la luz de partículas suspendidas en solución como resultado de complejos formados durante la reacción antígeno-anticuerpo. Este valor es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la concentración del mismo.

Los parámetros bioquímicos determinados por este método se describen a continuación.

4.1.3.1. Determinación de Apolipoproteína A1 (apoA1)

La apoA1 es el principal componente de las HDL. Esta apolipoproteína es un activador de la enzima de lecitina-colesterol-aciltransferasa

(LCAT) y elimina el colesterol libre de los tejidos extrahepáticos. Las mediciones de los valores de apoA1 son útiles en el diagnóstico de las enfermedades de las arterias coronarias.

El kit comercial contiene el anticuerpo específico para apoA1 de manera que se produce la reacción:



4.1.3.2. Determinación de apolipoproteína B (ApoB)

La apoB es el principal componente de las LDL y también constituye alrededor del 40% de la mitad proteínica de las VLDL y de los QM. La apoB es responsable del transporte y eliminación de lípidos. La medición de la apoB ayuda a identificar enfermedades de las arterias coronarias.

El kit comercial contiene el anticuerpo específico para apoB de manera que se produce la reacción:



4.1.3.3. Determinación de Lipoproteína (a) (Lp(a))

Los valores de Lp(a) tienen importancia diagnóstica cuando se hacen evaluaciones de enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas en poblaciones específicas.

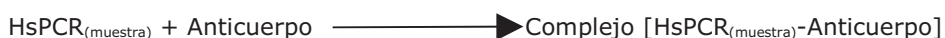
El kit comercial contiene el anticuerpo específico para Lp(a) de manera que se produce la reacción:



4.1.3.4. Determinación de proteína C reactiva ultrasensible (HsPCR)

Los valores de HsPCR facilitan la evaluación de estrés, trauma, infecciones, inflamación, cirugía y enfermedades relacionadas. Los ensayos de HsPCR cardíaco están indicados como adyuvantes para identificar y estratificar individuos con riesgo futuro de enfermedad cardiovascular. Conjuntamente con una evaluación clínica tradicional de síndromes coronarios agudos, HsPCR puede ser útil como marcador independiente de la prognosis de eventos recurrentes en pacientes con enfermedad coronaria estable o síndrome coronario agudo.

El kit comercial contiene el anticuerpo específico para HsPCR de manera que se produce la reacción:



4.1.4. Determinación del colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL)

La cuantificación de la concentración de c-LDL se realizó mediante estimación según el método descrito por Friedwald *et al* [207]. Según este método, cuando las concentraciones plasmáticas de triglicéridos son inferiores a 3.39 mmol/L (300 mg/dL) la concentración de c-LDL se puede estimar a partir de los valores previamente determinados de c-total, c-HDL y TG mediante la fórmula:

$$\text{c-LDL} = \text{c-total} - \text{c-HDL} - (\text{TG}/5)$$

4.2. DETERMINACIONES DE LOS MARCADORES INDIRECTOS DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL

Para la evaluación del metabolismo del colesterol, es decir, de la absorción y de la síntesis del mismo se utilizó el método basado en la medida de las concentraciones séricas de esteroides precursores de colesterol y de fitoesteroides por tratarse de una técnica validada para

su aplicación en estudios poblacionales cuando se busca responder a cuestiones relacionadas con cambios en la síntesis o en la absorción entre subgrupos [168] como es el caso que nos ocupa.

Todas las determinaciones fueron realizadas por el grupo de Hipertensión, Lípidos y Riesgo Cardiovascular del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer, IDIBAPS, y del CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, CIBERobn, en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clinic de Barcelona.

4.2.1. Marcadores indirectos utilizados

Los esteroides propuestos como marcadores indirectos de síntesis de colesterol fueron lanosterol y lanosterol. El fundamento para usar los niveles plasmáticos de estos compuestos como indicadores de síntesis se basa en la aceptación de que estos compuestos pasan a las lipoproteínas plasmáticas a un ritmo proporcional al de su formación en la vía de síntesis de colesterol [69].

Como marcadores indirectos de absorción de colesterol, los esteroides utilizados fueron sitosterol, estigmasterol y campesterol. El fundamento para usar los niveles plasmáticos de estos compuestos se basa en la aceptación de que el proceso de absorción del colesterol y el de estos compuestos es similar y, por tanto, sus concentraciones plasmáticas son reflejo de la eficiencia de absorción intestinal [65].

4.2.2. Fundamento del método

Las concentraciones plasmáticas de los esteroides utilizados como marcadores indirectos se analizaron utilizando una modificación del método descrito previamente por Heinemann *et al* [120] convenientemente validada.

El método se basa en la liberación de los esteroides mediante hidrólisis alcalina, extracción con solventes orgánicos y derivatización en

compuestos trimetilsilil para, posteriormente, separarlos mediante cromatografía de gases capilar.

4.2.3. Protocolo experimental

El protocolo experimental consta de varias etapas que se describen a continuación.

Etapla 1: Hidrólisis alcalina y extracción con solventes orgánicos de las muestras de suero

Se añade epicoprostanol (2 µg) al suero (0.1 mL) como patrón interno. A continuación, se lleva a cabo la hidrólisis alcalina mediante una solución hidroalcohólica de hidróxido potásico. Una vez liberados los esteroides, se procede a la extracción de los mismos con hexano. Las dos fases orgánicas obtenidas tras la centrifugación de los productos obtenidos de las dos extracciones consecutivas con hexano se combinan y se evaporan bajo atmósfera de nitrógeno.

Etapla 2: Derivatización a trimetilsilil éteres

La sililación es el procedimiento de derivatización más ampliamente utilizado para el análisis mediante cromatografía de gases [208,209]. En él, un hidrógeno activo es reemplazado por un grupo alquil-silil, frecuentemente trimetil-silil, formándose los denominados derivados silil los cuales son, generalmente, más volátiles, menos polares y más estables térmicamente que los compuestos originales. La reacción que se produce se muestra en la Figura 3. El reactivo de elección para llevar a cabo la derivatización es BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) con 1% TMCS (trimetilclorosilano).

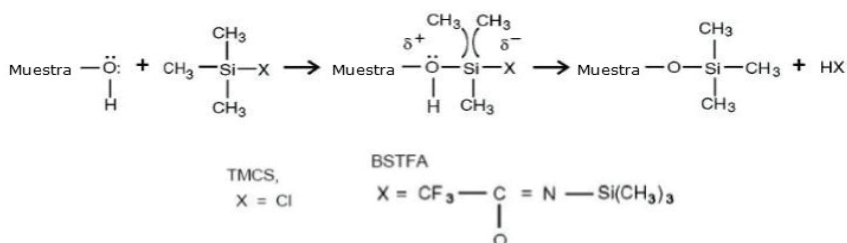


Figura 3. Reacción de derivatización

En el caso que nos ocupa, para derivatizar los esteroides se añaden 100 μL de una solución de BSTFA/Piridina 5:1 (v/v) al producto obtenido en la fase anterior y se incuba durante 1 hora a 65°C en baño seco.

Etapas 3: Cromatografía de gases

Una vez a temperatura ambiente, se procede a la evaporación bajo atmósfera de nitrógeno y el residuo seco obtenido se disuelve con n-isooctano. Esta disolución se transfiere a los viales de cromatografía y se procede a la inyección al cromatógrafo.

Los esteroides se cuantifican mediante una columna capilar TRACER® TR-STEROLS 30-m (Tecknokroma, Barcelona, España) en un equipo de cromatografía de gases Perkin Elmer GC Autosystem™ (Norwalk, CT, EEUU) equipado con detector de ionización de llama.

En cada serie de muestras analizadas se incluye una muestra de patrones. Esta muestra contiene 2 μg epicoprostanol (añadidos como disolución en etanol) como patrón interno y la misma cantidad de cada uno de los compuestos que se pretende cuantificar (i.e. latosterol, lanosterol, sitosterol, estigmasterol y campesterol). El proceso al que es sometida esta muestra de patrones es igual que las muestras de suero, excepto la etapa de hidrólisis alcalina y extracción con solventes que en este caso no es necesaria.

Etapas 4: Cálculos para la determinación de la concentración de los esteroides

El cálculo de la concentración de esteroides se realiza utilizando epicoprostanol como estándar interno por curva de calibración punto a punto. El área correspondiente al pico de cada esteroide se divide por el área correspondiente de epicoprostanol y se multiplica por la cantidad de éste añadida a la muestra y por el factor de respuesta correspondiente a cada esteroide. Estos factores de respuesta se calculan a partir de la muestra de patrones que se incluye en cada

serie de muestras analizadas. Igualmente, en cada serie se incluye una muestra correspondiente a un *pool* de sueros de pacientes normolipémicos que permite observar variaciones analíticas inter-ensayo. Todos los cálculos de concentración se realizan automáticamente mediante un programa informático de integración (TotalChrom Workstation, versión 6.2.).

Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo fueron 5.0 y 3.2% para latosterol, 14.9 y 2.0% para lanosterol, 1.9 y 1.6% para campesterol, 6.7 y 4.6% para estigmasterol y 2.0 y 1.8% para sitosterol, respectivamente.

5. ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS CON LAS VARIABLES DEL ESTUDIO

5.1. VARIABLES CLÍNICAS Y ANTROPOMÉTRICAS

A partir de la historia clínica se obtuvieron los datos de edad, sexo y hábito tabáquico así como la PAS y la PAD.

Como variables antropométricas se utilizaron el IMC y el perímetro de cintura.

5.2. VARIABLES DIETÉTICAS

5.2.1. Grupos de alimentos

Las cantidades de cada uno de los alimentos incluidos en el CFC se utilizaron para obtener las cantidades ingeridas de los principales grupos de alimentos y que sirven para tipificar el patrón dietético. Así, se calculó la cantidad ingerida de los siguientes grupos de alimentos:

- Aceites vegetales, distinguiendo entre aceite de oliva y aceite de semillas.
- Grasas, incluyendo manteca, mantequilla y margarinas.
- Frutos secos.
- Frutas, incluyendo las frutas desecadas.

- Hortalizas.
- Legumbres.
- Cereales y derivados, distinguiendo entre integrales y refinados, y patatas.
- Leche y derivados, distinguiendo entre enteros y desnatados.
- Carne y productos cárnicos, distinguiendo entre magros y grasos.
- Productos de la pesca, distinguiendo entre pescado blanco, pescado azul, marisco y conservas.
- Huevos.
- Dulces.
- Platos precocinados.
- *Snacks*.
- Salsas y condimentos.
- Zumos, bebidas refrescantes y bebidas alcohólicas (vino, cerveza y destiladas).

5.2.2. Energía, nutrientes y otros componentes de la dieta

Además de la cantidad de energía, en el estudio se tuvieron en cuenta las siguientes variables cuantificadas a partir de los resultados del CFC:

- Hidratos de carbono, proteína, lípidos totales, AGMI, AGPI y AGS, así como colesterol dietético.
- Ratio ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados (AGI/AGS), calculado como el cociente entre la suma de AGMI + AGPI y AGS.

- Ratio ácidos grasos monoinsaturados/ácidos grasos saturados (AGMI/AGS), calculado como el cociente entre AGMI y AGS.

- Fibra total y fibra soluble.

- Alcohol.

- Vitaminas: A, D, E, tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃), piridoxina (B₅), fólico (B₉), cobalamina (B₁₂) y C.

- Minerales: sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, yodo, selenio y cinc.

5.2.3. Fitoesteroles

A partir de los resultados del CFC, se obtuvieron las ingestas de fitoesteroles totales directamente a partir de los valores indicados en la Tabla 3.

Para cuantificar las aportaciones de los diferentes fitoesteroles dietéticos (estigmastanol, estigmasterol, β -sitosterol, campesterol y el denominado "otros fitoesteroles") fue necesario realizar una estimación. Esto fue debido a que solamente se disponía de datos individuales para los alimentos incluidos en las tablas españolas y no así para los alimentos cuyos valores se obtuvieron de las bases de datos extranjeras, las cuales ofrecían exclusivamente datos totales. Esta estimación se hizo al considerar que la mayoría de los alimentos se encontraban representados en las tablas españolas, las cuales como hemos dicho proporcionan datos de fitoesteroles individuales, y que las contribuciones de cada uno de los fitoesteroles al contenido total de los alimentos es relativamente constante. Para ello se procedió como sigue. En primer lugar, para cada uno de los individuos se cuantificó la ingesta de los fitoesteroles individuales teniendo en cuenta las cantidades aportadas por los alimentos de los que se disponía de datos. Lógicamente, la suma de estas cantidades no se correspondía con el valor de fitoesteroles totales calculado

inicialmente, al no haberse considerado todos los alimentos. Por ello, a continuación, se calcularon las contribuciones relativas de los diferentes fitoesteroles a esta suma parcial. A partir de estos porcentajes se estimaron las ingestas de fitoesteroles individuales del siguiente modo: $\text{Ingesta fitoesterol} = \text{Porcentaje fitoesterol} \times \text{Ingesta de fitoesteroles totales}$.

Finalmente, puesto que varios autores [107,156] postulan que el valor del cociente entre fitoesteroles totales ingeridos y colesterol dietético, ambos en mg/día, puede ser un indicador de dieta saludable, se realizó este cálculo denominándolo ratio fitoesteroles totales/colesterol.

5.2.4. Adherencia al patrón de Dieta Mediterránea

El grado de adherencia al patrón de DM se estimó empleando el método propuesto por Trichopoulou *et al* (*Modified Mediterranean Diet Scale*) [10]. Como se ha explicado en la Introducción, este método emplea una escala en la que intervienen 9 componentes: hortalizas, legumbres, frutas y frutos secos, cereales, pescado, carne y productos cárnicos, productos lácteos, alcohol y el ratio AGMI/AGS (el cual se emplea para evaluar la calidad de la ingesta de grasas). A cada uno de los componentes se les asignó el valor 0 ó 1 empleando como puntos de corte las medianas específicas de consumo según el sexo para todos los componentes excepto para el alcohol cuyo tratamiento fue diferente como se explica más adelante. Así, para los componentes considerados integrantes del patrón de DM (hortalizas, frutas y frutos secos, legumbres, cereales y patatas, pescado y ratio AGMI/AGS), cuando el consumo fue mayor o igual que la mediana específica de consumo según el sexo se les asignó el valor 1, mientras que cuando el consumo fue menor se les asignó el valor 0. Por el contrario, para los componentes considerados contrarios al patrón de DM (carnes y productos cárnicos y productos lácteos), cuando el consumo fue menor que la mediana específica de consumo según el

sexo se les asignó el valor 1, mientras que cuando el consumo fue mayor o igual se les asignó el valor 0. Finalmente, para el consumo de alcohol se asignó el valor 1 a los hombres cuyo consumo estuvo entre 10 y 50 g/día y a las mujeres cuyo consumo estuvo entre 5 y 25 g/día y al resto se les asignó el valor 0.

La adherencia al patrón de DM se considera máxima cuando se obtiene un valor de 9 y nula cuando el valor es de 0.

5.3. VARIABLES BIOQUÍMICAS

5.3.1. Variables bioquímicas generales

Para confirmar el cumplimiento de los criterios de inclusión del estudio, los parámetros bioquímicos estudiados fueron: glucosa, insulina, transaminasas hepáticas (ALT y AST), creatinina, ácido úrico, TSH, Lp(a) y HsPCR. Los valores de referencia que se tuvieron en cuenta fueron los utilizados habitualmente por el Laboratorio de Bioquímica del Hospital San Jorge de Huesca.

5.3.2. Perfil lipídico y cocientes lipídicos

Además de los valores de c-total, c-LDL, C-HDL, TG, ApoA1, ApoB se calcularon los cocientes: c-total/c-HDL, c-LDL/c-HDL y apoB/apoA1.

La relación c-total/c-HDL, denominada índice aterogénico o de Castelli, y la relación c-total/c-HDL constituyen indicadores de riesgo cardiovascular con un valor predictivo mayor que el de los componentes valorados individualmente. De este modo, los individuos con un ratio c-total/c-HDL o c-LDL/c-HDL alto tienen un riesgo cardiovascular mayor debido a la existencia de un desequilibrio entre el colesterol vehiculizado por las lipoproteínas aterogénicas (c-LDL) y las protectoras (c-HDL). Del mismo modo, la relación apoB/apoA1 es también de gran valor para la detección de riesgo aterogénico puesto que relaciona la apolipoproteínas que constituye la mayor parte del

contenido proteico de las partículas LDL (apoB) con la de las HDL (apoA1) [210].

5.3.3. Marcadores indirectos de la tasa de síntesis de colesterol

Para obtener los marcadores indirectos de la tasa de síntesis de colesterol, los valores de concentraciones plasmáticas de latosterol y lanosterol obtenidas para cada individuo se dividieron por la concentración plasmática de c-total correspondiente para eliminar la influencia de las variaciones en las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas. A los valores obtenidos se les denominó ratio latosterol-colesterol y ratio lanosterol-colesterol, respectivamente.

5.3.4. Marcadores indirectos de la tasa de absorción de colesterol

De igual forma, las concentraciones plasmáticas de sitosterol, campesterol y estigmasterol obtenidas para cada individuo se dividieron por la concentración plasmática de c-total correspondiente. A los valores obtenidos se les denominó ratio sitosterol-colesterol, ratio campesterol-colesterol y ratio estigmasterol-colesterol, respectivamente.

Puesto que estos ratios se habían obtenido en individuos con diferentes ingestas de fitoesteroles no tenían validez como marcadores indirectos de absorción, tal y como queda descrito en la Introducción, si no se eliminaba el efecto que la dieta tiene sobre estos valores.

Por ello, en aquellos casos en los que existía una relación lineal entre las concentraciones séricas y las cantidades ingeridas, se propuso una corrección adicional con el objeto de eliminar el efecto que esta cantidad ingerida tenía sobre dichas concentraciones séricas. La corrección consistió en dividir el valor del ratio fitoesterol-colesterol por su respectiva ingesta dietética y el valor obtenido se denominó ratio fitoesterol-colesterol corregido. Estos últimos fueron los valores

utilizados como marcadores indirectos de la tasa de absorción de colesterol.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las ingestas dietéticas fueron ajustadas para la ingesta energética total usando el método de residuales descrito por Willet [211].

Antes de cualquier análisis, se comprobó la normalidad de las variables de estudio mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov junto a la corrección de la significación de Lilliefors y la prueba de Shapiro-Wilk. Además, se representaron los datos en diagramas de caja (*box-plot*) para la detección de valores extremos considerándose como tales aquellos casos con valores > 3 veces la longitud de la caja respecto al valor para el percentil 75.

En los análisis descriptivos, las variables continuas se indicaron como media (desviación estándar) si la distribución era normal o como mediana [percentil 25-percentil 75] en el caso de distribuciones no normales, mientras que las variables categóricas se indicaron como cantidad (porcentaje).

Se realizó un análisis descriptivo de las variables recopiladas en la historia clínica y en las pruebas bioquímicas comparando entre sexos. De igual modo se procedió con todas las variables dietéticas estudiadas. Además, partiendo de la ingesta total de fitoesteroles obtenida de la encuesta dietética, la población se dividió en terciles de ingesta de fitoesteroles y se realizó un análisis descriptivo de las variables dietéticas comparando entre terciles. Las comparaciones en los análisis descriptivos se realizaron mediante pruebas ANOVA o Kruskal-Wallis, si las variables eran continuas, o la prueba chi-cuadrado, cuando las variables eran categóricas. Para aquellas variables en las que estas pruebas indicaron diferencias estadísticamente significativas se realizaron pruebas de comparación

2 a 2 mediante la prueba T de Student para muestras independientes o la prueba U de Mann-Whitney, según el caso.

La asociación entre ingesta de fitoesteroles categorizada por terciles con los niveles séricos de c-total, c-LDL, c-HDL y TG se estableció mediante un modelo de regresión lineal multivariable para las covariables sexo, edad, IMC, ratio AGI/AGS e ingesta energética total.

Del mismo modo, la asociación entre ingesta de fitoesteroles categorizada por terciles con los marcadores indirectos de síntesis y absorción de colesterol se estableció mediante un modelo de regresión lineal multivariable para las covariables sexo, edad e IMC.

En el caso de variables sesgadas, antes de llevar a cabo los cálculos de regresión lineal multivariable se realizó una transformación logarítmica para normalizar la distribución.

Las correlaciones entre variables se establecieron mediante el coeficiente de correlación Rho de Spearman.

La relación entre la ingesta de fitoesteroles y la adherencia al patrón de DM y entre las concentraciones séricas de fitoesteroles y sus respectivas ingestas dietéticas se establecieron mediante regresión lineal simple.

Todas las comparaciones fueron de dos colas. Un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo con SPSS versión 15.0 para WINDOWS (SPSS Inc. Chigago, IL).

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

El número de voluntarios que aceptaron participar en el estudio fue de 112. Ninguno de ellos presentaba antecedentes de enfermedad cardiovascular, hipertensión y/o dislipemias así como tampoco causas de dislipemias secundarias conocidas ni consumían fármacos que pudieran alterar el perfil lipídico ni alimentos suplementados con fitoesteroles. Sin embargo, al analizar las variables antropométricas fue necesario descartar a 9 por tratarse de individuos obesos. De los 103 restantes, se excluyeron 16 mujeres por menopausia y 2 por presentar valores extremos en los marcadores indirectos de metabolismo de colesterol. No se excluyó a ningún participante por valores perdidos de variables de interés ni por ingestas extremas de energía total. En conclusión, la población de estudio estuvo compuesta por 85 individuos (ver Figura 1).

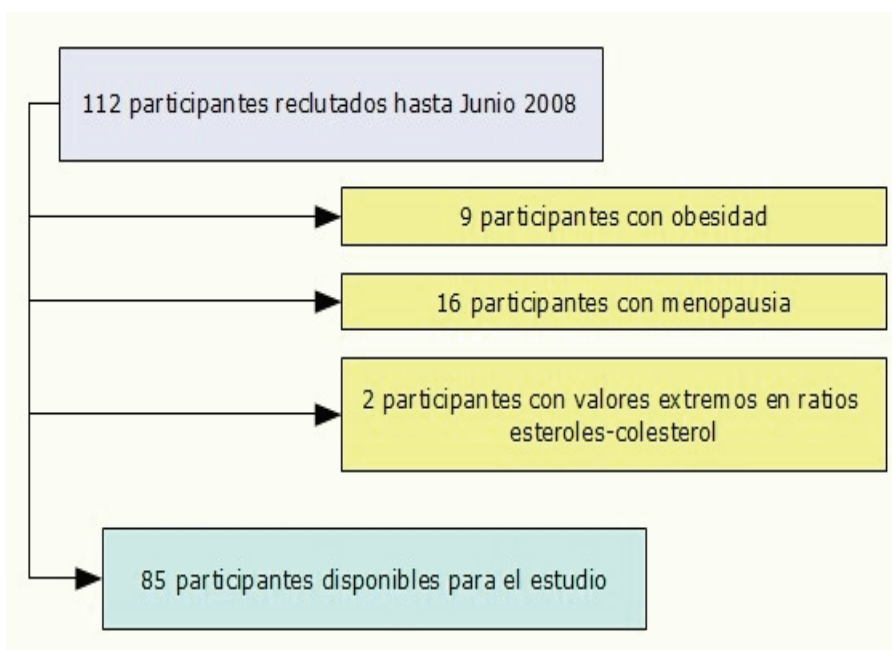


Figura 1. Criterios de inclusión y exclusión

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO

En la Tabla 1 se presentan los resultados de las variables recopiladas en la historia clínica.

Tabla 1. Características generales de los sujetos del estudio^a

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
N ^b	85(100)	39(46)	46(54)	
Edad, años	42[25-48]	47[36-53]	34[21-45]	0.000
IMC, Kg/m ²	23.7(3.2)	25.2(3.2)	22.5(2.6)	0.000 ^c
Perímetro cintura, cm	84(10)	90(9)	78(8)	0.000 ^c
PAD, mm Hg	72(9)	74(8)	70(10)	0.020 ^c
PAS, mm Hg	117(14)	124(14)	111(12)	0.000 ^c
Fumadores actuales ^b	11(13)	7(18)	4(9)	0.104 ^d

Abreviaturas: IMC, Índice de Masa Corporal; PAD, Presión arterial diastólica; PAS, Presión arterial sistólica.

^aValores expresados como media(SD) excepto ^bnúmero(%) o mediana[percentil25 – percentil75].

Valor *p* calculado mediante Kruskal-Wallis o ^cANOVA para variables continuas y mediante ^dchi² de Pearson para variables categóricas.

Como se puede apreciar, se trataba de una muestra de adultos con normopeso con una mediana de edad de 42 años. La proporción de hombres y de mujeres fue similar. Al comparar por sexos, el grupo de mujeres era significativamente más joven que el de hombres y presentaba valores de IMC y de perímetro de cintura significativamente inferiores. Aunque también existieron diferencias significativas en cuanto a la presión arterial, en ambos grupos la media se encontró dentro de los valores normales, PAS = 120-129 mm Hg y PAD = 80-84 mm Hg [31]. Por último, sólo un bajo porcentaje de la muestra fueron fumadores habituales.

1.2. PERFIL BIOQUÍMICO GENERAL DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO

En la Tabla 2 se recogen los resultados de los marcadores bioquímicos generales utilizados para confirmar el cumplimiento de los criterios de inclusión en el estudio.

Tabla 2. Perfil bioquímico general de los sujetos del estudio^a

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
Glucosa, mg/dL	93(11)	98(11)	90(10)	0.001 ^b
Insulina, µU/mL	4.00[2.54-5.85]	4.97[3.08-6.80]	3.48[1.99-5.25]	0.016
TSH, µU/mL	1.70[1.30-2.36]	1.53[1.30-1.86]	2.03[1.32-2.80]	0.022
Creatinina, mg/dL	0.9[0.8-1.0]	1.0[0.9-1.1]	0.8[0.7-0.8]	0.000
Ác.úrico, mg/dL	4.9(1.2)	5.8(1.1)	4.2(0.9)	0.000 ^b
ALT, UI/L	12[9-16]	13[10-17]	10[8-13]	0.004
AST, UI/L	18[14-21]	20[8-13]	17[13-20]	0.024
Lp(a), mg/dL	10.2[5.1-24.9]	9.3[4.0-19.4]	12.4[6.6-30.4]	0.276
HsPCR, mg/dL	0.07[0.03-0.20]	0.07[0.04-0.27]	0.07[0.03-0.16]	0.383

Abreviaturas: TSH, Hormona estimulante del tiroides; ALT, Alanina aminotransferasa; AST, Aspartato aminotransferasa; ; Lp(a), Lipoproteína a; HsPCR, Proteína C reactiva de alta sensibilidad.
^aValores expresados como media(SD) o mediana[percentil25 – percentile75].
Valor *p* calculado mediante Kruskal-Wallis o ^b ANOVA.

Todos los sujetos del estudio presentaron unos valores dentro de los rangos adecuados para todos los marcadores según los valores de referencia utilizados habitualmente por el Laboratorio de Bioquímica del Hospital San Jorge de Huesca.

1.3. PERFIL LIPÍDICO DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO

Los resultados para las variables bioquímicas relacionadas con el perfil lipídico analizadas en el estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Perfil lipídico de los sujetos del estudio^a

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
c-total, mmol/L	5.632(1.103)	5.792(0.900)	5.496(1.244)	0.219
c-LDL, mmol/L	3.829(1.080)	4.067(0.791)	3.627(1.247)	0.060
c-HDL, mmol/L	1.376(0.386)	1.244(0.348)	1.489(0.386)	0.003
TG, mmol/L	0.790[0.632-1.072]	0.903[0.700-1.479]	0.700[0.604-0.943]	0.011 ^b
ApoA1, g/L	1.67(0.37)	1.59(0.33)	1.73(0.40)	0.099
ApoB, g/L	0.87(0.26)	1.01(0.27)	0.75(0.16)	0.000
c-total/c-HDL	4.2[3.1-5.5]	5.2[3.8-5.8]	3.5[2.8-4.7]	0.000 ^b
c-LDL/c-HDL	2.8[1.9-4.1]	3.6[2.4-4.4]	2.3[1.6-3.4]	0.001 ^b
ApoB/ApoA1	0.5[0.4-0.6]	0.6[0.5-0.8]	0.4[0.3-0.5]	0.000 ^b

Abreviaturas: ApoA1, Apoproteína A1; ApoB, Apoproteína B.

^aValores expresados como media(SD) o mediana[percentil25 – percentil75].

Valor *p* calculado mediante ANOVA o ^bKruskall-Wallis.

En primer lugar, al comparar los resultados de hombres y mujeres se vio que, aunque los valores de c-total, c-LDL y apoA1 fueron similares, éstas últimas presentaban valores de c-HDL significativamente mayores que los hombres mientras que sus valores para TG, ApoB y ratios c-total/c-HDL, c-LDL/c-HDL y ApoA1/ApoB fueron significativamente menores.

Posteriormente, se realizó una valoración del riesgo cardiovascular que presentaba la muestra de sujetos estudiada según los criterios descritos en la adaptación española de la Guía Europea de Prevención Cardiovascular en la Práctica Clínica [31] y según los criterios para los índices aterogénicos [210].

Teniendo en cuenta los primeros, tanto los hombres como las mujeres del estudio presentaban valores de c-total y c-LDL superiores a los valores objetivo considerados en la citada Guía: c-total ≤ 5.2 mmol/L y c-LDL ≤ 3.4 mmol/L. Sin embargo, los valores de c-HDL y TG se encontraban dentro de los valores adecuados: c-HDL > 1.0 mmol/L para hombres y HDL > 1.2 mmol/L para mujeres y TG < 1.7 mmol/L.

Por otro lado, como ya hemos indicado, la información científica disponible actualmente indica que la valoración del perfil lipídico mediante el uso de índices aterogénicos es una aproximación mejor a la hora de establecer el riesgo cardiovascular. Los ratios c-total/c-HDL y c-LDL/c-HDL constituyen indicadores de riesgo con un valor predictivo superior al de los parámetros aislados utilizados de forma independiente y muy especialmente el primero. A su vez, el ratio ApoB/ApoA1 es también de gran valor a la hora de detectar el riesgo aterogénico y, frecuentemente, superior a los anteriores.

Teniendo en cuenta los criterios recopilados en la Tabla 4 podemos destacar lo siguiente. En el caso de los hombres, la mediana de los índices c-total/c-HDL y c-LDL/c-HDL indicó que hay un número considerable con riesgo cardiovascular mientras que en el caso de las

mujeres toda la muestra se encontró dentro de los valores objetivo. Sin embargo, las medianas para el índice ApoB/ApoA1, en ambos casos, cumplieron con los criterios.

Tabla 4. Criterios para índices aterogénicos [210]

	Cifra de riesgo		Objetivo	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
c-total/c-HDL	> 5.0	> 4.5	< 4.5	< 4.0
c-LDL/c-HDL	> 3.5	> 3.0	< 3.0	< 2.5
ApoB/ApoA1	> 1.0	> 0.9	< 0.9	< 0.8

A continuación, se compararon los valores obtenidos para c-total, c-LDL, c-HDL y TG con los datos para la población española obtenidos en el estudio Dieta y Riesgo de Enfermedad Cardiovascular en España en 1999 (DRECE) [212]. Los resultados, tras estratificar según sexo y rango de edad, se muestran en la Tabla 5.

Para la concentración plasmática de c-total, la mayor parte de los individuos de la muestra se encontraban en el percentil 75 mientras que el 28% (todas ellas mujeres entre 30 y 49 años) se encontraban en el percentil 90. Para la concentración plasmática de c-LDL, aunque un pequeño 6% se encontraba por encima del percentil 95, el resto se clasificó en el percentil 75 (53%) o en el percentil 90 (41%). Cabe destacar que los individuos que se clasificaron en los percentiles superiores fueron mayoritariamente hombres. Finalmente, para las concentraciones de c-HDL y de TG, los valores de plasmáticos de los individuos de la muestra se encontraban en el percentil 75 y percentil 50, respectivamente.

Tabla 5. Perfil lipídico y valores DRECE

Rango edad	N(%) ^a	c-total, mg/dL	c-LDL, mg/dL	c-HDL, mg/dL	TG mg/dL
<i>Hombres</i>		<i>P75</i>	<i>P75</i>	<i>P75</i>	<i>P50</i>
<29 años	6(7)	190(21)	137(28)*	42(11)	56[39-76]
30-39 años	5(6)	234(26)	170(29)**	45(7)	67[57-145]
40-49 años	15(18)	228(36)	158(30)*	49(14)	108[70-132]
>50 años	13(15)	221(35)	160(32)	51(15)	85[63-117]
<i>Mujeres</i>		<i>P75</i>	<i>P75</i>	<i>P75</i>	<i>P50</i>
<29 años	18(21)	181(30)	108(26)	61(15)	59[50-71]
30-39 años	10(12)	215(41)*	140(37)	58(16)	63[60-95]
40-49 años	14(16)	238(48)*	169(46)*	51(10)	81[54-96]
>50 años	4(5)	256(57)	184(66)	60(24)	57[39-72]

^a Número de hombres/mujeres (% respecto a la muestra total).

*p90 **Valores por encima del p95.

Tabla 6. Marcadores indirectos del metabolismo del colesterol de los sujetos del estudio^a

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
Marcadores indirectos de la tasa de síntesis (x10²mmol/mol)				
Ratio latosterol	110.88[82.54-146.19]	132.04[85.89-166.14]	101.57[79.55-130.87]	0.034
Ratio lanosterol	8.88[6.49-12.02]	9.88[7.36-13.05]	7.72[6.05-10.73]	0.055
Marcadores indirectos de la tasa de absorción (x10²mmol/mol)				
Ratio campesterol	176.94[143.16-234.44]	163.44[136.66-233.90]	183.19[159.48-239.37]	0.085
Ratio sitosterol	167.27(51.77)	157.27(47.08)	175.75(54.51)	0.101 ^b
Ratio estigmasterol	10.00[8.31-13.31]	9.63[8.35-12.36]	11.15[8.27-13.85]	0.172

^aValores expresados como media(SD) o mediana[percentil25 – percentil75].
Valor *p* calculado mediante Kruskal-Wallis o ^bANOVA.

1.4. MARCADORES INDIRECTOS DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL

En la Tabla 6 se describen los valores obtenidos para los ratios esteroides-colesterol calculados, como ya se indicó, como el cociente entre la concentración plasmática del esteroide y la concentración plasmática de colesterol total.

Estos valores son comparables a los obtenidos, utilizando el mismo método, en otros estudios de población española (111,112,114) y en el rango encontrado en la bibliografía para la población general.

Como se observa, mientras los valores de los ratios campesterol, sitosterol y estigmasterol no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos, cuando se compararon los ratios marcadores indirectos de síntesis se encontró que los valores en las mujeres fueron inferiores a los de los hombres (ratio lanosterol, $p < 0.05$ y ratio lanosterol, $0.1 > p > 0.05$).

En resumen, se trata de una muestra homogénea debido, en gran medida, a los estrictos criterios de inclusión y exclusión. Consistió en un grupo de 85 adultos (mediana de edad de 42 años) con un número similar de hombres y mujeres y un bajo porcentaje de fumadores. Todos ellos presentaron normopeso, valores normales de PAS y PAD y un perfil bioquímico general dentro de los rangos adecuados. Respecto al perfil lipídico, aunque los valores de c-total y c-LDL fueron superiores a los valores objetivo, la muestra se consideró representativa de la población española general. Además, teniendo en cuenta los índices aterogénicos, se vio que se trataba de individuos con un riesgo cardiovascular bajo.

A continuación se presentan los resultados respecto al patrón dietético y la influencia de la ingesta de fitoesteroides sobre el perfil lipídico y los marcadores indirectos del metabolismo del colesterol.

2. DESCRIPCIÓN DE LA DIETA

A continuación se exponen los resultados de la ingesta dietética de cada uno de los individuos obtenidos a partir del análisis del CFC y ajustados para la ingesta energética total por el método de residuales de Willet.

2.1. DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DIETÉTICO

2.1.1. Descripción de la ingesta de los principales grupos de alimentos

En la Tabla 7 se describe la ingesta de los grupos de alimentos incluidos en el CFC.

Tabla 7. Descripción de la ingesta de los principales grupos de alimentos

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
Frutas	324[225-467]	335[183-539]	309[240-465]	0.853
Frutos secos	6[1-12]	3[0-15]	8[6-10]	0.048
Hortalizas	382[299-491]	375[302-473]	394[288-506]	0.549
Legumbres	16[11-20]	13[10-19]	16[13-21]	0.051
Cereales y patatas	248[194-306]	236[172-317]	255[207-291]	0.498
C. integrales	1[0-5]	2[0-4]	0[0-8]	0.177
C. refinados	126[74-171]	112[54-168]	127[85-176]	0.255
Patatas	114[71-148]	134[69-154]	108[73-138]	0.498
Aceites vegetales	57[46-69]	55[43-71]	59[48-69]	0.470
De oliva	54[39-64]	52[36-63]	56[47-66]	0.186
De semillas	1.1[0.0-4.1]	0.3[0.0-5.6]	1.6[0.2-4.1]	0.166
Grasas	0.8[0-1.7]	0.8[0.1-1.7]	0.9[0.0-1.7]	0.758
Salsas	4.1[2.0-7.2]	2.9[1.5-6.7]	4.5[2.3-8.1]	0.146

Todos los valores estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales y expresados como mediana[percentil25-percentile75] en gramos/día.

Valor *p* calculado mediante Kruskal-Wallis

Tabla 7. Descripción de la ingesta de los principales grupos de alimentos -cont.-

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
Prod. lácteos	353[291-554]	341[297-519]	377[286-582]	0.402
Desnatados	196[16-308]	198[9-251]	194[81-381]	0.464
Enteros	173[91-282]	174[80-316]	160[103-228]	0.951
Carne y prod. cárnicos	177[137-214]	179[136-221]	174[138-213]	0.860
Magras	78[53-98]	72[49-96]	79[54-99]	0.731
Grasas	90[68-129]	99[67-132]	88[69-123]	0.585
Pescado	99[73-144]	99[69-155]	96[74-140]	0.874
Blanco	23[20-64]	24[21-65]	22[20-64]	0.052
Azul	18[8-19]	18[9-19]	18[8-19]	0.302
Marisco	33[23-52]	32[21-49]	36[26-54]	0.198
Conservas	9[5-15]	9[1-18]	9[6-13]	0.549
Huevos ^a	3.0[2.5-3.3]	2.8[2.5-3.3]	3.1[2.6-3.3]	0.364
Dulces	87[56-105]	87[37-123]	86[64-99]	0.853
Platos precocinados	27[11-45]	19[10-36]	29[16-48]	0.079
<i>Snacks</i>	0.3[0.0-3.1]	0.2[0.1-3.2]	2[0.0-3.1]	0.764
Bebidas refrescantes ^b	45[7-125]	32[0-92]	55[30-133]	0.040
Zumos ^b	29[13-171]	27[0-172]	42[13-138]	0.825
Vino ^b	18[2-54]	37[2-90]	12[3-30]	0.105
Cerveza ^b	34[4-116]	50[4-136]	26[3-63]	0.266
Destilados ^b	0.4[0.0-3.4]	0.3[0.0-3.2]	0.4[0.0-3.6]	0.237

Todos los valores estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales y expresados como mediana[percentil25-percentile75] en gramos/día excepto ^aen unidades/semana y ^ben cc/día.

Valor *p* calculado mediante Kruskal-Wallis

El patrón dietético de hombres y mujeres fue similar y sólo en algunos grupos de alimentos se observaron diferencias.

Respecto a los alimentos de origen vegetal, el consumo de frutas y hortalizas para la muestra se encontró entorno a las dos raciones diarias mientras que en el caso de los frutos secos el consumo fue bajo (menos de dos raciones semanales) siendo significativamente superior en mujeres que en hombres ($p < 0.05$). El número de raciones del grupo de las legumbres no llegó a la cantidad recomendada de 2-4 raciones semanales, tanto en hombres como en mujeres aunque la ingesta de éstas fue ligeramente superior ($0.1 > p > 0.05$). Además, el consumo de cereales, fundamentalmente cereales refinados, y patatas también se puede considerar bajo.

Por otro lado, se observó que el consumo de aceites vegetales (unas 6 raciones/día) era elevado y que se trataba fundamentalmente de aceite de oliva puesto que el consumo de aceites de semillas se limitaba a menos de una ración semanal. En relación con las grasas de adición, mantequilla, margarina y manteca de cerdo, y las salsas, mayonesa y *ketchup*, la ingesta fue ocasional.

Respecto a los alimentos de origen animal, el consumo de lácteos fue moderado con cantidades similares de enteros y desnatados pero el de carnes y productos cárnicos, tanto grasas (donde se incluían los embutidos) como magras, y pescados fue alto. En este último grupo, el consumo de pescado blanco y azul fue similar en todos los individuos pero cabe resaltar que el consumo de pescado blanco en hombres fue ligeramente superior que en mujeres ($0.1 > p > 0.05$). Por último, el número de huevos consumidos por semana fue de tres.

En cuanto a las bebidas consumidas, en general se puede considerar que el consumo de bebidas refrescantes, zumos y bebidas alcohólicas fue ocasional. El mismo resultado se encontró para el consumo de platos precocinados (pizza, croquetas, empanadillas, sopas, etc.) y *snacks* (palomitas de maíz).

2.1.2. Cálculo del grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea

Como ya se ha indicado, para el cálculo del grado de adherencia se tuvieron en cuenta los valores de las medianas específicas de consumo según el sexo. Los valores utilizados para los diferentes componentes que intervienen en la escala son los que se indican en la Tabla 8.

Tabla 8. Cálculo del grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea

Componente	Hombres		Mujeres	
	Valor 0	Valor 1	Valor 0	Valor 1
AGMI/AGS	< 1.75	≥ 1.75	< 1.75	≥ 1.75
Frutas y frutos secos (g/día)	< 337	≥ 337	< 313	≥ 313
Hortalizas (g/día)	< 375	≥ 375	< 394	≥ 394
Legumbres (g/día)	< 13	≥ 13	< 16	≥ 16
Cereales (g/día)	< 236	≥ 236	< 255	≥ 255
Pescado (g/día)	≥ 99	< 99	≥ 96	≥ 96
Carne y prod. cárnicos (g/día)	≥ 179	< 179	≥ 174	≥ 174
Productos lácteos (g/día)	≥ 341	< 341	≥ 377	≥ 377
Alcohol (g/día)	Resto	10-50	Resto	5-25

Como se observa, para los componentes considerados integrantes del patrón de DM, es decir, hortalizas, frutas y frutos secos, legumbres, cereales y patatas, pescado y ratio AGMI/AGS, cuando el consumo fue mayor o igual que la mediana específica de consumo según el sexo se les asignó el valor 1, mientras que cuando el consumo fue menor se les asignó el valor 0. Por el contrario, para los componentes considerados contrarios al patrón de DM, es decir, carnes y productos cárnicos y productos lácteos, cuando el consumo fue menor que la mediana específica de consumo según el sexo se les asignó el valor 1, mientras que cuando el consumo fue mayor o igual se les asignó el valor 0. Finalmente, para el consumo de alcohol se asignó el valor 1 a

los hombres cuyo consumo estuvo entre 10 y 50 g/día y a las mujeres cuyo consumo estuvo entre 5 y 25 g/día y al resto se les asignó el valor 0.

La muestra tuvo una media(SD) en el grado de adherencia al patrón de DM de 4.3(1.8). Teniendo en cuenta que los valores, según este índice, pueden variar entre 0 (adherencia nula) y 9 (máxima adherencia) podemos considerar que el grado de adherencia de la muestra estudiada se encuentra en un valor medio. Cuando se realizó el cálculo estratificando por sexos no se encontraron diferencias entre los valores de hombres, 4.3(1.9), y mujeres, 4.3(1.7).

2.2. DESCRIPCIÓN DE LA INGESTA DE ENERGÍA, MACRONUTRIENTES Y OTROS COMPONENTES DE LA DIETA

En la Tabla 9 se indican los valores de ingesta de energía, macronutrientes, colesterol, fibra dietética y alcohol por parte de los sujetos del estudio.

En primer lugar y como cabía esperar, la ingesta energética de hombres fue superior a la de mujeres ($p<0.001$). Sin embargo, el perfil de macronutrientes fue similar en ambos sexos observándose un claro desequilibrio respecto a las recomendaciones para los hidratos de carbono ($\sim 39\%$ vs. 50-55%) y para los lípidos ($\sim 44\%$ vs 30-35%), si bien el alto aporte de estos últimos se produjo a expensas de grasa insaturada (ratio AGI/AGS de 2.3). De igual modo, el aporte de colesterol dietético en el grupo estuvo por encima de las recomendaciones (> 300 mg/día). En segundo lugar, respecto a la fibra dietética, todo el grupo se encontró dentro del rango recomendado de 25 a 35 g/día. Por último, nos encontramos con una muestra de individuos cuyo consumo de alcohol se puede considerar ligero con valores superiores en el caso de los hombres ($p<0.05$).

Tabla 9. Descripción de la ingesta de energía, macronutrientes y otros componentes de la dieta

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
Energía, MJ/día	12.68(3.43)	14.33(3.19)	11.27(2.99)	0.000
Energía, Kcal/día	3 032(820)	3 429(763)	2 696(716)	0.000
Hidratos Carbono (%E)	39.3(5.4)	38.8(5.5)	39.7(5.4)	0.476
Proteína (%E)	15.0(2.2)	15.0(1.7)	15.1(2.5)	0.861
Grasa total (%E)	43.7(5.5)	43.6(5.5)	43.9(5.6)	0.794
AGS (%E)	12.2(1.9)	12.3(2.1)	12.2(1.8)	0.980
AGMI (%E)	21.1(3.8)	21.0(3.4)	21.3(4.2)	0.697
AGPI (%E)	5.8[5.2-7.1]	5.9[5.1-7.6]	5.7[5.3-6.9]	0.572 ^a
AGI/AGS	2.3(0.4)	2.3(0.5)	2.3(0.3)	0.619
Colesterol (mg/día)	513(99)	528(117)	501(81)	0.226
Fibra soluble (g/día)	7.9(2.3)	7.6(2.4)	8.1(2.2)	0.520
Fibra total (g/día)	26.5(7.8)	26.4(8.0)	26.6(7.8)	0.930
Alcohol (g/día)	4.5[1.8-11.1]	7.3[3.6-12.6]	4.0[1.2-8.9]	0.019 ^a

Abreviaturas: AGS, Ácidos grasos saturados; AGMI, Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, Ácidos grasos poliinsaturados; AGI, Ácidos grasos insaturados totales; %E, Porcentaje de ingesta energética total.

Todos los valores estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales y expresados como media(SD) o mediana[percentil25-percentil75].

Valor *p* calculado mediante ANOVA o ^aKruskall-Wallis

2.3. DESCRIPCIÓN DE LA INGESTA DE VITAMINAS Y MINERALES

Teniendo en cuenta los valores incluidos en las Tablas 10 y 11, todo el grupo cumplió ampliamente las ingestas recomendadas de minerales y vitaminas, sin apreciarse diferencias significativas entre los valores obtenidos en hombres y en mujeres.

Tabla 10. Descripción de la ingesta de minerales aportados por la dieta

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
Sodio, g/día	3.04[2.68-3.29]	3.09[2.68-3.49]	2.99[2.68-3.28]	0.412 ^b
Potasio, g/día	5.00(.90)	4.99(0.94)	5.00(0.88)	0.950
Calcio, mg/día	1277(308)	1276(335)	1277(286)	0.980
Magnesio, mg/día	444(64)	445(67)	443(62)	0.899
Hierro, mg/día	19(2)	19(2)	19(3)	0.904
Yodo, µg/día	303[247-507]	292[246-462]	308[245-514]	0.555 ^b
Selenio, µg/día	111(30)	111(35)	111(24)	0.965
Cinc, mg/día	14(2)	14(3)	14(2)	0.764

Todos los valores estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales y expresados como media(SD) o mediana[percentil25-percentil75].

Valor *p* calculado mediante ANOVA o ^bKruskall-Wallis

Tabla 11. Descripción de la ingesta de vitaminas aportadas por la dieta

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
Vitamina A, µg/día ^a	1498[1134-2017]	1569[1139-2047]	1379[1089-2005]	0.373 ^b
Vitamina D, µg/día	5.4[4.0-7.4]	5.2[4.2-7.1]	5.4[3.7-7.7]	0.930 ^b
Vitamina E, mg/día	13[12-15]	13[11-15]	13[12-15]	0.778 ^b
Vitamina B ₁ , mg/día	2.6(0.8)	2.6(1.1)	2.6(0.6)	0.652
Vitamina B ₂ , mg/día	2.2[1.9-2.5]	2.2[1.9-2.4]	2.3[1.9-2.6]	0.244 ^b
Vitamina B ₃ , mg/día ^c	45(7)	45(8)	45(6)	0.726
Vitamina B ₆ , mg/día	2.6(0.5)	2.6(0.5)	2.6(0.4)	0.997
Vitamina B ₉ , µg/día	414(106)	414(99)	414(112)	0.984
Vitamina B ₁₂ , µg/día	8.9[7.3-13.0]	9.6[7.6-13.2]	8.3[7.0-12.6]	0.174 ^b
Vitamina C, mg/día	223[175-319]	209[162-349]	235[182-283]	0.666 ^b

Todos los valores estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales y expresados como media(SD) o mediana[percentil25–percentile75].

^aEquivalentes de retinol

^cEquivalentes de niacina

Valor *p* calculado mediante ANOVA o ^bKruskall-Wallis.

2.4. DESCRIPCIÓN DE LA INGESTA DE FITOESTEROLES

Considerando a todo el grupo, la mediana de ingesta de fitoesteroles totales fue de 489 mg/día sin diferencias entre sexos (Tabla 12).

Tabla 12. Descripción de la ingesta de fitoesteroles aportados por la dieta

	Todos	Hombres	Mujeres	Valor <i>p</i>
Estigmastanol	15.6[12.5-18.0]	14.4[10.9-19.1]	15.9[13.1-17.3]	0.470
Estigmasterol	29.6[25.9-35.5]	29.6[24.9-35.8]	29.6[25.9-34.5]	0.979
Sitosterol	290.5[263.8-317.3]	290.5[263.8-334.4]	288.7[263.6-312.1]	0.812
Campesterol	37.0[31.3-43.6]	38.72[30.13-48.2]	36.8[31.7-41.2]	0.585
Otros fitoesteroles	111.2[94.9-127.6]	106.1[93.4-129.5]	112.9[95.4-125.9]	0.412
Fitoesteroles totales	488.7[446.3-528.1]	489.3[433.0-544.2]	488.7[453.5-526-2]	1.000

Todos los valores estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales y expresados como mediana[percentil25–percentile75] en gramos/día. Valor *p* calculado mediante Kruskal-Wallis

Además, se cuantificaron los fitoesteroles individuales para obtener una descripción del perfil presente en la dieta. Como se puede observar en la Tabla 12, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon los valores obtenidos para hombres y para mujeres. En ambos casos, el sitosterol fue el fitoesterol dietético más abundante, seguido por el grupo denominado “otros fitoesteroles”, grupo en el que se incluyen aquellos fitoesteroles no identificados (es decir, aquellos cuantificados como picos que aparecen en el cromatograma obtenido durante el análisis de alimentos después del pico de colesterol y que provisionalmente se identifican como fitoesteroles). Las cantidades de campesterol, estigmasterol y estigmastanol fueron, en comparación, mucho más pequeñas.

En la Figura 2 se representa la proporción de cada uno de los fitoesteroles individuales en la dieta según los resultados para todo el grupo.

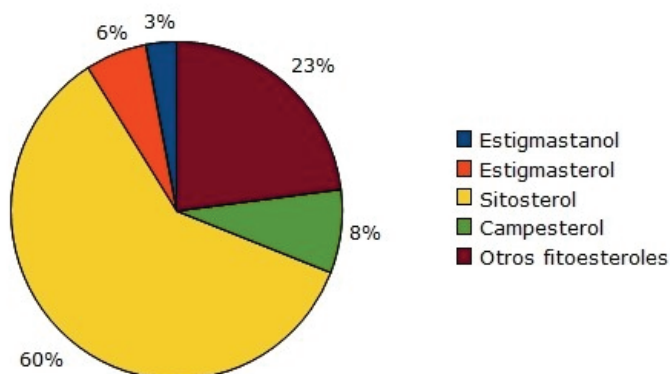


Figura 2. Porcentaje de fitoesteroles respecto a la ingesta total

Como ya se ha indicado, el sitosterol fue el componente más importante (un 60% del total de fitoesteroles ingeridos) si se compara con los porcentajes de campesterol (8%), estigmasterol (6%), estigmastanol (3%) y "otros fitoesteroles" (23%). Esta distribución no se modificó cuando se consideraron a hombres y mujeres por separado.

En resumen, las cantidades ingeridas de carnes y productos cárnicos fueron altas y las de aceites vegetales, especialmente de oliva, frutas, hortalizas, productos lácteos, pescados y huevos fueron adecuadas. La muestra presentó una ingesta baja de frutos secos, legumbres, cereales y patatas. El resto de alimentos estudiados se consumieron de forma ocasional. El grado de adherencia de este patrón dietético al patrón de DM fue de 4.3 sobre una puntuación máxima de 9.

Respecto al aporte de nutrientes y otros componentes de la dieta, el consumo de proteínas fue adecuado, el de hidratos de carbono fue bajo y el de lípidos alto, si bien este último se produjo a expensas de

grasa insaturada. Todo el grupo cumplió ampliamente las ingestas recomendadas de vitaminas y minerales. La cantidad de fibra dietética fue adecuada mientras que la de colesterol estuvo por encima de las recomendaciones. Finalmente, el consumo de alcohol se puede considerar como ligero.

La ingesta de fitoesteroles totales en la muestra estudiada fue de 489 mg/día siendo el sitosterol el fitoesterol mayoritario.

3. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE COLESTEROL Y LIPOPROTEÍNAS

Con el objeto de valorar la influencia que la ingesta de fitoesteroles presentes de forma natural en la dieta pudiera tener sobre el perfil lipídico, se procedió a dividir a la población en terciles de ingesta total de fitoesteroles.

Los puntos de corte se establecieron para las ingestas del percentil 33, 458.6 mg/día, y del percentil 66, 512.0 mg/día, de modo que los sujetos con ingestas < de 458.6 mg/día se incluyeron en el tercil 1, los sujetos con ingestas entre 458.6 y 512.0 mg/día en el tercil 2 y los sujetos con ingestas superiores a 512.0 mg/día en el tercil 3.

3.1. DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DIETÉTICO

3.1.1. Descripción del consumo de alimentos

En la Tabla 13 se describen las cantidades ingeridas de los diferentes grupos de alimentos en los terciles de ingesta de fitoesteroles total.

Tabla 13. Descripción del patrón dietético por terciles de ingesta total de fitoesteroles

Ingesta de fitoesteroles total (mg/día)	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	Valor <i>p</i>
	≤ 458,56	458,56-512,02	> 512,02	
Frutas	242[115-361]	285[234-442]	459[280-626]	0.000
Frutos secos	6[1-10]	4[1-10]	9[3-26]	0.100
Hortalizas	350[255-408]	359[302-474]	458[333-538]	0.030
Legumbres	13[10-17]	16[12-20]	17[13-25]	0.126
Cereales y patatas	255[198-308]	248[192-316]	243[159-292]	0.564
C. integrales	1[0-4]	1[0-3]	2[0-10]	0.472
C. refinados	121[73-152]	141[62-185]	126[75-177]	0.723
Patatas	130[102-165]	110[71-147]	90[51-140]	0.021

Valores expresados como media (SD) o mediana [percentil25 – percentile75] en gramos/día. Todos los valores de ingestas estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales.

Valor *p* calculado mediante Kruskal-Wallis

Tabla 13. Descripción del patrón dietético por terciles de ingesta total de fitoesteroles -cont.-

Ingesta de fitoesteroles total (mg/día)	Tercil 1 ≤ 458,56	Tercil 2 458,56-512,02	Tercil 3 > 512,02	Valor <i>p</i>
Aceites vegetales	51[35-55]	60[47-70]	63[51-74]	0.004
De oliva	51[35-56]	58[41-65]	59[40-70]	0.080
De semillas	0.8[0-2.2]	1.5[0.2-4.3]	0.9[0-7]	0.281
Grasas	0.8[0-1.7]	0.8[0-1.7]	0.8[0-1.7]	0.961
Salsas	4.2[2.1-7.1]	5.4[2.2-9.2]	3.0[0.9-4.6]	0.041
Productos lácteos	379[320-590]	379[291-583]	333[247-389]	0.197
Desnatados	183[7-295]	198[67-500]	201[84-249]	0.387
Enteros	174[120-362]	156[74-213]	176[87-266]	0.224
Carnes y prod. cárnicos	199[142-231]	191[140-207]	144[124-198]	0.039
Magras	82[57-101]	78[49-91]	63[47-98]	0.315
Grasas	101[69-148]	110[73-128]	76[59-105]	0.033
Pescado	99[77-146]	96[71-151]	101[69-140]	0.990
Pescado blanco	23[21-63]	23[20-64]	24[20-66]	0.745
Pescado azul	14[2-19]	18[8-37]	18[8-19]	0.872
Marisco	33[26-53]	36[26-52]	31[16-53]	0.482
Conservas	11[7-20]	8[4-12]	8[2-17]	0.231
Huevos ^a	3.0[2.5-3.3]	3.1[2.7-3.3]	2.9[2.4-3.6]	0.739
Dulces	92[68-119]	87[42-103]	81[59-101]	0.674
Platos precocinados	32[19-57]	25[14-37]	17[5-34]	0.030
<i>Snacks</i>	0.3[0.0-3.2]	0.7[0.0-3.2]	0.3[0.0-3.1]	0.744
Bebidas refrescantes ^b	65[27-159]	35[4-122]	42[3-69]	0.308
Zumos ^b	27[3-114]	86[13-200]	28[0-107]	0.212
Vino ^b	21[1-67]	17[6-44]	18[2-57]	0.968
Cerveza ^b	31[2-104]	28[4-134]	46[8-96]	0.796
Destilados ^b	2.8[0.2-3.8]	0.3[0-3.5]	0.0[0.0-2.2]	0.050

Valores expresados como media (SD) o mediana [percentil25 – percentil75] en gramos/día excepto ^aen unidades/semana y ^ben cc/día. Todos los valores de ingestas estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales. Valor *p* calculado mediante Kruskal-Wallis.

Como se observa, se encontraron diferencias significativas en el consumo de: frutas ($p < 0.001$), hortalizas, patatas, aceites vegetales, salsas, carnes y productos cárnicos, carnes grasas y platos precocinados ($p < 0.05$).

Con el objeto de detectar entre qué terciles se producían las diferencias, se llevaron a cabo pruebas estadísticas para comparar estos grupos dos a dos. Además, se incluyeron en las pruebas aquellos cuyos valores p se encontraron en el límite de la significación ($0.1 > p > 0.05$), es decir, frutos secos, aceite de oliva y destilados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Comparaciones dos a dos entre terciles de ingesta total de fitoesteroles para grupos de alimentos

	T-1 vs. T-2	T-2 vs. T-3	T-1 vs. T-3
Frutas	0.088	0.022	0.000
Frutos secos	0.609	0.037	0.136
Hortalizas	0.389	0.071	0.011
Patatas	0.198	0.097	0.007
Aceites vegetales	0.009	0.407	0.002
Aceite de oliva	0.060	0.873	0.046
Salsas	0.207	0.013	0.179
Carnes y productos cárnicos	0.219	0.122	0.015
Carnes grasas	0.566	0.027	0.025
Platos precocinados	0.066	0.315	0.013
Destilados	0.346	0.122	0.017

Valor p calculado mediante la prueba U de Mann-Whitney

En cuanto a los grupos de alimentos de mayor consumo, se vio como los valores para las patatas y las carnes y productos cárnicos fueron menores en el último tercil con respecto al primero ($p < 0.05$) pero no se apreciaron diferencias entre terciles consecutivos. Sin embargo, cuando se comparó la cantidad ingerida de carnes grasas, los valores del tercer tercil fueron inferiores en relación con los presentados tanto

por el tercil 1 como por el 2 (ambas, $p<0.05$). Con respecto a los aceites vegetales, el tercil 1 tuvo una ingesta inferior tanto cuando se comparó con el tercil 2 como con el tercil 3 (ambas, $p<0.05$). Cuando se valoró exclusivamente el consumo de aceite de oliva del tercil inferior sólo fue estadísticamente menor cuando se comparó con el tercil superior ($p<0.05$). En el caso de las hortalizas también sólo entre estos dos terciles hubo diferencias significativas ($p<0.05$) donde se observó un mayor consumo entre los individuos del tercil superior. Finalmente, al comparar las ingestas de frutas las diferencias se presentaron entre los terciles extremos ($p<0.001$) así como entre el segundo y el tercero ($p<0.05$); el mayor consumo se apreció en este último.

Respecto a los grupos de alimentos de consumo ocasional, el consumo de frutos secos fue superior en el tercer tercil respecto al segundo ($p<0.05$) pero no hubo diferencias en el resto de las comparaciones. De igual forma, en el caso de las salsas sólo entre estos dos terciles hubo diferencias significativas ($p<0.05$) aunque en este caso el consumo en el tercer tercil fue inferior. Tanto para los platos precocinados como para los destilados, las diferencias aparecieron entre los terciles extremos y, en ambos casos, el consumo fue inferior en el tercil superior con respecto al inferior ($p<0.05$, ambos).

En conclusión, cabe destacar que los individuos del tercer tercil presentaron mayores consumos de aceites vegetales, frutas y hortalizas y menores de patatas, carnes y productos cárnicos (especialmente, aquellos grasos), salsas, platos precocinados y bebidas destiladas que los individuos del primer tercil.

3.1.2. Grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea

El grado de adherencia al patrón de DM, expresado como media(SD), para cada uno de los terciles de ingesta total de fitoesteroles fue 3.5(1.9) para el tercil 1, 4.0(1.4) para el tercil 2 y 5.4(1.5). Teniendo

en cuenta que los valores, según este índice, pueden variar entre 0 (adherencia nula) y 9 (máxima adherencia) podemos considerar que el grado de adherencia para los tres terciles se encuentra en un valor medio.

Sin embargo, cuando se compararon estos resultados mediante el test ANOVA se apreció que las diferencias entre los diferentes subgrupos eran estadísticamente significativas ($p < 0.001$). En la Figura 3 se representan los valores para cada uno de los terciles donde se observa como los sujetos del tercil 3 presentaban un valor mayor que los del tercil 1 ($p = 0.001$) y que los del tercil 2 ($p < 0.05$) pero no se apreciaron diferencias entre los dos primeros terciles.

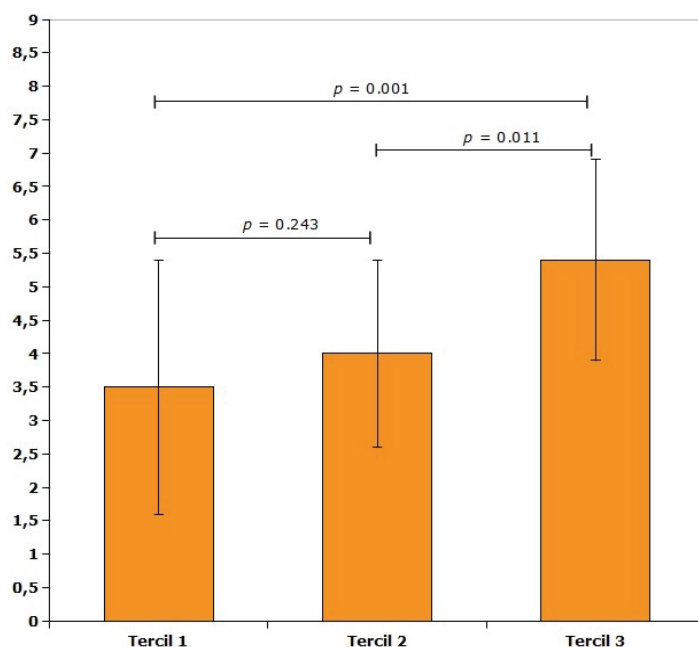


Figura 3. Grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea en los terciles de ingesta total de fitoesteroles. Valor p calculado mediante la prueba T para muestras independientes.

3.1.3. Dieta Mediterránea e ingesta de fitoesteroles

Puesto que parecía existir una relación entre la ingesta de fitoesteroles y el grado de adherencia al patrón de DM, se representaron ambas variables mediante un diagrama de dispersión.

Tal y como se observa en la Figura 4, existe una cierta relación positiva entre ellas ($R^2 = 0.187$, $p < 0.001$). Esto indica que, en general, un aumento en el grado de adherencia está asociado a una mayor ingesta de fitoesteroles. Sin embargo, como se aprecia en esta misma figura y queda reflejado en el bajo coeficiente de regresión, no siempre se cumple esta asociación existiendo individuos con altos *score* de adherencia que presentan ingestas totales de fitoesteroles inferiores a otros cuyos *score* son menores.

Cuando la representación se hizo por sexos dicha relación positiva se mantuvo (hombres, $R^2 = 0.169$, $p < 0.01$, y mujeres $R^2 = 0.213$, $p < 0.001$).

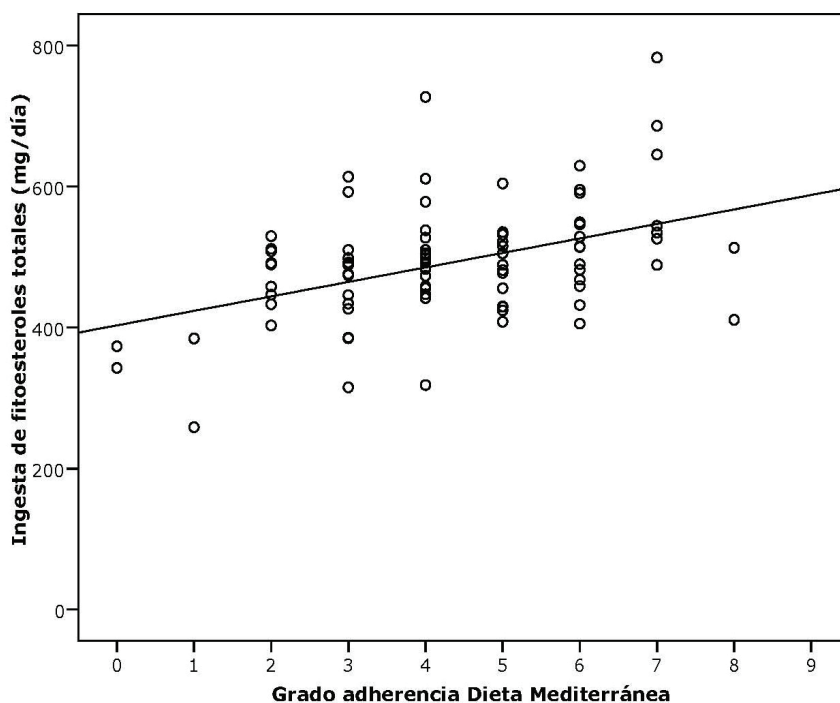


Figura 4. Regresión lineal entre ingesta de fitoesteroles y adherencia al patrón de Dieta Mediterránea

3.2. DESCRIPCIÓN DE LOS FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR AL PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO

A continuación, se procedió a estudiar aquellos otros factores dietéticos que pueden afectar a este nivel. De esta forma se pretendió detectar la existencia de posibles factores de confusión a la hora de evaluar la influencia de los fitoesteroles de la dieta sobre los niveles plasmáticos de colesterol y lipoproteínas.

Los resultados sobre los diferentes factores que pueden afectar al perfil lipídico plasmático tras dividir a la población según la ingesta total de fitoesteroles se incluyen en la Tabla 15.

Tabla 15. Factores que pueden afectar al perfil lipídico plasmático por terciles de ingesta total de fitoesteroles^a

Ingesta de fitoesteroles total (mg/día)	Tercil 1 ≤ 458.6	Tercil 2 458.56-512.0	Tercil 3 > 512.0	Valor p
N	28	29	28	
Hombres/Mujeres	12(43)/16(57)	14(48)/15(52)	13(46)/15(54)	0.917
Edad, años	32 [25-46]	41 [21-47]	47 [39-53]	0.048
IMC, Kg/m ²	22.9 (2.7)	24.2 (3.3)	24.0 (3.4)	0.244 ^b
Fumadores actuales	4(14)	4(14)	3(11)	0.767
Energía total, MJ/día	12.68 (3.41)	12.16 (3.10)	13.20 (3.79)	0.521 ^b
Grasa total (%E)	43.2 (5.5)	43.9 (5.2)	44.2 (6.0)	0.791 ^b
AGS (%E)	12.7 (2.0)	12.5 (1.8)	11.5 (1.9)	0.052 ^b
AGMI (%E)	20.1 (3.5)	21.8 (3.8)	21.5 (4.2)	0.230 ^b
AGPI (%E)	5.5 [5.0-6.8]	5.7 [5.3-6.8]	6.7 [5.1-8.4]	0.119
AGI/AGS	2.05 (0.32)	2.25 (0.32)	2.54 (0.43)	0.000^b
Colesterol (mg/día)	546.3 (88.7)	512.5 (99.0)	481.6 (102.9)	0.050^b
Fibra total (g/día)	22,4 (6,4)	25,9 (6,0)	31,3 (8,4)	0.000^b
Alcohol (g/día)	4.8[1.3-13.3]	4.2[2.0-7.7]	5.2[1.6-11.6]	0.954
Ingesta fitoesteroles total, (mg/día)	428 [385-446]	489 [479-501]	545 [528-609]	0.000
Estigmastanol, (mg/día)	13 [11-16]	16 [12-18]	16 [14-20]	0.022
Estigmasterol, (mg/día)	28 [23-31]	30 [26-35]	33 [30-39]	0.002
Sitosterol, (mg/día)	256 [229-265]	292 [282-301]	337 [313-375]	0.000
Campesterol, (mg/día)	31 [24-37]	37 [32-42]	43 [35-53]	0.000
Otros fitoesteroles, (mg/día)	94 [84-108]	115 [96-130]	125 [110-136]	0.000
Fitoesteroles totales/Colesterol	0.8 [0.7-0.9]	0.9 [0.8-1.1]	1.3 [1.0-1.5]	0.000

AGS: Ácidos grasos saturados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI:Ácidos grasos poliinsaturados; AGI:Ácidos grasos insaturados totales; %E: Porcentaje de ingesta energética total.

^aValores expresados como media (SD) o mediana [percentil25 – percentile75]. Todos los valores de ingestas estandarizados a la ingesta energética media de la muestra por el método de residuales.
Valor p calculado mediante chi² de Pearson (variables categóricas) y Kruskal-Wallis o ^bANOVA (variables continuas).

Como se aprecia en esta Tabla 15, los diferentes grupos de sujetos fueron homogéneos en cuanto a IMC, número de hombres y de mujeres y de fumadores, ingesta energética total, perfil de macronutrientes y cantidad de alcohol consumido.

Por el contrario, en el resto de variables las diferencias entre terciles fueron estadísticamente significativas. Así, se observaron diferencias en la edad ($p<0.05$), en el ratio AGI/AGS ($p<0.001$), en la ingesta de colesterol ($p=0.05$), en la ingesta de fibra total ($p<0.001$), así como en la ingesta de fitoesteroles, tanto cuando se considera el valor total ($p<0.001$) como los aportes de fitoesteroles individuales -estigmastanol ($p<0.05$), estigmasterol ($p<0.01$) y sitosterol, campesterol y "otros fitoesteroles" ($p<0.001$)- y en el ratio fitoesteroles/colesterol ($p<0.001$).

Es importante indicar que, aunque las cantidades de fitoesteroles individuales fueron diferentes entre los terciles, el aporte de cada uno de ellos a la cantidad total de fitoesteroles ingerida se mantuvo igual al perfil descrito en el Figura 2.

En aquellas variables en las que se observaron las diferencias y con el objeto de detectar entre qué grupos se producían, se llevaron a cabo pruebas estadísticas para comparar estos grupos dos a dos. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Comparaciones dos a dos entre terciles de ingesta total de fitoesteroles para factores que pueden afectar al perfil lipídico plasmático

	T-1 vs. T-2	T-2 vs. T-3	T-1 vs. T-3
Edad	0.777	0.084	0.018
AGI/AGS	0.023 ^a	0.006 ^a	0.000 ^a
Colesterol	0.181 ^a	0.253 ^a	0.015 ^a
Fibra total	0.034 ^a	0.007 ^a	0.000 ^a
Fitoesteroles totales	0.000	0.000	0.000
Fitoesteroles/Colesterol	0.000	0.000	0.000

Valor *p* calculado mediante la prueba U de Mann-Whitney o la ^aPrueba T para muestras independientes

Respecto a las características de los individuos, se observó que los sujetos del tercil 1 eran más jóvenes que los del tercil 3 (*p*<0.05) pero no se veían diferencias entre terciles consecutivos.

En cuanto a los factores dietéticos, se vio como los valores de colesterol dietético eran menores en el último tercil con respecto al primero (*p*<0.05) pero no se veían diferencias entre terciles consecutivos. Sin embargo, las cantidades ingeridas de fibra total y de fitoesteroles totales, fueron significativamente mayores en el tercer tercil respecto al primero (*p*<0.001) y esas diferencias se veían también cuando se comparaban terciles consecutivos (*p*<0.05 y *p*<0.001, respectivamente). Resultados que se repiten cuando se valoran los ratios AGI/AGS y fitoesteroles totales/colesterol (*p*<0.001, en todos los casos).

3.3. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Para estudiar la influencia de los fitoesteroles de la dieta sobre los niveles de lípidos plasmáticos se utilizó un modelo de regresión multivariable con el que se ajustó para las variables sexo, edad e IMC así como para determinadas variables dietéticas como ratio AGI/AGS, fibra dietética total e ingesta energética total. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

En el caso del c-total y del c-LDL, cuando únicamente se ajustó por variables no dietéticas (i.e. sexo, edad e IMC) los valores medios ajustados presentaban una tendencia a disminuir a lo largo de los terciles pero ésta fue no significativa. Sin embargo, al introducir las variables dietéticas que se consideraron como variables de confusión, i.e. ratio AGI/AGS e ingesta energética total, esta tendencia pasó a ser significativa en el caso del c-LDL ($p < 0.05$) y en el límite de la significación para el c-total ($0.1 > p > 0.05$). El añadir la fibra dietética total al modelo no modificó los resultados (datos no mostrados).

Por el contrario, para las concentraciones de c-HDL y TG no se observó ninguna tendencia.

Tabla 17. Distribución de los niveles plasmáticos de lípidos por terciles de ingesta de fitoesteroles totales

Ingesta fitoesteroles total (mg/día)	Tercil 1 ≤ 458,56	Tercil 2 458,56-512,02	Tercil 3 > 512,02	Valor <i>p</i> ^a
<u>c-total, mmol/L</u>				
Ajuste ^b	5.778 (5.402-6.154)	5.574 (5.207-5.941)	5.515 (5.132-5.898)	0.336
Ajuste^c	5.892 (5.512-6.271)	5.629 (5.278-5.980)	5.320 (4.928-5.712)	0.054
<u>c-LDL, mmol/L</u>				
Ajuste ^b	3.995 (3.627-4.364)	3.787 (3.427-4.146)	3.699 (3.324-4.074)	0.269
Ajuste^c	4.104 (3.732-4.477)	3.840 (3.496-4.184)	3.510 (3.126-3.895)	0.042
<u>c-HDL, mmol/L</u>				
Ajuste ^b	1.362 (1.219-1.505)	1.357 (1.217-1.496)	1.386 (1.240-1.531)	0.821
Ajuste^c	1.354 (1.200-1.507)	1.353 (1.211-1.495)	1.400 (1.241-1.558)	0.706
<u>Triglicéridos, mmol/L</u>				
Ajuste ^b	0.802 (0.691-0.932)	0.860 (0.743-0.995)	0.874 (0.750-1.018)	0.434
Ajuste^c	0.820 (0.699-0.963)	0.866 (0.747-1.003)	0.847 (0.717-0.999)	0.782

^a Valor *p* de tendencia lineal calculado como el coeficiente de significación de la variable terciles (1-3) usada como variable continua en el modelo de regresión lineal multivariable.
^b Medias marginales estimadas (Intervalo de confianza al 95%), ajuste por edad, sexo y IMC.
^c Medias marginales estimadas (Intervalo de confianza al 95%), ajuste por edad, sexo, IMC, ratio AGI/AGS e ingesta energética total.

4. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

4.1. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL

Como ya se ha descrito anteriormente, para valorar la influencia de los fitoesteroles dietéticos sobre la síntesis de colesterol se utilizaron los niveles plasmáticos de latosterol y lanosterol obtenidos para cada individuo. El fundamento para usar estos compuestos como indicadores se basa en la aceptación de que estos compuestos pasan a las lipoproteínas plasmáticas a un ritmo proporcional al de su formación en la vía de síntesis de colesterol [69]. Para obtener los marcadores indirectos de la tasa de síntesis de colesterol, los valores de concentraciones plasmáticas de estos compuestos se dividieron por la concentración plasmática de c-total correspondiente para eliminar la influencia de las variaciones en las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas. De este modo, los datos que se comparan para valorar la síntesis de colesterol son los ratios latosterol-colesterol y lanosterol-colesterol [65,186].

Entre estos ratios marcadores de síntesis existió una correlación significativa ($p < 0.001$) aunque ésta fue débil (Rho de Spearman = 0.481).

Para estudiar la influencia de los fitoesteroles de la dieta sobre los marcadores indirectos de síntesis se utilizó un modelo de regresión multivariable con el que se ajustó para las variables sexo, edad e IMC puesto que, tal y como se ha descrito en la Introducción, el proceso de síntesis parece estar afectado por estos factores. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Distribución de los marcadores indirectos de síntesis de colesterol por terciles de ingesta total de fitoesteroles^a

Ingesta fitoesteroles total (mg/día)	Tercil 1 ≤ 458,56	Tercil 2 458,56-512,02	Tercil 3 > 512,02	Valor <i>p</i>^b
Ratio latosterol- colesterol	106(92-123)	109(95-126)	121(104-140)	0.240
Ratio lanosterol- colesterol	7.78(6.62-9.16)	8.97(7.66-10.51)	9.08(7.70-10.71)	0.194

^a Medias marginales estimadas (IC 95%) al ajustar por edad, sexo y IMC expresadas en 10² x mmol de esterol-no-colesterol/mol de colesterol.

^b Valor *p* de tendencia lineal calculado como el coeficiente de significación de la variable terciles (1-3) usada como variable continua en el modelo de regresión lineal multivariable.

Como se puede apreciar, aunque parece existir una cierta tendencia a aumentar a lo largo de los terciles, esta tendencia no fue significativa.

4.2. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL

Como ya se ha descrito anteriormente, el método indirecto propuesto por Miettinen *et al* [65] para valorar la influencia de los fitoesteroles dietéticos sobre la absorción de colesterol se basa en utilizar los niveles plasmáticos de sitosterol, campesterol y estigmasterol obtenidos para cada individuo. El fundamento para usar estos compuestos como indicadores se basa en la aceptación de que las concentraciones plasmáticas de estos compuestos, una vez corregidas por la concentración plasmática de c-total correspondiente, correlacionan con la eficiencia de absorción de colesterol. Así, los valores de los ratios sitosterol-colesterol, campesterol-colesterol y estigmasterol-colesterol son indicadores de la tasa de absorción intestinal. Sin embargo, debido a que estas concentraciones también dependen de la cantidad ingerida, su utilidad queda comprometida cuando existe una diferente ingesta entre las situaciones que se están comparando [191] y sólo bajo condiciones constantes de ingesta de fitoesteroles las concentraciones séricas de estos compuestos (o los ratios fitoesteroles-colesterol) se relacionan positivamente con la eficiencia de absorción de colesterol [190].

Por ello, en el caso que nos ocupa en el que el objetivo era valorar la influencia de los fitoesteroles de la dieta sobre la tasa de absorción de colesterol, los ratios fitoesteroles-colesterol no son aplicables. De hecho, tal y como se observa en la Tabla 19 donde se muestran los valores de estos ratios por terciles de ingesta total de fitoesteroles sin ajustar y ajustados por las variables sexo, edad e IMC -variables que pueden afectar al proceso de absorción-, los resultados no mostraron ninguna tendencia significativa.

Tabla 19. Distribución de los ratios fitoesteroles-colesterol por terciles de ingesta total de fitoesteroles

	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3	Valor <i>p</i>
Ingesta fitoesteroles total (mg/día)	≤ 458,56	458,56-512,02	> 512,02	
Ratio sitosterol-colesterol				
Sin ajustar	172(55)	156(40)	175(58)	0.346
Ajuste ^a	167(148-187)	158(140-177)	175(156-195)	0.581 ^b
Ratio campesterol-colesterol				
Sin ajustar ^c	190[156-238]	167[144-216]	171[135-239]	0.684 ^d
Ajuste ^a	181(155-211)	176(152-204)	171(146-200)	0.621 ^b
Ratio estigmasterol-colesterol				
Sin ajustar ^c	10.31[9.05-13.62]	9.38[7.59-13.60]	10.03[8.74-13.00]	0.402 ^d
Ajuste ^a	10.45(8.98-12.18)	10.36(8.93-12.02)	11.22(9.61-13.10)	0.529 ^b

Valores expresados en 10² x mmol de esterol-no-colesterol/mol de colesterol como media(SD) o ^c mediana[percentil25 – percentil75] o ^a medias marginales estimadas (Intervalo de confianza al 95%) al ajustar por edad, sexo y IMC. Valor *p* calculado mediante ANOVA o ^d Kruskal-Wallis o ^b valor *p* de tendencia lineal calculado como el coeficiente de significación de la variable terciles (1-3) usada como variable continua en el modelo de regresión lineal multivariable.

En consecuencia, y con el objeto de confirmar la influencia que la cantidad presente en la dieta tiene sobre los valores plasmáticos de cada uno de los fitoesteroles valorados, se llevaron a cabo análisis de regresión lineal en los que se introdujeron como variables dependientes las concentraciones plasmáticas de sitosterol, campesterol y estigmasterol y como variables independientes las ingestas dietéticas correspondientes. Tal y como se puede observar en la Figura 5, en el caso del sitosterol, existe una relación lineal significativa ($p = 0.008$) entre ambas variables hecho que no se encontró para los otros dos fitoesteroles.

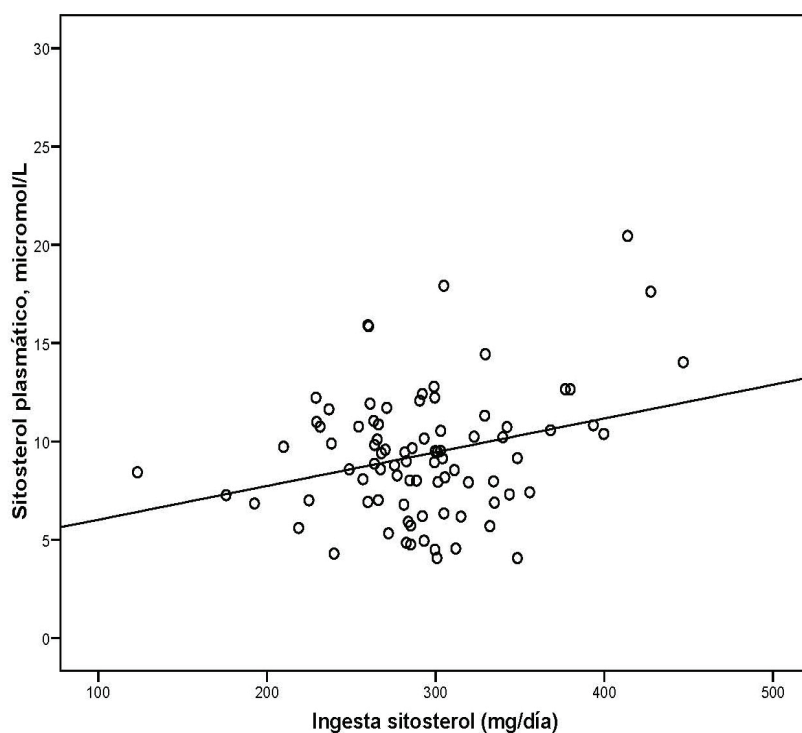


Figura 5. Regresión lineal entre ingesta de sitosterol y su concentración plasmática correspondiente

Teniendo en cuenta estos resultados y todo lo anteriormente expuesto, el indicador propuesto en este trabajo para la valoración del efecto de la ingesta de fitoesteroles sobre la eficiencia de absorción

intestinal de absorción fue el denominado ratio sitosterol-colesterol corregido que se obtuvo al dividir los valores del ratio sitosterol-colesterol por la ingesta correspondiente de sitosterol. Este ratio corregido se correlaciona, de forma significativa, con los valores originales (Rho de Spearman = 0.860, $p<0.001$).

Para estudiar la influencia de los fitoesteroles de la dieta sobre los marcadores indirectos de absorción se utilizó un modelo de regresión multivariable con el que se ajustó para las variables sexo, edad e IMC puesto que, tal y como ya se ha indicado, el proceso de absorción parece estar afectado por estos factores. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Distribución del marcador indirecto de absorción intestinal de colesterol por terciles de ingesta total de fitoesteroles^a

Ingesta fitoesteroles total (mg/día)	Tercil 1 ≤ 458,56	Tercil 2 458,56-512,02	Tercil 3 > 512,02	Valor p^b
Ratio sitosterol- colesterol corregido	6.47(5.78-7.26)	5.30(4.74-5.92)	4.98(4.43-5.60)	0.002

^a Medias marginales estimadas (Intervalo de confianza al 95%) al ajustar por edad, sexo y IMC expresadas en $10^3 \times \text{mmol}$ de sitosterol plasmático/mol de colesterol y mg de ingesta de sitosterol.
^b Valor p de tendencia lineal calculado como el coeficiente de significación de la variable terciles (1-3) usada como variable continua en el modelo de regresión lineal multivariable.

Como se ve, existió un descenso estadísticamente significativo a lo largo de los terciles de ingesta total de fitoesteroles para el ratio sitosterol-colesterol corregido utilizado como marcador indirecto de la tasa de absorción intestinal de colesterol.

4.3. CORRELACIONES ENTRE MARCADORES INDIRECTOS DE SÍNTESIS Y ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL

Finalmente, en la Tabla 21, se presentan las correlaciones encontradas entre los marcadores de síntesis y el de absorción.

Tabla 21. Correlaciones entre los marcadores indirectos de síntesis y absorción intestinal de colesterol^a

	Ratio latosterol-colesterol	Ratio lanosterol-colesterol
Ratio sitosterol-colesterol corregido	-0.393 (0.000)	-0.125 (n.s.)

^a Rho de Spearman (valor *p*). n.s.= no significativo

Como se puede apreciar, se encontró una débil correlación negativa entre el ratio sitosterol-colesterol corregido, marcador indirecto de absorción, y el ratio latosterol-colesterol, marcador indirecto de síntesis ($p<0.001$).

5. EFECTO DE LA INGESTA DE FITOESTEROLES PRESENTES DE FORMA NATURAL EN LA DIETA SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO Y LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL

En resumen, la muestra estudiada estuvo compuesta por 85 hombres y mujeres adultos (mediana de edad, 42 años) sanos cuyo patrón dietético tuvo un grado de adherencia a la DM medio (valor 4.3 en un rango de 0 a 9). El análisis de las ingestas de nutrientes dio como resultados destacables que, aunque el % de la energía total ingerida procedente de los lípidos fue elevada (44%), éste aporte se produjo a expensas de grasa insaturada (ratio AGI/AGS = 2.3). Por último, la ingesta de colesterol estuvo por encima de las recomendaciones (media > 500 mg/día). Respecto a la ingesta de fitoesteroles, la mediana para la muestra fue de 489 mg/día, siendo el sitosterol el fitoesterol más abundante (un 60% del total).

Cuando la población se dividió en terciles de ingesta total de fitoesteroles para establecer el posible efecto que éstos pudieran tener sobre el perfil lipídico y sobre el metabolismo del colesterol, se observó que las diferencias a nivel de nutrientes entre los diferentes subgrupos eran mínimas y, únicamente el ratio AGI/AGS, la ingesta de fibra total, colesterol así como de fitoesteroles, y en consecuencia el ratio fitoesteroles/colesterol, cambiaron a lo largo de los terciles. En esta situación, y tras ajustar por las variables de confusión, se observó que al aumentar la ingesta de fitoesteroles de la dieta existía una disminución significativa de la concentración de c-LDL.

Paralelamente, mediante la utilización de marcadores indirectos, se analizó el efecto que la ingesta de estos compuestos podía tener sobre el metabolismo del esteroide. En este sentido, aunque el aumento de la síntesis de colesterol no fue estadísticamente significativa, sí lo fue la disminución de la tasa de absorción intestinal de colesterol valorada mediante la utilización del ratio sitosterol-colesterol corregido por su ingesta correspondiente.

DISCUSIÓN

La enfermedad cardiovascular es un importante problema de Salud Pública en España y, también, en Aragón. Aunque se trata de enfermedades para las que se han descrito muchos factores de riesgo, existe consenso científico para afirmar que la disminución del c-LDL es importante para la reducción del riesgo cardiovascular [21-23]. Entre otros, la dieta es un factor modificable que juega un papel esencial en el manejo de las concentraciones sanguíneas de lípidos y, consecuentemente, de c-LDL [25,30,31].

Existe una significativa correlación positiva entre la eficiencia del proceso de absorción de colesterol y los niveles plasmáticos de c-LDL [40]. En este sentido, los fitoesteroles son componentes de la dieta cuyo efecto hipocolesterolemia se relaciona con su capacidad para hacer ineficiente este proceso [33]. Está bien documentado que los productos comerciales suplementados con fitoesteroles en dosis de gramos reducen los niveles séricos de colesterol [37,88,132-135]. Sin embargo, se conoce menos el posible efecto beneficioso a este nivel de los fitoesteroles obtenidos a través de una dieta sin suplementación.

Hasta este momento, el efecto de los fitoesteroles consumidos en las dosis moderadas presentes en la dieta habitual sobre el metabolismo del colesterol únicamente ha sido estudiado, como objetivo principal, en dos ensayos clínicos [112,167] y en dos estudios epidemiológicos [108,110]. Uno de los ensayos clínicos [167] emula las dosis moderadas mediante el suministro de una dosis controlada de fitoesteroles a través de un suplemento y valora tanto el efecto sobre el perfil lipídico como sobre el metabolismo del colesterol. El otro ensayo (realizado dentro del marco del estudio PREDIMED) [112] valora los mismos aspectos sobre población española anciana con alto riesgo cardiovascular pero el incremento en la ingesta de fitoesteroles se obtiene mediante la suplementación de la dieta habitual con aceite de oliva y frutos secos. Los dos estudios epidemiológicos (sobre

población británica [108] y sueca [110]) estudian el efecto de las diferentes dosis de fitoesteroles obtenidas a partir de los alimentos consumidos de forma habitual por la población. Sin embargo, en estos trabajos no se valora el efecto que los fitoesteroles tienen sobre el metabolismo del colesterol sino que, únicamente, se aportan resultados sobre el efecto sobre el perfil lipídico de los individuos.

En este marco, el presente trabajo, hasta lo que conocemos, es el primer estudio llevado a cabo en población española sin enfermedad cardiovascular en el que el objetivo principal es evaluar el efecto de los fitoesteroles ingeridos con la dieta habitual sobre el perfil lipídico plasmático y sobre el metabolismo del colesterol, evaluado este último mediante marcadores indirectos.

1. DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DIETÉTICO

1.1. CONSUMO DE ALIMENTOS

Las cantidades consumidas de cada uno de los grupos de alimentos se compararon con las recomendaciones más recientes para la población española [213]. Esta valoración indicó que las carnes y productos cárnicos se presentaban en la dieta en cantidades altas mientras que existía un adecuado consumo de productos lácteos, pescados y huevos así como de frutas, hortalizas y aceites vegetales (especialmente, aceite de oliva). Las cantidades ingeridas de frutos secos, legumbres, cereales y patatas fueron bajas y el consumo de mantequilla y margarina, salsas, bebidas alcohólicas y analcohólicas, precocinados y *snacks* se podía considerar ocasional.

Cuando estos datos se comparan con los recogidos en el documento realizado por la Fundación Española de la Nutrición en el año 2008 titulado "Valoración de la dieta española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario del MAPA" [214] en el que se analizan las cifras de consumo de alimentos realizado en España durante el año 2006, se observa que los resultados son muy similares aunque existen algunas

diferencias. Teniendo en cuenta las mismas recomendaciones, Moreiras *et al* concluyeron que el consumo de carnes y productos cárnicos en España era muy superior al recomendado mientras que, por el contrario, el de cereales y legumbres era inferior al considerado óptimo. Únicamente lácteos, pescado, huevos, aceite de oliva y frutas se ajustaban a las recomendaciones. Todas estas conclusiones corroboran los resultados obtenidos en nuestro estudio. Sin embargo, la discrepancia se encuentra para el grupo de las hortalizas puesto que el valor obtenido para la muestra estudiada superaba la estimación realizada a partir de los datos del Panel. De igual modo, aunque en ambos casos se cumplían las recomendaciones de 30-60 g/día, la cantidad consumida de aceite de oliva por nuestro grupo de estudio superaba las cifras estimadas para la población española (54 vs. 30 g/día) debido a que el consumo de otros aceites vegetales era muy inferior (1 vs. 19 g/día), sin embargo, el valor total de ingesta de aceites vegetales fue muy similar.

Las altas ingestas encontradas para frutas y hortalizas así como para el aceite de oliva respecto a otros países tienen su lógica si pensamos que España lidera el consumo de las primeras en Europa [215] y es la segunda, después de Grecia, en consumo de este tipo de aceite [216]. La explicación para el hecho de que la muestra estudiada presente un consumo mayor respecto a la media nacional puede buscarse en el tipo de muestra estudiada así como en los potenciales sesgos al evaluar consumos alimentarios.

Respecto al primer aspecto, tal y como está descrito en un estudio sobre población española [196], tanto los hombres como las mujeres de nivel educacional alto tienen una asociación positiva con el consumo de hortalizas y aceite de oliva. La misma conclusión se desprende al valorar el consumo de frutas y hortalizas en las cohortes pertenecientes al estudio EPIC de 10 países [217].

En relación con los posibles errores en la estimación de la ingesta, éstos se podrían asociar tanto a la encuesta utilizada como a otros potenciales errores procedentes del propio entrevistado. Parece poco probable que existan errores debidos al CFC utilizado ya que se trata de una encuesta validada y se ha confirmado que permite clasificar a los individuos según su consumo de alimentos de forma adecuada [218]. Por otro lado, como es bien conocido, existe una tendencia a que los individuos sobreestimen el nivel de consumo de aquellos alimentos considerados socialmente saludables y subestimen el consumo de los socialmente menos aceptables [219]. Sin embargo, el hecho de que alimentos considerados como menos saludables, como es el caso de las carnes grasas, se hayan consumido en cantidades altas parece indicar que este sesgo no es importante.

En cualquier caso, que estos valores sean comparables con las ingestas de frutas y hortalizas observadas para la cohorte española del estudio EPIC en los cuartiles superiores de ingesta de estos alimentos, corrobora la fiabilidad de las cifras e indica que se trata de una población con un alto consumo de estos grupos de alimentos [220].

1.2. INGESTA DE ENERGÍA, NUTRIENTES Y OTROS COMPONENTES DE LA DIETA

El aporte energético de la dieta de los individuos de la muestra estudiada estuvo ligeramente por encima de los valores descritos para la población española [214] (3032 vs. 2761 Kcal/día) como ya ha sido mostrado anteriormente para la población aragonesa [221]. Sin embargo, estos valores ligeramente superiores también podrían deberse al propio método de cuantificación de la ingesta puesto que la utilización de este CFC de alimentos se ha asociado, al igual que se ha indicado para la estimación de algunos grupos de alimentos, a ingestas energéticas algo más elevadas que cuando se realiza la cuantificación mediante otro tipo de encuestas dietéticas [218].

En cualquier caso, el perfil de macronutrientes (como % del valor energético total) fue similar entre sexos y los valores son consistentes con los que se obtienen a nivel nacional [214] y, también, para la Comunidad Autónoma de Aragón [221]. El bajo consumo de cereales, patatas y legumbres así como la alta ingesta de aceites vegetales explican el desequilibrio respecto a las recomendaciones para los hidratos de carbono (39% vs. 50-55%) y para los lípidos (44% vs 30-35%), respectivamente. Además, este alto consumo de aceites vegetales, especialmente de oliva, también es, al menos en parte, responsable de que el alto aporte de lípidos se produjera a expensas de grasa insaturada (ratio AGI/AGS = 2.3). Sin embargo, también se observó un alto aporte de colesterol (513 mg/día) probablemente debido al alto consumo de carnes y productos cárnicos. Cabe señalar que los valores nacionales para el consumo de colesterol se sitúan en unos 440 mg/día, siendo Aragón una comunidad autónoma en la que tradicionalmente se encuentran ingestas de colesterol por encima de la media española.

Finalmente, los altos valores de ingesta de fibra dietética son un reflejo de la alta ingesta de frutas y hortalizas que se observó en la muestra como también lo son las cifras elevadas en cuanto a micronutrientes como la vitamina C, el ácido fólico o el potasio.

1.3. INGESTA DE FITOESTEROLES

La mediana para la ingesta de fitoesteroles en la muestra estudiada fue 489 mg/día sin que se apreciaran diferencias entre los valores de hombres y de mujeres.

La ingesta dietética de fitoesteroles ha sido previamente descrita en otros países europeos como Finlandia [107] (Media hombres-mujeres=271 mg/día), Suecia [110] (Media hombres-mujeres=232 mg/día), Holanda [98] (Media hombres-mujeres=285 mg/día) y Reino Unido [108,109] (Media hombres-mujeres=296-306 mg/día). Teniendo en cuenta estos datos, el valor medio global oscila entre 230 y 310

mg/día. Todos estos estudios estiman las ingesta dietética a partir de encuestas validadas (o bien cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos semicuantitativos [98,108-110] o bien recuerdos de 24-horas [107]) en muestras representativas de la población del país o en cohortes con un número elevado de sujetos. A continuación, y según los resultados de análisis de alimentos de los respectivos países, estiman las cantidades de fitoesteroles presentes en la dieta habitual de estas poblaciones.

En el caso de España, la primera estimación se realizó en el año 2006 [97] tras analizar el contenido de fitoesteroles presente en alimentos españoles. Utilizando como datos de ingesta de alimentos los valores que se derivaban de la Encuesta de Presupuestos Familiares del año 2000 llevada a cabo por el MAPA de España, se encontró un valor de 375 mg/día. Este estudio constituyó la primera estimación de ingesta de fitoesteroles en un país mediterráneo. Sólo recientemente se han publicado datos españoles obtenidos a partir de encuestas dietéticas, unos en la cohorte española del estudio EPIC [111,113,114,222] donde se obtienen valores medios entre unos 230 y 310 mg/día y en un trabajo dentro del estudio PREDIMED [112] en el que la ingesta se estima en 355 mg/día.

Como se puede apreciar, los resultados de este trabajo proporcionan una cifra superior en comparación con los resultados previos.

Para poder explicar la variabilidad existente entre los valores indicados hay que tener en cuenta que las estimaciones se ven afectadas por varios factores como son:

- i. La metodología utilizada para cuantificar la ingesta dietética [116].
- ii. La tabla de composición de alimentos empleada [107,116], tanto por el número de alimentos que contiene como por los valores respectivos

iii. El diferente patrón dietético que tienen las poblaciones comparadas puesto que, como ya hemos indicado, valores altos se asocian con una dieta rica en productos de origen vegetal [106,117,118].

La explicación principal para las diferencias con respecto a los resultados en otros países podría ser la existencia de un patrón dietético distinto [97]. Si se observa, todos ellos son del norte de Europa donde, en principio, la dieta es bastante diferente de la propia de los países mediterráneos.

No obstante, también existen discordancias cuando se comparan con resultados españoles.

En el caso de la estimación realizada por Jimenez-Escrig *et al* [97], podría pensarse que las diferencias se deben al método utilizado para valorar la ingesta de los individuos, sin embargo, los resultados obtenidos mediante encuestas dietéticas son comparables a éstos [111-114,222] por lo que parece plausible pensar en otros factores como responsables.

Por un lado, la existencia de diferencias en el patrón dietético, incluso dentro de poblaciones del mismo país, podría ser uno de ellos puesto que, como se ha comentado, parece ser que los individuos que han participado en nuestro estudio presentaron valores de ingesta de frutas, hortalizas y aceites vegetales mayores que el resto de estudios españoles así como, tal y como ya se ha descrito, por encima de los valores medios para la población española.

Por otro lado, el hecho de que, a la hora de la cuantificación de los fitoesteroles ingeridos, en este trabajo se tengan en cuenta un mayor número de alimentos como fuente de estos compuestos podría ser una segunda explicación. En nuestro trabajo, la mayor parte de los datos de composición de alimentos en cuanto al contenido de fitoesteroles coinciden con los anteriores pero, además, se contemplaron otros alimentos que, aunque consumidos en menor

cantidad, son fuentes importantes de fitoesteroles, como se recoge en la Tabla 3 del capítulo Metodología. Tal es el caso de los dulces (bollería y pastelería), salsas, platos precocinados, etc.

En cualquier caso, la contribución relativa de cada uno de los diferentes fitoesteroles a la ingesta total es comparable con la descrita por Jimenez-Escrig *et al* [97], es decir, el sitosterol es el fitoesterol dietético mayoritario en ambos casos y después se encuentran el campesterol, el estigmasterol y el estigmastanol, en este orden. En ambos casos, el grupo denominado "otros fitoesteroles" supone aproximadamente un 25%.

Para terminar, merece la pena destacar que la ingesta moderada de fitoesteroles encontrada en nuestra población de estudio es comparable con la descrita para el quintil superior del estudio epidemiológico llevado a cabo por Andersson *et al* en el Reino Unido [108] (460 mg/día) lo cual corrobora que alcanzar este nivel de ingesta es factible a través de la dieta habitual.

2. FACTORES DIETÉTICOS QUE AFECTAN AL PERFIL LIPÍDICO PLASMÁTICO

Uno de los objetivos de este trabajo fue valorar la influencia que los fitoesteroles presentes de forma natural en la dieta tienen sobre el perfil lipídico. Para ello, los individuos de la muestra se dividieron en terciles donde las medianas para la ingesta total de fitoesteroles fueron 428, 489 y 545 mg/día, respectivamente.

Al comparar los diferentes terciles, se observó que la ingesta de fitoesteroles se relacionaba con otros factores dietéticos. Lo más destacable fue la relación directa con el ratio AGI/AGS y la fibra dietética e inversa con la ingesta de colesterol, siendo las diferencias más significativas cuando se compararon los terciles extremos. Como consecuencia de lo anterior, el ratio fitoesteroles totales/colesterol fue

significativamente mayor en el tercil superior (1.3) que en el inferior (0.8).

Está bien establecido que los factores dietéticos citados tienen un efecto importante sobre los niveles plasmáticos de colesterol. Así, cuando se reemplazan isocalóricamente los AGS con AGI, es decir existe un aumento en el ratio AGI/AGS, los niveles plasmáticos de c-total y c-LDL disminuyen [33]. Del mismo modo actúa la fibra dietética, pues existe suficiente evidencia científica para afirmar que este componente de la dieta dificulta la absorción intestinal de colesterol [33,34]. Finalmente, la recomendación de una menor ingesta de colesterol dietético está encaminada a controlar elevaciones de sus concentraciones plasmáticas, aunque la magnitud de este efecto es más difícil de estimar en cuanto que existe un alto grado de variabilidad individual en la respuesta entre individuos [32,33]. Respecto al ratio fitoesteroles/colesterol, aunque no existen recomendaciones oficiales, se ha sugerido que una dieta que contiene más fitoesteroles que colesterol, es decir, ratio > 1.0 , podría ser más saludable [156].

Por tanto, los resultados obtenidos parecen indicar que el tercil superior presenta un patrón dietético más beneficioso, con respecto a los niveles de colesterol sanguíneo, en comparación con el tercil inferior.

Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos en los dos estudios epidemiológicos llevados a cabo hasta el momento con objeto de valorar el efecto de los fitoesteroles observamos que son comparables. En el estudio de Andersson *et al* [108] también se observa una relación directa con el ratio AGI/AGS, aunque sus valores son más bajos ($Q_1=1.2$ - $Q_5=1.5$), y con la fibra ($Q_1=12.3$ - $Q_5=26.5$). Aunque en este caso la ingesta de colesterol también aumenta ($Q_1=212$ - $Q_5=319$), los valores para el ratio fitoesteroles/colesterol oscilan entre valores muy similares a los de este trabajo ($Q_1=0.8$ -

$Q_5=1.4$). En esta línea son los resultados obtenidos por Klingberg *et al* [110] quienes también observan una relación directa con el ratio AGI/AGS ($Q_1=1.2$ - $Q_5=1.7$) y con la fibra ($Q_1=15.1$ - $Q_5=23.0$) e inversa con la ingesta de colesterol ($Q_1=203$ - $Q_5=135$). El hecho de que los valores de colesterol dietético sean menores supone que el ratio fitoesteroles/colesterol varíe en un rango más amplio ($Q_1=0.8$ - $Q_5=2.0$).

También corroboran nuestros resultados los obtenidos por Escuriol *et al* para la población española [111,114]. En estos casos, los autores establecen la relación entre ingesta de fitoesteroles totales y estos factores dietéticos mediante el análisis de las correlaciones ajustadas por sexo, edad y energía. De este modo obtienen que los valores dietéticos de fitoesteroles correlacionan directamente con la fibra dietética ($r=0.6$), la ingesta de AGPI ($r=0.3$) e inversamente con la de AGS ($r=-0.3$) y de colesterol ($r=-0.2$) ($p<0.001$, todos).

Cuando en nuestro trabajo se analizaron qué variaciones en el patrón dietético podían ser las responsables de las diferencias entre terciles se observó que existía un consumo diferente para algunos grupos de alimentos. El consumo de frutas, hortalizas y aceites vegetales (especialmente, aceite de oliva) fue mayor en el tercil superior con respecto al inferior mientras que alimentos como carnes y productos cárnicos (en concreto, las carnes grasas) y los platos precocinados estuvieron presentes en menor cantidad en la dieta de los individuos del tercer tercil con respecto al primero.

Según los resultados mostrados por Jimenez-Escrig *et al* para España [97], los principales grupos de alimentos que contribuyen a las cantidades de fitoesteroles ingeridas son los aceites (40%), los cereales (30%) y frutas (12%) seguidos por legumbres y hortalizas (<10%) y frutos secos (<3%). Resultados que son muy similares a los obtenidos en otras estimaciones para individuos españoles [112]. Por tanto, parece lógico pensar que las diferencias en los consumos de

frutas, hortalizas y aceite de oliva fueron las principales responsables de la variación en la ingesta de fitoesteroles observada en los terciles, del mismo modo que lo fueron de los cambios en la cantidad de fibra dietética ingerida. Sin embargo, no se puede descartar que existan variaciones en las cantidades ingeridas de alimentos individuales incluso cuando no las haya para el consumo del grupo respectivo [99].

Por otro lado, además, si añadimos las diferencias en el consumo de carnes grasas y platos precocinados podemos explicar el aumento en el ratio AGI/AGS y la disminución de la cantidad de colesterol ingerida.

Así pues, todos estos resultados muestran que los fitoesteroles dietéticos son marcadores de elecciones saludables de alimentos [86]. El contenido dietético de fitoesteroles se relaciona de forma positiva con el consumo de alimentos y nutrientes saludables como frutas, hortalizas, fibra, AGI e inversamente con el de componentes poco saludables de la dieta como carnes grasas, AGS y colesterol, tal y como ha sido descrito previamente [111,114].

Esta hecho queda reflejado en los resultados obtenidos cuando se calculó el grado de adherencia al patrón de DM, indicador de dieta saludable, para cada uno de los terciles. Las mayores ingestas de frutas y hortalizas así como el mayor ratio AGI/AGS y las menores ingestas de carnes y productos cárnicos fueron las responsables de que el *score* en el tercer tercil fuera dos puntos superior que en el primero.

En resumen, los datos dietéticos estudiados indican que el tercil superior parece presentar un patrón más saludable en comparación con el tercil inferior. La pertenencia a este grupo de individuos es independiente del sexo pero sí se observa que se trata de sujetos de mayor edad que los del tercil inferior. Observaciones como ésta han

sido descritas en distintos trabajos donde se muestra una menor adherencia a la DM en adultos jóvenes [14,196].

3. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE COLESTEROL Y LIPOPROTEÍNAS

En nuestro estudio, se observó la existencia de una clara tendencia descendente en la concentración de c-total (10%) y de c-LDL (14%) a lo largo de los terciles de ingesta de fitoesteroles totales, independientemente de variables dietéticas como el ratio AGI/AGS, la ingesta energética total o la fibra dietética. Sin embargo, esta reducción sólo fue estadísticamente significativa en el caso de la fracción LDL. Por el contrario, no se observaron diferencias entre las concentraciones de c-HDL y TG de los diferentes subgrupos.

La tendencia descendente en los niveles séricos de c-total y c-LDL observada es consistente con resultados previos tanto cuando se estudia el efecto directo de dosis moderadas de fitoesteroles [108,110,156,167] como cuando se comparan los efectos de aceites vegetales que contienen distintas concentraciones de estos compuestos [157,160-162,164].

La magnitud de la reducción observada está en plena consonancia con los resultados obtenidos por Pelletier *et al* [156] en su estudio sobre 12 sujetos normolipémicos en el que la reducción significativa de c-total fue del 10% y la de c-LDL del 15%. El motivo fundamental por el que, con una población mucho más pequeña, obtienen diferencias estadísticamente significativas es que el rango en el ratio fitoesteroles/colesterol dietético fue mucho más amplio (0.7-1.9 vs 0.8-1.3) principalmente debido a una mayor dosis de fitoesteroles. Se sabe que el efecto de los fitoesteroles sobre la concentración sérica de colesterol es dosis-dependiente [37] por lo que, muy probablemente sea necesario un rango de valores de ingesta de fitoesteroles lo suficientemente amplio para que el efecto sea observable.

Sin embargo, en los dos estudios epidemiológicos [108,110] los porcentajes de reducción tanto de c-total como de c-LDL son inferiores a los que se acaban de mostrar. En el estudio de Andersson *et al* [108], las reducciones oscilan entre 4.1 y 2.4% para el c-total y entre 3.0 y 3.5% para el c-LDL. En este caso el rango para el ratio fitoesteroles/colesterol fue de 0.8-1.4, muy similar al encontrado en la muestra estudiada en este trabajo, pero la cantidad de colesterol dietético fue relativamente menor (máximo 350 mg/día frente a los 513 mg/día de media en la dieta de este trabajo). La cantidad de colesterol ingerida por la población que se estudia, si se tiene en cuenta que los fitoesteroles actúan sobre la absorción de este compuesto, es un factor que influye sobre el efecto final. Estudios en animales han mostrado que el papel de los transportadores de membrana ABCG5/G8 [223] y de la ACAT2 [224] como reguladores de la cantidad de colesterol transportada por los QM que alcanza el hígado posiblemente tiene más importancia bajo condiciones de alta ingesta de colesterol dietético. Aunque en un estudio reciente realizado en humanos [141] se concluye que la eficacia de los fitoesteroles no está afectada por variaciones en los niveles de ingesta de colesterol dietético, la elevada cantidad de fitoesteroles de este estudio (>1.6 g) no permite comparar los resultados con los obtenidos con dosis moderadas como las que nos ocupan dejando abierta la posibilidad de que en estos casos la relación entre ambas cifras sí tenga un efecto significativo. Por tanto, podemos pensar que en este caso la menor ingesta de colesterol justifica el menor efecto observado sobre los niveles plasmáticos de colesterol. Por otro lado, el hecho de que la cohorte estudiada fuera considerablemente más numerosa permitió obtener significación estadística en los resultados.

De forma similar se pueden explicar las reducciones observadas unos años más tarde por Klingberg *et al* [110] que fueron comparables a las del estudio epidemiológico previo.

En el ensayo más reciente llevado a cabo por Racette *et al* [167] en el que se ha valorado una ingesta moderada (459 mg/día) con respecto a una baja (59 mg/día), las reducciones observadas fueron de 3.3% para el c-total y 5.0% para el c-LDL, aunque no fueron estadísticamente significativas. En este caso, los menores valores no se pueden, obviamente, atribuir a un rango pequeño de ingesta de fitoesteroles pero sí a que la dieta en este ensayo clínico aportaba cantidades bajas de colesterol (unos 170 mg/día) al igual que lo eran las concentraciones de c-LDL (3.5 mmol/L). Respecto a las concentraciones séricas de c-LDL, varios autores como Demonty *et al* [37] y AbuMweis *et al* [134] indican que el efecto de los valores basales es significativo, de manera que aquellos individuos con altas concentraciones obtienen reducciones significativamente mayores que los que presentan niveles óptimos o límites ante una misma cantidad de fitoesteroles ingeridos. Además, es conveniente añadir que en este trabajo los fitoesteroles se aportaban a través de una dieta deficiente en estos compuestos suplementada con bebidas que contenían las cantidades de los mismos que se querían aportar en cada una de las intervenciones. Es posible que la forma de aportar los fitoesteroles mediante suplementación frente al consumo de los naturalmente presentes en los alimentos pueda tener influencia sobre los efectos observados.

Como se ha comentado al principio de este apartado, los resultados obtenidos también están en consonancia con todos los que, durante las pasadas dos décadas, intentaban demostrar que los distintos efectos de diversos aceites vegetales sobre el colesterol plasmático no sólo se debía al diferente perfil de ácidos grasos sino que los contenidos en fitoesteroles de estos aceites tenían un papel fundamental. Con este trabajo, en el que el efecto de los fitoesteroles es independiente del ratio AGI/AGS se corroboran, en parte, estas conclusiones.

Finalmente, en nuestro trabajo los fitoesteroles no tuvieron efecto sobre la fracción HDL ni sobre los TG plasmáticos. Este resultado concuerda con las conclusiones de varios meta-análisis que valoran el efecto de los fitoesteroles sobre el perfil lipídico [88,135] así como con lo descrito en diversos artículos de revisión [86,104,139,140].

4. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

En relación con el efecto de la ingesta de fitoesteroles sobre el metabolismo del colesterol, los resultados obtenidos en este trabajo muestran conclusiones aparentemente contradictorias, puesto que la probable menor absorción de colesterol asociada a una mayor ingesta de fitoesteroles no implicó un incremento en la biosíntesis del esteroide.

4.1. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL

Para valorar la influencia de los fitoesteroles presentes de forma natural en la dieta sobre la eficiencia de absorción intestinal de colesterol se utilizaron como marcadores indirectos los ratios plasmáticos fitoesteroles-colesterol. Desde que Miettinen *et al* propusieran la metodología [65], numerosos estudios han demostrado que estos ratios son marcadores indirectos fiables de la absorción de colesterol. Sin embargo, puesto que las concentraciones séricas de los diferentes fitoesteroles están estrechamente relacionadas con las respectivas cantidades ingeridas con la dieta, es esencial usar dietas controladas en este sentido [190]. De otro modo, cuando las ingestas dietéticas de fitoesteroles son diferentes entre los grupos a comparar, los ratios plasmáticos fitoesteroles-colesterol únicamente pueden ser utilizados como indicadores de cambios en las cantidades ingeridas [112,114,167] partiendo de la premisa de que cuando la cantidad ingerida es mayor, la concentración plasmática correspondiente se ve incrementada.

En este trabajo, los ratios sitosterol, campesterol y estigmasterol-colesterol no aumentaron de forma significativa a lo largo de los terciles de ingesta de fitoesteroles tras ajustar por sexo, edad e IMC. La explicación a esta discrepancia respecto a lo esperado podría encontrarse en el hecho de que, además de la dieta, hay otros factores que pueden influir en las concentraciones plasmáticas de fitoesteroles [188]. Sin embargo, muchos de estos factores quedaron controlados en este estudio a través de los criterios de exclusión y de los modelos estadísticos aplicados. Así, factores como el sexo, la obesidad, la resistencia a la insulina y/o el seguimiento de un tratamiento con estatinas no influyeron en los resultados. Respecto al posible efecto de factores genéticos (principalmente, apoE y transportadores de membrana ABCG5/G8) no parece probable que éste sea significativo. En primer lugar, durante el tratamiento estadístico de los datos se eliminaron aquellos casos cuyos valores para las concentraciones de los fitoesteroles fueron extremos con el fin de descartar aquellos individuos que pudieran comportarse como hipo- o hiperabsorbedores. Además, si bien la importancia de la variabilidad para los genes que codifican los transportadores ABCG5/G8 sobre las concentraciones plasmáticas de los esteroides está comprobada [189], estudios recientes han mostrado que el genotipo de la apoE no se relaciona con los niveles de fitoesteroides del plasma [11,111]. Por último, los valores observados se encontraron dentro del rango fisiológico de otros estudios previos [111,112,114,170,188,222, 225-228] lo que corrobora la fiabilidad de los resultados.

Por lo tanto, sin descartar el efecto debido a factores individuales no controlados [188], el hecho de que el rango en el que oscilaron las ingestas de fitoesteroides entre los terciles superior e inferior fuera tan estrecho así como el pequeño tamaño de la muestra podrían ser los responsables de la similitud entre los valores séricos. Dos trabajos que relacionan ingesta de fitoesteroides y ratios fitoesteroides-colesterol corroboran estos resultados [112,114]. Con rangos de ingesta de

fitoesteroles similares, sólo cuando el número de individuos fue mayor [114] se encontró significación estadística a la relación entre sitosterol dietético y su correspondiente ratio.

Teniendo en cuenta la aparente relación lineal entre las cantidades de fitoesteroles presentes en la dieta y en el plasma, para controlar el efecto de la dieta sobre los marcadores indirectos de absorción se propuso realizar una corrección del ratio plasmático fitoesterol-colesterol por la ingesta correspondiente. Sin embargo, cuando se valoró la relación entre los niveles séricos de cada uno de los fitoesteroles respecto a su ingesta dietética, solamente se encontró una relación lineal significativa para el sitosterol. La explicación a este hecho se puede buscar en las diferentes tasas de absorción intestinal y secreción biliar que presentan cada uno de los fitoesteroles. Como se explicó, estos compuestos, una vez captados por el hígado, se pueden incorporar en las VLDL o bien secretar con la bilis. Debido a la baja afinidad de la ACAT por el β -sitosterol en el hígado, éste tiene una mayor tasa de secreción y mayor aclaramiento hepático que el campesterol [123]. Esto, junto con la mayor absorción de campesterol en el intestino (1.89% vs. 0.51%) [122], explica por qué las concentraciones plasmáticas de campesterol (y, por tanto, los ratios campesterol-colesterol) son mayores que las de sitosterol siendo que su contenido en la dieta es menor (37 vs. 290 mg/día). En el caso de estigmasterol, debido a su estructura molecular, las tasas de absorción y aclaramiento hepático probablemente sean intermedias lo que unido a las pequeñas cantidades ingeridas (30 mg/día) hace que se pierda la linealidad respecto a sus valores plasmáticos.

Así, la propuesta sólo tuvo sentido en el caso del sitosterol.

El hecho de que este ratio corregido mostrara una alta correlación con el ratio sitosterol-colesterol hace pensar que el ratio propuesto continúa siendo un indicador fiable de absorción intestinal de colesterol. Por lo tanto, la disminución lineal estadísticamente

significativa observada en nuestro estudio a lo largo de los terciles para el ratio sitosterol-colesterol corregido por la ingesta dietética de sitosterol puede ser interpretada como una absorción disminuida asociada a ingestas moderadas de fitoesteroles procedentes de la dieta habitual.

Estos resultados están en consonancia con las reducciones en la eficiencia de absorción intestinal, medida mediante métodos isotópicos, observadas en estudios clínicos [164-167]. Ostlund *et al* [165] observaron que, al eliminar los 270 mg de fitoesteroles presentes de forma natural en el aceite de maíz ingerido por sujetos sanos, la cantidad de colesterol absorbida se incrementaba en un 38%. Cuando se reponían los fitoesteroles en una cantidad de 150 mg la cantidad absorbida se reducía en un 12% y cuando la cantidad repuesta era de 300 mg, la reducción pasaba a ser del 28%. De igual forma, en un estudio posterior llevado a cabo por este mismo grupo de investigadores, una dosis de fitoesteroles de 328 mg procedentes de germen de trigo reducía la absorción intestinal de colesterol en sujetos sanos en un 42.8% [166]. También se llega a una conclusión similar en un estudio sobre individuos ileostomizados [164] en el que se compararon los aceites de oliva y de colza, en el marco de dos dietas sin diferencias en el perfil lipídico de la grasa y en la cantidad de colesterol. En éste, la diferencia de 326 mg de fitoesteroles entre ambas dietas supuso una disminución de la absorción de colesterol de un 11%. Finalmente, en el reciente ensayo llevado a cabo por Racette *et al* [167], una dosis de fitoesteroles de 459 mg/día supuso un 10% de reducción del porcentaje de colesterol absorbido respecto a la dosis de 59 mg/día.

4.2. INFLUENCIA DE LOS FITOESTEROLES DE LA DIETA SOBRE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL

Considerando la fuerte homeostasis del colesterol presente en los humanos [69], se podría esperar que la síntesis hepática de colesterol se incrementara como consecuencia de la absorción disminuida observada. De hecho, la correlación inversa entre los ratios *latosterol-colesterol* y *lanosterol-colesterol* y el ratio *sitosterol-colesterol* corregido, concuerda con la regulación de esta homeostasis. Sin embargo, el incremento esperado de los marcadores indirectos de síntesis de colesterol en nuestro estudio, aunque se puede observar una tendencia, ésta no fue estadísticamente significativa.

Una explicación podría ser que el efecto que se produce sobre la absorción de colesterol fuera de una magnitud que sólo provocara una pequeña respuesta compensatoria sobre la síntesis de colesterol la cual no sería suficiente para alcanzar significación estadística. De hecho, está documentado que el descenso en la absorción inducido por el tratamiento con fitoesteroles (incluso a dosis altas procedentes de alimentos suplementados) es consistentemente más pronunciado que el aumento recíproco en la síntesis y es el motivo por el cual el efecto neto sobre el *pool* corporal de colesterol es una reducción en las concentraciones [69]. En el ensayo de Racette *et al* (167), donde la absorción disminuía en un 10% al comparar la dosis de fitoesteroles de 459 mg/día con respecto a la dosis de 59 mg/día, el valor del ratio *latosterol-colesterol*, marcador indirecto de síntesis, sí aumentó de forma significativa (24%). Sin embargo, los terciles comparados en nuestro estudio no tienen esta diferencia tan marcada en la ingesta de fitoesteroles lo que explica los resultados encontrados.

En cualquier caso, tal y como se ha indicado anteriormente, el pequeño tamaño de la muestra también podría explicar la falta de significación estadística.

Finalmente, estudios *in vitro* y en ratas [229,230] apuntan que los Δ^{22} -esteroles, como el estigmasterol, pueden tener un posible efecto inhibidor de la síntesis endógena puesto que parecen competir por la esterol- Δ^{24} -reductasa, incluso a las bajas concentraciones intracelulares observadas.

En cualquier caso, los valores observados se encontraron dentro del rango fisiológico de otros estudios previos [79,111,112,114,170,222,225,226,228] lo que refuerza la fiabilidad de los resultados.

5. PAPEL DE LOS FITOESTEROLES EN EL EFECTO BENEFICIOSO DEL PATRÓN DE DIETA MEDITERRÁNEA

La relación lineal encontrada entre el *score* de adherencia a la DM y la ingesta de fitoesteroles podría explicar parcialmente el beneficio observado de este patrón dietético sobre el perfil lipídico. Como se concluye de nuestros resultados, moderadas dosis de estos compuestos presentes en la dieta ejercen un papel regulador de las concentraciones plasmáticas de c-LDL como consecuencia de su efecto sobre la absorción de colesterol. El aumento del grado de adherencia desde un valor de 3.5 en el tercil inferior a uno de 5.5 en el superior está asociado a una disminución significativa de las concentraciones séricas de c-LDL.

Una mayor adherencia a una DM se asocia con una mejora significativa en el estado de salud. Así, en un reciente meta-análisis [11] en el que se analizaron los estudios de 12 cohortes, se observó que un incremento de dos puntos en el *score* de adherencia a una DM se relacionó con una reducción significativa en la mortalidad total. De entre las enfermedades estudiadas en este mismo trabajo, la mortalidad por enfermedad cardiovascular se vio reducida en un 9%. Más recientemente, en una valoración de la relación entre DM e incidencia de enfermedad cardiovascular sobre población española se

concluyó que ese mismo incremento de dos puntos en el *score* se asociaba con un 20% de reducción del riesgo cardiovascular [14].

Por este motivo, buscar cuáles pueden ser los componentes de DM que le proporcionan este carácter de patrón dietético saludable ha sido el objetivo de numerosos estudios. Existen evidencias sobre el efecto protector de las frutas y hortalizas en relación con las enfermedades cardiovasculares y sobre el efecto beneficioso del consumo de aceite de oliva y ácidos grasos ω -3 del pescado sobre el nivel de lipoproteínas plasmáticas pero las pruebas sobre el efecto positivo de legumbres y cereales son insuficientes [196]. Sin embargo, no se han identificado asociaciones apreciables con ningún alimento individual [10,231]. En conclusión, el responsable de la relación entre DM y salud parece ser el efecto sinérgico y acumulativo de todas las sustancias que este tipo de dieta aporta más que el efecto de un sólo grupo de alimentos [232]. En este sentido, Saura-Calixto y Goñi han propuesto una definición complementaria de la DM [198] que tiene en cuenta una serie de parámetros con los que se pretende considerar aquellos componentes bioactivos que presenta este patrón dietético. Uno de estos parámetros es el contenido de fitoesteroles naturalmente presentes en la dieta de los individuos. El rango que estos autores proponen para considerarlo un indicador de DM se sitúa entre 370 y 555 mg/día. El valor obtenido para el tercil superior en este estudio, es decir, para el grupo de individuos con un perfil lipídico más saludable fue de 545 mg/día, valor que se sitúa en la parte superior del rango indicado.

Esta aproximación propuesta por Saura-Calixto y Goñi podría tener mayor interés que el cálculo del grado de adherencia mediante el uso de escalas en las que el número de alimentos o nutrientes es limitado y en las que a todos los componentes se les asigna la misma puntuación puesto que en este caso el resultado final puede estar infravalorado [193,196]. Es, probablemente, el caso de la muestra

estudiada. Mientras que la adherencia se podría considerar alta según la propuesta de Saura-Calixto y Goñi, ya que se obtuvieron valores altos para tres de los indicadores que proponen (AGMI/AGS, fibra y fitoesteroles), el valor del *score* basado en la escala de Trichopoulou *et al* [10] no superaron la calificación de un grado de adherencia moderado. La explicación a esto viene dada por el hecho de que pequeños cambios en el consumo de algunos alimentos del mismo grupo pueden modificar las cantidades ingeridas de los compuestos bioactivos sin cambios significativos en el *score* de adherencia al patrón dietético.

En consecuencia, aunque se ha indicado que modificar la ingesta de unos pocos nutrientes o alimentos probablemente no tenga una influencia sustancial sobre la salud cardiovascular [233], estos cambios sí permitirían realizar pequeñas mejoras en los hábitos dietéticos de los individuos que incrementarían el contenido en compuestos cuya bioactividad está comprobada. Un ejemplo sobre los beneficios de mejorar una DM con determinados alimentos son los resultados del estudio PREDIMED, todavía en desarrollo, en el cual la mejora se realiza mediante la suplementación con aceite de oliva o con frutos secos [112].

6. INTERÉS DEL ESTUDIO REALIZADO

Nuestro principal descubrimiento fue que moderadas dosis de fitoesteroles presentes en alimentos naturales procedentes de la dieta habitual se asociaron tanto con menores concentraciones séricas de c-LDL como con una tasa reducida de absorción intestinal de colesterol, descrita por el ratio sitosterol-colesterol corregido por la ingesta de sitosterol disminuido.

Está ampliamente aceptado que las frutas y hortalizas así como los aceites vegetales insaturados son componentes esenciales de una dieta saludable y que su consumo ayuda a prevenir una amplia variedad de enfermedades, sin embargo, existen muchos intentos por

identificar qué componentes específicos son los responsables de tales efectos. Los resultados obtenidos en este estudio parecen indicar que los fitoesteroles aportados por las frutas y hortalizas así como por los aceites vegetales insaturados pueden jugar un importante papel. Así, en el abanico de hipótesis abiertas sobre cuáles son los componentes bioactivos de estos alimentos, junto a nutrientes antioxidantes como la vitamina C, E o carotenos y otros compuestos que previenen el daño oxidativo cabría la posibilidad de plantear el efecto de los fitoesteroles como agentes hipocolesterolemiantes.

Finalmente, los resultados de este estudio confirman que parte de los efectos beneficiosos del patrón de DM sobre el perfil lipídico y, por tanto, sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular es debido a las dosis moderadas de fitoesteroles, los cuales pueden ser bioactivos incluso a las pequeñas cantidades presentes en sus matrices alimentarias naturales.

Desde el punto de vista del consejo dietético en prevención primaria de enfermedad cardiovascular e incluso en prevención secundaria, el conocimiento de aquellos alimentos que se pueden considerar fuentes concentradas de fitoesteroles puede resultar muy importante. Incluso un pequeño cambio, como intercambiar un alimento con bajo contenido en fitoesteroles por otro de las mismas características nutricionales pero rico en estos compuestos, supone incrementos que, como se ha mostrado en este trabajo, pueden asociarse a beneficios hipocolesterolemiantes.

7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. La muestra estudiada no es representativa de la población general. Como se desprende del patrón dietético mostrado, se trata de una muestra de población Mediterránea acostumbrada a una alta ingesta de alimentos vegetales. Además, es un hecho bien conocido que los individuos que participan voluntariamente en la mayoría de los estudios epidemiológicos, habitualmente son más conscientes de su

estado de salud y tienen estilos de vida más saludables que la población general. Por ambos motivos, los resultados obtenidos probablemente no puedan ser generalizados a otras poblaciones.

2. El pequeño número de participantes en el estudio ha podido reducir la potencia estadística. Sin embargo, una muestra más numerosa no supondría cambios en el sentido de los resultados sino, por el contrario, sería esperable una mayor significación en las diferencias encontradas.

3. La metodología utilizada en la estimación de la ingesta dietética. Los cuestionarios de frecuencia de consumo, pese a ser una de las herramientas más utilizadas en epidemiología para estimar la dieta habitual de los individuos por su gran cantidad de ventajas prácticas, se basan en información subjetiva proporcionada por los propios individuos estudiados y algunos sujetos pueden haber distorsionado su ingesta dietética real. Además, algunos autores han puesto de relieve que este instrumento de medida no previene de un posible sesgo de mala clasificación de los individuos. Sin embargo, el uso de un cuestionario previamente validado [202,218] y cuya reproducibilidad se ha comprobado recientemente [203] respalda los resultados obtenidos. Si bien es cierto que en estos trabajos el cuestionario no se ha validado para cuantificar expresamente fitoesteroides, el hecho de que las fuentes alimentarias que los proporcionan sí estén incluidas (i.e. los coeficientes intraclase estimados para hortalizas, frutas y aceite de oliva fueron 0.81, 0.72 y 0.71, respectivamente, $p < 0.001$ [218]) apoya la fiabilidad de los resultados.

4. La posibilidad de que exista un sesgo de confusión no se puede descartar habida cuenta del diseño observacional del estudio. No obstante, esta potencial confusión se ha intentado controlar mediante la definición de unos criterios de inclusión y exclusión muy estrictos y mediante la introducción del análisis multivariable donde se han

incluido los principales factores de confusión como son el IMC, la edad, el sexo así como variables dietéticas como la ingesta energética total, el ratio AGI/AGS y la fibra dietética. En cualquier caso, es posible que existan factores que no se han medido que podrían ser fuertes predictores del resultado obtenido. Entre estos últimos destaca la no consideración de ciertos factores genéticos, especialmente para los transportadores ABCG5/G8, que influyen de forma directa sobre el metabolismo del colesterol, sin embargo, parece poco probable que exista una distribución sesgada de los individuos con ciertas características genéticas en los terciles comparados que haya podido falsear el resultado final.

5. No se ha comprobado la validez del marcador indirecto de absorción propuesto mediante métodos isotópicos lo que podría ser una posible continuación de este estudio. En cualquier caso, la consistencia del resultado con los de estudios previos apoya las conclusiones obtenidas.

8. FORTALEZAS DEL ESTUDIO

1. Este estudio observacional reproduce las condiciones de vida reales de los individuos con alimentos elegidos directamente por ellos y preparados en sus respectivos hogares.

2. Los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos habitualmente son autoadministrados, sin embargo, en este estudio el CFC fue cumplimentado mediante entrevista por dietistas entrenados con lo que se consiguió reducir el sesgo introducido por los sujetos estudiados.

3. La ingesta de fitoesteroles se ha determinado utilizando principalmente datos procedentes de tablas construidas con alimentos españoles [97] pero, a su vez, se tuvieron en cuenta las aportaciones de otros alimentos que no aparecían en estas tablas y que se

consideran importantes por sus concentraciones en este tipo de compuestos [90,91].

4. La novedad de este trabajo ha sido unir en una sola investigación el estudio del perfil lipídico y del metabolismo del colesterol, mediante marcadores indirectos, con los datos de consumo de fitoesteroles procedentes la dieta habitual en una población española no consumidora de alimentos funcionales enriquecidos, confirmando los resultados obtenidos en ensayos de intervención con dosis moderadas de fitoesteroles [112,167].

CONCLUSIONES

1. En la muestra estudiada, la ingesta de carne y productos cárnicos fue alta y la de productos lácteos, pescados y huevos así como la de frutas, hortalizas y aceite de oliva fue adecuada. La cantidad consumida de frutos secos, legumbres, cereales y patatas fue baja. El resto de alimentos valorados se consumieron de forma ocasional.
2. El grado de adherencia del patrón dietético de los individuos estudiados al patrón de Dieta Mediterránea fue medio con un valor de 4.3 sobre una puntuación máxima de 9.
3. La mediana de ingesta de fitoesteroles totales fue de 489 mg/día, valor superior a la media de otros países europeos así como a los valores estimados anteriormente para la población española. De todos los compuestos valorados, el β -sitosterol fue el más abundante suponiendo un 60% de la ingesta total.
4. La ingesta de fitoesteroles se relacionó de forma directa con el ratio AGI/AGS y la fibra dietética y de forma inversa con la cantidad de colesterol dietético. Como consecuencia, los individuos con mayores ingestas de fitoesteroles presentaron un ratio fitoesteroles/colesterol más alto.
5. La variación en la ingesta de fitoesteroles observada dentro del grupo estudiado estuvo motivada por las diferencias existentes en el consumo de frutas, hortalizas y aceite de oliva.
6. Un aumento en la ingesta de fitoesteroles supuso una disminución significativa de las concentraciones de c-LDL y no significativa de las de c-total. El consumo de fitoesteroles no afectó a las concentraciones de c-HDL ni de TG.
7. Una menor absorción intestinal de colesterol, indirectamente estimada mediante marcadores, se asoció con una mayor ingesta de fitoesteroles sin que se apreciara un aumento significativo de la síntesis.

8. La corrección de los ratios plasmáticos fitoesteroles-colesterol por la ingesta dietética del fitoesterol correspondiente puede utilizarse para subsanar la limitación que se presenta al usar los marcadores indirectos para valorar cambios en la tasa de absorción intestinal de colesterol bajo diferentes condiciones de ingesta de fitoesteroles.

9. Las dosis moderadas de fitoesteroles presentes de forma natural en la dieta habitual de los individuos estudiados se asociaron con menores concentraciones séricas de c-LDL y con inferiores tasas de absorción intestinal de colesterol, evaluadas mediante el ratio plasmático sitosterol-colesterol corregido por la ingesta dietética de sitosterol.

10. El conocimiento de aquellos alimentos considerados fuentes de fitoesteroles puede resultar muy importante en el consejo dietético para la prevención de enfermedad cardiovascular por sus beneficios hipocolesterolemiantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO - Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares. Nota informativa. Consultado en Agosto, 2010. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>
2. Instituto Nacional de Estadística. España. Defunciones según la causa de muerte. Consultado en Agosto, 2010. Disponible en:
<http://www.ine.es/inebmenu/indice.htm>
3. Kesteloot H, Sans S, Kromhout D. Dynamics of cardiovascular and all-cause mortality in Western and Eastern Europe between 1970 and 2000. *Eur Heart J* 2006;27(1):107-113.
4. Sociedad Española de Arteriosclerosis. Informe SEA 2007: Las Enfermedades Cardiovasculares en España: Hechos y cifras. Consultado en Marzo, 2010. Disponible en:
<http://www.searteriosclerosis.org/>
5. Consejo Económico y Social de Aragón. Gobierno de Aragón. Informe anual sobre la situación económica y social de Aragón, 2008. Consultado en Marzo, 2010. Disponible en:
<http://portal.aragon.es/portal/page/portal/CES/INFORMES/Informe%20año%202008>
6. WHO - Organización Mundial de la Salud. The atlas of heart disease and stroke. 2004. Consultado en Marzo, 2010. Disponible en:
<http://www.who.int>
7. Keys AE. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 1970;41(Suppl I):1-211.
8. Menotti A, Kromhout D, Blackburn H, Fidanza F, Buzina R, Nissinen A. Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. The Seven Countries Study Research Group. *Eur J Epidemiol* 1999;15(6):507-515.
9. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999;353(9164):1547-1557.
10. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348(26):2599-2608.

11. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ* 2008;337:a1344.
12. Buckland G, Gonzalez CA, Agudo A, Vilardell M, Berenguer A, Amiano P, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2009;170(12):1518-1529.
13. Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation* 2009;119(8):1093-1100.
14. Martinez-Gonzalez MA, Garcia-Lopez M, Bes-Rastrollo M, Toledo E, Martinez-Lapiscina EH, Delgado-Rodriguez M, et al. Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: A Spanish cohort. *Nutr.Metab.Cardiovasc.Dis.* 2010 Jan 20 (*In press*)
15. Sehayek E, Nath C, Heinemann T, McGee M, Seidman CE, Samuel P, et al. U-shape relationship between change in dietary cholesterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary cholesterol absorption in humans. *J.Lipid Res.* 1998;39(12):2415-2422.
16. Labarthe DR. Epidemiology and prevention of cardiovascular diseases: a global challenge. USA: Aspen Publishers Inc.; 1998.
17. Steinberg D. The cholesterol wars. The skeptics vs. the preponderance of evidence. Elsevier Inc; 2007. Consultado en Marzo, 2010. Disponible en: www.sciencedirect.com
18. Kwiterovich PO,Jr. State-of-the-art update and review: clinical trials of lipid-lowering agents. *Am J Cardiol* 1998;82(12A):3U-17U; discussion 39U-41U.
19. Stamler J, Daviglus ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA* 2000;284(3):311-318.
20. Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis* 2009;206(2):611-616.
21. Gould AL, Davies GM, Alemao E, Yin DD, Cook JR. Cholesterol reduction yields clinical benefits: meta-analysis including recent trials. *Clin Ther* 2007;29(5):778-794.

22. Preiss D, Sattar N. Lipids, lipid modifying agents and cardiovascular risk: a review of the evidence. *Clin Endocrinol* 2009;70(6):815-828.

23. Delahoy PJ, Magliano DJ, Webb K, Grobler M, Liew D. The relationship between reduction in low-density lipoprotein cholesterol by statins and reduction in risk of cardiovascular outcomes: an updated meta-analysis. *Clin Ther* 2009;31(2):236-244.

24. Grundy SM, Cleeman JI, Bairey Merz CN, Brewer Jr HB, Clark LT, Hunninghake DB, et al. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(3):720-732.

25. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486-2497.

26. Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2000;151(2):357-379.

27. Civeira F, International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004;173(1):55-68.

28. Snieder H, van Doornen LJ, Boomsma DI. Dissecting the genetic architecture of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: lessons from twin studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(12):2826-2834.

29. McCaffery JM, Poque-Geile MF, Muldoon MF, Debski TT, Wing RR, Manuck SB. The nature of the association between diet and serum lipids in the community: a twin study. *Health Psychol* 2001;20(5):341-350.

30. American Heart Association Nutrition Committee, Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006;114(1):82-96.

31. Lobos JM, Royo-Bordonada MA, Brotons C, Alvarez-Sala L, Armario P, Maiques A, et al. European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice: CEIPC 2008 Spanish adaptation. *Rev Esp Salud Publica* 2008;82(6):581-616.

32. Lichtenstein AH. Thematic review series: patient-oriented research. Dietary fat, carbohydrate, and protein: effects on plasma lipoprotein patterns. *J Lipid Res* 2006;47(8):1661-1667.
33. Van Horn L, McCoin M, Kris-Etherton PM, Burke F, Carson JA, Champagne CM, et al. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *J Am Diet Assoc* 2008;108(2):287-331.
34. Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1999;69(1):30-42.
35. Lupton JR, Turner ND. Dietary fiber and coronary disease: does the evidence support an association? *Curr Atheroscler Rep* 2003;5(6):500-505.
36. Theuwissen E, Mensink RP. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiol Behav* 2008;94(2):285-292.
37. Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Duchateau GS, Meijer L, Zock PL, et al. Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J Nutr* 2009;139(2):271-284.
38. Kerckhoffs DA, Brouns F, Hornstra G, Mensink RP. Effects on the human serum lipoprotein profile of beta-glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *J Nutr* 2002;132(9):2494-2505.
39. Ostlund RE, Jr. Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids* 2007;42(1):41-45.
40. Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* 2007;69:221-248.
41. Navarro V, Zabala A, Gomez S, Portillo MP. Metabolismo del colesterol: bases actualizadas. *Rev Esp Obes* 2009;7(6):360-384.
42. Jonas A, Phillips MC. Lipoprotein structure. En: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th ed.: Elsevier B.V.; 2008. p. 485-506.
43. Bhatnagar D, Soran H, Durrington PN. Hypercholesterolaemia and its management. *BMJ* 2008 Aug 21;337:a993.
44. Fielding CJ, Fielding PE. Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. En: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of*

Lipids, Lipoproteins and Membranes. 5th ed.: Elsevier B.V.; 2008. p. 533-553.

45. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J.Lipid Res.* 1993;34(10):1637-1659.

46. Fernandez C, Martin M, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA. Efecto de los fitosteroles sobre la biosíntesis de colesterol y la proliferación en células humanas. *Clin Invest Arterioscl* 2003;15(5):175-183.

47. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343(6257):425-430.

48. Lammert F, Wang DQ. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology* 2005;129(2):718-734.

49. Sanclemente T, Marques-Lopes I, Puzo J, Garcia-Otin AL. Role of naturally-occurring plant sterols on intestinal cholesterol absorption and plasmatic levels. *J Physiol Biochem* 2009;65(1):87-98.

50. Altmann SW, Davis HR,Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303(5661):1201-1204.

51. Davis HR,Jr, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an Intestinal Sterol Transporter. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(7):679-683.

52. Smart EJ, De Rose RA, Farber SA. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004;101(10):3450-3455.

53. Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis* 2009;203(1):18-31.

54. Joyce C, Skinner K, Anderson RA, Rudel LL. Acyl-coenzyme A:cholesteryl acyltransferase 2. *Curr Opin Lipidol* 1999;10(2):89-95.

55. Lee RG, Willingham MC, Davis MA, Skinner KA, Rudel LL. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. *J Lipid Res* 2000;41(12):1991-2001.

56. Hussain MM, Bakillah A. New approaches to target microsomal triglyceride transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 2008;19(6):572-578.

57. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002;110(5):671-680.

58. Duan LP, Wang HH, Wang DQ. Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice. *J Lipid Res* 2004;45(7):1312-1323.

59. Temel RE, Lee RG, Kelley KL, Davis MA, Shah R, Sawyer JK, et al. Intestinal cholesterol absorption is substantially reduced in mice deficient in both ABCA1 and ACAT2. *J Lipid Res* 2005;46(11):2423-2431.

60. Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* 2007;282(27):19493-19501.

61. Altmann SW, Davis HR, Jr, Yao X, Lavery M, Compton DS, Zhu LJ, et al. The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochim Biophys Acta* 2002;1580(1):77-93.

62. Labonte ED, Howles PN, Granholm NA, Rojas JC, Davies JP, Ioannou YA, et al. Class B type I scavenger receptor is responsible for the high affinity cholesterol binding activity of intestinal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771(9):1132-1139.

63. Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Pfenninger A, Frick W, Jahne G, et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem* 2005;280(2):1306-1320.

64. Levy E, Spahis S, Sinnott D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, et al. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(3):310-318.

65. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol*. 1990;131(1):20-31.

66. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE, Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res* 1999;40(2):302-308.

67. Cohen DE. Balancing Cholesterol Synthesis and Absorption in the Gastrointestinal Tract. *J.Clin.Lipidol.* 2008;2(2):S1-S3.

68. Ros E. Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Rev Esp Cardiol Supl* 2006;6:52G-62G.

69. Santosa S, Varady KA, AbuMweis S, Jones PJ. Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Sci* 2007;80(6):505-514.

70. Kempen HJ, de Knijff P, Boomsma DI, van der Voort HA, Gevers Leuven JA, Havekes L. Plasma levels of lathosterol and phytosterols in relation to age, sex, anthropometric parameters, plasma lipids, and apolipoprotein E phenotype, in 160 Dutch families. *Metabolism* 1991;40(6):604-611.

71. Wang DQ. Aging per se is an independent risk factor for cholesterol gallstone formation in gallstone susceptible mice. *J Lipid Res* 2002;43(11):1950-1959.

72. Duan LP, Wang HH, Ohashi A, Wang DQ. Role of intestinal sterol transporters Abcg5, Abcg8, and Npc1l1 in cholesterol absorption in mice: gender and age effects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(2):G269-76.

73. Wang HH, Afdhal NH, Wang DQ. Estrogen receptor alpha, but not beta, plays a major role in 17beta-estradiol-induced murine cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 2004;127(1):239-249.

74. De Marinis E, Martini C, Trentalance A, Pallottini V. Sex differences in hepatic regulation of cholesterol homeostasis. *J Endocrinol* 2008;198(3):635-643.

75. Atkins D, Walsh JM, Pignone M, Phillips CJ. Lipid screening in women. *J Am Med Womens Assoc* 2000;55(4):234-240.

76. Derby CA, Crawford SL, Pasternak RC, Sowers M, Sternfeld B, Matthews KA. Lipid changes during the menopause transition in relation to age and weight: the Study of Women's Health Across the Nation. *Am J Epidemiol* 2009;169(11):1352-1361.

77. Cauley JA, Gutai JP, Kuller LH, Powell JG. The relation of endogenous sex steroid hormone concentrations to serum lipid and lipoprotein levels in postmenopausal women. *Am.J.Epidemiol.* 1990;132(5):884-894.

78. Di Buono M, Hannah JS, Katzel LI, Jones PJ. Weight loss due to energy restriction suppresses cholesterol biosynthesis in overweight, mildly hypercholesterolemic men. *J Nutr* 1999;129(8):1545-1548.
79. Miettinen TA, Gylling H. Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis* 2000;153(1):241-248.
80. Miettinen TA, Kesaniemi YA. Cholesterol absorption: regulation of cholesterol synthesis and elimination and within-population variations of serum cholesterol levels. *Am J Clin Nutr* 1989;49(4):629-635.
81. Stahlberg D, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Forsell P, Nilsell K, et al. Hepatic cholesterol metabolism in human obesity. *Hepatology* 1997;25(6):1447-1450.
82. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 2001;5(4):378-387.
83. Miettinen TA, Gylling H. Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr Opin Lipidol* 1999;10(1):9-14.
84. Sudhop T, von Bergmann K. Cholesterol absorption inhibitors for the treatment of hypercholesterolaemia. *Drugs* 2002;62(16):2333-2347.
85. Pollak OJ. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 1953;7(5):702-706.
86. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 2002;41(6):457-500.
87. Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo Ji, Lampi AM. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000;80(7):939-966.
88. Law M. Plant sterol and stanol margarines and health. *BMJ* 2000;320(7238):861-864.
89. Ostlund RE, Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2002;22:533-549.
90. United States Department of Agriculture. National Nutrient Database. Consultado en Marzo, 2010. Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.
91. National Institute for Health and Welfare. Fineli® - Finnish Food Composition Database. Consultado en Marzo, 2010. Disponible en:

<http://www.fineli.fi/foodlist.php?lang=en>.

92. Normen L, Johnsson M, Andersson H, van Gameren Y, Dutta P. Plant sterols in vegetables and fruits commonly consumed in Sweden. *Eur J Nutr* 1999;38(2):84-89.

93. Normen L, Bryngelsson S, Johnsson M, Evheden P, Ellegård L, Brants H, et al. The Phytosterol Content of Some Cereal Foods Commonly Consumed in Sweden and in the Netherlands. *J Food Compost Anal* 2002;15(6):693-704.

94. Phillips KM, Ruggio DM, Toivo JI, Swank MA, Simpkins AH. Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats. *J Food Compost Anal* 2002;15(2):123-142.

95. Phillips KM, Ruggio DM, Ashraf-Khorassani M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J.Agric.Food Chem.* 2005;53(24):9436-9445.

96. Han JH, Yang YX, Feng MY. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. *Biomed Environ Sci* 2008; 21(6):449-453.

97. Jimenez-Escrig A, Santos-Hidalgo AB, Saura-Calixto F. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *J Agric Food Chem* 2006;54(9):3462-3471.

98. Normen AL, Brants HA, Voorrips LE, Andersson HA, van den Brandt PA, Goldbohm RA. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;74(1):141-148.

99. Ellegard LH, Andersson SW, Normen AL, Andersson HA. Dietary plant sterols and cholesterol metabolism. *Nutr Rev* 2007;65(1):39-45.

100. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España. La alimentación mes a mes: Diciembre 2009. Consultado en Marzo, 2010. Disponible en: <http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/consumo/ultimdatos.htm#art8>.

101. Albi T, Lanzon A, Guinda A, Perez-Camino MC, Leon M. Microwave and Conventional Heating Effects on Some Physical and Chemical Parameters of Edible Fats. *J Agric Food Chem* 1997;45(8): 3000-3003.

102. Weingartner O, Bohm M, Laufs U. Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2009;30(4):404-409.

103. Ahrens EH, Jr, Boucher CA. The composition of a simulated American diet. Comparison of chemical analyses and estimates from food composition tables. *J Am Diet Assoc* 1978;73(6):613-620.

104. Ling WH, Jones PJ. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 1995;57(3):195-206.

105. Morton GM, Lee SM, Buss DH, Lawrance P. Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet. *J Hum Nutr Diet* 1995;8(6):429-440.

106. de Vries JHM, Jansen A, Kromhout D, van de Bovenkamp P, van Staveren WA, Mensink RP, et al. The Fatty Acid and Sterol Content of Food Composites of Middle-Aged Men in Seven Countries. *J Food Compost Anal* 1997;10(2):115-141.

107. Valsta LM, Lemstrom A, Ovaskainen ML, Lampi AM, Toivo J, Korhonen T, et al. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *Br J Nutr* 2004;92(4):671-678.

108. Andersson SW, Skinner J, Ellegard L, Welch AA, Bingham S, Mulligan A, et al. Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr* 2004;58(10):1378-1385.

109. Klingberg S, Andersson H, Mulligan A, Bhaniani A, Welch A, Bingham S, et al. Food sources of plant sterols in the EPIC Norfolk population. *Eur J Clin Nutr* 2008;62(6):695-703.

110. Klingberg S, Ellegard L, Johansson I, Hallmans G, Weinehall L, Andersson H, et al. Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):993-1001.

111. Escuriol V, Cofan M, Moreno-Iribas C, Larrañaga N, Sanchez MJ, Navarro C, et al. Fitoesteroles plasmáticos: marcadores de una dieta saludable y un riesgo cardiometabólico menor en la población española del estudio EPIC. *Clin Invest Arterioscl* 2009;21(3):106-114.

112. Escuriol V, Cofan M, Serra M, Bullo M, Basora J, Salas-Salvado J, et al. Serum sterol responses to increasing plant sterol intake from natural foods in the Mediterranean diet. *Eur J Nutr* 2009;48(6):373-382.

113. Escuriol V, Mari-Dell'Olmo M, Rohlfis I, Borrell C, Chirlaque MD, Buckland G, et al. Plant sterol intake and education level in the Spanish EPIC cohort. *Nutrition* 2009;25(7-8):769-773.

114. Escuriol V, Cofan M, Moreno-Iribas C, Larranaga N, Martinez C, Navarro C, et al. Phytosterol plasma concentrations and coronary heart disease in the prospective Spanish EPIC cohort. *J Lipid Res* 2010;51(3):618-624.

115. Agren JJ, Tvrzicka E, Nenonen MT, Helve T, Hanninen O. Divergent changes in serum sterols during a strict uncooked vegan diet in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Nutr* 2001;85(2):137-139.

116. Verger P, Ireland J, Moller A, Abravicius JA, De Henauw S, Naska A, et al. Improvement of comparability of dietary intake assessment using currently available individual food consumption surveys. *Eur J Clin Nutr* 2002;56 Suppl 2:S18-24.

117. Cerqueira MT, Fry MM, Connor WE. The food and nutrient intakes of the Tarahumara Indians of Mexico. *Am J Clin Nutr* 1979;32(4):905-915.

118. Vuoristo M, Miettinen TA. Absorption, metabolism, and serum concentrations of cholesterol in vegetarians: effects of cholesterol feeding. *Am J Clin Nutr* 1994;59(6):1325-1331.

119. Salen G, Ahrens EH, Jr, Grundy SM. Metabolism of beta-sitosterol in man. *J Clin Invest* 1970;49(5):952-967.

120. Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 1993;23(12):827-831.

121. Lutjohann D, Bjorkhem I, Beil UF, von Bergmann K. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res* 1995;36(8):1763-1773.

122. Ostlund RE, Jr, McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF, et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytosterols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(4):E911-6.

123. Sudhop T, Sahin Y, Lindenthal B, Hahn C, Luers C, Berthold HK, et al. 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* 2002;51(6):860-863.

124. Miettinen TA, Vuoristo M, Nissinen MJ, Jarvinen HJ, Gylling H. Serum, biliary, and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized

patients before and during consumption of stanol ester margarine. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5):1095-1102.

125. Lin X, Ma L, Racette SB, Anderson Spearie CL, Ostlund RE, Jr. Phytosterol glycosides reduce cholesterol absorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296(4):G931-5.

126. Igel M, Giesa U, Lutjohann D, von Bergmann K. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J Lipid Res* 2003;44(3):533-538.

127. Patel MD, Thompson PD. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis* 2006;186(1):12-19.

128. von Bergmann K, Sudhop T, Lutjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol* 2005;96(1A):10D-14D.

129. Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest* 1974;53(4):1033-1043.

130. John S, Sorokin AV, Thompson PD. Phytosterols and vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(1):35-40.

131. Patel SB, Zablocki CJ. Plant Sterols and Stanols: Their Role in Health and Disease. *J Clin Lipidol* 2008;2(2):S11-S19.

132. Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R, et al. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 2003;78(8):965-978.

133. Berger A, Jones PJ, Abumweis SS. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis* 2004;3:5.

134. AbuMweis SS, Barake R, Jones PJ. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res* 2008;52.

135. Wu T, Fu J, Yang Y, Zhang L, Han J. The effects of phytosterols/stanols on blood lipid profiles: a systematic review with meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr* 2009;18(2):179-186.

136. Moruisi KG, Oosthuizen W, Opperman AM. Phytosterols/stanols lower cholesterol concentrations in familial hypercholesterolemic subjects: a systematic review with meta-analysis. *J Am Coll Nutr* 2006;25(1):41-48.

137. Baker WL, Baker EL, Coleman CI. The effect of plant sterols or stanols on lipid parameters in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;84(2):e33-7.

138. AbuMweis SS, Jones PJ. Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *Curr Atheroscler Rep* 2008;10(6):467-472.

139. de Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem* 2003;14(7):362-369.

140. Quilez J, García-Lorda P, Salas-Salvado J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin Nutr* 2003;22(4):343-351.

141. Kassis AN, Vanstone CA, AbuMweis SS, Jones PJ. Efficacy of plant sterols is not influenced by dietary cholesterol intake in hypercholesterolemic individuals. *Metabolism* 2008;57(3):339-346.

142. Brufau G, Canela MA, Rafecas M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutr Res* 2008;28(4):217-225.

143. Trautwein EA, Duchateau GS, Lin Y, Mel'nikov SM, Molhuizen HOF, Ntanos FY. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Tech* 2003;105(3-4):171-185.

144. Valenzuela B. A, Ronco M. AM. Fitosteroles y fitoestanoles: Aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Rev Chil Nutr* 2004;31:161.

145. Plat J, Mensink RP. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol* 2005;96(1A):15D-22D.

146. Micallef MA, Garg ML. Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia. *J Nutr Biochem* 2009;20(12):927-939.

147. Ikeda I, Tanabe Y, Sugano M. Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J Nutr Sci Vitaminol* 1989;35(4):361-369.

148. Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, et al. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(4):1259-1263.

149. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I, Makishima M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters

by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003; 278(38):36091-36098.

150. Plat J, Nichols JA, Mensink RP. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res* 2005;46(11):2468-2476.

151. Field FJ, Born E, Mathur SN. Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression. *J Lipid Res* 2004; 45(12):2252-2259.

152. Weststrate JA, Ayesch R, Bauer-Plank C, Drewitt PN. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine. *Food Chem Toxicol* 1999;37(11):1063-1071.

153. Jones PJ, Raeini-Sarjaz M, Ntanios FY, Vanstone CA, Feng JY, Parsons WE. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *J Lipid Res* 2000;41(5):697-705.

154. Plat J, Mensink RP. Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women. *FASEB J* 2002;16(2):258-260.

155. Racette SB, Spearie CA, Phillips KM, Lin X, Ma L, Ostlund RE, Jr. Phytosterol-deficient and high-phytosterol diets developed for controlled feeding studies. *J Am Diet Assoc* 2009;109(12):2043-2051.

156. Pelletier X, Belbraouet S, Mirabel D, Mordret F, Perrin JL, Pages X, et al. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann Nutr Metab* 1995;39(5):291-295.

157. Howell TJ, MacDougall DE, Jones PJ. Phytosterols partially explain differences in cholesterol metabolism caused by corn or olive oil feeding. *J Lipid Res* 1998;39(4):892-900.

158. Sarkkinen ES, Uusitupa MI, Gylling H, Miettinen TA. Fat-modified diets influence serum concentrations of cholesterol precursors and plant sterols in hypercholesterolemic subjects. *Metabolism* 1998; 47(6):744-750.

159. Phillips KM, Tarragó-Trani MT, Stewart KK. Phytosterol content of experimental diets differing in fatty acid composition. *Food Chem* 1999;64(3):415-422.

160. Pedersen A, Baumstark MW, Marckmann P, Gylling H, Sandstrom B. An olive oil-rich diet results in higher concentrations of LDL cholesterol and a higher number of LDL subfraction particles than rapeseed oil and sunflower oil diets. *J Lipid Res* 2000;41(12):1901-1911.

161. Wagner KH, Tomasch R, Elmadfa I. Impact of diets containing corn oil or olive/sunflower oil mixture on the human plasma and lipoprotein lipid metabolism. *Eur J Nutr* 2001;40(4):161-167.

162. Sato H, Ito K, Sakai K, Morinaga Y, Tashima I, Sukegawa E, et al. Effects of soybean-germ oil on reducing serum cholesterol levels in a double-blind controlled trial in healthy humans. *J Oleo Sci* 2004; 53(1):9-16.

163. Gardner DC, Coulston A, Chatterjee L, Rigby A, Spiller G, Farquhar JW. The effect of a plant-based diet on plasma lipids in hypercholesterolemic adults. *Ann Intern Med* 2005;142:725-733.

164. Ellegard L, Andersson H, Bosaeus I. Rapeseed oil, olive oil, plant sterols, and cholesterol metabolism: an ileostomy study. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(12):1374-1378.

165. Ostlund RE,Jr, Racette SB, Okeke A, Stenson WF. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2002;75(6):1000-1004.

166. Ostlund RE,Jr, Racette SB, Stenson WF. Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *Am J Clin Nutr* 2003;77(6):1385-1389.

167. Racette SB, Lin X, Lefevre M, Spearie CA, Most MM, Ma L, et al. Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr* 2010;91(1):32-38.

168. Matthan NR, Lichtenstein AH. Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 2004;174(2):197-205.

169. van Himbergen TM, Otokozawa S, Matthan NR, Schaefer EJ, Buchsbaum A, Ai M, et al. Familial combined hyperlipidemia is associated with alterations in the cholesterol synthesis pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(1):113-120.

170. Garcia-Otin AL, Cofan M, Junyent M, Recalde D, Cenarro A, Pocovi M, et al. Increased intestinal cholesterol absorption in autosomal dominant hypercholesterolemia and no mutations in the

low-density lipoprotein receptor or apolipoprotein B genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(9):3667-3673.

171. Gylling H, Rajaratnam RA, Vartiainen E, Puska P, Miettinen TA. Changes in serum level and metabolism of cholesterol with plant stanol esters in postmenopausal women with and without coronary artery disease. *Menopause* 2006;13(2):286-293.

172. Gylling H, Hallikainen M, Rajaratnam RA, Simonen P, Pihlajamäki J, Laakso M, et al. The metabolism of plant sterols is disturbed in postmenopausal women with coronary artery disease. *Metabolism* 2009;58(3):401-407.

173. Jarvisalo M, Raitakari O, Gylling H, Miettinen TA. Cholesterol absorption and synthesis in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(10):2300-2304.

174. Hallikainen M, Lyyra-Laitinen T, Laitinen T, Moilanen L, Miettinen TA, Gylling H. Effects of plant stanol esters on serum cholesterol concentrations, relative markers of cholesterol metabolism and endothelial function in type 1 diabetes. *Atherosclerosis* 2008;199(2):432-439.

175. Simonen P, Gylling H, Miettinen TA. The validity of serum squalene and non-cholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2008;197(2):883-888.

176. Assmann G, Cullen P, Kannenberg F, Schulte H. Relationship between phytosterol levels and components of the metabolic syndrome in the PROCAM study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14(2):208-214.

177. Gylling H, Hallikainen M, Kolehmainen M, Toppinen L, Pihlajamäki J, Mykkanen H, et al. Cholesterol synthesis prevails over absorption in metabolic syndrome. *Transl Res* 2007;149(6):310-316.

178. Wilund KR, Feeney LA, Tomayko EJ, Weiss EP, Hagberg JM. Effects of endurance exercise training on markers of cholesterol absorption and synthesis. *Physiol Res* 2009;58(4):545-552.

179. Miettinen TA, Gylling H, Viikari J, Lehtimäki T, Raitakari OT. Synthesis and absorption of cholesterol in Finnish boys by serum non-cholesterol sterols: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis* 2008;200(1):177-183.

180. Miettinen TA, Hallikainen M, Raitakari OT, Viikari J, Gylling H. Twenty-one year tracking of serum non-cholesterol sterols. The

Cardiovascular Risk in Young Finns study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19(8):525-531.

181. Matthan NR, Pencina M, LaRocque JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Schaefer EJ, et al. Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham offspring study participants with CHD. *J Lipid Res* 2009;50(9):1927-1935.

182. Silbernagel G, Fauler G, Renner W, Landl EM, Hoffmann MM, Winkelmann BR, et al. The relationships of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with the severity of coronary artery disease. *J Lipid Res* 2009;50(2):334-341.

183. Hoenig MR, Rolfe BE, Campbell JH. Cholestanol: a serum marker to guide LDL cholesterol-lowering therapy. *Atherosclerosis* 2006;184(2):247-254.

184. Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA. Effects of dietary cholesterol and fat on serum non-cholesterol sterols according to different apolipoprotein E subgroups among healthy men. *Br J Nutr* 2008;100(2):373-379.

185. Uusitupa MI, Miettinen TA, Sarkkinen ES, Ruuskanen E, Kervinen K, Kesaniemi YA. Lathosterol and other non-cholesterol sterols during treatment of hypercholesterolaemia with beta-glucan-rich oat bran. *Eur J Clin Nutr* 1997;51(9):607-611.

186. Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, van der Voort HA, Katan MB. Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. *J Lipid Res* 1988;29(9):1149-1155.

187. Pfohl M, Schreiber I, Liebich HM, Haring HU, Hoffmeister HM. Upregulation of cholesterol synthesis after acute myocardial infarction--is cholesterol a positive acute phase reactant? *Atherosclerosis* 1999;142(2):389-393.

188. Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J, et al. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev* 2006;64(9):385-402.

189. Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, et al. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 2002;43(3):486-494.

190. Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA. Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in

cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men. *Br J Nutr* 2008;99(2):370-378.

191. Vanstone CA, Jones PJ. Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 2004;79(2):340-341.

192. Hu FB. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr Opin Lipidol* 2002;13(1):3-9.

193. Kourlaba G, Panagiotakos DB. Dietary quality indices and human health: a review. *Maturitas* 2009;62(1):1-8.

194) Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am.J.Clin.Nutr.* 1995;61(6 Suppl):1402S-1406S.

195. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, et al. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* 1995;311(7018):1457-1460.

196. Gonzalez CA, Argilaga S, Agudo A, Amiano P, Barricarte A, Beguiristain JM, et al. Sociodemographic differences in adherence to the Mediterranean dietary pattern in Spanish populations. *Gac Sanit* 2002;16(3):214-221.

197. Knoops KT, Groot de LC, Fidanza F, Alberti-Fidanza A, Kromhout D, van Staveren WA. Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *Eur J Clin Nutr* 2006;60(6):746-755.

198. Saura-Calixto F, Goni I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009;49(2):145-152.

199. Rubio MA, Salas-Salvado J, Barbany M, Moreno B, Aranceta J, Bellido D, et al. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Esp Obes* 2007;5(3):135-175.

200. National Cancer Institute. Dictionary of cancer terms: pack year. Consultado en Marzo, 2010. Disponible en: http://www.cancer.gov/Templates/db_alpha.aspx?CdrID=306510.

201. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 2005;366(9497):1640-1649.

202. Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, et al. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol* 1993; 22(3):512-519.

203. de la Fuente-Arrillaga C, Vazquez Ruiz Z, Bes-Rastrollo M, Sampson L, Martinez-Gonzalez MA. Reproducibility of an FFQ validated in Spain. *Public Health Nutr.* 2010; 28:1-9.

204. Willett W. *Nutritional epidemiology*. 2nd ed. New York; Oxford: Oxford University Press; 1998.

205. Mataix Verdú J. *Tablas de composición de alimentos españoles*. 4th ed. Granada: Universidad de Granada; 2003.

206. Moreiras O., Carbajal A., Cabrera L. *Tablas de composición de alimentos*. 10th ed. Madrid: Pirámide; 2006.

207. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18(6):499-502.

208. Knapp DR. *Handbook of analytical derivatization reactions*. New York: John Wiley & Sons; 1979.

209. Blau K, Halket J. *Handbook of derivatives for chromatography*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1993.

210. Millán J, Pintó X, Muñoz A, Zúñiga M, Rubiés-Prat J, Pallardo LF, et al. Cocientes lipoproteicos: significado fisiológico y utilidad clínica de los índices aterogénicos en prevención cardiovascular. *Clín Investig Arterioscler* 2010;22(1):25-32.

211. Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65(4 Suppl): 1220S-1228S; discussion 1229S-1231S.

212. Gomez-Gerique JA, Gutierrez-Fuentes JA, Montoya MT, Porres A, Rueda A, Avellaneda A, et al. Lipid profile of the Spanish population: the DRECE (Diet and risk of cardiovascular disease in Spain) study. DRECE study group. *Med Clin (Barc)* 1999;113(19):730-735.

213. Aranceta Bartrina J (coord.). *Guía de la alimentación saludable*. 2004:105 pag.

214. Varela Moreiras G (coord.). *Valoración de la dieta española de acuerdo al panel de consumo alimentario del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA)*. 2008:68 pag.

215. Agudo A, Amiano P, Barcos A, Barricarte A, Beguiristain JM, Chirlaque MD, et al. Dietary intake of vegetables and fruits among adults in five regions of Spain. EPIC Group of Spain. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Eur J Clin Nutr 1999;53(3):174-180.
216. Linseisen J, Bergstrom E, Gafa L, Gonzalez CA, Thiebaut A, Trichopoulou A, et al. Consumption of added fats and oils in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) centres across 10 European countries as assessed by 24-hour dietary recalls. Public Health Nutr. 2002;5(6B):1227-1242.
217. Agudo A, Slimani N, Ocke MC, Naska A, Miller AB, Kroke A, et al. Consumption of vegetables, fruit and other plant foods in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts from 10 European countries. Public Health Nutr 2002;5(6B):1179-1196.
218. Fernandez-Ballart JD, Pinol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, et al. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. Br J Nutr 2010;1-9.
219. Hebert JR, Hurley TG, Peterson KE, Resnicow K, Thompson FE, Yaroch AL, et al. Social desirability trait influences on self-reported dietary measures among diverse participants in a multicenter multiple risk factor trial. J Nutr 2008;138(1):226S-234S.
220. Agudo A, Cabrera L, Amiano P, Ardanaz E, Barricarte A, Berenguer T, et al. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). Am J Clin Nutr 2007;85(6):1634-1642.
221. Varela G, Moreiras O, Carbajal A, Campo M. Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación 1991 (ENNA-3). 1995.
222. Cofán M, Escuriol V, García-Otín AL, Moreno-Iribas C, Larrañaga N, Sánchez MJ, et al. Association of plasma markers of cholesterol homeostasis with metabolic syndrome components. A cross-sectional study. Nutr Metab Cardiovasc Dis (*In Press*).
223. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. Science 2000;290(5497):1771-1775.

224. Buhman KF, Accad M, Farese RV. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529(1-3):142-154.
225. Fassbender K, Lutjohann D, Dik MG, Bremmer M, Konig J, Walter S, et al. Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk--the LASA study. *Atherosclerosis* 2008;196(1):283-288.
226. Pinedo S, Vissers MN, von Bergmann K, Elharchaoui K, Lutjohann D, Luben R, et al. Plasma levels of plant sterols and the risk of coronary artery disease: the prospective EPIC-Norfolk Population Study. *J Lipid Res* 2007;48(1):139-144.
227. Nissinen MJ, Miettinen TE, Gylling H, Miettinen TA. Applicability of non-cholesterol sterols in predicting response in cholesterol metabolism to simvastatin and fluvastatin treatment among hypercholesterolemic men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20(5): 308-316.
228. Strandberg TE, Gylling H, Tilvis RS, Miettinen TA. Serum plant and other noncholesterol sterols, cholesterol metabolism and 22-year mortality among middle-aged men. *Atherosclerosis* 2010;210(1): 282-287.
229. Fernandez C, Suarez Y, Ferruelo AJ, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA. Inhibition of cholesterol biosynthesis by Delta22-unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol Delta24-reductase in mammalian cells. *Biochem J* 2002;366(Pt 1):109-119.
230. Batta AK, Xu G, Honda A, Miyazaki T, Salen G. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. *Metabolism* 2006;55(3):292-299.
231. Hu FB. The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond. *N Engl J Med* 2003;348(26):2595-2596.
232. Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M, Serra-Majem L, Lairon D, Estruch R, Trichopoulou A. Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutr Rev* 2009;67 Suppl 1:S111-6.
233. Mente A, de Koning L, Shannon HS, Anand SS. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2009; 169(7):659-669.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

4-AAP	4-aminoantipirina
ABCG5/8	<i>ATP-binding cassette transporters G5/G8</i>
ACAT2	Acil-CoA-colesterol-aciltransferasa, isorforma2
ADP	Adenosin-difosfato
AGI/AGS	Ratio de ácidos grasos insaturados/saturados
AGMI/AGS	Ratio de ácidos grasos monoinsaturados/saturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AGT	Ácidos grasos <i>trans</i>
ALT	Alanina aminotransferasa
apoA1	Apolipoproteína A1
apoB	Apolipoproteína B
apoE	Apolipoproteína E
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosin-trifosfato
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida
C	Colesterol libre
CE	Éster de colesterol
CEst	Colesterol esterasa
CFC	Cuestionario de frecuencia de consumo
c-HDL	Colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad
c-LDL	Colesterol ligado a las lipoproteínas de baja densidad
COx	Colesterol oxidasa
c-total	Colesterol total
DCHBS	3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato
DM	Dieta Mediterránea
DRECE	Dieta y Riesgo de Enfermedad Cardiovascular en España
EPIC	<i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GK	Glicerol quinasa

GPO	Glicerol fosfato oxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HK	Hexoquinasa
HMG-CoA reductasa	Hidroximetil-glutaril-CoA-reductasa
HsPCR	Proteína C reactiva ultrasensible
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
LCAT	Lecitina-colesterol-aciltransferasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Lp(a)	Lipoproteína (a)
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MDH	Malato deshidrogenasa
MTP	<i>Microsomal transfer protein</i>
NAD	β-nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NPC1L1	Niemann-Pick C1- <i>like</i> 1
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PREDIMED	PREvención con DIeta MEDiterránea
QM	Quilomicrones
r-LDL	Receptor específico de LDL
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
TG	Triglicéridos
TMCS	Trimetilclorosilano
TSH	Hormona estimulante del tiroides
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Contenido de fitoesteroles, en mg/100 g peso fresco y crudo, en una selección de alimentos	19
---	----

Tabla 2. Indicadores dietéticos esenciales en la Dieta Mediterránea	42
---	----

METODOLOGÍA

Tabla 1. Definición y clasificación de la presión arterial	53
--	----

Tabla 2. Criterios SEEDO para definir la obesidad según el IMC en adultos	55
---	----

Tabla 3. Contenido de fitoesteroles de los alimentos utilizados en la cuantificación de la ingesta	58
--	----

RESULTADOS

Tabla 1. Características generales de los sujetos del estudio ...	88
---	----

Tabla 2. Perfil bioquímico general de los sujetos del estudio	89
---	----

Tabla 3. Perfil lipídico de los sujetos del estudio	90
---	----

Tabla 4. Criterios para índices aterogénicos	92
--	----

Tabla 5. Perfil lipídico y valores DRECE	93
--	----

Tabla 6. Marcadores indirectos del metabolismo del colesterol de los sujetos del estudio	94
--	----

Tabla 7. Descripción de la ingesta de los principales grupos de alimentos	96
---	----

Tabla 8. Cálculo del grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea	99
--	----

Tabla 9. Descripción de la ingesta de energía, macronutrientes y otros componentes de la dieta.....	101
---	-----

Tabla 10. Descripción de la ingesta de minerales aportados por la dieta	102
---	-----

Tabla 11. Descripción de la ingesta de vitaminas aportadas por la dieta	103
---	-----

Tabla 12. Descripción de la ingesta de fitoesteroles aportados por la dieta	104
---	-----

Tabla 13. Descripción del patrón dietético por terciles de ingesta total de fitoesteroles	107
---	-----

Tabla 14. Comparaciones dos a dos entre terciles de ingesta total de fitoesteroles para grupos de alimentos	109
---	-----

Índice de tablas	190
Tabla 15. Factores que pueden afectar al perfil lipídico plasmático por terciles de ingesta total de fitoesteroles	114
Tabla 16. Comparaciones dos a dos entre terciles de ingesta total de fitoesteroles para factores que pueden afectar al perfil lipídico plasmático	116
Tabla 17. Distribución de los niveles plasmáticos de lípidos por terciles de ingesta de fitoesteroles totales	118
Tabla 18. Distribución de los marcadores indirectos de síntesis de colesterol por terciles de ingesta total de fitoesteroles	120
Tabla 19. Distribución de los ratios fitoesteroles-colesterol por terciles de ingesta total de fitoesteroles	122
Tabla 20. Distribución del marcador indirecto de absorción intestinal de colesterol por terciles de ingesta total de fitoesteroles .	124
Tabla 21. Correlaciones entre los marcadores indirectos de síntesis y absorción intestinal de colesterol	125

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Metabolismo de las lipoproteínas	8
Figura 2. Proceso de síntesis endógena de colesterol	9
Figura 3. Proceso de absorción intestinal de colesterol	11
Figura 4. Homeostasis del colesterol en el organismo	13
Figura 5. Estructura química de los principales fitoesteroles	18
Figura 6. Porcentajes de absorción de distintos fitoesteroles en comparación con el colesterol medidos con la misma técnica analítica	23
Figura 7. Mecanismos de actuación de los fitoesteroles sobre la absorción de colesterol	27
Figura 8. Impacto estimado de diferentes factores sobre los ratios fitoesteroles-colesterol	38

METODOLOGÍA

Figura 1. Fases del estudio	50
Figura 2. Formato de respuesta cerrada para indicar la frecuencia de consumo	56
Figura 3. Reacción de derivatización	74

RESULTADOS

Figura 1. Criterios de inclusión y exclusión	87
Figura 2. Porcentaje de fitoesteroles respecto a la ingesta total	105
Figura 3. Grado de adherencia al patrón de Dieta Mediterránea en los terciles de ingesta total de fitoesteroles	111
Figura 4. Regresión lineal entre ingesta de fitoesteroles y adherencia al patrón de Dieta Mediterránea	112
Figura 5. Regresión lineal entre ingesta de sitosterol y su concentración plasmática correspondiente.....	123

ANEXOS

ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Naturaleza del proyecto

El proyecto de investigación para el que le pedimos su participación tiene por título **“Estudio fenotípico y genético de la influencia de la eficiencia de absorción intestinal de colesterol en los niveles plasmáticos de colesterol y en el desarrollo de arteriosclerosis subclínica.”**. El objetivo del estudio es determinar la relación entre la absorción de colesterol a nivel intestinal y la concentración de colesterol LDL en sangre, cuyo nivel es un factor de riesgo importante para el desarrollo de arteriosclerosis.

La forma de estimar la tasa de absorción de colesterol es mediante la medida en sangre de diferentes esteroides naturales por procedimientos analíticos especiales, pero no existen valores de referencia para la población general española.

La arteriosclerosis es una enfermedad que no presenta síntomas hasta que se produce un evento grave. En este proyecto se utiliza un procedimiento no invasivo basado en una técnica ecográfica para estudiar la presencia de arteriosclerosis desde etapas tempranas, lo cual tiene utilidad preventiva.

Finalmente, deseamos estudiar el papel que juegan determinados factores genéticos relativos a la absorción de colesterol en la variabilidad existente en la población y en su posible incidencia sobre los niveles de colesterol LDL.

Por estas razones queremos determinar en un grupo de personas representativo de la población general la concentración de estos esteroides en sangre para poder después estudiar la relación con factores genéticos relativos a la absorción de colesterol, con el nivel de colesterol LDL en sangre y con el desarrollo de arteriosclerosis en sus etapas más tempranas.

En qué consiste la participación

1. Permitir que los investigadores puedan, exclusivamente con fines de investigación y de forma anónima, conocer y utilizar datos de su historial clínico.
2. Completar una encuesta sobre la dieta que realiza en su vida cotidiana.
3. Permitir que los investigadores le realicen una ecografía carotídea para evaluar un marcador de arteriosclerosis.
4. Permitir la extracción de sangre en ayunas.

Qué hacen los investigadores con las muestras de sangre

Las muestras de sangre se procesarán para poder separar el plasma de las células. El plasma se guarda congelado para, posteriormente, hacer análisis bioquímicos. De las células sanguíneas se extrae el material genético (el ADN) con el que se harán los análisis genéticos.

Parte del plasma y del ADN de su muestra se depositará congelado en el banco de muestras para análisis futuros con el mismo objetivo. Este material podrá ser compartido con otros grupos de investigación relacionados, y otros tanto de centros públicos como de empresas privadas, procedimiento que siempre se hará bajo las normas de seguridad y confidencialidad necesarias.

Cada vez que los investigadores planteen un nuevo proyecto, este deberá ser evaluado por el Comité de Ética para verificar que el objetivo del estudio no es diferente del que usted ha sido informado.

Proyecto de investigación:

Estudio fenotípico y genético de la influencia de la eficiencia de absorción intestinal de colesterol en los niveles plasmáticos de colesterol y en el desarrollo de arteriosclerosis subclínica

Datos de contacto del participante

IMPORTANTE:

Estos datos sólo serán precisos si el participante acepta poder ser contactado tras la realización de todas las pruebas del presente proyecto de investigación para poder comunicarle resultados obtenidos en caso de que esté interesado en conocerlos, o si estuviera dispuesto a colaborar en estudios posteriores relacionados con este proyecto de investigación.

Por tanto no es obligatorio que el participante aporte esta información si no lo desea y en caso afirmativo no toda ella es necesaria.

Nombre _____	
Apellidos _____	
Teléfono _____	e-mail _____
Dirección postal: Calle _____	
Nº _____	Piso _____
Código postal _____	Ciudad _____

El equipo de investigadores se compromete a lo siguiente:

ninguno de estos datos será compartido con personas ajenas al desarrollo del proyecto de investigación para el que solicitamos su colaboración

contactar con el participante solamente en relación con el estudio realizado en el presente proyecto de investigación

esta hoja de datos será destruida tras la introducción de los datos en un sistema informático protegido para asegurar la confidencialidad de los mismos y cuyo uso estará restringido al desarrollo del presente proyecto de investigación

Qué hacen los investigadores con los datos que recogen

Los datos se guardan en ficheros en papel o informáticos. Estos ficheros identifican a cada participante con un código, por tanto no contienen ni su nombre ni otro dato que pueda ir contra su derecho a la confidencialidad. Con los datos de estos ficheros después se hacen análisis estadísticos para relacionarlos con los resultados de los análisis de laboratorio. Finalmente los resultados derivados de estos análisis se publican en revistas científicas.

Estos datos no se utilizarán para otra finalidad que no sea la descrita y para su uso se seguirá siempre: su voluntad, la normativa vigente respecto a protección de datos de carácter personal y en general a la ética en la investigación científica.

Beneficios y riesgos de participar en el estudio

El beneficio del estudio es profundizar en el conocimiento de la enfermedad por tal de mejorar la detección, el diagnóstico y el tratamiento. A corto plazo no se prevé que los resultados obtenidos del estudio puedan beneficiar directamente al individuo participante, sino que serán unos resultados que beneficiarán a la población en general. Este estudio puede ayudar a identificar rasgos de la enfermedad y genes que contribuyan a descubrir nuevas posibilidades diagnósticas, nuevos tratamientos o nuevas situaciones de interés comercial. En este caso, usted como participante no podrá reclamar compensaciones económicas.

Los riesgos para los participantes del estudio son mínimos o inexistentes. Excepcionalmente puede surgir alguna complicación menor derivada de la extracción de sangre.

Garantía de participación voluntaria

Los investigadores le garantizamos que, sea cual sea su decisión respecto a la participación en el proyecto, de ninguna manera se verá afectada su atención (o la de su familia) por el personal del centro. Además, en el caso que usted acepte participar, ha de saber que se puede retirar en cualquier momento sin tener que dar explicaciones, y en tal caso, su muestra será retirada del banco.

Confidencialidad y anonimato

El centro y los investigadores se responsabilizan de que en todo momento se mantenga la confidencialidad respecto a la identificación y los datos del participante. El nombre y los datos que permiten identificar al paciente sólo constan en la historia clínica. Todos los datos de esta investigación, se guardan informatizados en unos ficheros especialmente diseñados para la investigación y no aparecerá ni su nombre ni ningún otro dato que le pueda identificar. Cada participante se identifica con un código para evitar utilizar su nombre, así, este código le identifica en todo el estudio (en las muestras, en las bases de datos, etc) Los investigadores que no pertenecen al equipo de asistencia, como por ejemplo los del laboratorio, reciben las muestras identificadas sólo con el código. Estos procedimientos están sujetos a la Ley Orgánica 15 /1999 sobre Protección de Datos de Carácter Personal ya la Ley 41/02 de Autonomía del Paciente.

Preguntas

Ahora le damos la oportunidad de que, si no lo ha hecho antes, haga preguntas. Se las responderemos de

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE

PROYECTO: Estudio fenotípico y genético de la influencia de la eficiencia de absorción intestinal de colesterol en los niveles plasmáticos de colesterol y en el desarrollo de arteriosclerosis subclínica.

Yo, (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:(nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Doy mi conformidad para que mis datos clínicos sean revisados por personal ajeno al centro, para los fines del estudio, y soy consciente de que este consentimiento es revocable.

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del participante:

Fecha:

.....

.....

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

.....

.....

ANEXO II. INFORME PARTICIPANTES

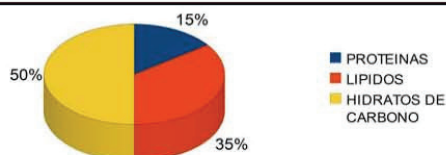
INFORME DE LOS RESULTADOS DE SU ENCUESTA DIETÉTICA

CODIGO: HOMBRE

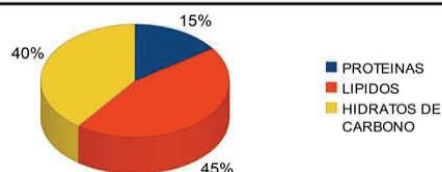
Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ingesta de calorías recomendada para una persona de su edad y sexo con una actividad física sedentaria-ligera es **2200-2800 Kcal/día**. Según la encuesta dietética que completó, usted consume **3429 Kcal/día** en su dieta habitual.

En una dieta saludable debe existir un equilibrio entre los diferentes nutrientes energéticos. Para ello, las calorías aportadas por cada uno a la ingesta energética total deben aproximarse a las proporciones indicadas en esta gráfica.

(Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, SENC)



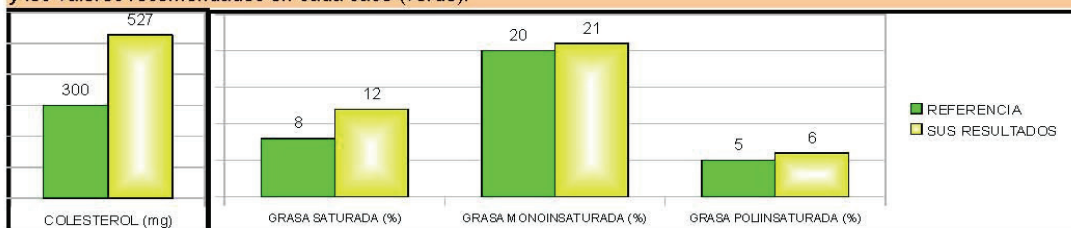
Esta gráfica describe la distribución de calorías según la encuesta dietética que completó. Compare sus resultados y podrá ver en qué medida su dieta es equilibrada.



Además, las recomendaciones para una dieta cardiosaludable incluyen una reducción de la grasa saturada y del colesterol y su sustitución por grasa mono- y poliinsaturada.

(OMS; American Heart Association, AHA; Sociedad Española de Arteriosclerosis, SEA)

En estas gráficas se representan la cantidad diaria de cada tipo de grasa y de colesterol que consume (amarillo) y los valores recomendados en cada caso (verde).



A continuación le presentamos los alimentos que aportan cada uno de los nutrientes valorados. Para mejorar su dieta, aumente o disminuya su consumo según los resultados descritos.

Fuentes de PROTEINAS



Fuentes de HIDRATOS DE CARBONO



Fuentes de LIPIDOS SATURADOS Y COLESTEROL



Fuentes de LIPIDOS MONOINSATURADOS



Fuentes de LIPIDOS POLIINSATURADOS



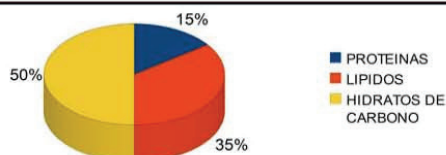
INFORME DE LOS RESULTADOS DE SU ENCUESTA DIETÉTICA

CODIGO: MUJER

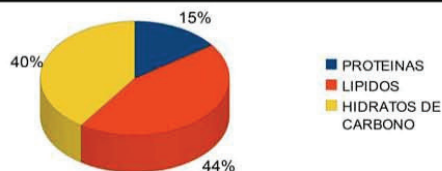
Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ingesta de calorías recomendada para una persona de su edad y sexo con una actividad física sedentaria-ligera es **1800-2200 Kcal/día**. Según la encuesta dietética que completó, usted consume **2696 Kcal/día** en su dieta habitual.

En una dieta saludable debe existir un equilibrio entre los diferentes nutrientes energéticos. Para ello, las calorías aportadas por cada uno a la ingesta energética total deben aproximarse a las proporciones indicadas en esta gráfica.

(Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, SENC)



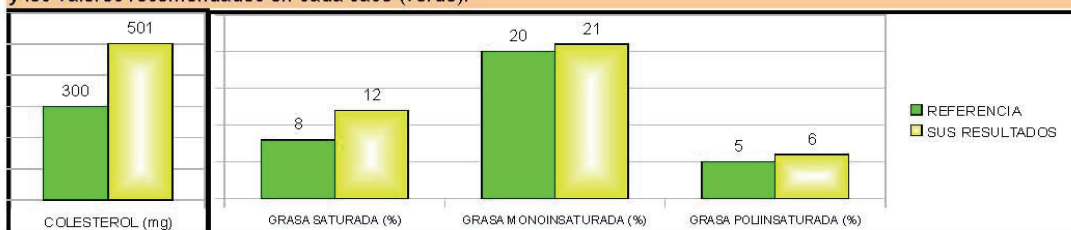
Esta gráfica describe la distribución de calorías según la encuesta dietética que completó. Compare sus resultados y podrá ver en qué medida su dieta es equilibrada.



Además, las recomendaciones para una dieta cardiosaludable incluyen una reducción de la grasa saturada y del colesterol y su sustitución por grasa mono- y poliinsaturada.

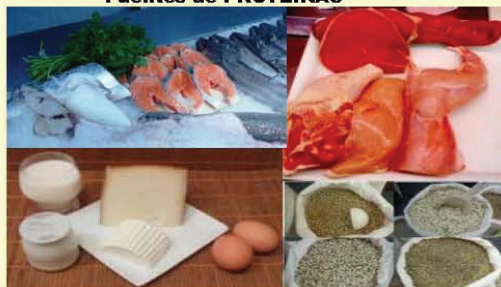
(OMS; American Heart Association, AHA; Sociedad Española de Arteriosclerosis, SEA)

En estas gráficas se representan la cantidad diaria de cada tipo de grasa y de colesterol que consume (amarillo) y los valores recomendados en cada caso (verde).



A continuación le presentamos los alimentos que aportan cada uno de los nutrientes valorados. Para mejorar su dieta, aumente o disminuya su consumo según los resultados descritos.

Fuentes de PROTEÍNAS



Fuentes de HIDRATOS DE CARBONO



Fuentes de LÍPIDOS SATURADOS Y COLESTEROL



Fuentes de LÍPIDOS MONOINSATURADOS



Fuentes de LÍPIDOS POLIINSATURADOS



ANEXO III. INFORMACIÓN HISTORIA CLÍNICA

RECOGIDA DE DATOS

N65

ESTUDIO DE ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL, HIPERCOLESTEROLEMIA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR SUBCLÍNICA

APELLIDOS _____ FECHA DE RECOGIDA DE DATOS _____

NOMBRE _____ FECHA DE NACIMIENTO _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

	SI edad NO NS/NC	ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR PRECOZ*	DISLIPEMIA	DIABETES MELLITUS	HIPERTENSIÓN ARTERIAL
1	Padre/Madre				
1	Hij@				
2	Herman@				
2	Abuel@				
2	Niet@				
3	Ti@				
3	Sobrin@				
3	Bisabuel@				
3	Bisniet@				
4	Prim@ herman@.				

*ECV PRECOZ: <45 a en Varones/< 55 a en mujeres. Angina de pecho, IAM, pr. esfuerzo positiva, by-pass coronario, AIT, ACV, isquemia EEII, by-pass femoropoplíteo

Árbol genealógico

ANTECEDENTES PERSONALES

ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR*	SI edad	NO	NS/NC
HTA	SI	NO	NS/NC
DIABETES MELLITUS	SI	NO	NS/NC
DISLIPEMIA	SI	NO	NS/NC

OTROS: esteatosis /aumento de transaminasas /litiasis biliar

ACTIVIDAD FÍSICA	Inactivo	Ocasional	Ligera	Moderada	Moderadamente fuerte	Fuerte
CONSUMO DE TABACO	SI desde _____ paq/año _____	NO	EX desde _____ paq/año _____			
CONSUMO ALCOHOL	SI g/semana	NO				

EXPLORACIÓN FÍSICA

TALLA _____ PESO _____ PERÍMETRO ABDOMINAL _____	TENSIÓN ARTERIAL: Sistólica _____ Diastólica _____
ARCO CORNEAL	SI NO
XANTOMAS TENDINOSOS	SI localización NO
XANTELASMAS	SI NO

MEDICACIÓN HABITUAL (en los últimos 6 meses: fármaco/dosis/duración tratamiento)

OBSERVACIONES

CONSENTIMIENTO INFORMADO	ECOGRAFÍA CAROTÍDEA	EXTRACCIÓN MUESTRA SANGÜÍNEA	PRUEBA FUNCIÓN ENDOTELIAL	ENCUESTA DIETÉTICA	ENCUESTA DE ACTIVIDAD FÍSICA
Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha

002545

**ANEXO IV. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE
CONSUMO DE ALIMENTOS**

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS (FFQ)

ID

002545

PÁGINA

1



así no marque



0	0	0	0	0
1	1	1	1	1
2	2	2	2	2
3	3	3	3	3
4	4	4	4	4
5	5	5	5	5
6	6	6	6	6
7	7	7	7	7
8	8	8	8	8
9	9	9	9	9

Por favor, marque una única opción para cada alimento.

Para cada alimento, marque el recuadro que indica la frecuencia de consumo por término medio durante el año pasado. Se trata de tener en cuenta también la variación verano/invierno. Por ejemplo, si toma helados 4 veces/semana sólo durante los 3 meses de verano, el consumo promedio al año es 1/semana		CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
			1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
I. LACTEOS	1. Leche entera (1 taza, 200 cc)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	2. Leche semidesnatada (1 taza, 200 cc)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	3. Leche descremada (1 taza, 200 cc)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	4. Leche condensada (1 cucharada)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	5. Nata o crema de leche (1/2 taza)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	6. Batidos de leche (1 vaso, 200 cc)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	7. Yogurt entero (1, 125 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	8. Yogurt descremado (1, 125 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	9. Petit suisse (1, 55 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	10. Requesón o cuajada (1/2 taza)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	11. Queso en porciones o cremoso (1, porción 25 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	12. Otros quesos: curados, semicurados (Manchego, Bola, Emmental...) (50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	13. Queso blanco o fresco (Burgos, cabra...) (50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	14. Natillas, flan, puding (1, 130 cc)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	15. Helados (1 cucurucho)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Un plato o ración de 100-150 gr, excepto cuando se indique otra cantidad		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
		1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +	
II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	16. Huevos de gallina (uno)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	17. Pollo o pavo CON piel (1 ración o pieza)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	18. Pollo o pavo SIN piel (1 ración o pieza)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	19. Carne de ternera o vaca (1 ración)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	20. Carne de cerdo (1 ración)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	21. Carne de cordero (1 ración)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	22. Conejo o liebre (1 ración)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	23. Hígado (ternera, cerdo, pollo) (1 ración)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	24. Otras vísceras (sesos, corazón, mollejas) (1 ración)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	25. Jamón serrano o paletilla (1 loncha, 30 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	26. Jamón York, jamón cocido (1 loncha, 30 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	27. Carnes procesadas (salchichón, chorizo, morcilla, mortadela, salchichas, butifarra, sobrasada, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	28. Patés, foie-gras (25 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	29. Hamburguesa (una, 50 gr.), albóndigas (3 unidades)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	30. Tocino, bacon, panceta (50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	31. Pescado blanco: mero, lenguado, besugo, merluza, pescadilla,... (1 plato, pieza o ración)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	32. Pescado azul: sardinas, atún, bonito, caballa, salmón (1 plato, pieza o ración 130 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	33. Pescados salados: bacalao, salazones (1 ración, 60 gr. en seco)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	34. Ostras, almejas, mejillones y similares (6 unidades)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	35. Calamares, pulpo, chipirones, jibia (sepia) (1 ración, 200 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	36. Crustáceos: gambas, langostinos, cigalas, etc. (4-5 piezas, 200 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	37. Pescados y mariscos enlatados al natural (sardinas, anchoas, bonito, atún) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
	38. Pescados y mariscos en aceite (sardinas, anchoas, bonito, atún) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

Por favor, marque una única opción para cada alimento.

Un plato o ración de 200 grs, excepto cuando se indique		CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO							
		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA		
			1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6
III. VERDURAS Y HORTALIZAS	39. Acelgas, espinacas	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	40. Col, coliflor, brócoles	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	41. Lechuga, endivias, escarola (100 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	42. Tomate crudo (1, 150 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	43. Zanahoria, calabaza (100 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	44. Judías verdes	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	45. Berenjenas, calabacines, pepinos	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	46. Pimientos (150 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	47. Espárragos	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	48. Gazpacho andaluz (1 vaso, 200 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	49. Otras verduras (alcachofa, puerro, cardo, apio)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	50. Cebolla (media unidad, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	51. Ajo (1 diente)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	52. Perejil, tomillo, laurel, orégano, etc. (una pizca)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	53. Patatas fritas comerciales (1 bolsa, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	54. Patatas fritas caseras (1 ración, 150 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
55. Patatas asadas o cocidas	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
56. Setas, níscalos, champiñones	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

Una pieza o ración		CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO							
		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA		
			1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6
IV. FRUTAS	57. Naranja (una), pomelo (uno), o mandarinas (dos)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	58. Plátano (uno)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	59. Manzana o pera (una)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	60. Fresas/fresones (6 unidades, 1 plato postre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	61. Cerezas, picotas, ciruelas (1 plato de postre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	62. Melocotón, albaricoque, nectarina (una pieza)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	63. Sandía (1 tajada, 200-250 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	64. Melón (1 tajada, 200-250 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	65. Kiwi (1 unidad, 100 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	66. Uvas (un racimo, 1 plato postre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	67. Aceitunas (10 unidades)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	68. Frutas en almíbar o en su jugo (2 unidades)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
69. Dátiles, higos secos, uvas-pasas, ciruelas-pasas (50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
70. Almendras, cacahuetes, avellanas, pistachos, piñones (30 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
71. Nueces (30 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
72. ¿Cuántos días a la semana toma fruta como postre?		0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	4 ☐	5 ☐	6 ☐	7 ☐

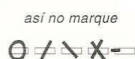
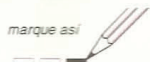
Un plato o ración		CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO							
		NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA		
			1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6
V. LEGUMBRES Y CEREALES	73. Lentejas (1 plato, 150 gr. cocidas)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	74. Alubias (pintas, blancas o negras) (1 plato, 150 gr. cocidas)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	75. Garbanzos (1 plato, 150 gr. cocidos)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	76. Guisantes, habas (1 plato, 150 gr. cocidas)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	77. Pan blanco, pan de molde (3 rodajas, 75 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	78. Pan negro o integral (3 rodajas, 75 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	79. Cereales desayuno (30 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	80. Cereales integrales: muesli, copos avena, all-bran (30 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	81. Arroz blanco (60 gr. en crudo)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	82. Pasta: fideos, macarrones, espaguetis, otras (60 gr. en crudo)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	83. Pizza (1 ración, 200 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

SUMCO 15294-05 (Rev. 1)

ID

Repita el
número
de la 1ª
hoja y
vuelva a
marcarlo

0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9



Por favor, marque una única opción para cada alimento.

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO

Una cucharada o porción individual. Para freír, untar,
mojar en el pan, aliñar o para ensaladas, utiliza en total:

	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1 - 3	A LA SEMANA			AL DÍA																							
			1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +																				
84. Aceite de oliva (una cucharada sopera)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
85. Aceite de oliva virgen (una cucharada sopera)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
86. Aceite de oliva de orujo (una cucharada sopera)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
87. Aceite de maíz (una cucharada sopera)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
88. Aceite de girasol (una cucharada sopera)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
89. Aceite de soja (una cucharada sopera)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
90. Mezcla de los anteriores (una cucharada sopera)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
91. Margarina (porción individual, 12 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
92. Mantecilla (porción individual, 12 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
93. Manteca de cerdo (10 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐																				
94. Marca de aceite de oliva que usa habitualmente:						<table border="1"> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td></tr> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td></tr> </table>				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																				
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																				

No marque
aquí

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO

	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1 - 3	A LA SEMANA			AL DÍA			
			1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
95. Galletas tipo María (4-6 unidades, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
96. Galletas integrales o de fibra (4-6 unidades, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
97. Galletas con chocolate (4 unidades, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
98. Repostería y bizcochos hechos en casa (50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
99. Croissant, ensaimada, pastas de té u otra bollería industrial comercial... (uno, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
100. Donuts (uno)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
101. Magdalenas (1-2 unidades)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
102. Pasteles (uno, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
103. Churros, porras y similares (1 ración, 100 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
104. Chocolates y bombones (30 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
105. Cacao en polvo-cacaos solubles (1 cucharada de postre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
106. Turrón (1/8 de barra, 40 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
107. Mantecados, mazapán (90 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO

	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1 - 3	A LA SEMANA			AL DÍA			
			1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
108. Croquetas, empanadillas, precocinados (una ración)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
109. Sopas y cremas de sobre (1 plato)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
110. Mostaza (una cucharadita de postre)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
111. Mayonesa comercial (1 cucharada sopera = 20 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
112. Salsa de tomate frito, ketchup (1 cucharadita)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
113. Picante: tabasco, pimienta, pimentón (una pizca)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
114. Sal (una pizca)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
115. Mermeladas (1 cucharadita)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
116. Azúcar (1 cucharadita)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
117. Miel (1 cucharadita)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
118. Snacks distintos de patatas fritas: gusanitos, palomitas, maíz, etc. (1 bolsa, 50 gr.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
119. Otros alimentos de frecuente consumo:									
119.1	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
119.2	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
119.3	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

119.3 (No marque aqui)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO

[illegible]

2 Se la quito

	SÍ	NO		SÍ	NO
¿Procura tomar mucha fibra?	☐	☐	¿Evita el consumo de mantequilla?	☐	☐
¿Procura tomar mucha fruta?	☐	☐	¿Procura reducir el consumo de grasa?	☐	☐
¿Procura tomar mucha verdura?	☐	☐	¿Procura reducir el consumo de carne?	☐	☐
¿Procura tomar mucho pescado?	☐	☐	¿Limita la sal en las comidas?	☐	☐
¿Suele comer entre comidas (picotear)?	☐	☐	¿Le añade azúcar a algunas bebidas?	☐	☐
¿Sigue una dieta especial?	☐	☐	¿Procura reducir el consumo de dulces?	☐	☐

➔ Si ha contestado SÍ, señale el tipo de dieta:

No debe marcar esta zona sombreada

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
—	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Si durante el año pasado tomó vitaminas y/o minerales (incluyendo calcio) o productos dietéticos especiales (salvado, aceite de onagra, leche con ácidos grasos omega-3, flavonoides, etc.), por favor indique la marca y la frecuencia con que los tomó:

Marcas de los suplementos de vitaminas o minerales o de los productos dietéticos	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
		1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +
134.	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
134.1	☐		☐	☐	☐		☐	☐	☐
134.2	☐		☐	☐	☐		☐	☐	☐

134.2 (No marque aqui)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

ANEXO V. PUBLICACIONES

Role of naturally-occurring plant sterols on intestinal cholesterol absorption and plasmatic levels

T. Sanclemente, I. Marques-Lopes, J. Puzo and A.L. García-Otín¹

Faculty of Health Sciences and Sports, University of Zaragoza, Huesca, Spain,

¹Molecular Research Laboratory, University Hospital Miguel Servet, Aragon Health Sciences Institute (I+CS), Inst. Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain

(Received on January, 2009)

T. SANCLEMENTE, I. MARQUES-LOPES, J. PUZO and A.L. GARCÍA-OTÍN. *Role of naturally-occurring plant sterols on intestinal cholesterol absorption and plasmatic levels* (minireview). J Physiol Biochem, **65** (1), 87-98, 2009.

Cardiovascular disease is a major health problem in developed countries although its incidence is relatively lower in Mediterranean countries which is partly ascribed to dietary habits. Epidemiologic evidence shows that elevated serum cholesterol, specifically low-density lipoprotein cholesterol (c-LDL), increases cardiovascular disease. Phytosterols are bioactive compounds, found in all vegetable foods, which inhibit intestinal cholesterol absorption and, therefore, have a serum cholesterol-lowering effect. Intestinal cholesterol absorption is a multistep process where plant sterols and stanols may act: *a*) attenuating the NPC1L1 gene expression, which may result in a lower cholesterol uptake from the lumen; *b*) lowering the cholesterol esterification rate by the ACAT2 (acyl-CoA cholesterol acyltransferase) and, consequently, the amount of cholesterol secreted via the chylomicrons and *c*) upregulating the expression of ABC-transporters ABCG5 and ABCG8 in intestinal cells, which may result in an increased excretion of cholesterol by the enterocyte back into the lumen. Many clinical trials proved that commercial products enriched with phytosterols reduce cholesterol levels. Likewise, recent studies show that phytosterols present in natural food matrices are also effective and could be an important component of cardioprotective dietary patterns such as the Mediterranean diet.

Key words: Phytosterols, Diet, Cardiovascular disease, Intestinal cholesterol absorption.

Cardiovascular diseases (CVDs) are the main cause of death globally. More people

die annually from CVDs than any other cause, and it is expected that, by 2015, almost 20 million people will die from these diseases (75). In Spain, CVD are also the leading cause of death making up 32.5% of total mortality in 2006 (48).

Correspondence to I. Marques-Lopes (Tel.: +34 974 239 391 Ext. 3309; Fax. +34 974 239 392; e-mail: imarques@unizar.es).

However, like other Mediterranean countries, the Spanish cardiovascular mortality rate (adjusted by age) is relatively lower than those of other western countries (65). This lower incidence of coronary heart disease has been partly ascribed to dietary habits (11).

The traditional risk factors for cardiovascular disease include: obesity and sedentary lifestyle, hypertension, cigarette smoking, glucose intolerance and, the best known number one cause, fasting serum lipids; that is total, low-density lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol (c-total, c-LDL and c-HDL, respectively) and triglyceride concentrations (12, 65). Focusing on these, wide clinical and epidemiological evidence supports a direct link between high plasma cholesterol concentration, particularly c-LDL and CVD risk (12, 14).

The amount of cholesterol that flows in plasma is modified by age, sex, food intake habits and in an important way by genetics. Nowadays, it is accepted that approximately 80% of serum cholesterol is determined by the individual's genotype whereas the other 20% is determined by the individual diet and lifestyle (68). The major dietary components that affect concentrations of serum cholesterol are dietary fat-related components, such as the types of fatty acids and cholesterol (35, 45, 70), alcohol (70) and constituents of the diet, such as water-soluble fiber and plant sterols and stanols, that have the capacity to render cholesterol absorption inefficient and consequently have a potential cholesterol-lowering effect (27, 51, 66, 70). Thus, the current dietary recommendations include changes in the fatty acid composition of the diet but also an adequate intake of partial inhibitors of the intestinal cholesterol absorption (12).

This review first describes different aspects of cholesterol absorption and in

the second part summarizes several topics about the dietary components that affect this process such as plant sterols and stanols.

Intestinal cholesterol absorption

Cholesterol homeostasis is maintained by balancing intestinal cholesterol absorption and endogenous cholesterol synthesis with biliary bile acid and cholesterol excretion. However, because bile acids are efficiently reabsorbed and a fraction of biliary cholesterol is absorbed in the intestine, the overall whole-body cholesterol balance is kept mainly by matching cholesterol synthesis with fecal sterol loss. The latter are strictly dependent on the efficiency of the intestinal absorption of cholesterol (both dietary and biliary) which in turn relates to blood cholesterol levels (63). In fact, in humans, there is a significant and positive correlation between the level of plasma LDL cholesterol and the efficiency of intestinal cholesterol absorption (28, 43). Therefore, modulation of cholesterol absorption is potentially an effective way of lowering plasma LDL cholesterol levels in the general population (73).

Cholesterol that enters the small intestinal lumen to be absorbed derives mainly from the diet and bile. The average intake of cholesterol in the Western diet is approximately 400 mg per day and bile is estimated to contribute nearly 1000 mg of cholesterol per day to the intraluminal pool (16, 63, 73). A third source of intraluminal cholesterol comes from the turnover of intestinal mucosal epithelium, which provides roughly 300 mg of cholesterol per day; however, taking into account that the major sites of absorption are in the upper part of the small intestine and the intestinal sloughing occurs throughout the intestinal tract, this third

source may not contribute greatly to cholesterol absorption (63, 73).

Conceptually, intestinal absorption of cholesterol has to be distinguished from its uptake by the enterocyte. Intestinal absorption of cholesterol is most accurately defined as the transfer of intraluminal cholesterol into intestinal or thoracic duct lymph. Intestinal uptake of cholesterol refers to its entry from the lumen into intestinal absorptive cells (73). As can be inferred from these definitions, intestinal cholesterol absorption is a multistep process that is regulated by multiple genes at the enterocyte level (31) and any factors that change the transport of cholesterol from the intestinal lumen to the lymph (such as dietary, pharmacological, biliary, cellular and luminal factors) can influence the efficiency of intestinal cholesterol absorption (Fig. 1).

In the intestinal tract, esterified cholesterol from the diet is first hydrolyzed by pancreatic carboxyl ester lipase. Absorption of this free cholesterol plus biliary cholesterol now depends on mixed micelles: mixtures of free cholesterol, mono- and di-acylglycerols, fatty acids, phospholipids and bile salts. The transfer of free cholesterol from mixed micelles through the apical brush border membrane into the enterocyte is not completely understood but recent findings (2) revealed the existence of a protein located at the apical membrane of the enterocyte, named Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), which plays a critical role in the transport of cholesterol into the cell. The existence of other transporters at this level, such as the ANXA2-CAV1 complex, has been questioned and its functional significance is unclear (6).

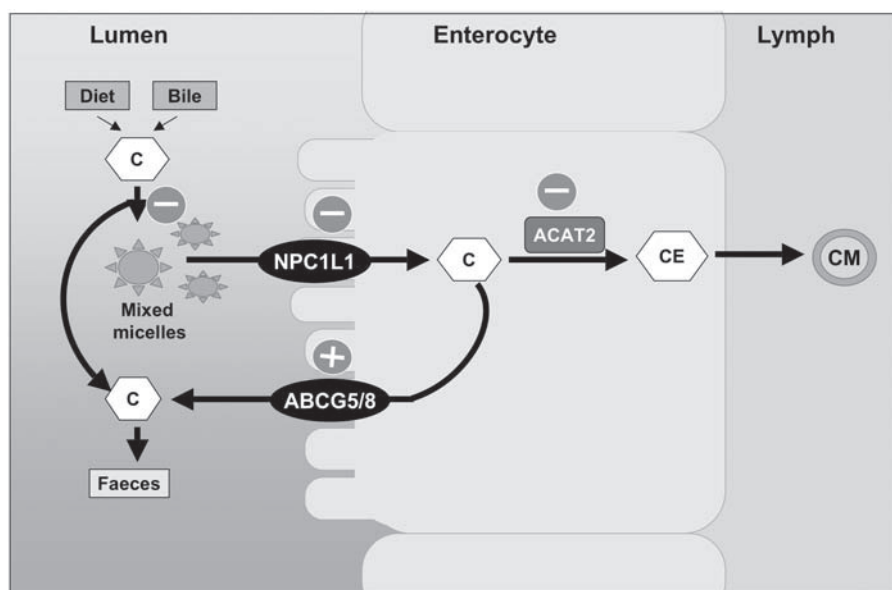


Fig. 1. Multistep process of intestinal cholesterol absorption and potential cholesterol-lowering mechanisms of action of phytosterols.

C, free cholesterol; CE, cholesteryl esters; CM, chylomicrons; NPC1L1, Niemann-Pick C1-like 1; ACAT2, Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase 2; ABCG5/8, ATP-binding cassette transporters G5/G8.

Within the enterocyte, free cholesterol is esterified by acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase isoform 2 (ACAT2) which is highly specific for cholesterol (33), then esterified cholesterol is incorporated into chylomicrons which are subsequently secreted into the circulation.

Nevertheless, unesterified cholesterol can also be transported back into the intestinal tract through ATP-binding cassette (ABC) transporters, such as ABCG5 and ABCG8 (10, 76). Furthermore, growing evidence supports the role of other transporters, such as ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), the scavenger receptors CD36 and class B type I (SR-BI), the membrane-bound ectoenzyme aminopeptidase N (APN), the human P-glycoprotein (Pgp) or ABCB1 and the microsomal triacylglycerol transfer protein (MTP) (34), but their significance is not clearly defined yet (6).

Finally, cholesterol and bile acids that escape intestinal absorption are excreted as fecal neutral and acidic sterols which represent the major route for sterol elimination from the body (63).

Therefore, it is accepted that the combined regulatory effects of NPC1L1, ABCG5 and ABCG8 may play a critical role in modulating the amount of cholesterol that reaches the lymph from the intestinal lumen (73). Besides, the enterocyte's cholesterol-esterifying activity may also be an important regulator because reesterification of the absorbed cholesterol enhances the diffusion gradient for intraluminal cholesterol entry into the cell (63, 73).

In conclusion, intestinal cholesterol absorption is incomplete and the absorbed amount averages only 40–60% of dietary cholesterol (63), although with a high variability between individuals (5, 28, 40, 64) ranging from 20 to 80% (5). This sub-

ject variability depends in part on genetic factors and an intra-individual variability, which may be modulated by physiological (age, velocity of intestinal transit, quality of bile acids, obesity) and dietary conditions (low-fat meals, high amounts of dietary cholesterol, plant and marine sterols and soluble fiber) (63).

A number of methods have been developed to quantify cholesterol absorption. These methods can be broadly classified into those that use radiolabeled isotopes and those that do not (37). Among these last ones, in clinical practice those which use blood levels or ratios of plant sterols and cholestanol are used more frequently (26, 67). Cholesterol synthesis and absorption can be measured by quantification of serum non-cholesterol sterols expressed in ratios to serum cholesterol, in order to eliminate the effects of variation of non-cholesterol sterol transporters, mainly LDL, on their concentrations. This technique is simpler than the measurements of absolute cholesterol synthesis with sterol balance technique and absorption percentage of dietary cholesterol with isotopes. In general, the ratios to serum cholesterol of precursor sterols cholestanol, desmosterol and lathosterol reflect absolute synthesis of cholesterol, while those of absorption sterols cholestanol, campesterol and sitosterol reflect cholesterol absorption percentage in normal population (39, 40, 41, 42). In addition, these markers reflect changes in cholesterol metabolism despite the amount of dietary fat and cholesterol consumed (49). Estimating cholesterol absorption efficiency by this approach is the only method currently available that can be used in a practical sense for large-scale clinical trials or population based studies when questions are related to changes in cholesterol absorption between

subpopulations or different treatments (37). Because of that, this technique has been applied in several studies (15, 28, 38, 39).

Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering agents

Definition and food sources.— The blood cholesterol reducing effect of phytosterols was described in 1953 by Pollak (62) but it was not until the 1990s that significant advances were made in the understanding of this field.

Phytosterols are structural and functional components in the cellular membranes of the plants with a similar structure to cholesterol. The structural difference appears in the aliphatic side chain (36). It is commonly accepted the division between plant sterols and stanols (saturated forms of sterols) but both are generally known as phytosterols, a term that is meant to be all-inclusive (52). Although more than 40 molecular forms have been identified, sitosterol, campesterol and stigmasterol are the most common plant sterols in nature, and account for more than 95% of total phytosterols in the dietary intake. Plant stanols, such as sitostanol and campestanol, are in lower proportion in the vegetal kingdom (32). Because of their role in the cellular membranes, all vegetable food contains appreciable quantities of phytosterols. The most concentrated sources are vegetable oils (the corn and the sunflower ones are especially rich although the amounts found in safflower, soybean and olive are also important) and nuts. Smaller amounts are found in cereals, legumes, fruits and vegetables, but these items are consumed in large portions so it is important to take them into account when the total intake of phytosterols is estimated (52). Moreover,

because of their cholesterol-lowering effects, these components are incorporated nowadays into a wide variety of food products, referred to as functional foods.

Daily intake of phytosterols.— The human body can not synthesize phytosterols and, therefore, these components are derived only from the diet (3). Estimates of daily phytosterol consumption in various populations range from ~ 160 to 360 mg *per day* (1, 9, 18, 22, 29, 30, 36, 47, 50, 69), approximately the same as cholesterol intake (52). Furthermore, phytosterols intake in subjects with a high consumption of vegetable foods, such as vegans, is quite higher, close to 1000 mg *per day* (58). The variation in the estimated phytosterol intakes could be explained by several factors that affect it such as the methodology used to quantify the dietary intake (71), the food composition database selected (69, 71), and importantly, the different dietetic pattern that the populations have, because high values could reflect a diet richer in vegetables and vegetable oils (7, 9). Much higher intakes are derived from the consumption of functional foods that averages 2 g *per day* (12).

However, in healthy humans, plant sterols are poorly absorbed in the intestine while absorption of plant stanols is even lower (53) and their biliary excretion is fast (72) so that their serum levels, under normal conditions, are < 1 mg/dl (40, 53, 56, 73).

Cholesterol-lowering mechanisms of action of phytosterols.— Phytosterols are thought to act primarily in the intestinal lumen; scientific evidence shows that phytosterol intake affects the cholesterol uptake because of chemical structures similarity in both. Thus, phytosterols may displace cholesterol from mixed micelles,

because they are more hydrophobic than cholesterol. This replacement causes a reduction of micellar cholesterol concentrations and, consequently, lowers cholesterol absorption (6, 17, 21, 59). The unabsorbed cholesterol is excreted in the faeces, increasing its concentration at this level (74) and, therefore, its elimination from the body. This proposed mechanism implies that phytosterols should be consumed with each cholesterol-containing meal to achieve maximal effectiveness. However, as Plat recently showed (61), the decrease in serum cholesterol in subjects consuming margarines enriched with plant stanol esters once a day was similar to that in subjects who consumed the same amount divided over three servings a day. In fact, post hoc analysis pointed out that daily consumption frequency does not determine the cholesterol-lowering efficacy of phytosterols (32). A possible explanation for this effect may be that their retention in the intestine could exert a beneficial action at other levels (6).

It seems that the phytosterols are easily transported from the intestinal lumen into the enterocytes (20) but they are poorly incorporated and secreted into the circulation via the chylomicrons (59) increasing their protein-mediated (ABCG5 and ABCG8) efflux back into the lumen (20). Consequently, their serum levels are very low except in people who suffer from phytosterolemia or sitosterolemia, a rare autosomal recessive disorder characterized by hyperabsorption of plant sterols and stanols that results in their body accumulation and can lead to severe atherosclerosis at a very young age (46, 56, 57). So, it has been proposed that they may affect the cholesterol uptake attenuating the NPC1L1 gene expression, which may result in a lower cholesterol uptake from the lumen (13), and/or upregulating the

expression of ABC-transporters ABCG5 and ABCG8 in intestinal cells (23), which may result in an increased excretion of cholesterol by the enterocyte back into the lumen.

Nevertheless, recent animal studies have shown that phytosterols decrease blood cholesterol levels independently of intestinal ABC sterol transporters and NPC1L1 protein gene expression (13) and a human trial developed by Kassis (24) suggests that the efficacy of phytosterols is not affected by cholesterol intake. Therefore, other mechanisms are thought to be involved in the serum cholesterol reduction such as the decrease of the cholesterol esterification rate by the ACAT2 (acyl-CoA cholesterol acyltransferase) and, consequently, the amount of cholesterol excreted via the chylomicrons (6).

More studies must be developed to elucidate this additional pathways used by phytosterols to limit the amount of cholesterol absorption.

In any case, less intestinal cholesterol absorption caused by dietary phytosterols intake leads to a state of relative cholesterol deficiency which results in a compensatory increase in endogenous cholesterol synthesis (44, 59) and a higher LDL-receptor expression (59, 60). The net overall effect is that circulating c-LDL concentrations are lowered (27). On the contrary, phytosterols have no effect on triglycerides or c-HDL levels (8).

Regarding bile metabolism, no data exist on the direct effects of plant sterols or stanols on bile metabolism (6, 8) and future research is necessary.

Phytosterol supplements.— It is well documented that commercial products enriched with plant sterols reduce serum cholesterol levels. They are effective not only in healthy subjects but also in hyper-

cholesterolemic, with familial hypercholesterolemia and with type II diabetes patients (4).

A recent meta-analysis of 41 cholesterol-lowering clinical trials (25) showed that the placebo-adjusted reduction in c-LDL was 10% with 2 g of phytosterols daily, with little additional reduction at higher doses. Besides, the efficacy was similar for plant sterols and stanols although the food form might substantially affect c-LDL reduction.

Phytosterols naturally present in foods.—

In contrast to these studies with products supplemented with phytosterols, much less is known about the effects of dietary plant sterol intake (52). Traditionally, plant sterols from the habitual diet have not been considered to have any significant effect on the serum cholesterol level but this view has been questioned and several studies have demonstrated that the amounts of naturally occurring phytosterols play an important role in the control of serum cholesterol levels (3, 19, 30, 54, 55).

In order to explain the differences showed by different oils to reduce serum cholesterol levels, apart from the profile of fatty acids, Howell *et al* (19) carried out a trial which compared the effects of corn and olive oils. 16 normolipidemic individuals consumed three 10-day experimental diets containing corn oil (high in PUFA and phytosterols), olive oil (high in MUFA and low in phytosterols), or olive oil supplemented with phytosterols given at twice the level naturally found in corn oil (high in MUFA and phytosterols). Plasma total cholesterol concentrations after both the olive oil and the olive oil-phytosterol treatments were higher than those after the corn oil treatment. Olive oil treatment resulted in greater

plasma c-LDL concentrations compared to corn oil treatment. Addition of the phytosterol mixture to the olive oil diet resulted in suppression of the significant differences in c-LDL concentrations between corn and olive oil. Thus, the concentration of phytosterols presents in corn oil led to a significant reduction in cholesterol. The bioactivity of corn oil phytosterols was demonstrated again (54) by including corn oil containing 270 mg of phytosterols in single-meal cholesterol absorption tests. When phytosterols were removed from the corn oil, cholesterol absorption increased in a 38% and this was reduced to normal after adding the phytosterols back to purified oil. Besides, corn oil containing as little as 150 mg phytosterols administered in a single meal had a statistically significant effect on reducing cholesterol absorption efficiency (specifically, a reduction of 12%), suggesting that low levels might be more effective than previously thought. Similar results were obtained from the study of the endogenous phytosterols of wheat germ which has a high content of phytosterols relative to total fat (55). Three single-meal tests were performed in the same individuals using either untreated wheat germ which contained 328 mg phytosterols, selectively phytosterol-extracted wheat germ, or extracted wheat germ to which the phytosterols had been returned. Cholesterol absorption increased 42.8% when extracted wheat germ was used and this was reduced to the original value when phytosterols were added back. These results showed that phytosterols in low amounts, much less than those recommended for hypercholesterolemic individuals, in common foods could reduce cholesterol absorption.

Furthermore, two recent epidemiological studies have shown the relationship

between dietary phytosterols intake and lower serum cholesterol levels. The first of them was a large-scale epidemiologic study of a British population where plant sterol intake from food and concentrations of blood lipids were measured (3). In this free-living population, both men and women consuming high amounts of plant sterols (> 400 mg/day) had lower total serum cholesterol concentration and lower c-LDL concentration compared with those consuming low amounts of plant sterols (< 180 mg/day) after adjusting for age, BMI and total energy intake. The second one is a epidemiological study of Swedish people (30). The same measures were done and the outcome was similar to the precedent study corroborating that a significant inverse relation between naturally-occurring dietary plant sterols and serum concentrations of c-total and c-LDL existed.

Conclusions

Phytosterols are recognized as an important component of a healthy diet and are included in the dietary treatment to reduce serum cholesterol levels through rendering intestinal cholesterol absorption inefficient. In this way, it is necessary to carry out more studies in order to elucidate the mechanisms that these compounds use to reduce the amount of absorbed cholesterol.

Up to this time attention has been focused principally on the supplemented foods but, taking into account the preliminary results, the future work perhaps needs to be concentrated on the potential role of the lower levels of phytosterols in the natural diet and standard foods. In fact, they may be potentially more important than functional foods, especially in diets rich in vegetables, fruit, nuts, beans

and oil which provide an important amount of phytosterols and may partly explain diet-related effects on serum cholesterol concentration. This latter could be, among other, the explanation for the lowering mortality rate due to cardiovascular diseases in the Mediterranean countries.

Acknowledgements

The Spanish Ministry of Health (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Project nº PI 061402) are greatly acknowledged for supporting this study.

T. SANCLEMENTE, I. MARQUES-LOPES, J. PUZO y A.L. GARCÍA-OTÍN. *Papel de los esteroides vegetales de la dieta sobre la absorción intestinal de colesterol y sus niveles plasmáticos* (minirrevisión). J Physiol Biochem, **65** (1), 87-98, 2009.

La enfermedad cardiovascular es un problema de salud importante en los países desarrollados, aunque su incidencia es relativamente menor en los países mediterráneos lo que es parcialmente atribuible a los hábitos dietéticos. Existen evidencias epidemiológicas que muestran que el colesterol sérico elevado, específicamente el colesterol ligado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), incrementa la enfermedad cardiovascular. Los fitosteroides son compuestos bioactivos, presentes en todos los alimentos de origen vegetal, que inhiben la absorción intestinal de colesterol y, por lo tanto, tienen un efecto reductor en el colesterol sérico. La absorción intestinal de colesterol es un proceso multi-etapa donde los esteroides y estanoles vegetales pueden actuar de diversas formas: a) atenuando la expresión del gen NPC1L1, lo que puede suponer una disminución del ingreso de colesterol desde el lumen intestinal; b) disminuyendo la tasa de esterificación del colesterol por la ACAT2 (acil-CoA colesterol aciltransferasa) y, en consecuencia, la cantidad de colesterol excretada vía quilomicrones y c) aumentando la expresión de los ABC-transportadores ABCG5 y ABCG8 en las células intestinales, lo que puede derivar en una excre-

ción incrementada de colesterol desde el enterocito hacia el lumen. Diversos ensayos clínicos han demostrado que los productos comerciales enriquecidos con fitosteroles reducen los niveles de colesterol. Sin embargo, estudios recientes muestran que los fitosteroles presentes en matrices alimentarias naturales también pueden ser bioactivos y podrían ser un componente importante de los patrones dietéticos cardioprotectores como es la dieta Mediterránea.

Palabras clave: Fitosteroles, Dieta, Enfermedad cardiovascular, Absorción intestinal de colesterol.

References

- Ahrens, E.H. Jr., Boucher, C.A. (1978): The composition of a simulated American diet. *J Am Diet Assoc*, **73**, 613-620.
- Altmann, S.W., Davis, H.R.J., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos L.M., Tetzloff, G. Iyer, S.P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., Graziano, M. P. (2004): Niemann-Pick C1-like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, **303**, 1201-1204.
- Andersson, S.W., Skinner, J., Ellegård, L., Welch, A.A., Bingham, S., Mulligan, A., Andersson, H., Khaw, K.T. (2004): Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr*, **58**, 1378-1385.
- Berger, A., Jones, P.J., Abumweis, S.S. (2004): Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis*, **7**, 3-5.
- Bosner, M.S., Lange, L.G., Stenson, W.F., Ostlund, R.E. Jr. (1999): Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res*, **40**, 302-308.
- Calpe-Berdiel, L., Escola-Gil, J. C., Blanco-Vaca, F. (2008): New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.026.
- Cerqueira, M.T., Fry, M.M., Connor, W.E. (1979): The food and nutrient intakes of the Tarahumara Indians of Mexico. *Am J Clin Nutr*, **32**, 905-915.
- De Jong, A., Plat, J., Mensink, R.P. (2003): Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J Nutr Biochem*, **14**, 362-369.
- De Vries, J.H.M., Jansen, A., Kromhout, D., van de Bovenkamp, P., van Staveren, W. A., Mensink, R. P., Katan, M. B. (1997): The fatty acid and sterol content of food composites of middle-aged men in seven countries. *J Food Comp Anal*, **10**, 115-141.
- Duan, L.P., Wang, H.H., Wang, D.Q.H. (2004): Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters ABCG5 and ABCG8 in mice. *J Lipid Res*, **45**:1312-1323.
- Estruch, R., Martínez-González, M.A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas, M.I., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., López-Sabater, M.C., Vinyoles, E., Arós, F., Conde, M., Lahoz, C., Lapetra, J., Sáez, G., Ros, E. (2006): Effects of a Mediterranean-Style Diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*, **145**, 1-11.
- 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.
- Field, F.J., Born, E., Mathur, S.N. (2004): Stanols decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression. *J Lipid Res*, **45**, 2252-2259.
- Friday, K.E. (2003): Aggressive lipid management for cardiovascular prevention: evidence for clinical trials. *Exp Biol Med*, **228**,769-778.
- García-Otín, A.L., Cofan, M., Junyent, M., Recalde, D., Cenarro, A., Pocovi, M., Ros, E., Civeira, F. (2007): Increased intestinal cholesterol absorption in autosomal dominant hypercholesterolemia and no mutations in the Low-Density Lipoprotein receptor or Apolipoprotein B genes. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 3667-3673.
- Grundy, S.M. (1983) Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu Rev Nutr*, **3**, 71-96.
- Heinemann, T., Kullak-Ublick, G.A., Pietruck, B., von Bergmann, K. (1991): Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur J Clin Pharmacol*, **40**, S59-S63.
- 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*, **32**, 363-372.
- Howell, T.J., MacDougall, D.E., Jones, P.J.H. (1998): Phytosterols partially explain differences

- in cholesterol metabolism caused by corn or olive oil feeding. *J Lipid Res*, **39**, 892-900.
20. 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.
 21. Ikeda, I., Tanabe, Y., Sugano, M. (1989): Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **35**, 361-369.
 22. Jiménez-Escrig, A.J., Santos-Hidalgo, A.B., Saura-Calixto, F. (2006): Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *J Agric Food Chem*, **54**, 3462-3471.
 23. Kaneko, E., Matsuda, M., Yamada, Y., Tachibana, Y., Shimomura, I., Makishima, M. (2003): Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterols-derived Liver X receptor agonist. *J Biol Chem*, **278**, 36091-36098.
 24. Kassis, A.N., Vanstone, C.A., Abumweis, S.S., Jones, P.J.H. (2008): Efficacy of plant sterols is not influenced by dietary cholesterol intake in hypercholesterolemic individuals. *Metabolism*, **57**, 339-346.
 25. Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R. (2003): Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc*, **78**, 965-978.
 26. Kempen, H.J.M., de Knijff, P., Boomsma, D.I., van der Voort, H.A., Gevers Leuven, J.A., 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.
 27. Kerckhoffs, D.A. J. M., Brouns, F., Hornstra, G., Mensink, R.P. (2002): Effects on the human serum lipoprotein profile of beta-glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *J Nutr*, **132**, 2494-2505.
 28. Kesäniemi, Y.A., Miettinen, T.A. (1987): Cholesterol absorption efficiency regulates plasma cholesterol level in the Finnish population. *Eur J Clin Invest*, **17**, 391-395.
 29. Klingberg, S., Andersson, H., Mulligan, A., Bhaniani, A., Welch, A., Bingham, S., Khaw, K.T., Andersson, S., Ellegård, L. (2008): Food sources of plant sterols in the EPIC Norfolk population. *Eur J Clin Nutr*, **62**, 695-703.
 30. Klingberg, S., Ellegård, L., Johansson, I., Hallmans, G., Weinshall, 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.
 31. Lammert, F., Wang, D.Q. (2005): New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology*, **129**, 718-734.
 32. Law, M. (2000): Plant sterol and stanol margarines and health. *BMJ*, **320**, 861-864.
 33. Lee, R. G., Willingham, M.C., Davis, M.A., Skinner, K.A., Rudel, L.L. (2000): Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney and adrenal of nonhuman primates. *J Lipid Res*, **41**, 1991-2001.
 34. Levy, E., Spahis, S., Sinnett, D., Peretti, N., Maupas-Schwalm, F., Delvin, E., Lambert, M., Lavoie, M. A. (2007): Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol*, **18**, 310-318.
 35. Lichtenstein, A.H. (2006): Dietary fat, carbohydrate, and protein: effects on plasma lipoprotein patterns. *J Lipid Res*, **47**, 1661-1667.
 36. Ling, W.H., Jones, P.J. H. (1995): Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci*, **57**, 195-206.
 37. Matthan, N.R., Lichtenstein, A.H. (2004): Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis*, **174**, 197-205.
 38. Miettinen, T.A., Gylling, H., Raitakari, O.T., Hallikainen, M., Viikari, J. (2008): Adolescent cholesterol metabolism predicts coronary risk factors at middle age: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Transl Res*, **151**, 260-266.
 39. Miettinen, T.A., Gylling, H., Viikari, J., Lehtimäki, T., Raitakari, O.T. (2008): Synthesis and absorption of cholesterol in Finnish boys by serum non-cholesterol sterols. The cardiovascular risk in young Finns study. *Atherosclerosis*, **200**, 177-183.
 40. Miettinen, T.A., Tilvis, R.S., Kesäniemi, A. (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.
 41. Miettinen, T.A., Tilvis, R.S., Kesäniemi, Y.A. (1989): Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men. *Metabolism*, **38**, 136-40.
 42. Miettinen, T.A., Gylling, H. (2000): Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis*, **153**, 241-248.
 43. Miettinen, T.A., Kesäniemi, Y.A. (1989): Cholesterol absorption: regulation of cholesterol synthesis and elimination and within-population variations of serum cholesterol levels. *Am J Clin Nutr*, **49**, 629-635.
 44. Miettinen, T.A., Gylling H. (1999): Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr Opin Lipidol*, **10**, 9-14.

45. Millen, B.E., Franz, M.M., Quatromoni, P.A., Gagnon, D.R., Sonnenberg, L.M., Ordovas, J.M., Wilson, P.W., Schaefer, E.J., Cupples, L.A. (1996): Diet and plasma lipids in women. I. Macronutrients and plasma total and low-density lipoprotein cholesterol in women: the Framingham nutrition studies. *J Clin Epidemiol*, **49**, 657-663.
46. Moghadasian, M.H., Frohlich, J.J. (1999): Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am J Med*, **107**, 588-594.
47. Morton, G.M., Lee, S.M., Buss, D.H., Lawrance, P. (1995): Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet. *J Hum Nutr Diet*, **8**, 429-440.
48. National Statistics Institute, Spain. Mortality statistics: Cause of death. www.ine.es/inebmenu/indice.htm (consulted in September 2008).
49. Nissinen, M.J., Gylling, H., Miettinen, T.A. (2008): Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men. *Br J Nutr*, **99**, 370-378.
50. Normen, A.L., Brants, H.A., Voorrips, L.E., Andersson, H.A., Van den Brandt, P.A., Goldbohm, R.A. (2001): Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr*, **74**, 141-148.
51. Ostlund, R.E. Jr. (2007): Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids*, **42**, 41-45.
52. Ostlund, R.E. Jr. (2002): Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr*, **22**, 533-539.
53. Ostlund, R.E. Jr, McGill, J.B., Zeng, C.M., Covey, D.F., Stearns, J., Stenson, W.F., Spilburg, C.A. (2002): Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Δ^5 -phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, 911-916.
54. Ostlund, R.E. Jr, Racette, S.B., Okeke, A., Stenson, W.F. (2002): Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *Am J Clin Nutr*, **75**, 1000-1004.
55. Ostlund, R.E. Jr, Racette, S.B., Stenson, W.F. (2003): Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *Am J Clin Nutr*, **77**, 1385-1389.
56. Patel, M.D., Thompson, P.D. (2006): Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis*, **186**, 12-19.
57. Patel, S.B. (2008): Plant sterols and stanols: their role in health and disease. *J Clin Lipidol*, **2**, S11-S19.
58. Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen T.A., Toivo J., Lampi A.M. (2000): Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric*, **80**, 939-966.
59. Plat, J., Mensink, R.P. (2005): Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol*, **96**, 15D-22D.
60. Plat, J., Mensink, R.P. (2002): Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women. *FASEB J*, **16**, 258-260.
61. Plat, J., van Onselen, E.N., van Heugten, M.M., Mensink, R.P. (2000): 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.
62. Pollak, O.J. (1953): Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation*, **7**, 702-706.
63. Ros, E. (2000): Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, **151**, 357-379.
64. Schayek, E., Nath, C., Heinemann, T., McGee, M., Seidman, C.E., Samuel, P., Breslow, J.L. (1998): U-shape relationship between change in dietary cholesterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary cholesterol absorption in humans. *J Lipid Res*, **39**, 2415-2422.
65. Spanish Atherosclerosis Society. Cardiovascular diseases and their risk factors in Spain: facts and figures. Report 2007. www.searteriosclerosis.org (consulted in November 2008).
66. Theuwissen, E., Mensink, R.P. (2008): Water-soluble fibers and cardiovascular disease. *Physiol Behav*, **94**, 285-292.
67. Tilvis, R.S., Miettinen, T.A. (1986): Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr*, **43**, 92-97.
68. Valenzuela, A., Ronco, A.M. (2004): Phytosterols and phytostanols: natural allies for the protection of cardiovascular health. *Rev Chil Nutr*, **21**(S1), 161-169.
69. Valsta, L.M., Lemström, A., Ovaskainen, M.L., Lampi, A.M., Toivo, J., Korhonen, T., Piironen, V. (2004): Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *Brit J Nutr*, **92**, 671-678.

70. Van Horn, L., McCoin, M., Kris-Etherton, P.M., Burke, F., Carson, J.A., Champagne, C.M., Karmally, W., Sikand, G. (2008): The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *J Am Diet Assoc*, **108**, 287-331.
71. Verger, P., Ireland, J., Møller, A., Abravicius, J.A., De Henauw, S., Naska, A. (2002): Improvement of comparability of dietary intake assessment using currently available individual food consumption surveys. *Eur J Clin Nutr*, **56**, S18-S24.
72. Von Bergmann, K., Sudhop, T., Lütjohann, D. (2005): Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol*, **96**, 10D-14D.
73. Wang, D.Q. (2007): Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol*, **69**, 221-248.
74. Weststrate, J.A., Ayesch, R., Bauer-Plank, C., Drewitt, P. N. (1999): Safety evaluation of phytosterol esters. Part 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine. *Food Chem Toxicol*, **37**, 1063-1071.
75. World Health Organization. www.who.int (consulted in September 2008).
76. Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R.E., Berge, K.E., Horton, J. D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. (2002): Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*, **110**, 671-680.

A moderate intake of phytosterols from habitual diet affects cholesterol metabolism

T. Sanclemente¹, I. Marques-Lopes¹, M. Fajó-Pascual¹, M. Cofán², E. Jaraúta⁴, E. Ros², J. Puzo^{1,3}, A.L. García-Otín⁴

¹Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte, Universidad de Zaragoza, Huesca, España; ²Unidad de Lípidos, Serv. Endocrinología y Nutrición, Hospital Clínic, Barcelona, España y CIBERobn, Inst. de Salud Carlos III, España; ³Hospital General San Jorge, Huesca, España; ⁴Laboratorio de Investigación Molecular, Unidad de Lípidos, Hospital Univ. Miguel Servet, Inst. Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, España

(Received on November, 2009)

T. SANCLEMENTE, I. MARQUES-LOPES, M. FAJÓ-PASCUAL, M. COFÁN, E. JARAUTA, E. ROS, J. PUZO and A.L. GARCÍA-OTÍN. *A moderate intake of phytosterols from habitual diet affects cholesterol metabolism*. J Physiol Biochem, **65** (4), 397-404, 2009.

Cholesterol metabolism homeostasis is the result of a balance between synthesis, degradation and intestinal absorption. It is well established that intestinal cholesterol absorption efficiency can be modified by the intake of phytosterol-enriched food and, therefore, have a serum cholesterol-lowering effect. Recent epidemiological and clinical studies have shown that presence of phytosterols at normal diet levels could also be effective on lowering total and LDL serum cholesterol since they affect whole-body cholesterol metabolism even at those moderate doses. The aim of this study was to analyze the effect of the levels of the naturally-occurring phytosterols in the diet on cholesterol metabolism parameters. In order to do that a group of 99 healthy volunteers was studied for their dietary habits and surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption. The mean daily dietary intake of phytosterols, measured by a food semiquantitative frequency questionnaire, was found to be 494 mg being β -sitosterol the major contributor to it. Subjects were classified into tertiles according to their total phytosterol intake and comparisons were done between subgroups. No statistical differences were observed for surrogate markers of intestinal cholesterol absorption, but a significant increase in the cholesterol synthesis surrogate marker lathosterol-to-cholesterol ratio associated to highest dietary phytosterol intake was observed. Regardless of this, only a non significant trend toward a less atherogenic lipid profile was observed in the upper tertile. In conclusion, the intake of moderate amounts of phytosterols naturally present in habitual diet may affect cholesterol metabolism and specially the rate of cholesterol synthesis as estimated by the surrogate marker lathosterol-to-cholesterol ratio in serum.

Key words: Phytosterols, Diet, Cardiovascular disease, Intestinal cholesterol absorption, Cholesterol synthesis, Lathosterol.

Cardiovascular disease is a major health problem in developed countries although its incidence is relatively lower in the Mediterranean area which is partly ascribed to dietary habits (5).

Epidemiologic and clinical evidence shows that elevated serum cholesterol, specifically low-density lipoprotein cholesterol (c-LDL), increases cardiovascular disease risk (5). In humans, there is a significant and positive correlation between the level of plasma c-LDL and the efficiency of intestinal cholesterol absorption (9). Lower cholesterol absorption produces a state of relative cholesterol deficiency, followed by an upregulation of cholesterol biosynthesis (23) and of LDL receptor activity (20) resulting in a decrease of c-LDL concentration as the net overall effect (23). Therefore, modulation of cholesterol absorption is potentially an effective way of lowering plasma c-LDL levels in the general population.

Mediterranean diet, which is rich in plant-based food, contains a wide range of bioactive compounds such as phytosterols (PS) which could inhibit intestinal cholesterol absorption and, therefore, have a serum cholesterol-lowering effect (24). PS are structural and functional components in the cellular membranes of the plants with a similar structure to cholesterol. The mechanisms by which these molecules affect intestinal cholesterol absorption are not completely understood but some of them are well known. PS are thought to act primarily in the intestinal lumen, displacing the cholesterol from mixed micelles and, consequently, increasing the amounts excreted by faeces. In addition to that, taking into account that the intestinal cholesterol absorption is a multistep process, PS may also act: *a*) attenuating the NPC1L1 gene expression, which may result in a lower cholesterol uptake from

the lumen; *b*) lowering the cholesterol esterification rate by the ACAT2 (acyl-CoA cholesterol acyltransferase) and, consequently, the amount of cholesterol secreted into the circulation from the enterocytes via the chylomicrons and *c*) upregulating the expression of ABC-transporters ABCG5 and ABCG8 in intestinal cells, which may result in an increased excretion of cholesterol by the enterocyte back into the lumen (22).

Although more than 40 different molecular forms have been identified β -sitosterol, campesterol and stigmasterol are the most common PS in foods, and account for more than 95% of total PS dietary intake (12). The most concentrated sources of these compounds are vegetable oils, nuts and legumes but fruits, vegetables and cereals are also important because of the big portion sizes that are consumed (18). Estimates of daily phytosterol consumption in various populations range from ~ 146 to 405 mg although some vegetarians can have almost a daily intake of 1 g (19).

Whereas it is clinically demonstrated that PS intakes of 2 to 3 g/d reduce c-LDL levels by about 10% in human subjects much less is known about the possible benefits of naturally-occurring plant sterols. Traditionally, plant sterols from the habitual diet have not been considered to have any significant effect on the serum cholesterol level but several trials concluded that doses as lower as those obtained from traditional food have an effect on cholesterol absorption (22). Moreover, recent epidemiological (1, 11) and clinical (4, 21) studies have shown that presence of PS at normal diet levels are also effective lowering total and LDL serum cholesterol since they affect whole-body cholesterol metabolism even at those moderate doses (21).

Several methods have been developed to measure cholesterol metabolism. Nevertheless, when the question of interest is related to changes between subpopulations or between treatments in large-scale clinical trials or population based studies, the use of surrogate markers of cholesterol metabolism is considered a faster and simpler option (23). Cholesterol synthesis and absorption rates can be indirectly measured by quantification of serum non-cholesterol sterols expressed as ratios to serum cholesterol. In general, the ratios to serum cholesterol of precursor sterols desmosterol and lathosterol reflect absolute synthesis of cholesterol, while those of cholestanol, campesterol and sitosterol reflect cholesterol absorption percentage in normal population (15).

The aim of the present study was to quantify the naturally-occurring phytosterol intake in a Spanish free-living population as well as to investigate its effect on intestinal cholesterol absorption and, consequently, on serum cholesterol concentrations.

Material and Methods

Study population.— The participants were 99 healthy adults aged 20–70 years old both from Aragón, Spain. Furthermore, they fulfilled the following criteria: no known cardiovascular disease or causes of secondary hyperlipidemia, body mass index (BMI) values lower than 30 kg/m² and no habitual consumption of artificially PS supplemented foods. All subjects volunteered to the study and gave written informed consent. The study protocol had been accepted by the Aragón Ethics Committee of Clinical Investigation.

Participants attended an interview with a trained dietitian who collected informa-

tion on lifestyle variables such as level of physical activity, alcohol consumption and smoking status as well as other about illness antecedents and pharmacological treatment.

Anthropometric measurements.— Additionally, several anthropometric measurements were taken at the interview. Height was measured without shoes to the nearest centimetre. Weight was measured in light clothing without shoes to the nearest kilogram. Finally, waist circumference was taken to nearest centimetre. BMI was calculated as the weight in kilograms by the square of height in metres. In addition to that, blood pressure was measured with a validated semi-automatic oscillometer.

Blood samples and laboratory procedures.— Coded samples of serum were stored at -80 °C until assay. Glucose, total cholesterol, HDL cholesterol (after immunoprecipitation) and triglyceride levels were quantified enzymatically with an Autoanalyzer Synchron DX800 (Beckman Instruments). c-LDL was calculated by the Friedewald formula. All biochemical determinations are under a quality control program.

Serum noncholesterol sterols concentrations (sitosterol, campesterol, lathosterol and desmosterol) were analyzed by gas chromatography using a modification of a method previously described by HEINEMANN *et al.* (7). Briefly, epicoprostanol (2 mg) was added to serum (0.1 ml) as internal standard. After alkaline hydrolysis, extraction, and derivatization to trimethylsilyl ethers, the sterols were quantified on a 30-m nonpolar capillary column (TRB-Esterol; Teknokroma, Barcelona, Spain) with a Perkin Elmer GC Autosystem (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Noncholesterol sterols are

expressed as ratios to cholesterol ($10^2 \times$ millimol *per* mol cholesterol) and indicated in text as the ratio.

Dietary assessment.— Food intake was assessed through a 136-item food semi-quantitative frequency questionnaire (FFQ) previously validated and accepted in Spain (14).

Nutrient scores were calculated as frequency $\times$ nutrient composition of a specified portion size, where frequencies were registered in nine categories that ranged from “never or almost never” to “ ≥ 6 times/day” for each food item. Once the amount of each food item, in mL or g, is known, dietary intake scores were computed using an *ad hoc* computer program specifically developed in SPSS language syntax for this purpose. Data of energy, nutrients, fibre and alcohol were updated using the information included in food composition tables for Spain (16).

The amount of PS in 51 food items from the FFQ was considered to estimate total PS intake as well as individual phytosterol intake. Phytosterol content values used were obtained mainly from a database of Spanish foods (8) but, when data were not available, some of them were taken from Fineli[®] - Finnish Food Composition Database (Available at: <http://www.fineli.fi/foodlist.php?lang=en>) and the USDA National Nutrient Database (Available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>).

Statistical analysis.— Statistical calculations were performed with the use of SPSS 15.0 for WINDOWS (SPSS Inc. Chicago, IL). Normality on variables was checked before further analyses.

A descriptive analysis was performed providing data from men and women separately. Continuous variables were

expressed as means (SD) (if normal distribution) or as medians [25th and 75th percentiles] otherwise, whereas categorical variables were reported as *n* (%). Division into tertiles of phytosterol intake was done by ranking according to total phytosterol intake defined as milligram phytosterol *per* day. Tertiles comparisons were undertaken by ANOVA or Kruskal-Wallis tests if variables were continuous and chi square test if categorical. Association of total phytosterol intake categorized by tertiles with serum cholesterol levels was assessed by a multivariate linear regression model adjusted for covariates such as sex, age, BMI, total energy intake and soluble fibre. Associations between noncholesterol sterol-to-cholesterol ratios were assessed by the Rho of Spearman correlation coefficient. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The sample was composed of middle-aged subjects (63 women and 36 men) who met the inclusion criteria. As far as blood pressure and serum lipid profile are concerned, the study population was within the normal rates, i.e. systolic 120–129 mmHg and diastolic 80–84 mmHg (13). Serum levels of total and LDL cholesterol were lower than the values for 75th percentile according to the DRECE criteria (6). Furthermore, the serum levels of c-HDL and triglycerides were in the healthy range (c-HDL ≥ 1 mmol/L and triglycerides ≤ 1.7 mmol/L) (13). Finally, the whole group presented ratios of noncholesterol sterols that were comparable to those obtained using the same method at other studies (4) and in the range of the general population levels (2).

The mean daily dietary intake of PS was found to be 494 mg. Among the identified PS compounds, β -sitosterol was the major contributor to the total intake (60.2%), followed by campesterol (7.4%), stigmasterol (6.3%) and stigmastanol (4.1%). The unknown PS fraction accounted for as much as 23.1% of total PS intake.

When the sample was categorized by tertiles of total phytosterol intake, sex, age, BMI, energy intake and total phytosterol intake were statistically different (Table I). Additionally serum levels of total cholesterol and c-LDL in the 3rd tertile were lower than in the 1st one,

although the differences were not statistically significant. The higher serum level of c-HDL in the upper tertile was not significant either when compared to the lower one. Adjusting for soluble fibre did not modify the results (data not shown).

Concerning surrogate markers of cholesterol absorption, serum sitosterol levels strongly correlated with those of campesterol ($r = 0.851$, $p < 0.01$). In the same way, surrogate markers of cholesterol synthesis, lathosterol and desmosterol, were also correlated ($r = 0.508$, $p < 0.01$).

Data of serum noncholesterol sterols ratios by tertiles are reported in Table II. In relation to surrogate markers of chole-

Table I. Distribution of serum lipid levels by tertiles of total phytosterol (PS) intake.

PS intake (mg/day)	Tertile 1 ≤ 427.82	Tertile 2 427.83-532.76	Tertile 3 > 532.77	P value
N	33	33	33	
Male, n(%)	8(24)	11(33)	17 (52)	0.000
Age, years	30 [21-46]	45 [28-59]	50 [45-57]	0.000 [†]
Body mass index, Kg/cm ²	22.6 (2.5)	23.7 (2.8)	24.5 (3.2)	0.024*
Energy, MJ/day	9.438 (1.893)	12.566 (2.190)	15.335 (2.778)	0.000*
PS intake, mg/day	348.74 [305.96-393.04]	474.97 [456.53-500.77]	615.09 [571.92-701.90]	0.000 [†]
Plasma lipids, mmol/L				
Total Cholesterol adjusted [‡]	5.852	5.619	5.633	0.746
LDL-Cholesterol adjusted [‡]	3.986	3.857	3.749	0.831
HDL-Cholesterol adjusted [‡]	1.388	1.328	1.514	0.234
Triglycerides	0.7113 [0.6209-0.9992]	0.8467 [0.6548-1.1234]	0.8355 [0.6435-1.2701]	0.281 [†]

Values expressed as mean (SD) or medians [25thpercentile- 75thpercentile] unless otherwise expressed. P value calculated by *ANOVA or [†]Kruskal-Wallis test. [‡]Adjusted by sex, age, BMI, and total energy intake by a multivariate linear regression model.

Table II. Distribution of surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption by tertiles of total phytosterol intake.

PS intake (mg/day)	Tertile 1 ≤ 427.82	Tertile 2 427.83-532.76	Tertile 3 > 532.77	P value
Plasma noncholesterol sterol-to-cholesterol ratios, 10 ² x mmol/mol				
Desmosterol	188.17 [155.27-229.79]	203.46 [177.98-223.79]	205.91 [174.65-257.47]	0.441
Lathosterol	90.88 [76.81-113.49]	117.45 [87.69-146.08]	134.39 [97.01-167.29]	0.004
Campesterol	190.14 [143.99-241.10]	169.80 [141.26-211.39]	177.88 [139.96-243.74]	0.511
Sitosterol	168.38 [122.84-216.90]	156.10 [128.32-197.64]	179.80 [123.33-228.13]	0.339

Values expressed as medians [25thpercentile- 75thpercentile]. P value calculated by Kruskal-Wallis test.

terol absorption, the campesterol ratio did not show a clear trend. However, when the upper tertile was compared to the lower one, the sitosterol ratio increased although not in a significant way. Focusing on the surrogate markers of cholesterol synthesis, while the desmosterol ratio showed a weak increase (not statistically different) the lathosterol ratio increased in a statistically significant way across tertiles (47.88%, $p=0.004$).

Discussion

Intakes of PS have been previously described in other countries such as Finland (25), Sweden (11), The Netherlands (17), United Kingdom (10) as well as Spain (8). The estimation of PS intake for our sample was higher when compared with previous results. This variation could be explained by several affecting factors such as the methodology used to quantify the dietary intake, the food composition database selected and, importantly, the different dietetic pattern in Spain. The last one could be the most important explanation for the differences with the other countries, all of them in the North of Europe where the diet is quite different of the typical Mediterranean one. However, compared with the previous Spanish study, differences with our PS intake estimation is most likely due to the methodology used to quantify the dietary intake (whereas JIMÉNEZ-ESCRIG *et al.* estimated PS intake based on the Spanish National Food Consumption survey in our study a FFQ was used) and/or the choice of the food composition database (in our study more food items were used than in JIMÉNEZ-ESCRIG *et al.* some of them important sources of PS such as corn oil). In any case, the relative contribution of

the different individual PS to the total intake was comparable in both studies.

The PS intake in our study did not reduce total and c-LDL in a significant way although the detected trend and the magnitude of the reduction were similar to that reported in previous epidemiological studies (1, 11). Insufficient statistical power, due to small sample size, might explain the lack of statistical significance. Other important question is that the upper tertile contained several menopausal women. Taking into account that this status has an impact on the levels of serum lipids (3) it should be necessary to control for this confounding factor in order to obtain a more accurate conclusion.

The lathosterol ratio is a surrogate marker of cholesterol synthesis. Therefore, the observed increase of this ratio across tertiles might be interpreted as an enhanced cholesterol synthesis at moderate PS intakes. This finding suggests further that, considering the close cholesterol homeostasis presented in humans (23), the intestinal cholesterol absorption was likely to be inhibited by the dietary PS. Our results are also in consonance with those from a recent controlled feeding study where the cholesterol biosynthesis, estimated from the lathosterol ratio, was increased in response to a moderate dose of total PS *per day* (459 mg). In the former study, a significantly reduced efficiency of intestinal cholesterol absorption was observed, as measured by isotopic methods (21).

On the contrary, the sitosterol and campesterol ratios did not show the expected decreased absorption because the reliability of these surrogate markers depends on the use of controlled diets. Besides other affecting factors such as apolipoprotein E phenotype, ATP-bind-

ing cassette transporter polymorphisms or gender, the serum proportions of PS are tightly related to their amounts in the diet, in spite of their reported low fractional absorption. That is why, the use of these ratios as surrogate markers of cholesterol absorption requires taking into account all of them as confounding factors (2). Nevertheless, and for the previously stated reason, a dose-dependent increase in plasma PS concentration can be used as a reliable indicator of the adherence to a healthy diet.

In conclusion, the results of this study suggest that PS consumed at the moderate doses present in a healthy diet enhanced the cholesterol synthesis what may be the compensatory consequence of a decrease in the intestinal cholesterol absorption. More studies are necessary to establish a methodology to control for the confounding effect of different factors such as the PS present in the habitual diet, in order to use the serum plant sterol levels as reliable surrogate markers of cholesterol absorption.

Acknowledgements

This work has been funded by the Instituto de Salud Carlos III (PI06/1402) – Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) and CTP Network (2006-2009).

References

1. Andersson, S.W., Skinner, J., Ellegard, L., Welch, A.A. *et al.* (2004): Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: A cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr*, **58**, 1378-1385.
2. Chan, Y.M., Varady, K.A., Lin, Y., Trautwein, E., Mensink, R.P. *et al.* (2006): Plasma concentrations of plant sterols: Physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev*, **64**, 385-402.
3. Derby, C.A., Crawford, S.L., Pasternak, R.C., Sowers, M. *et al.* (2009): Lipid changes during the menopause transition in relation to age and weight: The study of women's health across the nation. *Am J Epidemiol*, **169**, 1352-1361.
4. Escurriol, V., Cofan, M., Serra, M., Bullo, M. *et al.* (2009): Serum sterol responses to increasing plant sterol intake from natural foods in the Mediterranean diet. *Eur J Nutr*, **48**, 373-382.
5. Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M.A., Corella, D., Salas-Salvado, J. *et al.* (2006): Effects of a Mediterranean-Style Diet on cardiovascular risk factors: A randomized trial. *Ann Intern Med*, **145**, 1-11.
6. Gomez-Gerique, J.A., Gutierrez-Fuentes, J.A., Montoya, M.T., Porres, A. *et al.* (1999): Lipid profile of the Spanish population: The DRECE (Diet and Risk of Cardiovascular Disease in Spain) study. DRECE study group. *Med Clin-Barcelona*, **113**, 730-735.
7. Heinemann, T., Axtmann, G. and von Bergmann, K. (1993): Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest*, **23**, 827-831.
8. Jimenez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A.B. and Saura-Calixto F. (2006): Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *J Agric Food Chem*, **54**, 3462-3471.
9. Kesaniemi, Y. A. and Miettinen, T.A. (1987): Cholesterol absorption efficiency regulates plasma cholesterol level in the Finnish population. *Eur J Clin Invest*, **17**, 391-395.
10. Klingberg, S., Andersson, H., Mulligan, A., Bhaniani, A. *et al.* (2008): Food sources of plant sterols in the EPIC Norfolk population. *Eur J Clin Nutr*, **62**, 695-703.
11. Klingberg, S., Ellegård, L., Johansson, I., Hallmans, G. *et al.* (2008): Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden. *Am J Clin Nutr*, **87**, 993-1001.
12. Law, M. (2000): Plant sterol and stanol margarines and health. *BMJ*, **320**, 861-864.
13. Lobos, J.M., Royo-Bordonada, M.A., Brotons, C., Alvarez-Sala, L. *et al.* (2008). European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: CEIPC 2008 Spanish adaptation. *Rev Esp Salud Publica*, **82**, 581-616.
14. Martin-Moreno, J. M., Boyle, P., Gorgojo, L., Maisonneuve, P. *et al.* (1993). Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol*, **22**, 512-519.
15. Miettinen, T.A., Tilvis, R.S. and Kesaniemi, Y.A. (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.

16. Moreiras O., Carbajal A. and Cabrera L. (2006): *Tablas de composición de alimentos (Food composition tables)*. 10th ed. Pirámide, Madrid.
17. Normen, A.L., Brants, H.A., Voorrips, L.E., Andersson, H.A. *et al.* (2001): Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr*, **74**, 141-148.
18. Ostlund, R.E.Jr. (2002): Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr*, **22**, 533-549.
19. Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J. and Lampi A.M. (2000): Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric*, **80**, 939-966.
20. Plat, J. and Mensink, R.P. (2005): Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: Mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol*, **96**, 15D-22D.
21. Racette, S. B., Lin, X., Lefevre, M., Spearie, C.A. *et al.* (2009). Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: A controlled feeding study. *Am J Clin Nutr*, Nov 4. (Epub ahead of print).
22. Sanclemente, T., Marques-Lopes, I., Puzo, J. and Garcia-Otin, A.L. (2009): Role of naturally-occurring plant sterols on intestinal cholesterol absorption and plasmatic levels. *J Physiol Biochem*, **65**, 87-98.
23. Santosa, S., Varady, K.A., AbuMweis, S. and Jones, P.J. (2007): Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: Does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Sci*, **80**, 505-514.
24. Saura-Calixto, F. and Goñi, I. (2009): Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Crit Rev Food Sci*, **49**, 145-152.
25. Valsta, L.M., Lemstrom, A., Ovaskainen, M.L., Lampi, A.M. *et al.* (2004): Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: Quality of new values and their effect on intake. *Brit J Nutr*, **92**, 671-678.

Naturally-occurring phytosterols in the usual diet influence cholesterol metabolism in healthy subjects

Sanclemente T¹, Marques-Lopes I¹, Fajó-Pascual M¹, Cofán M², Jarauta E⁴, Ros E², Puzo J^{1,3}, García-Otín AL⁴.

¹ Department of Nutrition, Faculty of Health, Sciences and Sports, University of Zaragoza, Pl. Universidad, 3 - 22002 - Huesca, Spain.

² Lipid Clinic, Endocrinology and Nutrition, Biomedical Research Institute August Pi Sunyer, Hospital Clínic, C. Villarroel, 170 – 08036 – Barcelona, Spain. CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain.

³ General Hospital San Jorge, Av. Martínez de Velasco, 36 – 22004- Huesca, Spain.

⁴ Molecular Research Laboratory, University Hospital Miguel Servet, Aragon Health Sciences Institute (I+CS), P. Isabel La Católica, 1-3 – 50009 - Zaragoza, Spain.

Short title: Naturally-occurring diet phytosterols and cholesterol metabolism.

Corresponding author:

Iva Marques Lopes,
Facultad Ciencias de la Salud y del Deporte,
Plaza Universidad, Nº 3,
22002 Huesca, España.
E-mail: imarques@unizar.es
Telephone: +34 974239391
Fax: +34 974239392

Word counts:

Abstract: 241

Text: 2602

Number of references: 29 references

Number of tables: 3 tables

Keywords: Phytosterols, diet, cardiovascular disease, intestinal cholesterol absorption, sitosterol

ABSTRACT

Background and aims: Modulation of cholesterol absorption is potentially an effective way of lowering blood cholesterol levels and decreasing inherent cardiovascular risk in the general population. It is well established that cholesterol absorption efficiency can be modified by the intake of foods enriched with gram-doses of phytosterols but little is known about the effects of phytosterols in the usual diet, even though moderate doses have been reported to affect whole-body cholesterol metabolism. A way to indirectly measure cholesterol synthesis and absorption rates is by quantification of serum non-cholesterol sterols. The aim of this study was to investigate the role of the naturally-occurring phytosterol intake on cholesterol absorption and on serum cholesterol concentrations in a Spanish free-living population.

Methods and results: 85 healthy volunteers were studied regarding their dietary habits (using a validated food frequency questionnaire), lipid profile and surrogate markers of cholesterol metabolism. Subjects were classified into tertiles of total phytosterol intake and differences in lipid profile and markers of cholesterol metabolism were assessed by multivariate linear regression models adjusted for various confounding factors. The daily intake of phytosterols and cholesterol was 489 (median) and 513 (mean) mg, respectively. Both serum LDL-cholesterol concentration and sitosterol-to-cholesterol ratio corrected by sitosterol intake (a surrogate marker of intestinal cholesterol absorption) decreased significantly ($p < 0.05$, both) across tertiles of phytosterol intake.

Conclusion: Phytosterols consumed at moderate doses in the habitual diet appear to reduce blood cholesterol levels via decreased cholesterol absorption in healthy subjects.

INTRODUCTION

Cardiovascular disease is a major health problem in developed countries, albeit its incidence is relatively lower in the Mediterranean area, which can partly be ascribed to dietary habits (1).

Presently, there is overwhelming epidemiologic and clinical evidence relating increased serum cholesterol, specifically low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, to an enhanced cardiovascular disease risk. In humans there is a direct correlation between plasma LDL-cholesterol levels and the efficiency of intestinal cholesterol absorption (2). A reduction of cholesterol absorption produces a state of relative cholesterol deficiency, which stimulates counter-regulatory mechanisms, namely cholesterol biosynthesis (3) and LDL receptor activity (4) to maintain cholesterol homeostasis, resulting in decreased LDL-cholesterol concentration as the overall effect (3). Therefore, modulation of cholesterol absorption is potentially an effective way of lowering plasma LDL-cholesterol levels in the general population (5).

Phytosterols, structural and functional components of the plant cell membranes with a similar structure to cholesterol, are one of the dietary components that have the capacity to render cholesterol absorption inefficient and, consequently, have a potential cholesterol-lowering effect (6). In fact, many clinical trials have shown that phytosterols incorporated into various foods at doses of about 2 g/day consistently reduce LDL-cholesterol levels by nearly 9% on average in human subjects (7). However, much less is known about the possible benefits of naturally-occurring phytosterols.

Estimates of daily phytosterol consumption in various populations range from ~ 160 to 360 mg (6), and these figures are two to three-fold higher among subjects with a high intake of vegetable foods, such as vegetarians (8). The most concentrated sources of these compounds (beta-sitosterol, campesterol and stigmasterol are the predominant forms) are vegetable oils, seeds, nuts and legumes. Fruits, vegetables and cereals are also important because of the large portion sizes that are consumed (9). That is why the

Mediterranean diet, which is rich in plant-based foods, contains large amounts of phytosterols (10).

Traditionally, phytosterols from the habitual diet have not been considered to have any significant effect on the serum cholesterol level, but it has been suggested that the relatively low doses contained in non-supplemented foods influence cholesterol absorption (6). Moreover, recent epidemiological studies (11,12) have shown that phytosterols from the usual diet relate inversely to total and LDL serum cholesterol levels, while a recent controlled feeding trial (13) has reported that even moderate doses affect whole-body cholesterol metabolism.

Cholesterol synthesis and absorption rates can be indirectly measured by quantification of serum non-cholesterol sterols expressed as ratios to serum cholesterol. The ratios of cholesterol precursors reflect absolute cholesterol synthesis, while those of phytosterols reflect cholesterol absorption efficiency (14). However, the reliability of these surrogate markers of absorption is questionable when the dietary amounts of phytosterols consumed are different among the subjects studied (15).

The aim of the present study was to investigate the role of naturally-occurring phytosterols intake from the usual diet on intestinal cholesterol absorption, as determined from serum levels of surrogate markers of absorption, and on the serum lipid profile in a Spanish free-living population.

METHODS

Study population

The participants were 85 healthy adults aged 18-66 years old from the Aragon region in Northeastern Spain. They fulfilled the following criteria: no known cardiovascular disease or secondary hyperlipidemia; body mass index (BMI) values lower than 30 Kg/m² and waist circumference lower than 102 cm (men) or 88 cm (women); no menopausal status in women; and no habitual consumption of phytosterol-supplemented foods. All subjects volunteered to the study and gave written informed consent. The study protocol was approved by the Aragon Ethics Committee of Clinical Investigation.

Medical and lifestyle information and anthropometric measurements

Participants attended an interview with a trained dietitian who collected demographic data, information on lifestyle factors, including food consumption, smoking and physical activity, and a comprehensive medical history, including prior diagnosis of hypertension, hyperlipidemia or diabetes and medication use.

At the same visit, anthropometric measurements (height, weight and waist circumference) were obtained by standard methods. Additionally, blood pressure was measured with a validated semi-automatic oscillometer.

Dietary assessment

Information on usual food intake over the previous year was assessed by a 136-item semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ) previously validated in Spain (16). Nutrient scores were calculated as frequency x nutrient composition of a specified portion size, where frequencies were registered in nine categories that ranged from “never or almost never” to “ ≥ 6 times/day” for each food item. Once the amount of each food item, in millilitres or grams, was known, dietary intake scores were computed using an *ad hoc* computer program specifically developed in SPSS language syntax for this purpose. Data of energy, nutrients, fibre and alcohol were updated using the information included in Spanish food composition tables.

The amount of phytosterols in 51 food items from the FFQ was considered to estimate total phytosterol intake as well as intake of individual phytosterol species. The phytosterol food composition values used were obtained mainly from a database of Spanish foods (17) and, if necessary, from Fineli® - Finnish Food Composition Database or the USDA National Nutrient Database.

Blood samples and laboratory procedures

A blood sample was taken after an overnight fast. Coded samples of serum were stored at -80°C until assay. Glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (after immunoprecipitation) and triglyceride levels were quantified enzymatically with an Autoanalyzer Synchron DX800 (Beckman Instruments). LDL-cholesterol was calculated

by the Friedewald formula. All biochemical determinations were performed under a quality control program.

Serum non-cholesterol sterols concentrations (beta-sitosterol, campesterol, stigmasterol and lathosterol) were analysed by gas chromatography using a modification of the method previously described by Heinemann *et al.* (18). Briefly, epicoprostanol (2 mg) was added to serum (0.1 ml) as internal standard. After alkaline hydrolysis, extraction, and derivatization to trimethylsilyl ethers, the sterols were quantified on a 30-m nonpolar capillary column (TRB-Esterol; Teknokroma, Barcelona, Spain) with a Perkin Elmer GC AutosystemTM (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

Considering that, in a similar way to cholesterol, non-cholesterol sterols are transported exclusively in lipoprotein particles and the number of these particles may vary among individuals, the absolute values of non-cholesterol sterols levels were expressed as ratios to cholesterol (14). Additionally, in order to eliminate the effect of phytosterol intake on the corresponding serum levels and maintain their reliability as surrogate markers of absorption (19), we introduced a new correction, which was the division of the sitosterol, campesterol and stigmasterol-to-cholesterol ratios by their respective intakes. These new figures reflect the rate of cholesterol absorption independently of the amount of phytosterols in the diet of each study subject.

Statistical analysis

Normality of variables was examined before analysis. Continuous variables were summarized as means (SD) when normally distributed, or as medians [25th and 75th percentiles] otherwise, whereas categorical variables were reported as counts (%). Values with a skewed distribution were transformed to their natural logarithm for analysis.

All diet components were adjusted for total energy intake using the residuals method (20). Division into tertiles of phytosterol intake was done by ranking according to total phytosterol intake defined as milligrams of phytosterols *per day*.

A comparison between tertiles for subjects' characteristics and habitual diet was performed by ANOVA or Kruskal-Wallis tests for continuous variables or the chi square test for categorical variables.

The associations of total phytosterol intake categorized in tertiles with serum lipid levels were assessed by multivariate linear regression after adjustment for covariates such as sex, age, BMI, total energy intake, unsaturated fatty acid-to-saturated fatty acid ratio (UFA/SFA) and total fiber. Similar models were constructed to examine the associations of tertiles of phytosterol intake with surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption, using as covariates sex, age and BMI.

Associations between dietary and serum phytosterols were assessed by linear regression, while those among surrogate markers of cholesterol metabolism were assessed by Spearman correlations.

All comparisons were two-tailed and a p value < 0.05 was considered significant.

Statistical calculations were performed with SPSS 15.0 for WINDOWS (SPSS Inc. Chicago, IL).

RESULTS

Study population and dietary data

The sample was composed of 85 healthy middle-aged subjects (46 women, 39 men). None of the study subjects had hypertension or abnormal fasting blood glucose. Serum levels of total cholesterol and LDL-cholesterol were below the 75th percentile of a Spanish reference population (21), while serum levels of HDL-cholesterol were ≥ 1 mmol/L and triglycerides ≤ 1.7 mmol/L. The study subjects also showed serum phytosterols-to-cholesterol ratios that were comparable to those reported in recent studies of Spanish population groups (22,23) and in other reports (24).

In our healthy subjects, the median of total phytosterol intake was 489 mg *per day*. Among the identified phytosterols, sitosterol was the major contributor to total intake (59.9%), followed by campesterol (8.0%), stigmasterol (6.9%) and stigmasterol (3.7%). The unknown phytosterol fraction accounted for as much as 21.5% of the total intake. Mean cholesterol intake was 513 mg *per day*.

When the sample was categorized by tertiles of total phytosterol intake, subgroups were similar regarding sex and BMI but age increased with phytosterol intake (Table 1). Intakes of total energy and macronutrients were similar while the unsaturated/saturated fatty acid

relation (UFA/SFA) and total fiber increased with the phytosterol intake ($p < 0.001$). Total dietary phytosterol intake ranged between 428 and 545 mg *per day* ($p < 0.001$) from the first to the third tertile and cholesterol intake decreased marginally across tertiles ($p = 0.05$). The ratio between dietary intake of phytosterols and cholesterol increased across tertiles ($p < 0.001$) mainly due to the increasing phytosterol intake

Serum lipids

The serum levels of total cholesterol and LDL-cholesterol, adjusted for covariates such as sex, age, BMI, UFA/SFA ratio, total energy intake, decreased across increasing tertiles of phytosterol intake, although the linear trend was significant only for LDL-cholesterol ($p < 0.05$) (Table 2). Further adjustment for total fiber did not substantially change the results (data not shown). On the other hand, the serum concentrations of HDL-cholesterol and triglycerides were similar between tertiles of phytosterol intake.

Surrogate markers of cholesterol metabolism

The serum levels of the main plant sterol sitosterol, were directly related to their dietary intake ($p = 0.008$). Consequently, the surrogate marker of cholesterol absorption sitosterol-to-cholesterol ratio was corrected by sitosterol intake to be used in the estimation of the cholesterol absorption efficiency. No statistically significant relations were observed for campesterol or stigmasterol.

Table 3 shows the values of surrogate markers of cholesterol metabolism adjusted for covariates such as age, sex and BMI by tertiles of dietary phytosterol intake. Corrected sitosterol-to-cholesterol ratios decreased across increasing tertiles of phytosterol intake ($p = 0.002$). Further adjustment for dietary components such as total fiber and the ratio UFA/SFA did not substantially change the results (data not shown). The surrogate marker of cholesterol synthesis, the lathosterol-to-cholesterol ratio, although a positive linear trend was observed, it was not significantly different by tertiles of phytosterol intake. The two surrogate markers of cholesterol metabolism were inversely and significantly correlated ($r = -0.393$, $p < 0.001$).

DISCUSSION

In this cross-sectional study of healthy Spanish subjects we assessed the effects of phytosterol intake with natural foods in the usual diet on cholesterol metabolism, as evaluated by lipid profiles and surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis. Our main finding was that moderate doses of phytosterols in natural foods from the habitual diet were associated with both lower serum LDL-cholesterol concentrations and reduced intestinal cholesterol absorption, defined by a decreased serum sitosterol-to-cholesterol ratio corrected by sitosterol intake. The results add to the emerging evidences on the bioactivity of moderate doses of dietary phytosterols (11-13, 22).

Intake of phytosterols has been previously described in countries such as Finland (25), Sweden (12), The Netherlands (26) and United Kingdom (11) (average intake ranged between 212 to 310 mg *per day*), as well as in Spain (17,22,23), with average intakes between 320 and 375 mg *per day*. The estimation of phytosterol intake for our sample (median 489 mg *per day*) was higher in comparison with available figures for various European countries. The variation in phytosterol intake across European countries may be accounted for by differences in methods used to quantify the dietary intake, variable and incomplete phytosterol food composition databases, and differences in dietary patterns. Spain leads the consumption of vegetables and fruits in Europe (27), and is second only to Greece in consumption of olive oil (28), which probably explains the high reported phytosterol intakes in Spanish populations (17,22,23), including the present study.

Remarkably, median phytosterol intake in our population was comparable to values in the top quintile of the distribution described in the UK (~ 460 mg *per day*) (11). When the dietary data was compared across tertiles, the ratio between the dietary intake of phytosterols and cholesterol increased reaching a value of 1.3 in the upper tertile. It is estimated that, in Europe, this ratio normally ranges between 0.5 and 1.0 (25) and, although no official recommendations exist, it has been suggested that a diet containing more phytosterols than cholesterol, i.e. ratio > 1.0, would be healthier (29).

In our study, increasing phytosterol intake was associated with a nearly significant reduction in serum total cholesterol and a significant reduction in LDL-cholesterol,

independently of dietary variables such as total energy intake, the ratio UFA/SFA and total fiber. Even with the relatively small number of study subjects, our finding is consistent with data from cross-sectional studies relating phytosterol intake in the customary diet with serum cholesterol levels (11,12). These results are also consistent with prior interventional studies in which the diet was enriched with moderate doses of phyosterols (13,22), but showing that those amounts can be achieved by the usual diet, too. Since the seminal observation of Miettinen *et al* (14), numerous studies have demonstrated that the serum phytosterol-to-cholesterol ratios are reliable surrogate markers of intestinal cholesterol absorption. However, since serum phytosterol concentrations are directly related to dietary phytosterol intake (14), to use them as reliable markers of cholesterol absorption it is important either to use well controlled diets (19) or, as postulated here, to correct the phytosterol-to-cholesterol ratios by the respective dietary intake. The observed statistically significant linear decrease of the corrected sitosterol-to-cholesterol ratios across tertiles of phytosterol intake in our study might be interpreted as decreasing cholesterol absorption with increasing phytosterol intake at moderate doses from usual diet. The observed 10% reduction of cholesterol absorption, measured using isotopic methods, with an average 459 mg/day dose in the study of Racette *et al.* (13) supports our findings. Given the tight control of cholesterol homeostasis (3), one would expect hepatic cholesterol synthesis to be enhanced when absorption decreases. In our study, serum lathosterol-to-cholesterol ratios, a surrogate marker of cholesterol synthesis, did not increase significantly across tertiles of phytosterol intake, probably due to insufficient statistical power. Alternatively, the modest effect on cholesterol absorption observed triggered only a small compensatory response of cholesterol synthesis, not enough to reach statistical significance.

Our study has limitations, such as the relatively small number of study subjects, which might reduce statistical power, and the assessment of food intake based on subjective self-reports. The study deals with a Mediterranean population sample with customarily high intake of plant food, thus the findings might not be generalized to other populations. Strengths of the study are the real-life conditions with self-selected, home-prepared foods

and that plant sterol intake was determined mainly from composition tables constructed with Spanish foods (17).

In conclusion, phytosterols consumed at moderate doses in the habitual diet appear to reduce blood cholesterol levels via decreased cholesterol absorption. So, they could be used as a tool to prevent cholesterol risings in healthy subjects, especially when their diet is rich in cholesterol.

ACKNOWLEDGEMENTS

Work supported in part by grants from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (PI06/0365 and PI06/1402). CIBERObn is an initiative of ISCIII, Spain. The authors sincerely thank Dr. T.A. Miettinen from University of Kuopio, Finland, for his expert advice on the application of surrogate markers of cholesterol metabolism.

REFERENCES

- (1) Martinez-Gonzalez MA, Garcia-Lopez M, Bes-Rastrollo M, Toledo E, Martinez-Lapiscina EH, Delgado-Rodriguez M, et al. Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: A Spanish cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010. *In press*. doi:10.1016/j.numecd.2009.10.005
- (2) Kesaniemi YA, Miettinen TA. Cholesterol absorption efficiency regulates plasma cholesterol level in the Finnish population. *Eur J Clin Invest* 1987;17:391-95.
- (3) Santosa S, Varady KA, AbuMweis S, Jones PJ. Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist? *Life Sci* 2007;80:505-14. doi:10.1016/j.lfs.2006.10.006.
- (4) Plat J, Mensink RP. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol* 2005;96:15D-22D. doi:10.1016/j.amjcard.2005.03.015.

- (5) Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* 2007;69:221-48.
- (6) Sanclemente T, Marques-Lopes I, Puzo J, Garcia-Otin AL. Role of naturally-occurring plant sterols on intestinal cholesterol absorption and plasmatic levels. *J Physiol Biochem* 2009;65:87-98.
- (7) Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Duchateau GS, Meijer L, Zock PL, et al. Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J Nutr* 2009;139:271-84.
- (8) Vuoristo M, Miettinen TA. Absorption, metabolism, and serum concentrations of cholesterol in vegetarians: effects of cholesterol feeding. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1325-31.
- (9) Ostlund RE, Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2002;22:533-49.
- (10) Saura-Calixto F, Goni I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009;49:145-52.
- (11) Andersson SW, Skinner J, Ellegard L, Welch AA, Bingham S, Mulligan A, et al. Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1378-85.
- (12) Klingberg S, Ellegard L, Johansson I, Hallmans G, Weinehall L, Andersson H, et al. Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden. *Am J Clin Nutr* 2008;87:993-01.
- (13) Racette SB, Lin X, Lefevre M, Spearie CA, Most MM, Ma L, Ostlund RE Jr. Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr* 2010;91:32-38.
- (14) Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 1990;131:20-31.
- (15) Vanstone CA, Jones PJ. Limitations of plasma plant sterols as indicators of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 2004;79:340-41.
- (16) de la Fuente-Arillaga C, Vazquez Ruiz Z, Bes-Rastrollo M, Sampson L, Martinez-

- Gonzalez MA. Reproducibility of an FFQ validated in Spain. *Public Health Nutr* 2010;28:1-9.
- (17) Jimenez-Escrig A, Santos-Hidalgo AB, Saura-Calixto F. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *J Agric Food Chem*. 2006;54:3462-71.
- (18) Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 1993;23:827-31.
- (19) Nissinen MJ, Gylling H, Miettinen TA. Responses of surrogate markers of cholesterol absorption and synthesis to changes in cholesterol metabolism during various amounts of fat and cholesterol feeding among healthy men. *Br J Nutr* 2008;99:370-78.
- (20) Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1220S-28S.
- (21) Gomez-Gerique JA, Gutierrez-Fuentes JA, Montoya MT, Porres A, Rueda A, Avellaneda A, et al. Lipid profile of the Spanish population: the DRECE (diet and risk of cardiovascular disease in Spain) study. DRECE study group. *Med Clin (Barc)* 1999;113:730-35.
- (22) Escuriol V, Cofán M, Serra M, Bulló M, Basora J, Salas-Salvadó J, et al. Serum sterol responses to increasing plant sterol intake from natural foods in the Mediterranean diet. *Eur J Nutr* 2009;48:373-82.
- (23) Cofán M, Escuriol V, García-Otín AL, Moreno-Iribas C, Larrañaga N, Sánchez MJ, et al. Association of plasma markers of cholesterol homeostasis with metabolic syndrome components. A cross-sectional study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; *In press*. doi:10.1016/j.numecd.2010.01.005.
- (24) Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J, et al. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev* 2006;64:385-402.
- (25) Valsta LM, Lemstrom A, Ovaskainen ML, Lampi AM, Toivo J, Korhonen T, et al. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *Br J Nutr* 2004;92:671-78.
- (26) Normen AL, Brants HA, Voorrips LE, Andersson HA, van den Brandt PA, Goldbohm

RA. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;74:141-48.

(27) Agudo A, Amiano P, Barcos A, Barricarte A, Beguiristain JM, Chirlaque MD, et al. Dietary intake of vegetables and fruits among adults in five regions of Spain. EPIC Group of Spain. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:174–80.

(28) Linseisen J, Bergström E, Gafá L, González CA, Thiébaud A, Trichopoulou A, et al. Consumption of added fats and oils in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) centres across 10 European countries as assessed by 24-hour dietary recalls. *Public Health Nutr* 2002;5:1227–42.

(29) Pelletier X, Belbraouet S, Mirabel D, Mordret F, Perrin JL, Pages X, et al. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann Nutr Metab* 1995;39:291-95.

Table 1. Description of the study population and dietary data by tertiles of total phytosterol intake^a

	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	p value^b
Phytosterols intake (mg/day)	≤ 459	459-512	> 512	
N	28	29	28	
Male/Female	0.75	0.93	0.87	0.917
Age, years	32 [25-46]	41 [21-47]	47 [39-53]	0.048
Body mass index, Kg/m ²	22.9 (2.7)	24.2 (3.3)	24.0 (3.4)	0.244 ^c
Energy, MJ/day	12.68 (3.41)	12.16 (3.10)	13.20 (3.79)	0.521 ^c
Carbohydrates (% of total energy)	39.1 (5.7)	39.4 (5.0)	39.3 (5.8)	0.975 ^c
Total fibre (g/day)	22.4 (6.4)	25.9 (6.0)	31.3 (8.4)	0.000 ^c
Protein (% of total energy)	15.6 (2.4)	14.8 (2.1)	14.7 (2.0)	0.224 ^c
Total fat (% of total energy)	43.2 (5.5)	43.9 (5.2)	44.2 (6.0)	0.791 ^c
SFA (% of total energy)	12.7 (2.0)	12.5 (1.8)	11.5 (1.9)	0.052 ^c
MUFA (% of total energy)	20.1 (3.5)	21.8 (3.8)	21.5 (4.2)	0.230 ^c
PUFA (% of total energy)	5.5 [5.0-6.8]	5.7 [5.3-6.8]	6.7 [5.1-8.4]	0.119
UFA/SFA	2.05 (0.32)	2.25 (0.32)	2.54 (0.43)	0.000 ^c
Cholesterol (mg/day)	546 (89)	513 (99)	482 (103)	0.050 ^c
Total dietary phytosterol intake, (mg/day)	428 [385-446]	489 [479-501]	545 [528-609]	0.000
Stigmastanol, (mg/day)	13 [11-16]	16 [12-18]	16 [14-20]	0.022
Stigmasterol, (mg/day)	28 [23-31]	30 [26-35]	33 [30-39]	0.002
Sitosterol, (mg/day)	256 [229-265]	292 [282-301]	337 [313-375]	0.000
Campesterol, (mg/day)	31 [24-37]	37 [32-42]	43 [35-53]	0.000
Other phytosterols, (mg/day)	94 [84-108]	115 [96-130]	125 [110-136]	0.000
Total phytosterols/Cholesterol	0.8 [0.7-0.9]	0.9 [0.8-1.1]	1.3 [1.0-1.5]	0.000

All data adjusted for total energy intake using the residuals method of Willet.

Abbreviations: SFA = Saturated fatty acids; MUFA = Monounsaturated fatty acids; PUFA = Polyunsaturated fatty acids; UFA = Total unsaturated fatty acids

^a Values expressed as mean (SD) or medians [25th percentile- 75th percentile]

^b p value calculated by Pearson's chi² for categorical variables and Kruskal-Wallis or ^cANOVA for continuous variables

Table 2. Distribution of serum lipid levels by tertiles of total phytosterol intake^a

	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	P value^b
Phytosterols intake (mg/day)	≤ 459	459-512	> 512	
Total Cholesterol	5.89 (5.51-6.27)	5.63 (5.28-5.98)	5.32 (4.93-5.71)	0.054
LDL-Cholesterol	4.10 (3.73-4.48)	3.84 (3.50-4.18)	3.51 (3.13-3.90)	0.042
HDL-Cholesterol	1.35 (1.20-1.51)	1.35 (1.21-1.50)	1.40 (1.24-1.56)	0.706
Triglycerides	0.82 (0.70-0.96)	0.87 (0.75-1.00)	0.85 (0.72-1.00)	0.782

Values are estimated marginal means (95% confidence intervals) expressed as mmol/L

^a Adjusted by age, sex, BMI, UFA/SFA ratio and total energy intake.

^b P value for linear trend was estimated as the significance of the coefficient for tertile numbers (1-3) fitted as a continuous variable in a multivariate linear regression model.

Table 3. Distribution of surrogate markers of cholesterol metabolism by tertiles of total phytosterol intake^a

	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3	P value^b
Phytosterols intake (mg/day)	≤ 459	459-512	> 512	
Surrogate marker of absorption				
Corrected sitosterol-to- cholesterol	6.47 (5.78-7.26)	5.30 (4.74-5.92)	4.98 (4.43-5.60)	0.002
Surrogate marker of synthesis				
Lathosterol-to-cholesterol	106 (92-123)	109 (95-126)	121 (104-140)	0.240

Values are estimated marginal means (95% confidence intervals). Corrected sitosterol-to-cholesterol ratios expressed as $10^3 \times$ mmol of sitosterol/mol of cholesterol and mg of sitosterol intake and lathosterol-to-cholesterol ratios expressed as $10^2 \times$ mmol of lathosterol/mol of cholesterol

^a Adjusted by age, sex and BMI.

^b *p* value for linear trend was estimated as the significance of the coefficient for tertile numbers (1-3) fitted as a continuous variable in a multivariate linear regression model.

