

TESIS DOCTORAL

Efectos de la intervención nutricional con un preparado lácteo enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico y vitaminas sobre marcadores relacionados con el riesgo cardiovascular y con el metabolismo óseo en pacientes dislipémicos

ELENA C. MARTÍN BAUTISTA

Granada, 2006

Efectos de la intervención nutricional con un preparado lácteo enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico y vitaminas sobre marcadores relacionados con el riesgo cardiovascular y con el metabolismo óseo en pacientes dislipémicos.

Memoria que presenta la Licenciada
ELENA C. MARTÍN BAUTISTA
para optar al grado de Doctora en
Farmacia por la Universidad de
Granada.

Los trabajos de investigación que se exponen en esta Memoria Doctoral han sido realizados en el Departamento de Nutrición y Salud de Puleva Biotech S.A., en colaboración con la Universidad de Granada, bajo la dirección de los doctores D. Eduardo López-Huertas León, D. Juristo Fonollá Joya y D. Manuel Muñoz Torres, bajo la tutela de la C.U. Dra. Maria Dolores Suárez, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada.

Dr. Eduardo López-Huertas
León

Dr. Juristo Fonollá
Joya

Dr. Manuel Muñoz
Torres

C.U. Dra. Maria Dolores
Suárez Ortega



Universidad de Granada
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular



Puleva Biotech S.A.
Departamento de Nutrición y Salud

La presente Memoria de Tesis ha sido realizada en las instalaciones de la empresa Puleva Biotech S.A., gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Fundación Universidad-Empresa (2003-2005) de la Universidad de Granada.

A todos los que han creído en mí

Índice y Abreviaturas

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VII
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y SUS FACTORES DE RIESGO	11
3.1.1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	12
3.1.2. RIESGO CARDIOVASCULAR EN ESPAÑA	14
3.2. ATEROSCLEROSIS	16
3.2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS	16
3.2.2. LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS Y ATEROSCLEROSIS	21
3.3. OSTEOPOROSIS	24
3.3.1. DEFINICIÓN Y FACTORES DE RIESGO	24
3.3.2. EPIDEMIOLOGÍA	25
3.3.3. PREVENCIÓN.....	26
3.3.4. FISIOPATOLOGÍA DEL REMODELADO ÓSEO	28
3.3.4.1. Factores sistémicos.....	29
3.3.4.2. Factores locales.....	31
3.3.4.3. Sistema OPG/RANKL	31
3.3.5. MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL REMODELADO ÓSEO	33
3.3.6. OSTEOPOROSIS Y ATEROSCLEROSIS.....	34
3.4. DIETA MEDITERRÁNEA	36
3.4.1. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS	37
3.4.2. RECOMENDACIONES DIETÉTICAS.....	39
3.4.3. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3.....	43
3.4.3.1. Ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y enfermedad cardiovascular ..	49
3.4.3.2. Ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y osteoporosis.....	52
3.4.4. ÁCIDO OLEICO	53
3.4.5. VITAMINAS DEL GRUPO B.....	54
3.4.6. VITAMINA E	57

4. MATERIAL Y MÉTODOS	61
4.1. MATERIAL	63
4.1.1. APARATOS DE USO GENERAL	63
4.1.2. PREPARADOS LÁCTEOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO	65
4.2. MÉTODOS	68
4.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	68
4.2.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO	69
4.2.2.1. Población del estudio	69
4.2.2.2. Muestra	69
4.2.2.3. Criterios de inclusión	69
4.2.2.4. Criterios de exclusión	70
4.2.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	70
4.2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	71
4.2.4.1. Cálculo de ingesta nutricionales.....	71
4.2.4.2. Determinación de ácidos grasos en plasma	71
4.2.4.3. Determinación de folato sérico y folato eritrocitario.....	73
4.2.4.4. Determinación de vitamina B6 en plasma	74
4.2.4.5. Cálculo del índice de masa corporal.....	74
4.2.4.6. Determinación de colesterol total en plasma	74
4.2.4.7. Determinación de triglicéridos en plasma.....	75
4.2.4.8. Determinación del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad en plasma.....	76
4.2.4.9. Cálculo del colesterol de lipoproteínas de baja densidad en plasma.....	76
4.2.4.10. Determinación de malondialdehído en plasma.....	76
4.2.4.11. Determinación de vitamina E en plasma	78
4.2.4.12. Determinación de homocisteína en plasma.....	79
4.2.4.13. Determinación de moléculas de adhesión vascular en plasma	80
4.2.4.14. Determinación de proteína C reactiva en suero.....	81
4.2.4.15. Determinación de glucosa plasmática.....	81
4.2.4.16. Determinación de transaminasas.....	82
4.2.4.17. Determinación de 25-hidroxivitamina-D en suero.....	82
4.2.4.18. Determinación de calcio en suero	83
4.2.4.19. Determinación de la osteoprotegerina en suero	83
4.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	84
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	84

5. RESULTADOS	87
5.1. CAPTACIÓN, SEGUIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO	89
5.2. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL PLASMA	92
5.3. VITAMINAS DEL GRUPO B	97
5.4. ÍNDICE DE MASA CORPORAL.....	99
5.5. COLESTEROL TOTAL, COLESTEROL LDL, COLESTEROL HDL Y TRIGLICÉRIDOS EN PLASMA	99
5.6. PARÁMETROS DE OXIDACIÓN PLASMÁTICA	105
5.7. HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA	106
5.8. MARCADORES DE INFLAMACIÓN.....	107
5.9. ÍNDICE DE MASA CORPORAL.....	108
5.10. TRANSAMINASAS.....	108
5.11. CALCIO Y 25-HIDROXIVITAMINA D.....	110
5.12. MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA.....	112
6. DISCUSIÓN	117
7. CONCLUSIONES	141
8. BIBLIOGRAFIA	145
<i>CURRICULUM VITAE</i>	191

ABREVIATURAS

5-MTHF	5-metiltetrahidrofolato
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido graso
AGMI	Ácido graso monoinsaturado
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
AGPI-CL	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga
AGS	Ácido graso saturado
ALA	Ácido α -linolénico
Apo	Apolipoproteína
CL	Cadena larga
C-HDL	Colesterol HDL
C-LDL	Colesterol LDL
CML	Células de músculo liso
CPE	Centro periférico de especialidades
CT	Colesterol total
Cys	Cisteína
DMO	Densitometría ósea
DHA	Ácido docosahexaenóico
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
EPA	Ácido eicosapentaenóico
et al.	<i>et alter</i> (y otros)
GH	Hormona del crecimiento
GGT	Gamma-glutamyltransferasa
GOT	Gamma-oxalacetatotransferasa

GPT	Gamma-piruvatotransferasa
Hyc	Homocisteína
HDL	Lipoproteínas de densidad alta
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-coenzimaA
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INF- γ	Interferón gamma
LA	Ácido linoléico
LDL	Lipoproteínas de densidad baja
LDLmo	LDL modificada
LDLox	LDL oxidada
LT	Leucotrieno
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos
MDA	Malondialdehído
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear kappa-beta
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerina
PC	Prostaciclina
PCR	Proteína C Reactiva
PG	Prostaglandinas
P/V	Relación peso/volumen
PTH	Parathormona
QM	Quilomicrón
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa beta
RANKL	Ligando del receptor de factor nuclear kappa beta

RL	Radicales libres
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SAM	S-adenosilmetionina
sVCAM-1	Moléculas de adhesión vascular soluble
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicéridos
tHcy	Homocisteína total
THF	Tetrahidrofolato
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TX	Tromboxano
V/V	Relación volumen / volumen
VCAM	Moléculas de adhesión vascular
VIP	Péptido vasoactivo intestinal
VLDL	Lipoproteínas de densidad muy baja
vs.	<i>Versus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> = Organización Mundial de la Salud (OMS)

1

Justificación

La enfermedad cardiovascular (ECV) representa la primera causa de mortalidad en los países desarrollados. En España, la prevalencia de la hipercolesterolemia es bastante alta. Un 18% (18,6% en varones y 17,6% en mujeres) de la población española de 35 a 64 años presenta una colesterolemia mayor o igual a 250 mg/dL y un 57,8% (56,7% en varones y el 58,6% en mujeres) posee valores de colesterol mayores a 200 mg/dL (*Banegas et al., 1993*). Sin embargo, la mayoría de las personas desconocen este hecho e, incluso, la mayoría de los que tienen alto riesgo cardiovascular no reciben tratamiento ni consejo dietético alguno. Además de la hipercolesterolemia, existen otros factores de riesgo asociados a las ECVs como son la hipertrigliceridemia, la hipertensión, la homocisteína sérica elevada, el tabaquismo, la inactividad física, la obesidad y la diabetes (*Lusis, 2000*). La dieta juega un papel fundamental en la modulación de estos factores y está demostrado que los países de dieta mediterránea presentan una menor morbilidad y mortalidad por ECV (*Kok y Kromhout, 2004*). El efecto de esta dieta a nivel cardiovascular está relacionado con una reducida ingesta de grasas saturadas en pos de un mayor consumo de pescado (rico en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 o AGPIs) y de aceite de oliva (rico en antioxidantes y ácidos grasos monoinsaturados o AGMIs), así como un aumento de la ingesta de frutas y verduras (ricas en antioxidantes y vitaminas). Las autoridades sanitarias y sociedades científicas recomiendan el consumo de pescado o grasas de pescado para reducir el riesgo de ECV (*WHO, 2003*). La dieta española ha experimentado en los últimos años una serie de cambios, quizás asociados al desarrollo económico, que hacen que tienda a separarse en algunos aspectos del patrón dietético mediterráneo recomendable, evolucionando hacia un modelo anglosajón. Así, encuestas nutricionales recientes han puesto de manifiesto como, actualmente, en la dieta española se lleva a cabo una ingesta excesiva de grasas saturadas (procedentes principalmente de la carne y los derivados lácteos) y una ingesta deficiente de hidratos de carbono (*Aranceta et al, 2001*). Debido a la escasa accesibilidad a alimentos ricos en AGPIs de cadena larga

(AGPIs-CL) omega-3 (ácido eicosapentenoico ó EPA y ácido docosahexenoico ó DHA), cuya ingesta se lleva a cabo fundamentalmente a partir de pescado graso, se deben considerar vías alternativas para que el consumo de este tipo de ácidos grasos (AGs) sea accesible a toda la población y una de estas vías puede ser su ingesta en una matriz láctea junto a vitaminas y ácido oleico, también importantes en una dieta saludable. Como consecuencia de todo ello, las autoridades sanitarias y sociedades nutricionales trabajan activamente en la búsqueda de estrategias eficaces que permitan controlar y reducir los factores de riesgo y disminuir el impacto de la ECV en la salud de la población y el enorme gasto sanitario que ocasiona (*Villar et al., 2003*).

Del mismo modo, los factores nutricionales juegan un importante papel en la adquisición y mantenimiento de la masa ósea. Una baja ingesta de calcio, vitamina D y ácidos grasos incrementa el riesgo de enfermedades óseas como la osteoporosis, que produce al año en torno a 1´66 millones de fracturas de cadera y cuya incidencia puede cuadruplicarse antes del año 2050. Los trabajos realizados respecto a la relación entre los AGPIs-CL omega-3 y la osteoporosis indican que una mayor ingesta de EPA y DHA en detrimento de AGPIs omega-6 (ácido linoléico) tiene efectos beneficiosos sobre el hueso (*Schlemmer et al., 1999*) y que la reducción en ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos puede ser beneficiosa en pacientes con osteoporosis; sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha son escasos.

La presente Memoria Doctoral pretende mostrar las ventajas que la recuperación y/o incremento en la ingesta de diversos nutrientes administrados en un alimento funcional tiene sobre la prevención del riesgo cardiovascular y sobre el metabolismo óseo. Al mismo tiempo, evalúa el uso de la alimentación funcional (Puleva Omega 3[®], producto lácteo enriquecido en AGPIs-CL omega-3, ácido oleico, vitaminas B₆, D, E y ácido fólico), como una herramienta sencilla en la obtención de un patrón dietético saludable dentro del programa de alimentación y hábitos de vida que acompaña a las estrategias de prevención en pacientes con alteraciones en el metabolismo lipídico y/o óseo.

2

Objetivos

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la influencia que el consumo continuado de cantidades dietéticas de una mezcla de los nutrientes AGPIs-CL omega-3, ácido oleico y vitaminas B₆, D, E y ácido fólico, administrados de una manera conjunta en una matriz láctea, ejerce sobre marcadores de riesgo cardiovascular y del metabolismo óseo en una población con alteraciones lipídicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estudiar el efecto del consumo del producto en el perfil nutricional y marcadores de riesgo cardiovascular de los sujetos del estudio durante los 6 meses que dura la intervención.
2. Evaluar el efecto del consumo continuado de la mezcla de los nutrientes administrados en una matriz láctea sobre marcadores relacionados con el metabolismo óseo, así como sus posibles mecanismos de actuación.
3. Evaluar el posible papel del consumo de estos nutrientes como estrategia nutricional en la prevención de la dislipemia y en la pérdida de masa ósea.

3

Introducción

3.1. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y SUS FACTORES DE RIESGO

La ECV constituye la primera causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados siendo la responsable de 16,7 millones de defunciones al año en todo el mundo (*WHO, 2004*). En España, la ECV también es la primera causa de mortalidad ocasionando el 36% de todas las defunciones. Entre las diferentes ECVs destacan la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular que, en conjunto, constituyen algo más del 60% de la mortalidad cardiovascular total. Además, las ECVs ocasionan 5 millones de estancias hospitalarias al año en España lo que supone un elevado impacto sanitario y social y un grave problema de salud pública (*Villar et al., 2003*). ECVs tales como la angina de pecho, el infarto de miocardio y la enfermedad vascular periférica tienen su origen en la aterosclerosis. La aterosclerosis es una enfermedad progresiva que se caracteriza por la presencia de placas fibroadiposas que comienzan a desarrollarse en la íntima arterial (placas de ateromas), especialmente en aorta, arterias coronarias y arterias cerebrales, que pueden llegar a ocupar la luz arterial comprometiendo así la funcionalidad circulatoria. El estrechamiento de la luz del vaso (estenosis) dificulta la llegada de sangre a los tejidos irrigados (isquemia) disminuyendo el aporte de oxígeno. En las lesiones avanzadas se puede producir trombosis, lo que con frecuencia provoca la oclusión del vaso, cesando la irrigación al tejido que se necrosa (infarto). Las placas de ateroma pueden producir también un debilitamiento progresivo de la pared arterial, que puede dilatarse (aneurisma) hasta romperse y producir una hemorragia (*Millán et al., 2000*) (figura 3.1.1.)

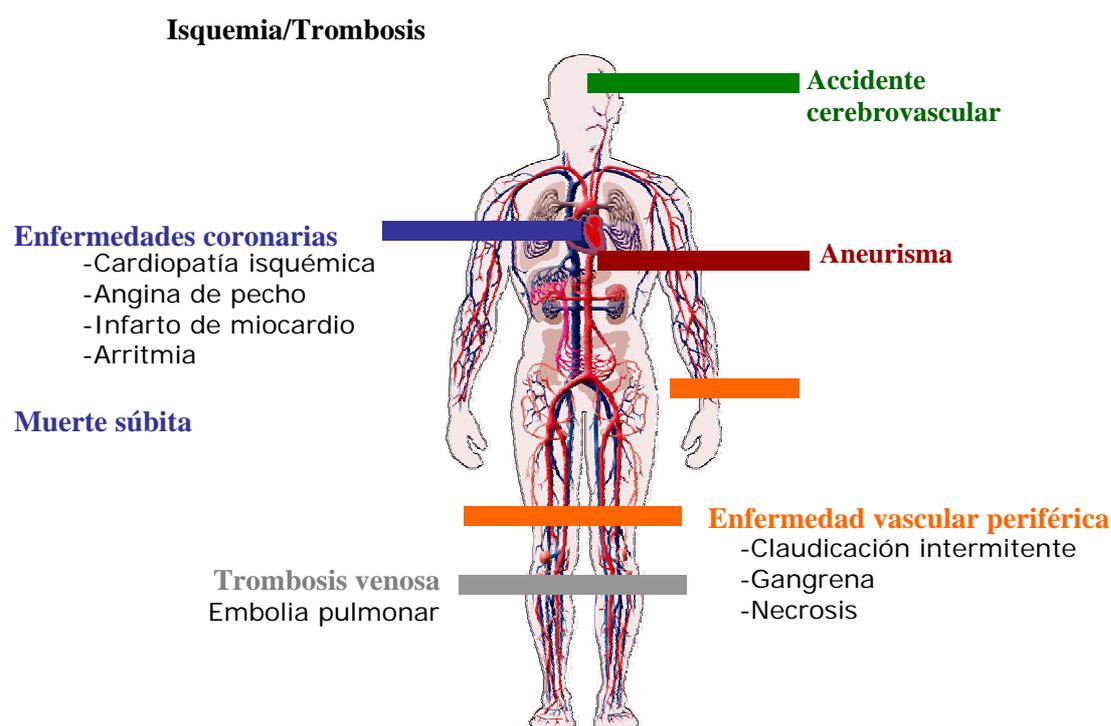


Figura 3.1.1. Manifestaciones clínicas de la enfermedad cardiovascular (Drouet, 2002).

3.1.1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial y compleja a la que se han asociado multitud de factores de riesgo. Los estudios epidemiológicos de los últimos 50 años, que comenzaron con el estudio de "Framingham" (Dawber y Kannel, 1966) identificaron a la hipercolesterolemia, la hipertensión, la hiperglucemia y el tabaquismo como los factores de riesgo "mayores" o "causales" de las ECVs. Otros trabajos de investigación posteriores han dado a conocer nuevos factores de riesgo como la hipertrigliceridemia, la hiperhomocisteinemia y la concentración elevada en sangre de ciertos factores de coagulación y de lipoproteína(a). Aunque la mayoría de estos factores presentan una asociación con el proceso aterosclerótico, el mecanismo por el cual conducen al desarrollo de la enfermedad aterosclerótica no está claramente establecido por lo que se conocen como factores de riesgo "condicionales".

Otros factores como la obesidad, el sedentarismo, el sexo masculino, los antecedentes familiares de ECV y los factores psicosociales se consideran “factores predisponentes” ya que pueden empeorar o agravar las consecuencias de los factores de riesgo mayores (Grundy *et al.*, 1999). El avance en el conocimiento acerca de nuestra predisposición genética ha permitido una clasificación más completa de los factores de riesgo de las ECV en dos categorías: factores con componente genético y factores ambientales (tabla 3.1.1. y tabla 3.1.2.).

Tabla 3.1.1. Factores de riesgo con componente genético asociados a la aterosclerosis y a las enfermedades cardiovasculares (Lusis, 2000).

- Concentraciones elevadas de proteínas de baja densidad-LDL /proteínas de muy baja densidad-VLDL (Assmann *et al.*, 1999).
- Baja concentración de proteínas de alta densidad-HDL (Gordon y Rifkind, 1989).
- Concentraciones elevadas de lipoproteína(a) (Kronenber *et al.*, 1999).
- Presión arterial elevada (Assmann *et al.*, 1999) (Luft, 1998).
- Concentraciones elevadas de homocisteína (Gerhard y Duell, 1999).
- Antecedentes familiares (Goldbourt y Neufeld, 1988).
- Diabetes y obesidad (Assmann *et al.*, 1999).
- Factores hemostáticos (Assmann *et al.*, 1999).
- Depresión y otros trastornos del comportamiento (Glassman y Shapiro, 1998).
- Sexo masculino (Nathan y Chaudiri, 1997).
- Inflamación (Kugiyama *et al.*, 1999).
- Síndrome metabólico (Lusis *et al.*, 1998).

Tabla 3.1.2. Factores de riesgo ambientales asociados a la aterosclerosis y a las enfermedades cardiovasculares (*Lusis, 2000*).

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- Dieta rica en grasa saturada y colesterol (<i>Assmann et al., 1999</i>).- Tabaquismo (<i>Assmann et al., 1999</i>).- Concentraciones bajas de antioxidantes (<i>Steinberg y Witzmun, 1999</i>).- Sedentarismo (<i>Assmann et al., 1999</i>).- Agentes infecciosos (<i>Hu et al., 1999</i>). |
|---|

3.1.2. RIESGO CARDIOVASCULAR EN ESPAÑA

El último informe de la Sociedad Española de Aterosclerosis (*Villar et al., 2003*) alerta del impacto que las ECVs están teniendo en la salud y en la economía de la población española, no sólo por sus elevadas tasas de mortalidad y morbilidad, sino también por la alta prevalencia de los factores de riesgo asociados a las ECVs entre la población española:

- La prevalencia de **hipercolesterolemia** en la población española es elevada: el 18% de individuos entre 35-56 años posee valores de colesterol total (CT) elevados, superiores a 250 mg/dL y el 57,8% tiene concentraciones mayores a 200 mg/dL. Sin embargo, la mayoría de las personas con hipercolesterolemia desconocen padecerla y la mayoría no reciben tratamiento dietético ni hipolipemiente (*Banegas et al., 1993; Alvarez-Sala et al., 2005*).
- El 40 % de la población española padece **hipertensión arterial**. Este porcentaje aumenta con la edad y alcanza el 68% entre las personas mayores de 60 años. Además, sólo el 16% de la población hipertensa tiene controlada regularmente su presión arterial de forma óptima (*Banegas et al., 1998; Banegas y Rodríguez Artalejo, 2002*).

- En España el porcentaje de **población diabética** entre los 30-65 años se estima en un 6% y en un 10% si se aumenta la edad límite hasta los 89 años. Además la frecuencia de diabetes está aumentando en los últimos años y una parte muy importante de las personas con trastornos del metabolismo glucídico desconoce padecerla (*Goday, 2002*).
- El 36% de los españoles son **fumadores habituales** y existe una de las prevalencias de tabaquismo más altas de Europa entre los jóvenes españoles. El tabaco produce aproximadamente 52.000 muertes al año en España (16% de todas las defunciones) siendo la primera causa de enfermedad, discapacidad y muerte prematuras evitables dentro de la población española (*Villar et al., 2003*).
- Según las encuestas realizadas por el Ministerio de Sanidad y Consumo en el año 2001, el 46.6% de la población mayor de 16 años declara **no realizar actividad física** durante su tiempo libre, el 38.3% manifiesta realizar actividad física de forma ocasional y solo el 8.5% declara ser lo suficientemente activo como para obtener un beneficio para su salud (*MSC, 2001*).
- Los últimos datos de prevalencia de **obesidad** indican también una tendencia al aumento de la misma tanto en población adulta como infantil: el 14.5% de los ciudadanos españoles entre 25 y 60 años son obesos (índice de masa corporal mayor de 30), mientras que el sobrepeso (índice de masa corporal mayor de 25) asciende al 38.5% (*Aranceta et al., 2003*). Más preocupante es el fenómeno de obesidad en la población infantil y juvenil (de 2 a 24 años), situada ya en el 13,9%, y la de sobrepeso, que está en el 26,3% (*Serra et al., 2003*).

3.2. ATEROSCLEROSIS

3.2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una lesión arterial caracterizada por un engrosamiento de la íntima a causa de una compleja interacción entre la pared vascular y los componentes de la sangre donde pueden intervenir procesos inflamatorios, de crecimiento, de proliferación y migración de células de músculo liso (CML) y de síntesis de matriz extracelular, además de procesos degenerativos, de necrosis y trombóticos, dando lugar a las placas de ateroma (Ross y Fuster, 1996). Numerosos autores han sugerido que el proceso de aterosclerosis ocurre principalmente en tres etapas: iniciación de la lesión o formación de la estría grasa, formación de la placa fibrosa, lesiones avanzadas y trombosis (Lusis, 2000; Glass, 2001; Berliner, 2002; Hansson, 2005). Los principales acontecimientos que tienen lugar en cada una de estas etapas se detallan en la tabla 3.2.1. y tabla 3.2.2.:

Tabla 3.2.1. Etapas de inicio y formación de la placa fibrosa de la aterosclerosis (Berliner, 2002).

<u>INICIO DE LA LESIÓN. FORMACIÓN DE LA ESTRÍA GRASA</u>
<p>A. Aumento de la permeabilidad de la membrana: entrada de monocitos en la pared arterial, aumento de moléculas de adhesión (VCAM, P-selectina), producción de factores quimiotácticos y de diferenciación de monocitos y linfocitos.</p> <p>B. Formación de células espumosas: alteración de lipoproteínas, captación de lipoproteínas modificadas por receptores basureros ó "scavenger" de macrófagos y acumulación de colesterol en los macrófagos.</p>
<u>FORMACIÓN DE LA PLACA FIBROSA</u>
<p>A. Aumento de la proliferación y quimiotaxis de células de músculo liso.</p> <p>B. Rotura de la membrana basal por metaloproteinasas.</p> <p>C. Aumento de la síntesis de proteínas de la matriz por células de músculo liso.</p> <p>D. Muerte de las células espumosas (<i>foam cells</i>) por apoptosis y formación del núcleo necrótico.</p>

Tabla 3.2.2. Etapas avanzadas de la aterosclerosis (Berliner, 2002).

<u>LESIONES AVANZADAS Y TROMBOSIS</u>
A. Aumento de las señales protrombóticas de las células endoteliales.
B. Aumento de la expresión de moléculas protrombóticas por parte de macrófagos y células de músculo liso.
C. Reducción de la luz arterial y placa inestable.
D. Desprendimiento del trombo e isquemia.
E. Ruptura del vaso sanguíneo.

El primer acontecimiento que tiene lugar en la aterosclerosis es la acumulación del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) en la matriz subendotelial. Cuando existe un exceso de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulante, aumenta el transporte y la retención de las mismas en los lugares dónde la permeabilidad es mayor. Las LDL difunden a través del endotelio y quedan retenidas debido a la interacción entre la molécula de la apolipoproteína (Apo) B de las LDL y los proteoglicanos de la matriz subendotelial (Boren *et al.*, 1998). La acumulación de partículas de LDL estimula en el endotelio la producción de moléculas proinflamatorias, incluyendo moléculas de adhesión celular (VCAM-1, PCAM-1, ICAM-1, P-selectina, E-selectina), proteínas quimiotácticas (MCP-1) y factores de crecimiento (M-CSF). Todo ello ocasiona la llegada de monocitos y linfocitos a la pared arterial. Estos macrófagos presentan en su superficie unos receptores llamados basureros ó “scavenger” que reconocen y captan las lipoproteínas modificadas y otras partículas. La captación indiscriminada de lípidos por parte de los macrófagos produce su acumulación en el interior de la célula transformándose en lo que se conoce como células espumosas o “foam cells” (figura 3.2.1.). Las lipoproteínas de alta densidad ó HDLs tienen un importante papel protector en la aterosclerosis por un doble mecanismo (Gordon y Rifkind, 1989), por una parte son capaces de retirar el exceso de colesterol acumulado en la matriz subendotelial y en el interior de las células espumosas (Tall *et al.*, 2000) y, por la otra, protege de la oxidación lipídica debido en parte a la presencia en esta

lipoproteína de una enzima, la paraxonasa sérica, que degrada ciertos fosfolípidos biológicamente activos (Barter, 2004).

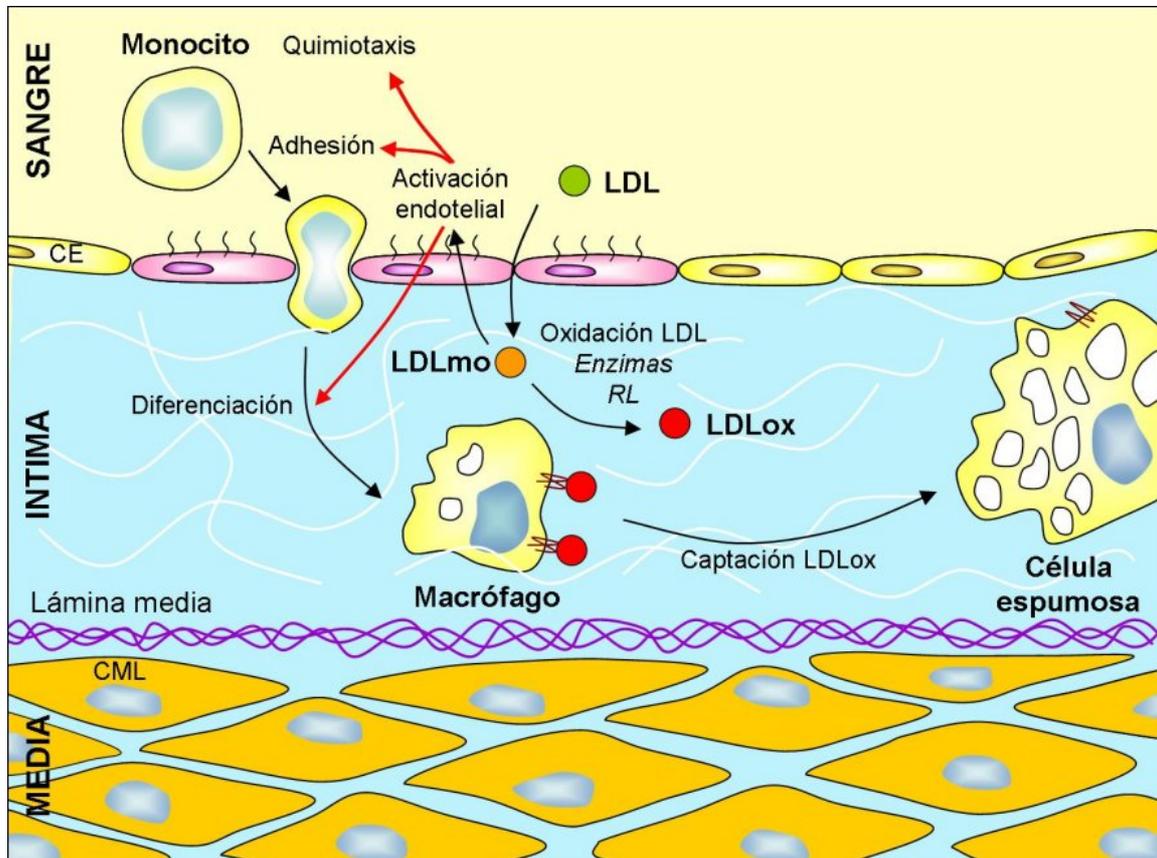


Figura 3.2.1. Acontecimientos iniciales en el desarrollo de la estría grasa. Adaptado de Glass y Witztum, 2001. CE, células endoteliales; CML, células de músculo liso; RL, radicales libres; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLmo, LDL modificadas; LDLox, LDL oxidadas.

Además, el efecto conjunto provoca la estimulación de la respuesta inmune local y la manifestación de efectos a distancia, como la producción de la proteína C reactiva (PCR) en el hígado.

El siguiente paso en el desarrollo de la aterosclerosis es la formación de la placa fibrosa que se caracteriza por un crecimiento de una masa lipídica extracelular, principalmente colesterol y ésteres de colesterol, la acumulación de CMLs y la formación de una red proteica de matriz extracelular producida por las CMLs (Lusis, 2000). La placa fibrosa se inicia con la migración de las CMLs desde la capa media hacia la matriz subendotelial. Allí las células proliferan y captan las

lipoproteínas modificadas contribuyendo así, junto con las células espumosas, al engrosamiento del núcleo lipídico (figura 3.2.2.). Además estas células secretan proteínas de la matriz extracelular, como colágeno y proteoglicanos, conduciendo al desarrollo de la placa fibrosa (Glass y Witztum, 2001).

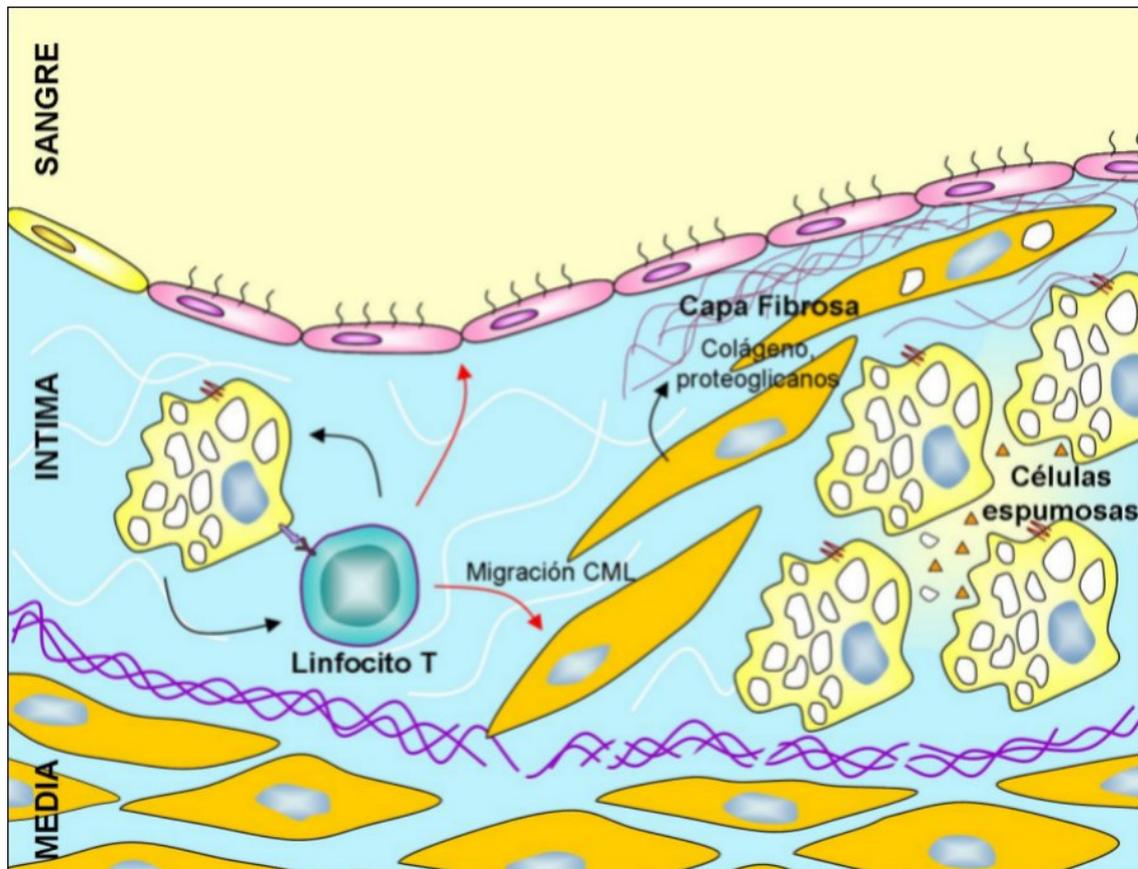


Figura 3.2.2. Progresión de lesión aterosclerótica: formación de la placa fibrosa. Adaptado de Glass y Witztum, 2001. CML, células de músculo liso.

La respuesta proliferativa de las CMLs y de las células inflamatorias hace que la estria grasa evolucione a una placa aterosclerótica más compleja llevando la lesión a estadios más avanzados que implican muerte celular, rotura de las placas, calcificación y procesos trombóticos. Las placas ateromatosas más avanzadas presentan un núcleo necrótico que consiste en un gran núcleo lipídico rodeado por una delgada cubierta fibrosa. Las células espumosas pueden morir liberando una gran cantidad de lípidos a la matriz extracelular,

formándose así el núcleo necrótico al que contribuyen además los lípidos intracelulares, las CMLs que también han captado LDL modificadas y el resto del material lipídico extracelular (Benett, 1999) (figura 3.2.3.).

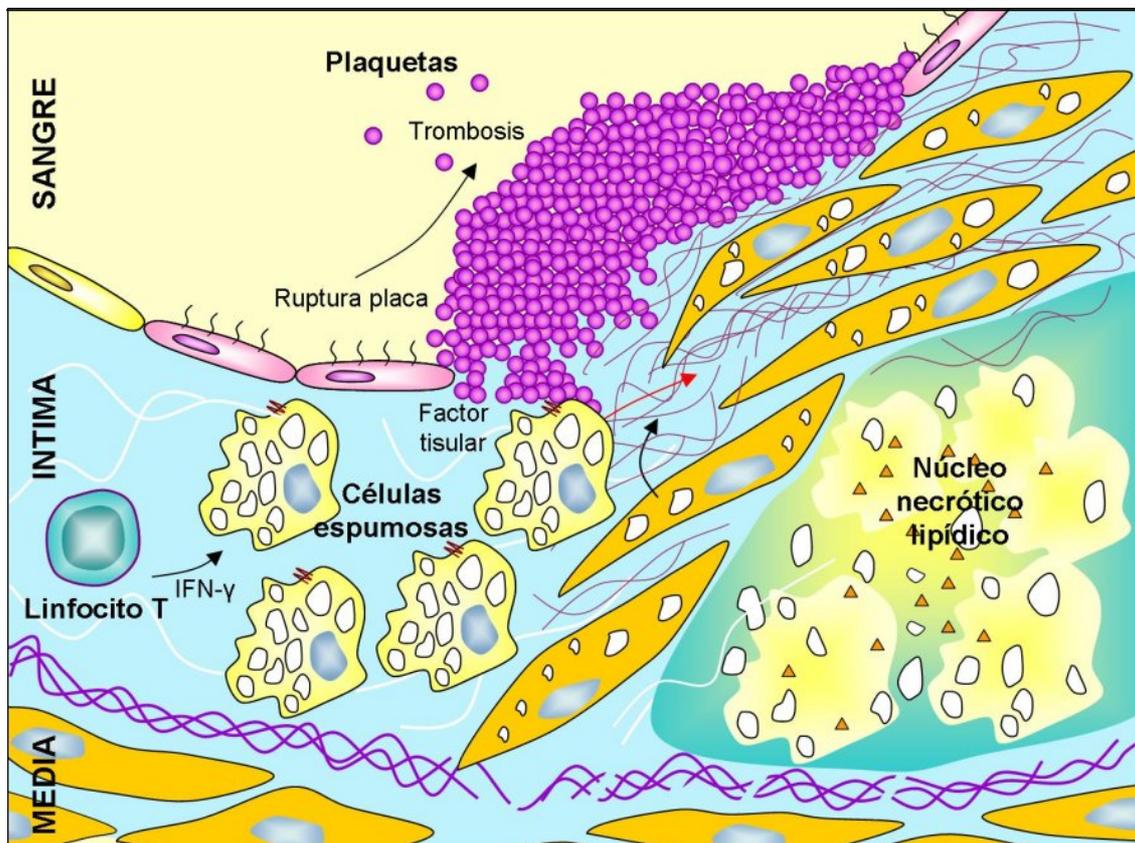


Figura 3.2.3. Lesiones avanzadas: ruptura de la placa fibrosa y trombosis. Adaptado de Glass y Witztum, 2001. IFN- γ , Interferón gamma.

No se conoce muy bien los mecanismos que inducen a la apoptosis de los macrófagos y de las CMLs aunque se ha sugerido que las partículas de LDL oxidadas podrían participar en este proceso ya que son capaces de inducir la muerte de muchos tipos de células (Berliner y Heinecke, 1996). Las placas más vulnerables a la rotura generalmente son delgadas y contienen un elevado número de células inflamatorias. La estabilidad de las placas depende del mantenimiento de la placa fibrosa que, a su vez, depende del equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz. Las CMLs sintetizan las fibras de colágeno y los proteoglicanos de la matriz extracelular, mientras que

los macrófagos secretan varias proteinasas como colagenasas, gelatinasas y catepsinas que la degradan.

Las placas más complejas también pueden presentar depósitos de calcio lo que ocasiona un cambio en las características mecánicas del tejido arterial, contribuyendo a la inestabilidad de la placa y limitando la flexibilidad de los vasos sanguíneos. Los componentes internos de la placa y el factor tisular inician la cascada de la coagulación que provoca la adhesión de las plaquetas circulantes y que, a su vez, pueden producir trombosis por oclusión de la luz vascular (*Glass y Witztum, 2001*). De esta forma, las lesiones ateroscleróticas avanzadas pueden acarrear síntomas isquémicos como resultado de un estrechamiento progresivo de la luz arterial. Las consecuencias agudas de las ECVs, tales como el infarto de miocardio o la enfermedad cerebrovascular, son el resultado generalmente de la ruptura de la placa y la trombosis (*Lee y Libby, 1997*).

3.2.2. LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS Y ATEROSCLEROSIS

Las alteraciones de las lipoproteínas plasmáticas y los trastornos del metabolismo de los lípidos se encuentran entre los factores de riesgo de aterosclerosis más firmemente establecidos y mejor conocidos (*Henry et al., 2001*). La relación existente entre la hipercolesterolemia y el riesgo de ECV ha sido descrita extensamente en la literatura científica (*Steinberg, 2002; Nabel, 2003; Salam, 2004*).

Sin embargo, el colesterol es un componente esencial de todos los tejidos ya que forma parte de las estructuras de las membranas y es precursor de una serie de moléculas como vitaminas, hormonas y sales biliares. El colesterol es transportado en la sangre por las lipoproteínas entre las que se encuentran los quilomicrones (QMs), las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs), las LDLs y las HDLs.

En la figura 3.2.4. se muestra los porcentajes de cada uno de los componentes de las diferentes lipoproteínas.

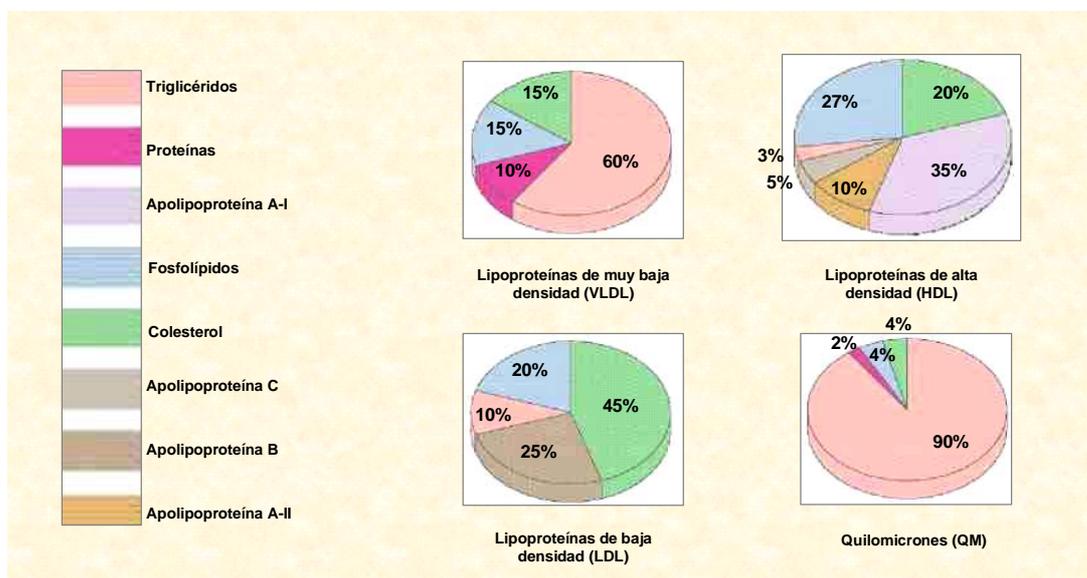


Figura 3.2.4. Conformación de una lipoproteína. Adaptado de (Lobby, 2001).

Los **QMs** son las lipoproteínas del plasma de mayor tamaño y su función es transportar los triglicéridos (TG), el colesterol y otros componentes liposolubles de la dieta desde el intestino hasta la sangre. Las **VLDLs** son lipoproteínas secretadas a nivel hepático y en menor cantidad a nivel intestinal que contienen colesterol, fosfolípidos, TG, Apo B100 y pequeñas cantidades de Apo E y Apo C. Presentan cierta similitud con los QMs, aunque son menos voluminosas. Los remanentes de VLDL, ricos en ésteres de colesterol se conocen como lipoproteínas de densidad intermedia (**IDL**). Las **LDLs** se generan en el plasma, procedentes de las IDL y contienen sólo una molécula de Apo B100. El papel de las LDLs es transportar el colesterol a los tejidos periféricos y regular la síntesis *de novo* del colesterol en estos lugares. Está ampliamente descrito que concentraciones elevadas de LDL en plasma constituyen un factor de riesgo independiente de ECV (Olson, 1998). Sin embargo, los estudios *in vitro* han demostrado que las LDL nativas están desprovistas de actividad aterogénica y sólo después de su modificación pueden dar lugar a la formación de células

espumosas (*Heinecke et al., 1984*). Debido a su característica de depositarse en las paredes de los vasos sanguíneos que presentan lesiones endoteliales se las considera un factor potencial de aterogénesis. Otras lipoproteínas como la **lipoproteína (a)** también se consideran aterogénicas. Se trata una lipoproteína esférica, rica en ésteres de colesterol y fosfolípidos, que se asemeja en su composición a la LDL. Esta lipoproteína puede quedar retenida en la subíntima arterial y contribuye a la formación de las células espumosas. Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que las concentraciones elevadas de lipoproteína(a) constituyen un factor de riesgo de ECV (*Genest et al., 1991; Schaefer et al., 1994; Boston et al., 1996; Seman et al., 1999*). Por último, las **HDLs** pueden ser producidas por el hígado o generadas en el plasma como consecuencia de interacciones entre las distintas lipoproteínas plasmáticas y los tejidos. El papel de las HDLs es el transporte inverso de colesterol desde los tejidos extrahepáticos hacia el hígado (*Olson, 1998*). Son consideradas como un factor de protección contra la aterogénesis ya que extraen el colesterol plasmático excedente. De esta forma, niveles elevados de HDL son beneficiosos para el organismo y se correlacionan inversamente con el riesgo de sufrir enfermedad vascular coronaria relacionada a procesos ateroscleróticos. Por todo ello, hoy en día se tienden más a considerar los valores de C-LDL como factor de riesgo cardiovascular en vez de la concentración total de colesterol.

3.3. OSTEOPOROSIS

3.3.1. DEFINICIÓN Y FACTORES DE RIESGO

La osteoporosis es una enfermedad metabólica ósea crónica y progresiva caracterizada por una resistencia disminuida de los huesos que predispone a una persona a sufrir una fractura (NIH, 2001). La resistencia ósea refleja la integración de la densidad ósea (determinada por el pico de masa ósea y por la cantidad de pérdida ósea expresada como gramos de mineral por área o volumen) y la calidad ósea (caracterizada por la arquitectura, recambio, acúmulo de lesiones y mineralización). En la figura 3.3.1. se observa la imagen de la arquitectura ósea de un hueso sano joven al lado de la imagen de un hueso osteoporótico, caracterizado por la pérdida de masa ósea.

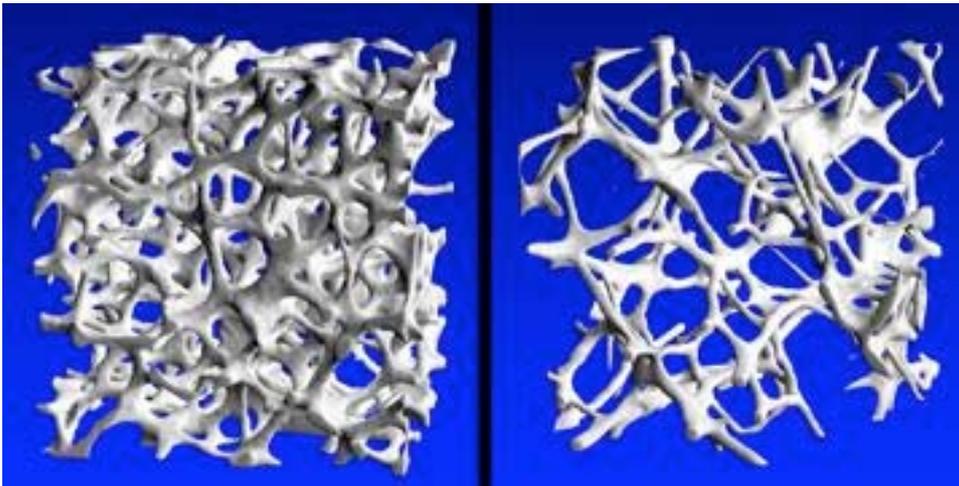


Figura 3.3.1. Hueso sano (izquierda) y hueso osteoporótico (derecha).

La Organización Mundial de la Salud ha establecido unas definiciones basadas en mediciones de masa ósea mediante densitometría ósea (DMO) para mujeres de raza blanca (WHO, 1994). Así, se establece como valores normales de DMO superiores a -1 , osteopenia valores de DMO entre -1 y $-2,5$, osteoporosis con valores de DMO inferiores a $-2,5$ y osteoporosis establecida cuando junto con las condiciones previas se asocia una ó más fracturas osteoporóticas.

En la osteoporosis, la actividad osteoclástica (destrucción de hueso producido por los osteoclastos) aumenta, ó bien disminuye la actividad osteoblástica (formación de hueso llevado a cabo por los osteoblastos). No solo pueden sufrir osteoporosis las mujeres menopaúsicas, sino también los hombres y mujeres adultas en general, ancianos, embarazadas, diabéticos y enfermos de cáncer. Estudios epidemiológicos han identificado un conjunto de factores de riesgo para la osteoporosis (NOF, 1998) que se pueden clasificar en:

- a) Factores de riesgo genéticos: raza caucásica, historia familiar, constitución pequeña, longitud del eje del fémur, menopausia prematura (antes de los 45 años) y menarquía tardía.
- b) Factores de riesgo relacionados con la nutrición y con el estilo de vida: nuliparidad, inactividad, amenorrea secundaria prolongada, tabaquismo, ingesta excesiva de alcohol, inmovilización prolongada, nutrición parenteral prolongada y bajo peso corporal.
- c) Factores de riesgo relacionados con trastornos médicos: anorexia nerviosa, hipogonadismo, hipertiroidismo, síndromes de malaabsorción, hiperparatiroidismo primario, hipercortisolismo, insuficiencia renal crónica, artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria y osteogénesis imperfecta.
- d) Fármacos: corticoterapia crónica, citostáticos, tratamiento excesivo con hormona tiroidea, anticonvulsivantes y anticoagulantes.

3.3.2. EPIDEMIOLOGÍA

La osteoporosis es una enfermedad con una prevalencia elevada ya que afecta al 12% de los hombres españoles en edad avanzada y al 35% de las mujeres españolas mayores de 50 años, porcentaje que se eleva a un 52% tras los 70 (SEIOMM, 2002). Esta patología es preocupante por su elevada incidencia, por las complicaciones derivadas de ella (fracturas y aumento de mortalidad) y por

su elevado coste social y económico. El riesgo en vida de sufrir una fractura osteoporótica para una mujer de 50 años se encuentra entre el 30 % y el 40 %, siendo superior al riesgo de padecer cáncer de mama (del 9% al 12%) y similar al riesgo de padecer una ECV. Una de cada 5 mujeres de más de 50 años tiene al menos una fractura vertebral debido a la osteoporosis, que se asocia al deterioro de la calidad de vida y al aumento de riesgo de padecer otras fracturas. Este importante problema de salud pública empeorará en el futuro con el envejecimiento progresivo de la población que caracteriza a nuestra sociedad.

3.3.3. PREVENCIÓN

La prevención constituye la única orientación efectiva para el control de la osteoporosis (*Karlsson et al., 2005*) ya que, el tratamiento farmacológico (terapia hormonal sustitutiva, calcitonina, bifosfonatos) aún no es capaz de restaurar hueso de buena calidad en el esqueleto con osteoporosis, aunque sí provoca que la pérdida ósea se retrase lo más posible. La prevención primaria tiene como objetivo conseguir un buen pico de masa ósea e intentar reducir la pérdida de la misma y se basa en medidas no farmacológicas:

- a) Aumento de la ingesta de calcio: el calcio presente en la dieta parece de extraordinaria importancia en cuanto a los niveles de masa ósea desarrollada, desde el período del crecimiento hasta la tercera década de la vida (*Goulding et al., 2005*). Se recomienda una ingesta diaria de 800 mg de calcio durante la edad de 1 a 10 años, 1200 mg desde los 11 a los 18 años, y de 800 a 1000 mg en la edad adulta. Durante el embarazo, la lactancia y la posmenopausia debería incrementarse a 1200-1500 mg/día (*Hodgson et al., 2003*). La importancia del consumo de leche como fuente de calcio se ha comprobado en diversos estudios (*Teegarden et al., 1999; Weley, 2005*).

- b) Aumento de la ingesta de vitamina D y exposición solar: la vitamina D en forma de colecalciferol se puede encontrar en algunos alimentos, como los cereales, lácteos, huevos y pescado; y también puede ser sintetizada en la piel a través de la activación por la luz ultravioleta. Posteriormente es hidroxilada a 25-hidroxivitamina D en el hígado, y finalmente, se transforma en 1,25-dihidrocolecalciferol ó hormona D₃ tras una segunda hidroxilación en el riñón (figura 3.3.2.).

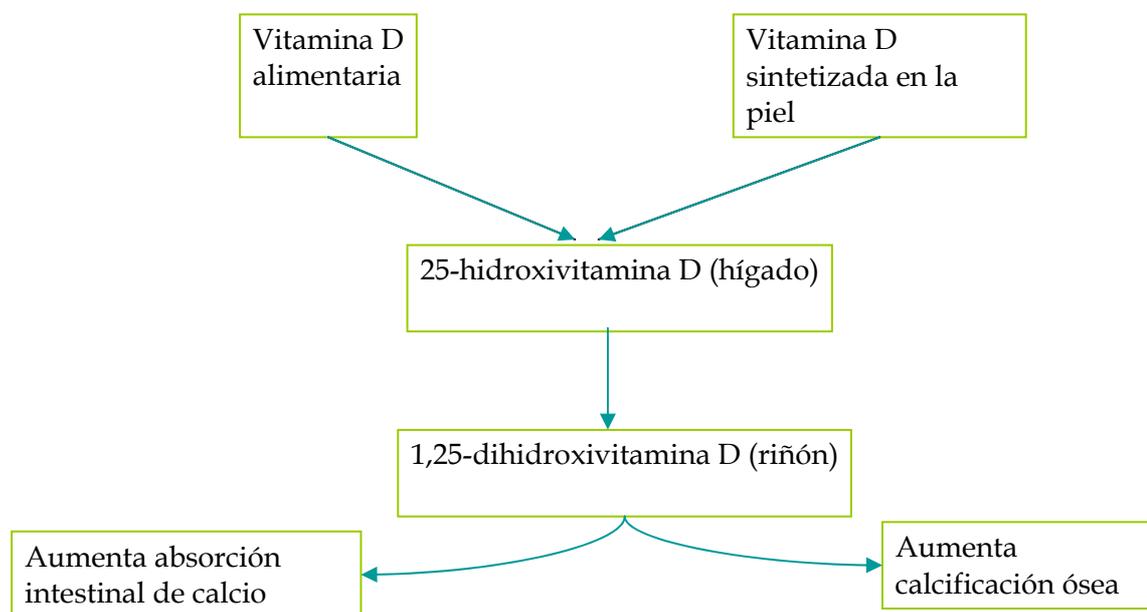


Figura 3.3.2. Biosíntesis endógena y aporte externo de la vitamina D.

El papel de la hormona D₃ es aumentar la absorción de calcio en el intestino (Lehmann, 2005) y aumentar la calcificación ósea, por lo que una deficiencia de vitamina D está relacionada con el riesgo de tener fracturas (Fairfield y Fletcher, 2002; Holick, 2005). Los requerimientos diarios de vitamina D para los adultos es de 800 UI al día.

- c) Aumento del ejercicio físico: el ejercicio físico practicado de forma regular a todas las edades es uno de los pocos factores capaces de estimular los osteoblastos y con ello de aumentar la masa ósea (Soot et al.,

2005). Los efectos beneficiosos del ejercicio sobre la masa ósea se pierden rápidamente si la frecuencia e intensidad de los ejercicios se reduce, reiniciando un estilo de vida sedentario (Gillespie et al., 2002).

- d) Reducción de hábitos nocivos: ciertos hábitos tóxicos, como el tabaco y alcohol, son capaces por sí solos de reducir la masa ósea (Jamal et al., 1999; SEIOMM, 2002).

3.3.4. FISIOPATOLOGÍA DEL REMODELADO ÓSEO

El tejido óseo sufre un continuo intercambio, en condiciones normales en equilibrio, entre formación ósea y resorción ósea. Este proceso se lleva a cabo mediante la acción sucesiva de osteoblastos y osteoclastos sobre una misma superficie ósea (Epstein, 2005). En cada ciclo de remodelado, las células que recubren la superficie ósea son reemplazadas por osteoclastos, que durante un período de dos semanas excavan una laguna o cavidad en el tejido óseo (**resorción ósea**) (Abe-Amer, 2005). Posteriormente, los osteoclastos son reemplazados por osteoblastos que depositan matriz ósea y gradualmente rellenan el espacio reabsorbido (**formación ósea**). El impacto de este proceso a nivel tisular viene determinado por el número de unidades de remodelado en el esqueleto y por el balance final de cada ciclo, es decir, por la diferencia entre la cantidad de tejido reabsorbido y formado en cada unidad. Cuando hay un incremento absoluto o relativo de la resorción frente a la formación se produce una pérdida de masa ósea. Ello puede ser debido a un aumento de la resorción a consecuencia de que los osteoclastos excavan cavidades muy profundas que los osteoblastos son incapaces de restaurar (recambio óseo alto), o bien por un déficit en la formación, al producir los osteoclastos cavidades normales o incluso de menor profundidad pero que los osteoblastos no pueden rellenas (recambio óseo bajo). Este remodelado es necesario para mantener la integridad estructural del esqueleto y ayudar a su función metabólica como almacén de

calcio y fósforo, estando altamente regulado tanto por factores sistémicos como locales.

3.3.4.1. Factores sistémicos

Los moduladores sistémicos mayores son la parathormona (PTH), vitamina D y, en menor medida, la calcitonina. Otros factores que también intervienen son las hormonas gonadales, las hormonas tiroideas, los glucocorticoides y la hormona del crecimiento.

- **PTH:** se segrega por las glándulas paratiroides. Provoca la resorción ósea y aumenta los niveles plasmáticos de calcio mediante su retirada del hueso o bien aumentando la absorción del mismo a nivel digestivo y urinario (*Martin, 2005*). Esta hormona tiende a aumentar con la edad, pudiendo producir un incremento en el recambio óseo y una pérdida de masa ósea.
- **Vitamina D:** el 1,25-dihidroxicolecalciferol u hormona D₃ tienen efectos directos sobre el metabolismo óseo tanto en la mineralización como en la síntesis de la matriz proteica. Actúa sobre diversos órganos implicados en la homeostasis cálcica, siendo el principal regulador de la absorción intestinal y reabsorción renal de calcio, modula la síntesis de las principales hormonas calciotropas y aumenta el aporte de calcio y fósforo, necesarios para la mineralización de la matriz. Estudios recientes han demostrado como la insuficiencia de vitamina D tiene efectos adversos sobre el metabolismo mineral óseo y podría ser un importante factor de riesgo para la osteoporosis y la fractura ósea en mujeres (*Mezquita-Raya, 2001*) (*Riggs, 2003*).
- **Calcitonina:** hormona segregada por las células parafoliculares de la glándula tiroides. El principal efecto de la calcitonina es inhibir la resorción ósea mediada por osteoclastos (*Yamamoto et al., 2005*). Además tiene una acción hipocalcemiante y aumenta el almacenamiento del calcio en hueso.

- **Hormonas gonadales:** los estrógenos son los esteroides sexuales dominantes en la regulación de la resorción ósea (disminuyendo su acción) tanto en mujeres como en hombres (*Muñoz-Torres y Mezquita-Raya, 1999; Falahati-Nini, 2000*).
- **Hormona del crecimiento (GH):** es el mayor determinante del crecimiento esquelético en la etapa previa al cierre de los cartílagos epifisarios, aumentando la formación ósea (*Muñoz-Torres et al., 2001; Cancer-Gaspar et al., 2005*).
- **Glucocorticoides:** actúan incrementando la resorción ósea mediante la estimulación de la osteoclastogénesis al estimular la expresión del ligando de RANK y disminuir la expresión de la osteoprotegerina. Sin embargo, el efecto más significativo de los glucocorticoides sobre hueso es la inhibición de la formación ósea, que se produce al descender el número de osteoblastos y, por lo tanto, la disminución de su función (*Reynolds et al., 2005*).
- **Hormonas tiroideas:** incrementan el remodelado óseo y aumentan la actividad osteoblástica y osteoclástica (*Kanatani, 2004*).

Tabla 3.3.1. Resumen de los efectos de las hormonas sobre el metabolismo óseo.

	AUMENTADA POR:	DISMINUIDA POR:
RESORCIÓN ÓSEA	PTH Glucocorticoides Hormonas tiroideas	Calcitonina Hormonas gonadales GH
FORMACIÓN ÓSEA	GH Vitamina D Hormonas gonadales Calcitonina	PTH Glucocorticoides

3.3.4.2. Factores locales

La estructura y el remodelado óseo están determinados por estímulos locales que actúan sobre las células del tejido óseo directamente y como mediadores de las hormonas sistémicas. Se han identificado diversos factores reguladores locales, como citoquinas, interleukinas (IL), factores de crecimiento, prostglandinas (PG) y óxido nítrico, producidos por la médula ósea adyacente o bien por las propias células del hueso. Los datos en humanos son limitados, basándose en estudios sobre cultivos de médula ósea de mujeres estrógeno-deficientes en los que se ha identificado un aumento significativo de **IL-1**, factor de necrosis tumoral alfa (**TNF- α**), **IL-6** y **PG**. Las PG son potentes reguladores de la función de la célula ósea, particularmente la PGE2 (*Radi y Khan, 2005*), actuando tanto en la resorción como en la formación ósea. La síntesis excesiva de PG se traduce en un aumento de la resorción ósea, mientras que la producción deficiente altera la función formativa de las células óseas y su respuesta ante los estímulos mecánicos y la remodelación.

3.3.4.3. Sistema OPG/RANKL

En los últimos años, se han realizado grandes avances en el conocimiento del mecanismo molecular de la regulación del remodelado óseo, especialmente sobre la relación existente entre los osteoblastos y los osteoclastos. La **osteoprotegerina (OPG)** es una proteína con una potente actividad inhibitoria de la osteoclastogénesis (*Mezquita-Raya et al., 2005*) y tiene una acción antagónica a otra proteína producida por los osteoblastos llamada **ligando del receptor de factor nuclear kappa β (RANKL)** que se tiene que unir al **receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK ó NF-KB)** para activarse. La interacción RANK y RANKL estimula la actividad resortiva de los osteoclastos e inhibe su apoptosis (*Aubin y Bonnelye, 2000*). La OPG neutraliza tanto al RANKL soluble como a su forma unida a la célula (*Hofbauer y Heufelder, 2000*), inhibiendo la diferenciación de los precursores de los osteoclastos e induciendo su apoptosis.

En resumen, el RANKL (factor de diferenciación osteoclástica) y la OPG (factor inhibidor de la osteoclastogénesis), ambos expresados en los osteoblastos, actúan sobre la osteoclastogénesis que precede a la fase de resorción ósea: mientras el primero es un fuerte estímulo del proceso, el segundo es su principal inhibidor. La OPG actúa como “receptor señuelo” del primero, evitando su unión al RANK (figura 3.3.3.).

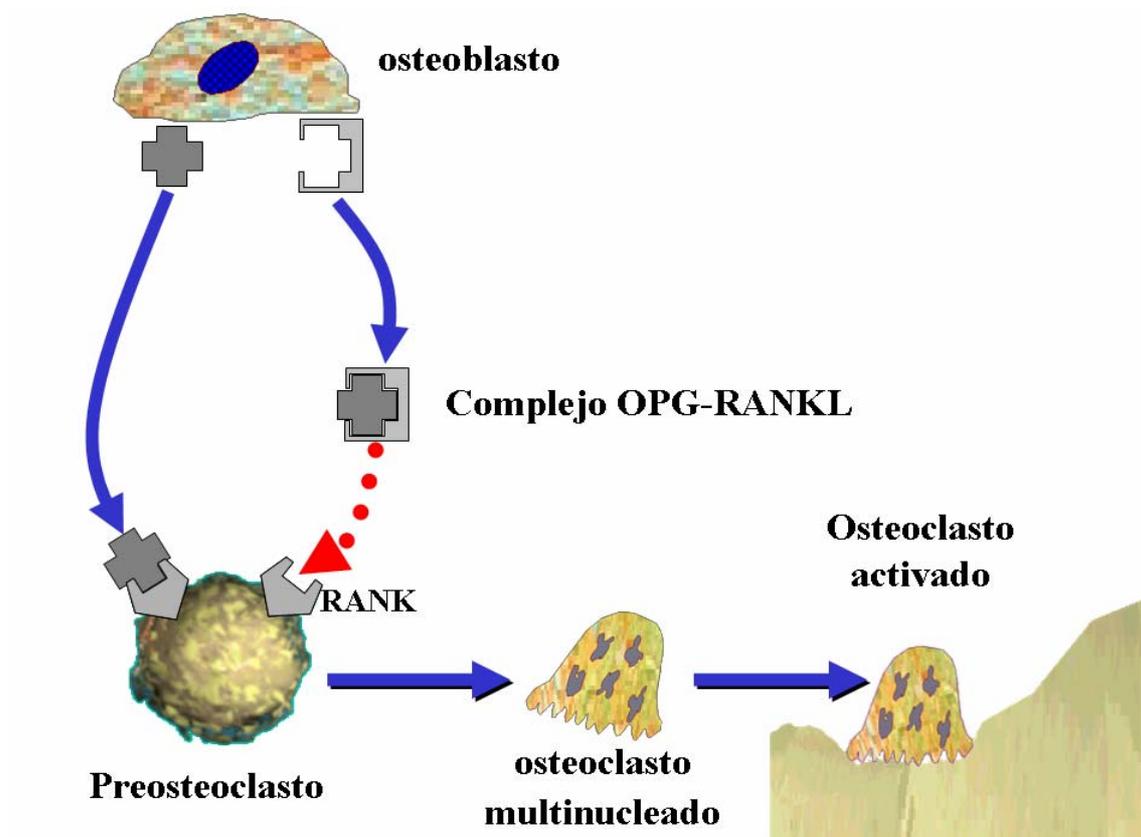


Figura 3.3.3. Sistema OPG/RANKL (Muñoz-Torres et al., 2004)

Todo ello sugiere que la osteoclastogénesis requiere un balance entre la producción de RANKL y su antagonista la OPG (Muñoz-Torres *et al.*, 2004), y en cuya regulación intervienen diversos factores como hormonas, citoquinas y PG (tabla 3.3.2. y tabla 3.3.3.)

Tabla 3.3.2. Factores estimuladores e inhibidores del RANKL.

RANKL	
FACTORES ESTIMULADORES	FACTORES INHIBIDORES
- IL-1, IL-6, IL-11	- Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP) (Gaddy-Kurten y Coker, 2002)
- Oncostatina	- Estrógenos: 17- β -estradiol
- TNF- α (Suda <i>et al.</i> , 2001)	
- PGE ₂ (Hofbauer <i>et al.</i> , 1999)	
- Dexametasona	
- PTH (Lee y Lorenzo, 1999)	
- Inmunosupresores: ciclosporina A, rapamicina y tacrolimo	
- Hipoestrogenismo	

IL, interleuquina; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; PG, prostaglandina; PTH, parathormona.

Tabla 3.3.3. Factores estimuladores e inhibidores de la OPG.

OPG	
FACTORES ESTIMULADORES	FACTORES INHIBIDORES
- IL-1	- PGE ₂
- TNF α	- Inmunosupresores: ciclosporina A, rapamicina y tacrolimo
- 1,25 OH ₂ vitamina D (Varga <i>et al.</i> , 2004)	- PTH
- 17- β -estradiol (Saika <i>et al.</i> , 1999)	- Glucocorticoides
- VIP (Gaddy-Kurten y Coker, 2002)	- Hipoestrogenismo

IL, interleuquina; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; PG, prostaglandina; PTH, parathormona; VIP, péptido vasoactivo intestinal.

3.3.5. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELADO ÓSEO

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo son sustancias liberadas a la circulación durante los procesos de formación y/o resorción ósea, que reflejan la actividad metabólica del tejido óseo en un momento determinado y complementan a las técnicas densitométricas. Además, nos informan sobre la tasa de pérdida de tejido óseo pudiendo ser útiles para determinar el riesgo de fracturas futuras. En el proceso de resorción ósea se origina la liberación del contenido mineral y de la degradación de la matriz proteica y, en cambio, en la síntesis y mineralización del tejido óseo se liberan sustancias enzimáticas y fragmentos derivados del procesamiento del colágeno que son vertidos al torrente circulatorio y pueden ser determinados como índices de remodelado óseo. La tabla 3.3.4. muestra la clasificación de estos marcadores según Delmas y Garnero (*Delmas y Garnero, 1996*):

Tabla 3.3.4. Marcadores de formación y resorción ósea.

MARCADORES DE FORMACION ÓSEA	MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA
- Fosfatasa alcalina total (t ALP)	- Hidroxiprolina (OHP)
- Fosfatasa alcalina ósea (b ALP)	- Piridolina (Pyr) y deoxipiridolina (d-Pyr)
- Osteocalcina (OC)	- Fosfatasa ácida tartratoresistente (TRAP)
- Propéptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP)	- Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX)
- Propéptido N-terminal del procolágeno tipo I (PINP)	- Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I (NTX)

3.3.6. OSTEOPOROSIS Y ATEROSCLEROSIS

La relación entre dos enfermedades en un principio tan distantes como son la osteoporosis y la aterosclerosis se empezó a estudiar hace escasos años (Qi *et al.*, 2003). El riesgo de sufrir ECV es directamente proporcional a la severidad de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas (Tankó *et al.*, 2005) y se ha demostrado que niveles altos de colesterol pueden influir en la osteoporosis debido a que los metabolitos de la enzima que regula la síntesis de colesterol, la hidroximetilglutaril-coenzimaA (HMG-CoA) reductasa están implicados en la diferenciación de los osteoclastos (Erdemli *et al.*, 2005). De tal forma que el aumento incontrolado de la actividad HMG-CoA reductasa implica un aumento de osteoclastos y, por lo tanto, un incremento de su acción resorptiva (Nakashima *et al.*, 2004). El colesterol podría intervenir directamente tanto en la progresión de la osteoporosis como en la calcificación de las lesiones de la pared vascular. Esto da lugar a una interconexión entre el metabolismo del colesterol, el remodelado óseo y el desarrollo de aterosclerosis (Hamerman, 2005). Además, se ha puesto de manifiesto que los bifosfonatos nitrogenados utilizados en el tratamiento de la osteoporosis por su capacidad para aumentar la masa, la mineralización y la resistencia ósea, producen la disminución de la concentración plasmática de LDL oxidadas ricas en colesterol (Rogers, 2003; Parhami *et al.*, 2000).

También hay que destacar que el sistema OPG/RANKL/RANK puede representar un nexo de unión entre el metabolismo óseo y el sistema vascular, pues el OPG presenta un papel protector en el sistema vascular. Estudios en ratones deficientes en OPG muestran una mayor calcificación vascular y formación de aneurismas en las grandes arterias que aquellos no deficientes (Bucay *et al.*, 1998). De hecho, la relación RANKL/OPG disminuye por la presencia de óxido nítrico (implicado en la regulación del endotelio vascular) en células de médula ósea (Fan *et al.*, 2004; Parhami *et al.*, 2001).

3.4. DIETA MEDITERRÁNEA

Comparando las tasas de mortalidad por ECV (ajustadas por edades) de España y otros países del norte de Europa se ha observado que, al igual que otros países del Mediterráneo, España posee unas tasas de mortalidad inferiores (Villar *et al*, 2003). Esta menor incidencia ha sido atribuida, entre otros factores, a los hábitos dietéticos de la región mediterránea, originándose el término “dieta mediterránea”, que es el conjunto de hábitos alimenticios asociados a un patrón dietético común (Trichopoulou y Lagiou, 1997) (Kok y Kromhout, 2004) y que está constituido por los siguientes alimentos :

A) Elevado consumo de alimentos de origen vegetal como frutas, verduras, legumbres y cereales que se consumen frescos o mínimamente procesados, lo que hace que conserven sus propiedades nutricionales. Son ricos en fibra, vitaminas B₆, B₁₂, ácido fólico y antioxidantes, que destacan por su papel en la prevención cardiovascular. En concreto, estos nutrientes participan del metabolismo de la homocisteína (Hcy), un metabolito del aminoácido cisteína (Cys), cuyos niveles en plasma están directamente relacionados con una mayor agregación plaquetaria, estrés oxidativo, proliferación de CMLs en la pared del vaso, menor producción de óxido nítrico y alteración en la función endotelial (Willet *et al.*, 1995) (Panagiotakos *et al*, 2004).

B) El consumo de aceite de oliva como principal fuente de grasa de la dieta, que es rico en ácido oleico y antioxidantes. La evidencia científica sugiere que su consumo continuado es positivo para la salud al reducir los factores de riesgo de ECV (Sanders, 2001) y es capaz de modificar la respuesta inmune e inflamatoria. Las propiedades terapéuticas se deben no solo al ácido oleico sino también a otros componentes como los antioxidantes (Owen *et al.*, 2000) y los fenoles (Visioli y Galli, 2002; Gonzalez-Santiago *et al*, 2005).

C) **El consumo de pescado** con un alto contenido en AGPIs-CL omega-3. Los estudios indican que el consumo de ácidos grasos de esta serie, en concreto EPA y DHA, reduce el riesgo de mortalidad cardiovascular. Se ha descrito que los AGPIs-CL omega-3 disminuyen los niveles de TG en plasma, la infiltración de macrófagos en la pared del vaso, la producción de moléculas quimiotácticas, de factores de crecimiento, de moléculas de adhesión, de eicosanoides y de citocinas inflamatorias (*von Schacky et al., 2001*). Además pueden disminuir la presión sanguínea, aumentar la producción de óxido nítrico, contribuir a la vasodilatación, disminuir la trombosis y aumentar la tasa cardiaca (*Marchioli et al., 2001*).

D) **La ingesta diaria de lácteos** (especialmente el yogur y el queso) en cantidades moderadas, aportan a la dieta calcio, fósforo y vitaminas (*Ranganathan et al., 2005*).

E) **El consumo moderado de vino**, especialmente durante las comidas, tiene un papel protector frente a las ECV (*Whelan et al., 2004; Urquiaga et al., 2004*).

F) **Ingesta reducida de carnes rojas y huevos** (*Cade et al., 2004*).

3.4.1. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

El primer estudio que estableció los efectos beneficiosos producidos por el patrón dietético mediterráneo fue el estudio de los 7 países "**The Seven Countries Study**", llevado a cabo en la década de los 50 por Keys (*Keys et al., 1980*). Este estudio analizó una serie de factores de riesgo cardiovascular entre 13000 hombres de 40 a 59 años distribuidos en 16 cohortes pertenecientes a 7 países: Finlandia, Estados Unidos, Japón, Holanda y 3 países mediterráneos: Grecia, Italia y Yugoslavia. Las 5 cohortes mediterráneas estudiadas (Creta,

Corfú, Crevalcore, Montegiorgio y Dalmacia) mostraron una dieta basada en el consumo de aceite de oliva, cereales, frutas, verduras frescas y vino. La dieta de las cuatro poblaciones no mediterráneas se caracterizaba, sin embargo, por un elevado consumo de grasa animal acompañado de lácteos y bebidas alcohólicas, fundamentalmente cerveza y licores. Estos distintos modelos dietéticos se asociaron con las tasas de mortalidad por ECV, lo que puso de manifiesto el posible efecto protector de la dieta mediterránea frente a esta enfermedad. Posteriormente, varios estudios epidemiológicos y de intervención han investigado los efectos de los distintos componentes dietéticos de la dieta mediterránea en otras poblaciones diferentes encontrando, en general, una disminución en los factores de riesgo y la mortalidad cardiovascular (Kok y Kromhout, 2004). Uno de los más significativos fue el **“Lyon Diet Heart Study”**, que investigó el efecto de la dieta mediterránea en 605 pacientes que habían sufrido algún episodio de infarto de miocardio. Tras 27 meses de seguimiento los resultados mostraron que la mortalidad por evento cardiovascular fue un 70% menor en el grupo que siguió la dieta mediterránea que los que no la siguieron (de Lorgeril et al., 1994). El último gran estudio realizado, el **“Elderly Prospective Cohort Study (EPIC)”**, cuenta con más de 74000 hombres y mujeres mayores de 60 años con un seguimiento medio de 89 meses. Los resultados de este estudio muestra que una mayor adherencia al patrón dietético mediterráneo se asoció con una menor mortalidad global y una mayor supervivencia en este grupo de población (Trichopoulou et al., 2005).

Con el fin de encontrar que componentes de la dieta podrían ser los responsables de dicho efecto protector, los diferentes estudios examinaron la ingesta de nutrientes llegando a la conclusión de que el tipo de grasa de la dieta, más que la cantidad de la misma, estaba relacionada con el riesgo cardiovascular y que, la sustitución en la dieta de los grasa saturada por la monoinsaturada del aceite de oliva, podría resultar beneficiosa en la ECV (de Lorgeril et al., 1997; Kok y Kromhout, 2004).

Otro de los argumentos empleados para explicar el efecto beneficioso de la dieta mediterránea en las ECVs es el elevado consumo de compuestos antioxidantes (*Trichopoulou et al., 1999*). La dieta mediterránea, rica en frutas, verduras y aceite de oliva, conduce a una elevada ingesta de antioxidantes que podrían trasladar sus propiedades biológicas al organismo (*Visioli y Galli, 1998*). Como sugieren varios autores estos compuestos, al menos en parte, son responsables de las bajas incidencias de ECV observadas en los países de la cuenca mediterránea (*Ghiselli et al., 1997; Giugliano, 2000; Bazzano et al., 2003*).

3.4.2. RECOMENDACIONES DIETÉTICAS

Los beneficios cardiovasculares observados en las poblaciones con patrón dietético mediterráneo han influido en las recomendaciones nutricionales de sociedades y organismos internacionales para la prevención de la ECV.

- El **Programa Nacional de Educación en Colesterol (NCEP)** de los Estados Unidos realizó en el año 2002 la tercera versión del Informe del Panel para Tratamiento del Adulto (ATPIII). Las recomendaciones del **ATP III** (*NCEP, 2002*) están orientadas a lograr un impacto en la reducción de la morbimortalidad por enfermedad coronaria. Los principales puntos del ATP III son:

- ▶ Principales factores de riesgo: una concentración de C-LDL mayor de 100 mg/dL, el tabaquismo, la hipertensión (presión arterial mayor o igual 140 mg/90 mmHg), una concentración de C-HDL menor de 40 mg/dL, antecedentes familiares de cardiopatía coronaria prematura (familiar de primer grado de sexo masculino antes de los 55 años; familiar de primer grado femenino antes de los 65 años), la edad (hombres mayor o igual de 45 años; mujeres mayor o igual a 55 años).

- ▶ Los cambios en estilo de vida sugeridos son: control del sobrepeso, ejercicio y modificaciones en la dieta. La dieta debe contener un máximo de grasas saturadas y aumentar el consumo de esteroides de origen vegetal.
- ▶ Recomendaciones para las concentraciones de lípidos en sangre (tabla 3.4.1.):

Tabla 3.4.1. Recomendaciones de los niveles plasmáticos lipídicos (NCEP, 2002).

TIPO DE LÍPIDO	CONCENTRACIONES	LÍMITE
COLESTEROL TOTAL	<200 mg/dL	Deseable
	200-239 mg/dL	Límite alto
	>239 mg/dL	Alto
COLESTEROL LDL	< 100 mg/dL	Óptimo
	100-129 mg/dL	Límite bajo
	130-159 mg/dL	Límite alto
	160-189 mg/dL	Alto
	>190 mg/dL	Muy alto
COLESTEROL HDL	<40 mg/dL	Bajo
	>60 mg/dL	Alto
TRIGLICÉRIDOS	<150 mg/dL	Normal
	150-199 mg/dL	Levemente elevados
	200-499 mg/dL	Elevados
	>500 mg/dL	Muy elevados

- La **Organización Mundial de la Salud (OMS)** recomienda consumir pescado de manera regular para conseguir una ingesta de EPA y DHA próxima a los 200-500 mg por semana. De igual manera, recomienda sustituir el consumo de grasa saturada por grasa monoinsaturada (enfaticando en el aceite de oliva) e incrementar la ingesta de frutas y verduras que contribuirá a mejorar nuestros niveles de folatos y antioxidantes naturales (WHO, 2003). El perfil de grasas que

recomienda la OMS consiste en consumir menos de un 30% de grasa total repartida de la siguiente manera: menos del 10 % de grasa saturada, entre un 15 y un 20% de grasa monoinsaturada, entre un 6 y un 10% de grasa poliinsaturada y un 3% de AGPIs-CL omega-3.

- La **Sociedad Americana del Corazón (American Heart Association “AHA”)** recomienda que para la prevención de la enfermedad coronaria:

- a) Las personas adultas han de consumir pescado al menos 2 veces por semana.
- b) Para pacientes con enfermedad cardíaca crónica las recomendaciones de consumo son de 1 gramo diario de EPA y DHA procedente de aceites de pescado o suplementos.
- c) Para pacientes con hipertrigliceridemia se recomienda el suplemento de 2 a 4 gramos diarios de EPA y DHA para disminuir en de un 20 a un 40 % los niveles de TG del plasma (*Kris-Etherton et al., 2003*).
- d) Reducir en la ingesta de grasas saturadas, colesterol y AGs *trans* (los aceites hidrogenados presentes en margarinas y determinados alimentos preparados).
- e) Consumir 5 porciones de frutas y verduras y 6 porciones de cereales por día.

- La **Guía Europea de Prevención Cardiovascular (The Third Joint Task Force)**, sugiere la implantación de una dieta saludable como estrategia fundamental para la prevención de ECV (*de Backer et al., 2004*) empleando como base el patrón dietético mediterráneo establece que:

1. La dieta debe ser variada y proporcionar una ingesta calórica adecuada para el mantenimiento del peso ideal.
2. Los alimentos cuyo consumo debe fomentarse son los siguientes: frutas y verduras, cereales y pan integral, productos lácteos y bajos en grasa, pescado, carne magra y aceite de oliva.

3. La ingesta de productos vegetales puede tener un efecto positivo en la prevención cardiovascular a través de un incremento en la ingesta de fibra, vitaminas y de antioxidantes.
4. Por lo que a la prevención cardiovascular se refiere, parece más importante el tipo de grasa consumida que la cantidad total, cuyo límite superior podría situarse entre el 30% y el 35% de la ingesta calórica total, siempre que exista un claro predominio de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMIs). Puesto que parece poco probable eliminar la grasa saturada de una dieta nutricionalmente equilibrada, lo más aconsejable sería mantener un consumo lo más bajo posible de la misma (menos de 7% de la ingesta calórica total), tratar de eliminar o reducir al mínimo la ingesta de grasas hidrogenadas, estimular la ingesta de AGMIs procedente del aceite de oliva y de AGPIs-CL omega-3.

Existe un gran interés por parte de organismos internacionales relacionados con la Sanidad y Salud Pública por la adopción de un patrón dietético más saludable que constituiría una herramienta de prevención efectiva y aplicable a toda la población desde edades muy tempranas. Sin embargo, aunque los patrones dietéticos y hábitos de vida pueden corregirse y modificarse, es cierto que son característicos e inherentes a nuestra cultura y costumbres. Quizás sea ésta la razón por la que las diferentes estrategias que han intentado promover la dieta mediterránea en países no mediterráneos no han tenido el éxito esperado (*Paffenbarger et al., 1993*) (*Wannamethee et al., 1998*). Además, no podemos olvidar que incluso en países mediterráneos como el nuestro, los patrones dietéticos han ido progresivamente alejándose del patrón inicial. En España existen importantes diferencias geográficas en lo que a mortalidad cardiovascular se refiere (*Villar et al., 2003*) y los diversos estudios sobre la dieta existente en España reflejan que aunque todavía se ajusta al patrón mediterráneo, se están produciendo algunos cambios asociados al desarrollo económico que hacen que tienda a separarse en algunos aspectos de este patrón dietético mediterráneo

(Ros y Rahola., 1998). El perfil alimentario actual sugiere elevados consumos para el grupo de las carnes, pescados y lácteos. El consumo de cereales (pan fundamentalmente), vegetales y hortalizas ha disminuido de manera significativa y el consumo de frutas y verduras expresa una tendencia hacia un mayor consumo de productos elaborados y procesados en detrimento de las frutas y verduras frescas. Por último, también se han observado deficiencias de numerosos minerales y de las vitaminas A, D, E, B₆ y ácido fólico (Ortega et al., 2003) (Aranceta et al., 2004) (Ortega et al., 2004). Por lo tanto, es importante establecer pautas para volver a establecer la dieta mediterránea como patrón dietético y facilitar el consumo de los alimentos que la constituyen.

3.4.3. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3

Los AGs forman parte generalmente de los TG, fosfolípidos y esteroides, constituyentes de las membranas celulares. Los AGs pueden ser saturados (sin dobles enlaces), monoinsaturados (con un doble enlace) o poliinsaturados (con dos o más dobles enlaces). Los AGSs abundan en los animales terrestres y en el aceite de coco y palma. Los AGMIs predominan en el aceite de oliva y en el aceite de colza. Los AGPIs se pueden dividir en dos familias: la familia omega-6 (ó n-6) y la familia omega-3 (ó n-3). La familia n-6 deriva del ácido linoleico (18:2 n-6) y se encuentra en el aceite de girasol, maíz, trigo, uva y cacahuete. Tiene dos dobles enlaces y se caracteriza por tener el primero de ellos en el carbono número 6 de la cadena, contado desde el metilo del extremo de la misma. La familia de AGPIs omega-3 deriva del ácido α -linolénico (18:3 n-3), AG mayoritario en el aceite de colza y soja, con tres dobles enlaces y el primer doble enlace está situado en el carbono número 3 de la cadena. Tanto el linoléico como el α -linolénico son ácidos grasos esenciales, ya que no pueden ser sintetizados por el organismo y, por lo tanto, deben ser aportados en la dieta (Sanders, 2000). Los diferentes números y posiciones de los dobles enlaces de la cadena confieren a los AGs diferentes propiedades fisiológicas derivadas de su

metabolismo, lo que hace que la relación entre los AGs omega-6 y omega-3 de la dieta sea muy importante. El ácido linoléico se metaboliza a ácido araquidónico (AA) (20:4 n-6) y el α -linolénico da lugar al EPA (20:5 n-3) y al DHA (22:6 n-3) mediante la acción de elongasas y desaturasas (Nakamura y Nara, 2003). Todos estos ácidos grasos emplean las mismas rutas metabólicas y compiten por las mismas enzimas, por lo que un aumento de la ingesta de un precursor originaría un aumento de la formación de los AGs de su serie (figura 3.4.1.).

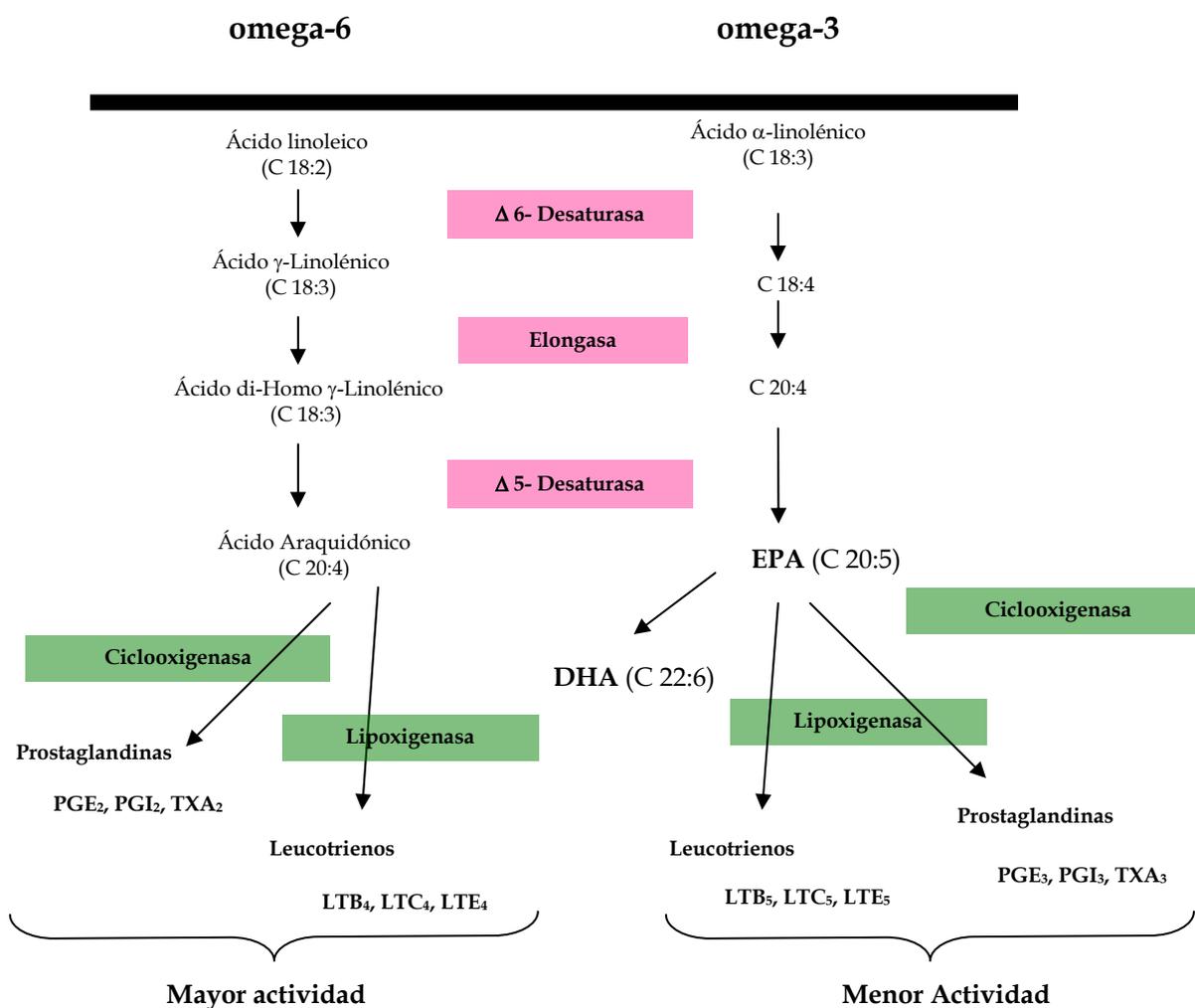


Figura 3.4.1. Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados. PG, prostglandina; TX, tromboxano; LT, leucotrieno.

Además de ser una fuente de energía, las familias de AGPIs omega-6 y omega-3 se incorporan a las membranas de las células donde son precursores de los **eicosanoides** como las PGs, prostaciclina (PCs), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs) que intervienen en numerosos procesos fisiológicos tales como la coagulación de la sangre ó la respuesta inflamatoria e inmunológica. En general, los eicosanoides sintetizados a partir de la familia de los AGPIs n-3 son menos activos que los eicosanoides derivados de la familia n-6. Al aumentar el consumo de AGPI n-3 en la dieta, también puede incrementarse la producción de eicosanoides de estas formas menos activas. El consumo de AGPIs n-6 y n-3 determina los tipos y cantidades de eicosanoides en el organismo, lo cual influye potencialmente en todos los procesos en los que intervienen.

Las estimaciones realizadas sobre la ingesta de AGPIs omega-3 se basan principalmente en los datos sobre consumo y composición de alimentos y dietas. El consumo aproximado de ácido α -linolénico en los países europeos oscila entre 0,6 y 2,5 g/día (*Hulshof et al., 1999*). Sin embargo, hay pocos datos disponibles de la ingesta de DHA y EPA en Europa como consecuencia de la escasez de datos fiables de consumo de alimentos. Un cálculo aproximado del consumo de omega-3 en Europa propuesto por Sanders (*Sanders, 2000*) es de 0,1 a 0,5 g/día. Estas cifras son elevadas en comparación con la ingesta de DHA y EPA estimada para Estados Unidos (0,1-0,2 g/día), pero reducidas con respecto a los datos de ingesta estimados para Japón (hasta 2 g/día) (*Kris-Etherton et al., 2000*), donde el pescado es uno de los alimentos más consumidos. En la tabla 3.4.2. se muestra una estimación resultante de un estudio del 2003 sobre el consumo de AGs en la población española.

Tabla 3.4.2. Ingestas de grasa y ácidos grasos en la población española (Capita y Alonso-Calleja, 2003).

	Hombres	Mujeres
Grasa total (% energía/día)	39.21 ± 4.58	38.96 ± 5.47
AGSs (% energía/día)	13.03 ± 2.19	12.20 ± 2.34
AGMIs (% energía/día)	15.51 ± 2.51	15.58 ± 2.50
AGPIs (% energía/día)	6.22 ± 1.76	7.10 ± 2.18
Ácido oleico (18:1n-9) (g/día)	46.50 ± 9.32	33.96 ± 11.06
Ácido linoléico (18:2 n-6) (g/día)	17.35 ± 6.25	14.61 ± 7.39
Ácido α -linolénico (18:3 n-3) (g/día)	1.90 ± 0.36	1.41 ± 0.80
Ácido araquidónico (20:4 n-6) (g/día)	0.34 ± 0.08	0.22 ± 0.12
EPA (20:5n-3) (g/día)	0.16 ± 0.12	0.07 ± 0.05
DHA (22:6n-3) (g/día)	0.31 ± 0.27	0.15 ± 0.12
AGPI n-3 (g/día)	2.46 ± 0.77	1.68 ± 0.67
n-6/n-3	7.14 ± 0.04	8.33 ± 0.05

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. AGS, ácido graso saturado; AGMI, ácido graso monoinsaturado; AGPI, ácido graso poliinsaturado; DHA, ácido docosahexaenoico; EPA. Ácido eicosapentaenoico.

Las fuentes más ricas de DHA y EPA son los aceites de pescado en general y, especialmente el pescado azul (caballa, sardina, atún). El alto contenido de estos AGs en el pescado es consecuencia del consumo de fitoplancton (rico en AGPIs n-3), que contribuye a la adaptación de los peces a las aguas frías. El contenido de AGPIs omega-3 varía en función de la especie de pescado, su localización, la estación del año y la disponibilidad de fitoplancton (Schimdt *et al.*, 2001) (tabla 3.4.3.).

Tabla 3.4.3. Contenido medio de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en los diferentes tipos de pescado (Mataix et al, 2002).

PESCADO	GRAMOS DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3/ 100 GRAMOS
Caballa	2.8
Arenque	1.81-3.51
Salmón	1.8
Trucha	1.3
Bacalao	0.26
Sardina	2.3
Atún	1.2
Anchoa	1.47
Carpa	0.70
Rodaballo	0.52
Lucio	0.37
Lenguado	0.10
Pez espada	0.44
Mejillón	0.68
Ostras	0.37
Langostinos	0.11
Calamar	0.45
Caviar	3.74

Las más recientes recomendaciones internacionales sobre la ingesta de AGPIs se detallan en la tabla 3.4.4.

Tabla 3.4.4. Recomendaciones internacionales de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados.

ORGANISMO	AÑO	POBLACIÓN	RECOMENDACIÓN
World Health Organization <i>(WHO, 2003)</i>	2003	Población adulta en general	6-10% de la energía diaria de AGPI: 5-8% AGPI n-6 1-2% AGPI n-3
American Heart Association <i>"AHA"</i> <i>(Kris-Etherton et al., 2002)</i>	2002	Adultos sin ECV	Comer pescado dos veces/semana
		Adultos con ECV	1 g/día de EPA+DHA (preferiblemente de aceite de pescado)
		Adultos con triglicéridos elevados	2-4 g/día de EPA+DHA
Workshop "The essentiality of recommended dietary intakes from omega-6 y omega-3 fatty acids" <i>(Simpoulous et al., 2000)</i>	2000	Población adulta en general	LA: 4.44 g / día/2000 kcal ALA : 2.22 g / día/2000 kcal DHA+EPA: 0.65 g / día/2000 kcal
British Nutrition Foundation <i>(BNF, 1999)</i>	1999	Población adulta (19-50 años)	LA : 1% de la energía diaria ALA : 0.2 % de la energía diaria EPA+DHA : 1.25 g/día

ECV, enfermedad cardiovascular; LA, ácido linoléico; ALA, ácido α -linolénico; EPA, ácido eicosapentanoico; DHA, ácido docosahexenoico.

3.4.3.1. Ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y enfermedad cardiovascular

Los efectos saludables derivados del consumo directo o de suplementos de AGPIs omega-3 han recibido en las últimas dos décadas mucha atención por parte de la comunidad científica. Los resultados de los estudios epidemiológicos y de intervención indican que el consumo de AGPI n-3 puede afectar favorablemente a la salud cardiovascular, incluso tratándose de una ingesta pequeña de pescado (una vez por semana). Algunos estudios epidemiológicos destacables en este sentido son los siguientes: el estudio **“The Seven Countries Study”**, de 20 años de duración y seguimiento, demostró que aquellos hombres que consumían 30 gramos al día de pescado reducían el riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria en un 50% en relación a los voluntarios que no consumían pescado (*Kromhout et al., 1985*). El **“The Western Electric Study”** determinó que los hombres que consumían más de 35 gramos al día de pescado presentaban un riesgo relativo de mortalidad por enfermedad coronaria de 0,62 en comparación con los que casi nunca consumían pescado (*Daviglus et al., 1997*). El **“US Physicians’ Health Study”** demostró que el consumo semanal de pescado estaba asociado a un riesgo relativo de 0,48 de muerte súbita cardíaca (*Albert et al., 1998*). El estudio sobre **“Prevención de Aterosclerosis Coronaria Mediante Intervención con Ácidos Grasos Omega-3 de Origen Marino”** (también conocido por **“SCIMO”**), demostró una reducción en el desarrollo de la aterosclerosis al administrar dosis bajas de AGPIs n-3 (1,65 g/día) (*von Schacky et al., 2001*).

Igualmente, tres estudios de intervención han mostrado que el consumo de pescado o de aceite de pescado tiene efectos protectores importantes frente a las ECVs. El **“Diet And Reinfarction Trial” (DART)** demostró que dosis relativamente bajas de AGPI n-3 (2-3 g/semana), equivalentes a 2-3 porciones de pescado azul a la semana, reducían el riesgo de sufrir un episodio coronario secundario y producían un descenso del 30% en la mortalidad a causa de ECV (*Burr et al., 1989*). En el estudio **“GISSI-Prevenzione”**, el consumo de un suplemento nutricional de DHA y EPA de 1 gramo al día disminuyó en un 17% el riesgo de mortalidad por ECV, en relación con el grupo control que no

consumió el suplemento (*Hopper et al., 1999*). Por último, el “**Lyon Heart Study**” demostró que una dieta de tipo mediterránea, que aportaba ácido oleico, antioxidantes naturales, cantidades reducidas de ácidos grasos saturados y aproximadamente 2 gramos al día de ALA, redujo la aparición de episodios coronarios en un 70% y la mortalidad en un 80% (*Kris-Etherton et al., 2001*).

Aunque aún no está claro el mecanismo exacto mediante el cual los AGPIs n-3 ejercen su efecto protector, se han propuesto varios mecanismos posibles. Entre ellos se ha descrito la capacidad que tienen estos AGs para influenciar en la coagulación sanguínea y la trombosis, el perfil de los lípidos plasmáticos, la presión sanguínea, la arritmia y la inflamación:

a) Efecto ateroprotector: proviene principalmente de su incorporación a los fosfolípidos de las membranas de las células, al sustituir parcialmente al AA como sustrato inicial para la producción de eicosanoides (*BNF, 1999*). Cuando las células vasculares sufren algún tipo de daño, se desencadena el proceso de agregación plaquetaria y los intermediarios derivados del metabolismo de los AGPIs n-3 son menos protrombóticos y vasoconstrictores que los derivados procedentes del AA (n-6). El contenido en AGs de las plaquetas origina la producción de TXA₂ a partir de la familia n-6, o de TXA₃ a partir de la familia n-3. Este último posee un efecto proagregante menor que el TXA₂, reduciendo por tanto la agregación plaquetaria y la trombosis (*Connor, 2000*).

b) Mejora el perfil lipídico en plasma: ensayos clínicos han demostrado que dosis bajas de aceites de pescado (1 g/día de AGPIs n-3) pueden disminuir la concentración de TGs del plasma en ayunas y también en el estado postprandial (*Williams et al., 1992; Zampelas et al., 1994; Harris, 1997; Visioli et al., 2000*). Los TGs elevados son un factor de riesgo independiente de las ECV, especialmente en individuos con valores reducidos de C-HDL. Tras consumir una comida rica en grasa, se produce un aumento característico de los TGs sanguíneos que se conoce con el nombre de hiperlipemia postprandial o

respuesta postprandial. La intensidad de esta respuesta también se considera un factor de riesgo de ECV y está relacionada con el tipo de grasa ingerida. Algunos estudios indican que la ingesta de DHA y EPA reduce el aumento postprandial de los TGs y, por tanto, produce un efecto beneficioso (*Adler y Holub, 1997*). Con respecto a los efectos de los AGPIs omega-3 sobre el colesterol sanguíneo, en la mayoría de los estudios llevados a cabo hasta ahora no se han encontrado efectos significativos sobre el colesterol total (*Harris, 1997*). En cambio, los aceites de pescado suelen producir un aumento en el C-HDL de un 10%, aunque este depende del alimento y de las cantidades de omega-3 ingeridas (*BNF, 1999*).

c) Descenso de la presión sanguínea: la hipertensión es uno de los factores de riesgo de ECV más importantes. Entre otros efectos, la hipertensión provoca la activación del endotelio (*Brown y Hu, 2001*), lo que a su vez origina la producción endotelial de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y la infiltración de células sanguíneas a la pared vascular, contribuyendo al engrosamiento de la arteria y al desarrollo de la aterosclerosis (*BNF, 1992*). Existen evidencias científicas de que los AGPIs n-3 pueden estimular la producción endotelial de óxido nítrico (*Harris, 1996*). Esta molécula provoca la relajación de las CMLs permitiendo la dilatación de los vasos sanguíneos, que reduce a su vez la presión sanguínea y la activación endotelial. Se ha demostrado que sólo cantidades elevadas de aceites de pescado (un mínimo de 3 g/día) producen un descenso significativo, aunque moderado, de la presión sanguínea (*Appel et al., 1993*). Las cantidades de pescado que habría que consumir para obtener estas dosis efectivas son tan elevadas que en la práctica sólo se alcanzan mediante el consumo de suplementos o alimentos enriquecidos con AGPIs n-3.

d) Producción de mediadores inmunológicos: muchos de los cambios que ejercen los AGPIs n-3 en el sistema inmune están mediados por cambios en la

producción de eicosanoides (Calder, 1997; Hughes y Pinder, 2000; Terada et al., 2002). El aporte con AGPIs n-3 conduce a la formación del LTB₅, el cual es poco activo biológicamente, a expensas de la síntesis del LTB₄ proinflamatorio (Gil y Rueda, 2002). Por último, también existen estudios que demuestran que los AGPIs n-3 pueden inhibir directamente la síntesis de citocinas proinflamatorias tales como IL-1 y TNF- α , de manera independiente a la regulación por eicosanoides (Calder, 1997).

3.4.3.2. Ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y osteoporosis

Entre los principales nutrientes de la dieta implicados en el mantenimiento de la salud ósea están el calcio (Di Daniele et al., 2004; Flynn, 2004), la vitamina D (Drin, 2004; Meier, 2004) y los AGs, aunque los estudios de su acción sobre la biología ósea son actualmente escasos (Watkins et al., 2001; Terano, 2001). En estudios en animales la ingesta de AGPIs omega-3 disminuye la osteoclastogénesis y la pérdida de masa ósea en ratones ovariectomizados (Sun et al., 2003; Watkins et al., 2001). Otros estudios demuestran cómo el DHA y el EPA aumentan la absorción de calcio y disminuyen la excreción urinaria de calcio, inhibiendo la osteoporosis en ratas (Sagakuchi et al., 1994; Sun et al., 2004), mientras que la ingesta de grasas saturadas interfiere con la absorción de calcio y predisponen a la osteoporosis (Das, 2000). Además, los animales deficientes en AGs esenciales desarrollan osteoporosis (Kruger y Horrobion, 1997; Schlemmer et al., 1999).

En estudios en humanos, la reducción del AA de los fosfolípidos resultó beneficiosa en pacientes con osteoporosis (Priante et al., 2002) y, además, se ha estudiado la posible relación que existe entre un exceso en la producción de PGE₂ con un aumento de resorción ósea. Esto es debido a que la PGE₂ sintetizada por los osteoblastos activa la resorción osteoclástica del hueso, así como la formación osteoblástica del hueso, pero a altas concentraciones de PGE₂ inhibe la formación de hueso (Ono et al., 2005). Por lo tanto, la grasa de la dieta influye en la composición del AG de la membrana del osteoblasto; si es rica en AGPIs omega-3 se producirá PGE₂ (derivado del AA) en menor

cantidad y más PGE3 (derivado del ALA). Aunque sí se ha observado que niveles bajos del ratio omega-6/omega-3 conllevan efectos beneficiosos sobre la densidad mineral ósea (*Claassen et al., 1995; Albertazzi y Coupland, 2002*), aún son necesarios más estudios para establecer una clara relación entre los AGPIs n-3 y la osteoporosis.

3.4.4. ÁCIDO OLEICO

El ácido oleico es un AGMI (18:1 n-9) que se encuentra en grandes proporciones en el aceite de oliva y al que se le atribuye propiedades beneficiosas frente a la ECV (*Moreno y Mitjavila, 2003*). El ácido oleico tiene una acción hipocolesterolemizante debido a que produce una mayor excreción biliar de colesterol, bien como tal o en forma de ácidos biliares. Numerosos estudios llevados a cabo en humanos han mostrado que la sustitución de las grasas saturadas en la dieta por el aceite de oliva dio lugar a un descenso de los niveles de CT y de C-LDL (*Kris-Etherton et al., 1999*) que fue acompañado de un aumento de C-HDL (*Thomsen et al., 1999*). Igualmente, otros estudios epidemiológicos y de intervención han mostrado que dietas con aceite de oliva pueden reducir la presión arterial (*Ferrara et al., 2000; Psaltopoulou et al., 2004; Perona et al., 2004*).

Otra propiedad del ácido oleico es que limita la oxidación de las LDLs disminuyendo su poder aterogénico. Diversos estudios de intervención en humanos han mostrado un efecto protector del aceite de oliva frente a la oxidación de las LDLs (*Gimeno et al., 2002; Visioli et al., 2004*). Ésto es debido a que las partículas de LDLs enriquecidas en AGMIs son más resistentes a la oxidación (*Mata et al., 1997*) y, por lo tanto, son captadas por macrófagos en menor medida que las ricas en AGPIs (*Aviram y Eias, 1993*). El ácido oleico también parece tener un efecto beneficioso en los procesos inflamatorios que se desencadenan en las etapas tempranas de la aterosclerosis. Un estudio a doble ciego llevado a cabo en hombres adultos mostró que el consumo de aceite de

oliva virgen durante dos meses originó un descenso en la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) por células mononucleares periféricas (Yaqoob *et al.*, 1998). En otro estudio llevado a cabo en un modelo *in vitro* de aterosclerosis usando células endoteliales estimuladas con citoquinas, el ácido oleico disminuyó la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y del factor nuclear NF- κ B (Massaro *et al.*, 1999). Otros estudios han encontrado que el ácido oleico puede producir una disminución de los factores de coagulación y trombogénesis, interviniendo así en procesos fibrinolíticos (Pérez-Jiménez *et al.*, 1999).

Respecto a la relación del ácido oleico y el metabolismo óseo, son muy pocas los estudios es los que se compare el efecto de la ingesta de diferentes tipos de grasa sobre la composición mineral del hueso, pero sí se sabe que una ingesta lipídica equilibrada es necesaria para la correcta absorción de calcio y fósforo, lo que permitirá una adecuada osificación y crecimiento. El tipo de grasa es importante ya que el ácido oleico y los AGs esenciales estimulan la absorción de calcio, mientras que un exceso de AGs de cadena larga deprimen la absorción de calcio (Laval y Laval, 1996). Así, un estudio realizado por Trichopoulou (Trichopoulou *et al.*, 1997) observó la existencia de una asociación positiva, tanto en hombres como en mujeres adultas, entre al ingesta de grasa monoinsaturada y la densidad mineral del hueso, aunque hacen falta más ensayos que nos permitan profundizar en el tema con el fin de confirmar dichos resultados.

3.4.5. VITAMINAS DEL GRUPO B

Se ha demostrado que los aportes dietéticos de piridoxina (**vitamina B₆**), **ácido fólico** (vitamina B₉) y cobalamina (**vitamina B₁₂**) juegan un papel fundamental en la prevención de las ECV (Brear *et al.*, 2002) y reducen los niveles plasmáticos de homocisteína total (tHcy) (Den Heijer *et al.*, 1998; Malinow *et al.*, 2001). El ácido fólico ha cobrado un mayor protagonismo en las últimas décadas por su presunto papel en la patogénesis de los defectos del tubo neural (Lucock, 2000),

en las ECV (Devaraj y Jialal, 2000) y en el cáncer. Los humanos y mamíferos en general, no pueden sintetizar folatos ya que, carecen de las enzimas necesarias para la síntesis *de novo*, por lo que tienen dependencia de una variedad de fuentes alimentarias para incorporar esta vitamina. Entre las fuentes ricas en estos nutrientes se encuentran extractos de levaduras, hígado, champiñones, riñones, vegetales de hojas verdes y frutas cítricas. Sin embargo, la falta en folato es aún la deficiencia vitamínica más común de los países desarrollados. Los niveles plasmáticos de ácido fólico están en el rango de 3-30 ng/ml. El folato circula en plasma como 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), siendo la mayor parte de este folato captado por el hígado. La función metabólica del folato es la de transportar unidades monocarbonadas. Dentro de las células, la forma biológicamente activa, el tetrahydrofolato (THF), acepta unidades monocarbonadas de diversas fuentes, para luego transferirlas a otras moléculas. Estas unidades monocarbonadas se reparten principalmente entre dos rutas metabólicas (figura 3.4.2.).

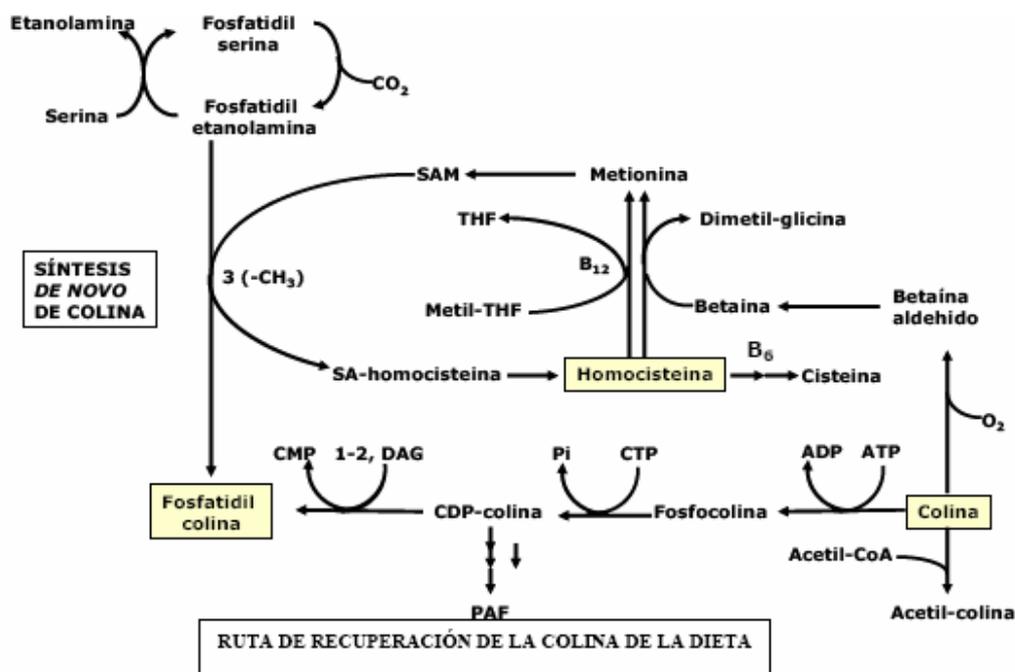


Figura 3.4.2. Esquema de la relación entre la homocisteína y las vitaminas B (Gil, 2004).

SAM, S-adenosilmetionina; THF, tetrahydrofolato, ADP, adenosíndifosfato; ATP, adenosíntrifosfato.

La primera de las rutas es la biosíntesis de purinas y pirimidinas, y la otra comprende la síntesis de metionina y S-adenosilmetionina (SAM) que se empleará en reacciones de metilación. Estas dos rutas metabólicas están enlazadas por la reacción en la que el aminoácido homocisteína sufre una S-metilación para formar metionina. La enzima que cataliza esta reacción es la metionina sintasa, la cual requiere vitamina B₁₂ como cofactor (Molloy, 2001).

Los constantes requerimientos de metilación de ADN, proteínas, lípidos, neurotransmisores y otros intermediarios biológicos genera una producción constante de homocisteína que, ó bien se recicla a metionina vía folato y vitamina B₁₂, ó bien se cataboliza vía cistationina β -sintasa dependiente de la vitamina B₆.

El interés inicial del ácido fólico en la salud se centraba en su papel para la prevención de los defectos del tubo neural (Refsum, 2001) tales como la espina bífida. En la actualidad, el interés se centra en su relación con el potencial aterogénico de la Hcy y por tanto en el papel que puede jugar en la ECV (Cleophas et al., 2000; Cheng et al., 1997). Precisamente, estas observaciones sobre las implicaciones cardiovasculares de la homocistinuria fueron las que inspiraron la teoría aterogénica de la homocisteína, desarrollada por McCully en 1969 (McCully, 1969). Entre las características histopatológicas de las lesiones inducidas por la Hcy se encuentra el daño oxidativo (Nappo et al, 1999; Sepúlveda-Sánchez et al., 2004), el engrosamiento intimal, la hipertrofia de la musculatura lisa vascular, la agregación plaquetaria (Welch y Loscalzo, 1998), el descenso de la producción de óxido nítrico (Tsai et al., 2000) y la formación de trombos (Menéndez y Fernández-Britto, 1999).

El tratamiento general de la hiperhomocisteinemia consiste en la administración de suplementos con ácido fólico (Malinow et al., 2001; Verharr et al., 2002), vitamina B₁₂ (Brönstrup et al., 1998), que se encuentra en alimentos de origen animal como carne, leche, pescado y huevos; y vitamina B₆ (Andreotti et al., 2000), vitamina hidrosoluble presente en las patatas, cereales, pan carne, pescado, huevos y plátanos. La deficiencia de estas vitaminas podrían

potencialmente aumentar la Hcy en sangre (*de Caterina et al., 2004; Strain et al., 2004*). El consumo de suplementos de ácido fólico y vitamina B₁₂ disminuye los niveles de Hcy entre un 25-50% en condiciones normales. En un ensayo clínico realizado por Sepúlveda-Sánchez (*Sepúlveda-Sánchez et al., 2004*) con 90 pacientes con enfermedad coronaria, el suplemento dietético con 5 mg/día de ácido fólico durante 12 semanas descendía de manera significativa los niveles plasmáticos de Hcy. Además la acción sinérgica del ácido fólico, vitaminas B₆, B₁₂ y AGPIs omega-3 produce un magnífico papel protector frente a las ECVs (*de Bree et al., 2004*).

Además, existe una relación entre Hcy y el metabolismo óseo (*Herrmann et al., 2005*), pues la Hcy podría inhibir la formación de osteoblastos y aumentar la diferenciación de los osteoclastos, a la vez que podría interferir directamente con proteínas la matriz extracelular ósea y cambiar su estructura, reduciendo su estabilidad. Por lo tanto, una deficiencia de vitaminas B provocaría, no solo un aumento de Hcy en plasma, sino que, además, supone un riesgo de sufrir osteoporosis. Estudios en animales demuestran que la falta de vitamina B₆ en ratas está relacionada con un aumento en el riesgo de fracturas (*Dodds et al., 1986*). Estudios en humanos demuestran que la deficiencia de vitaminas B aumenta el riesgo de sufrir algún tipo de fractura (*Goerrs et al., 1992*), especialmente la de la cadera (*Reynolds et al., 1992; Melhus et al., 1999*). Según el "The Framingham Osteoporosis Study" existe una relación entre la vitamina B₁₂ y la densidad mineral ósea en mujeres (*Tucker et al., 2005*), teoría que se apoya con otros estudios en los que el consumo de suplementos de folato y vitamina B₁₂ reducían el riesgo de fractura (*Lumbers et al., 2001; Sato et al., 2005*).

3.4.6. VITAMINA E

La vitamina E es una vitamina liposoluble presente en frutas y vegetales que protege a la membranas celulares de la peroxidación lipídica. La vitamina E desempeña un papel preventivo en el daño celular debido a la oxidación por diferentes causas como la edad, las ECVs, inflamación e infección (*Morrissey y Sheepy, 1999*), al eliminar los radicales libres y al impedir la oxidación de C-LDL, que es uno de los factores responsables de la aterosclerosis (*Stringer et al., 1989*). Otra importante función de la vitamina E en el organismo es la protección de la oxidación de los AGPIs (*Harris et al., 2002*). La vitamina E podría mejorar el papel de los omega-3, pues estos son muy susceptibles de la oxidación por radicales libres endógenos que se forman en el metabolismo normal de las células (*Meydani et al., 1991; Morrissey y Sheepy, 1999*)

Se han realizado numerosos estudios sobre los beneficios de la vitamina E. Entre ellos, el **“Nurses’ Health Study”**, en el que intervinieron 87000 individuos. Los resultados de este estudio indicaron que el riesgo de padecer una ECV estaba inversamente relacionado con la ingesta de vitamina E. El **“Cambridge Heart AntiOxidant Study” (CHAOS)**, llevado a cabo con 2002 hombres y mujeres con enfermedad coronaria, encontró un efecto beneficioso del tratamiento con α -tocoferol. Así, tras un periodo de 17 meses se observó un 47% de reducción de mortalidad por ECV y un 77% de reducción de infartos de miocardio no mortales, entre los pacientes tratados con el antioxidante con respecto al placebo (*Stephens et al., 1996*). En un estudio prospectivo a doble ciego llevado a cabo con 40 pacientes de trasplante cardíaco, el tratamiento con vitaminas C y E condujo a una menor progresión de la lesión aterosclerótica comparada con el placebo (*Fang et al., 2002*); aunque la relación entre vitamina E y ECV se pone en duda en otros estudios como en el **“GISSI- Prevenzione”** (*Hopper et al., 1999*).

En cambio, parece no existir una relación tan importante entre la vitamina E y la osteoporosis. Estudios en animales demuestran que la vitamina E aumenta la

tasa de formación de hueso en pollos alimentados con dieta rica en ácidos grasos insaturados (*Xu et al., 1995*) y que la administración de esta vitamina en conejos con osteoporosis inducida por heparina, evita la resorción ósea (*Turan et al., 2003*). Aunque los estudios realizados en humanos relacionan el riesgo de padecer osteoporosis con una deficiencia en vitaminas antioxidantes (A, C y E) (*Maggio, 2003*), la relación exacta de esta enfermedad con la falta de vitamina E aún está por demostrar.

4

Material y Métodos

4.1. MATERIAL

4.1.1. APARATOS DE USO GENERAL

- **Centrífuga** refrigerada modelo 3K15 provista de un rotor vascular nº11133 de SIGMA (Osterode am Harz, Alemania).
- **Centrífuga** refrigerada modelo 5415 R para tubos de 1.5 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania).
- **Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)** modelo Waters 2695 provisto de detector de fluorescencia (Milford, Massachusetts, EEUU).
- **Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID)** modelo CP3800 de Varian (Palo Alto, California, EEUU).
- **Cromatógrafo de gases** modelo 3800 provisto de un inyector automático modelo 8200 y acoplado a un espectrómetro de masas modelo Saturn 2000 de Varian (Palo Alto, California, EEUU).
- **Espectrofotómetro** modelo Cary 100 BIO UV-Visible de Varian (Palo Alto, California, EEUU).
- **Evaporador "SpeedVac"** modelo SPD 2010 de Thermo Savant (EEUU).
- **Balanza de precisión** modelo BP61S de Sartorius AG, (Göttingen, Alemania).
- **Balanza analítica** modelo BL 3100 de Sartorius AG (Göttingen, Alemania).
- **pH-metro** modelo GLP22 de Crisol (Barcelona, España).
- **Congelador de temperatura -80°C** modelo MDF-U71V de SANYO (Bensenville, Illinois, EEUU).
- **Micropipetas de precisión** modelo Pipetman de Gilson (Francia).
- **Bloques calefactores** de Stuart-Scientific (Reino Unido).
- **Agitadores magnéticos con calefactor** modelo MR 3001 K de Heidolph (Schwabach, Alemania).

- **Agitador vibrador (Vórtex)** modelo Reax Top de Heidolph (Schwabach, Alemania).
- **Lector de placas** modelo 550 de BIO-RAD (Reino Unido) a una longitud de onda de 450 nm.
- **Otros materiales de laboratorio:** tubos para extracción sanguínea (Sarstedt®), matraces aforados, pipetas de vidrio, tubos de vidrio con rosca, pipetas Pasteur de vidrio, viales cromatográficos, tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad, jeringas de plástico de 1 mL, 5 mL y 10 mL de capacidad, filtros de jeringa de nylon de 0.2 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, filtros de disco de nylon de 4.7 cm de diámetro y 0.45 μm , filtros de disco de acetato de celulosa de 4.7 cm de diámetro y 0.22 μm , guantes de látex, tubos falcon de 15 mL, micropipetas multicanal de 50 a 300 μL , vasos de precipitado.

4.1.2. PREPARADOS LÁCTEOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

En este estudio se evaluaron los efectos de 2 productos lácteos, una bebida láctea enriquecida con AGPIs-CL omega-3 (DHA y EPA), ácido oleico, vitaminas A, B6, D, E y ácido fólico; que se comparó con una leche semidesnatada enriquecida en vitaminas A y D. Ambas eran isoenergéticas y con un perfil nutricional similar, diferenciándose solamente en los nutrientes enriquecidos. En la tabla 4.1.1. se describe la composición de estos dos preparados lácteos más detalladamente:

Tabla 4.1.1. Composición de los preparados lácteos utilizados en el estudio.

NUTRIENTES	LECHE CONTROL	LECHE ENRIQUECIDA
Energía (kcal/L)	465	520
Proteínas (g/L)	31	35
Carbohidratos (g/L)	47	52
Grasa total (g/L)	19	19
Ácidos grasos saturados (% grasa total)	70.5	23.7
Ácidos grasos monoinsaturados (% grasa total)	27.2	56.8
Ácidos grasos poliinsaturados (% grasa total)	2.3	19.5
Ácido oleico (g/L)	4.09	10.34
EPA (g/L)	ND	0.40
DHA (g/L)	ND	0.27
Colesterol (mg/L)	82	39.1
Calcio (mg/L)	1185	1215
Vitamina A (µg/L)	1200	1200
Vitamina B6 (mg/L)	ND	3
Ácido fólico (µg/L)	ND	300
Vitamina B12 (µg/L)	3.8	3.8
Vitamina D (UI)	300	300
Vitamina E (mg/L)	ND	15

Análisis realizados por el Departamento de Control de Calidad de PULEVA Biotech S.A.

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico.

ND, no detectable.

Los sujetos consumieron 500 mL al día del preparado correspondiente, por lo que su ingesta diaria de nutrientes aportada durante la intervención fue:

Tabla 4.1.2. Ingesta diaria de nutrientes para un consumo de 500 mL/día.

NUTRIENTES	LECHE CONTROL	LECHE ENRIQUECIDA
Energía (kcal/día)	232.5	260
Proteínas (g/día)	15.5	17.5
Carbohidratos (g/día)	23.5	26
Grasa total (g/día)	9.5	9.5
Ácidos grasos saturados (% grasa total)	70.5	23.7
Ácidos grasos monoinsaturados (% grasa total)	27.2	56.8
Ácidos grasos poliinsaturados (% grasa total)	2.3	19.5
Ácido oleico (g/día)	2.05	5.17
EPA (g/día)	ND	0.20
DHA (g/día)	ND	0.14
Colesterol (mg/día)	41	19.55
Calcio (mg/día)	590	675
Vitamina A (µg/día)	600	600
Vitamina B6 (mg/día)	ND	1.5
Ácido fólico (µg/día)	ND	150
Vitamina B12 (µg/día)	1.9	1.9
Vitamina D (UI/día)	150	150
Vitamina E (mg/día)	ND	7.5

Análisis realizados por el Departamento de Control de Calidad de PULEVA Biotech S.A.

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; ND, no detectable.

La leche enriquecida con AGPIs-CL omega-3, ácido oleico y vitaminas B6, ácido fólico, D y E se elaboró según indica la figura siguiente:

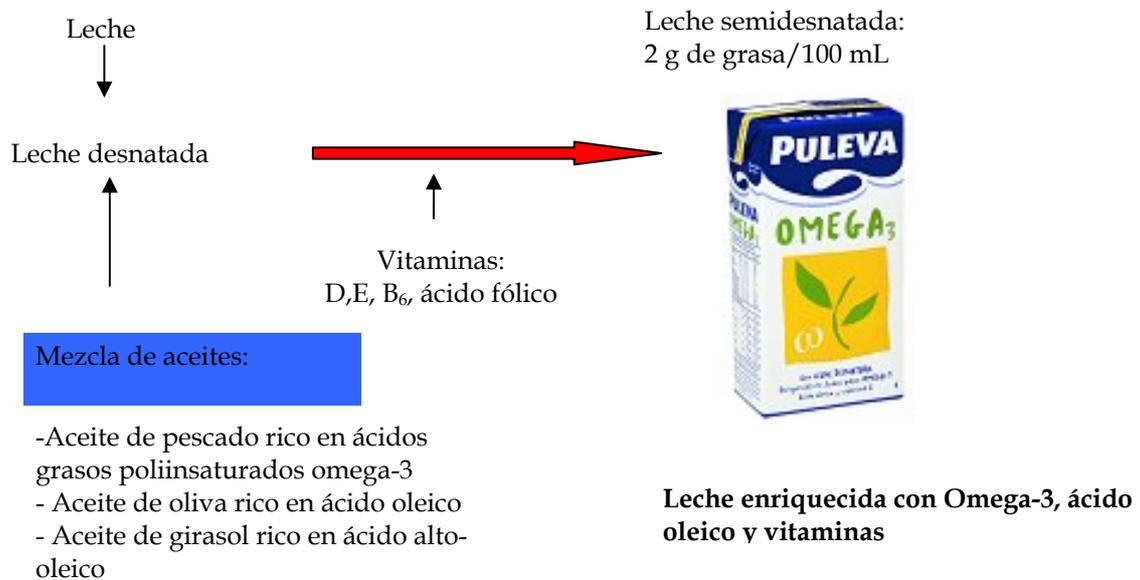


Figura 4.1.3. Proceso de elaboración del preparado lácteo enriquecido "PULEVA Omega-3®".

Al tratarse de un estudio a doble ciego, ambos preparados se envasaron con formato tetrabrick con papel blanco, en el que ni los voluntarios ni el personal investigador conocían que tipo de preparado consumía cada paciente.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio nutricional se llevó a cabo con un diseño prospectivo, aleatorio y controlado con placebo a doble ciego. Los sujetos fueron seleccionados en la Consulta de Endocrinología del Centro Periférico de Especialidades (CPE) del Zaidín del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada. En este estudio participaron 75 pacientes que fueron distribuidos por muestreo aleatorio simple, utilizando el programa SIGESMO, en 2 grupos: el grupo C (37 individuos), que consumió la leche control y el grupo E (38 individuos), que consumió el producto lácteo enriquecido con AGPI s-CL omega-3, ácido oleico y vitaminas. La cantidad de cada uno de los productos ingerida al día fue de 500 mL/día durante 6 meses.

La extracción de sangre se realizó al inicio del estudio (T0), a los tres meses (T3) y a los 6 meses (T6) de la intervención nutricional.

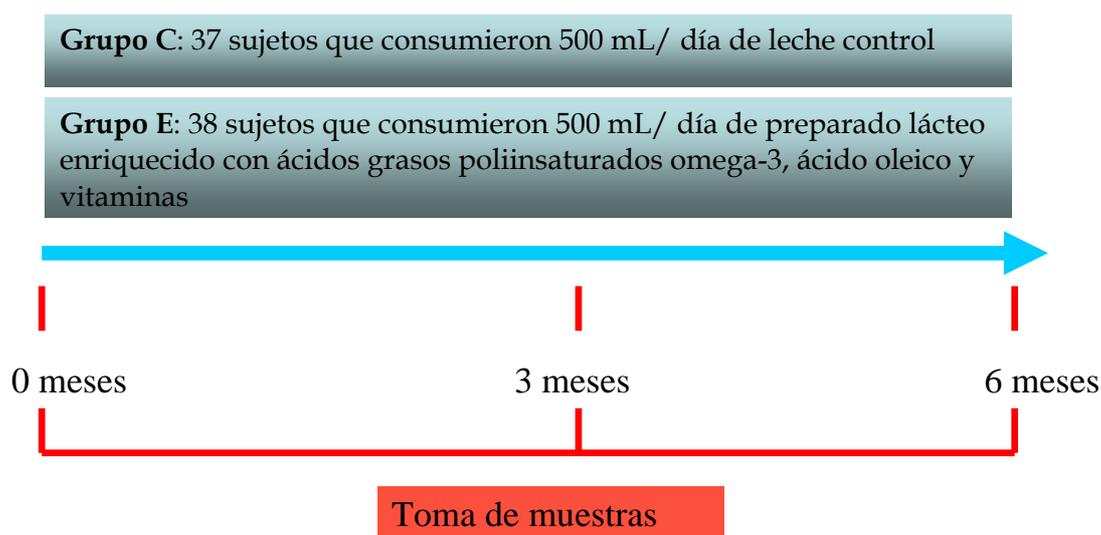


Figura 4.2.1. Esquema del diseño del estudio experimental.

El protocolo del estudio incluyó la historia clínica, el cuestionario de inclusión, la encuesta nutricional y la exploración física. Los pacientes-voluntarios fueron incluidos en el estudio después de una entrevista con el equipo investigador y tras firmar el consentimiento informado. Además, se realizó un seguimiento a los pacientes durante todo el estudio consistente en una entrevista personal con el equipo médico en los meses correspondientes a la toma de muestras, además de un seguimiento telefónico mensual. El producto lácteo asignado aleatoriamente se entregó en los domicilios de los sujetos participantes y el cumplimiento de la ingesta del producto se llevó a cabo por la recogida de los envases consumidos. A los pacientes se les realizó un seguimiento dietético mediante dos encuestas nutricionales de frecuencia de alimentos semanal, al principio (tiempo 0 semanas) y al final del estudio (tiempo 22 semanas).

4.2.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO

4.2.2.1. Población del estudio

Pacientes adultos dislipémicos sin indicación de tratamiento farmacológico para las alteraciones lipídicas y/u óseas de la provincia de Granada, España.

4.2.2.2. Muestra

Sujetos que acudieron a la Consulta de Endocrinología del CPE Zaidín y que aceptaron participar voluntariamente firmando el consentimiento informado correspondiente.

4.2.2.3. Criterios de inclusión

● Edades comprendidas entre 30 y 65 años.

● Concentración elevada de lípidos:

TG entre de 150 mg/dL y 350 mg/dL

y/ó

C-LDL entre 130 mg/dL y 220 mg/dL.

4.2.2.4. Criterios de exclusión

- Dislipemia con concentraciones fuera del rango especificado en los criterios de inclusión.
- Pacientes en tratamiento con fármacos con influencia sobre el metabolismo lipídico.
- Pacientes con enfermedad coronaria o equivalentes de riesgo.
- Pacientes con diabetes mellitus
- Pacientes con alteración significativa de la función renal, hepática o intestinal.
- Enfermedad endocrinometabólica no controlada.
- Pacientes con inadecuadas expectativas de cumplimiento y/o colaboración a juicio del investigador.

4.2.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

La toma de muestras se llevó a cabo por el servicio médico de la consulta de Endocrinología del CPE del Zaidín. La sangre se recogió en 5 tubos vacutainer (Sarstedt®) de 7.5 mL especiales para la obtención de suero y plasma. Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 3500 r.p.m. durante 10 minutos y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

4.2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.4.1. Cálculo de las ingestas nutricionales

Las encuestas nutricionales realizadas al principio y al final del estudio fueron analizadas estimándose la ingesta diaria de nutrientes mediante las tablas de composición españolas (*Mataix et al., 1998*).

4.2.4.2. Determinación de ácidos grasos en plasma

El método empleado fue el descrito por Lepage (*Lepage y Roy, 1986*). Éste método presenta la ventaja de realizar la extracción lipídica y la transesterificación de los AGs en una sola etapa. El análisis de los AGs del plasma se realizaron en tubos de ensayo de vidrio Pírex con 200 μ L de plasma a los que se adicionaron 2 mL de una mezcla metanol:tolueno 4:1 (V/V) y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos. A continuación se añadieron lentamente 200 μ L de cloruro de acetilo en agitación continua y campana de extracción de gases. Los tubos se cerraron herméticamente y se incubaron durante 1 h a 100°C en una placa calefactora. Seguidamente se enfriaron en un baño de hielo y se le adicionaron 5 mL de una disolución de carbonato potásico al 6% (P/V). Para finalizar, los tubos se centrifugaron a 1700 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron con ayuda de pipetas Pasteur de vidrio y se introdujeron en viales para su análisis por cromatografía gaseosa. La determinación de los ésteres metílicos de los AGs en plasma se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases con inyector automático, acoplado a un detector de llama (detector FID) en las siguientes condiciones experimentales:

- Fase estacionaria: columna Supelco SPTM 2380 Fused Silica Capillary Column 60m x 0.25 mm x 0.2 μ m.
- Fase móvil: helio purísimo.
- Volumen de inyección: 2 μ L.

- Temperaturas del horno: $T_0 = 60^\circ\text{C}$ (0.5 min), $T_1 = 150^\circ\text{C}$ (rampa $10^\circ\text{C}/\text{min}$, 5 min), $T_2 = 220^\circ\text{C}$ (rampa $2^\circ\text{C}/\text{min}$, 1 min), duración 50.5 minutos
- Temperatura del inyector: 250°C .
- Liner: Split/splitless 2 mm ID, Split: 50%.
- Flujo: 1 mL/min.
- Temperatura del detector: 280°C .
- Gases combustión: aire e hidrógeno.

La identificación cromatográfica de los AGs se realizó también por comparación de los tiempos de retención de los picos con los obtenidos a partir de una solución patrón de 37 ácidos grasos (Sulpeco 37 Component FAME mix, Sigma) (Figura 4.2.2.). La cuantificación se realizó mediante integración de los picos y los resultados se expresaron como tanto por ciento del total de los AGs correspondientes.

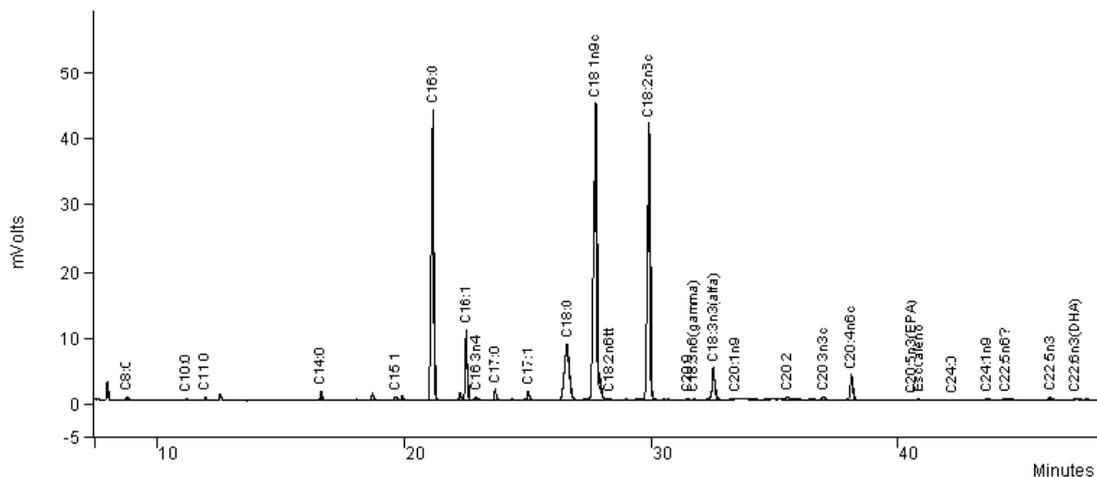


Figura 4.2.2. Cromatograma tipo del perfil de ácidos grasos en plasma.

En la tabla 4.2.3. se muestran los AGs cuantificados en este estudio:

Tabla 4.2.3. Ácidos grasos determinados en plasma.

NOMENCLATURA SISTEMÁTICA	NOMENCLATURA COMÚN
C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1 n-7	Ácido palmitoleico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1 n-9	Ácido oleico
C18:1 n-7	Ácido vacénico
C18:2 n-6	Ácido linoleico
C18:3 n-3	Ácido α -linolénico
C20:4 n-6	Ácido araquidónico
C20:5 n-3	Ácido eicosapentanoico (EPA)
C22:6 n-3	Ácido docosahexanoico (DHA)

C= Carbono

4.2.4.3. Determinación de folato sérico y folato eritrocitario

La concentración de folato sérico y eritrocitario de los sujetos del estudio se llevó a cabo mediante un radioinmunoanálisis empleando el kit comercial *SimulTRAC-SNB* proporcionado por la casa comercial MP Biomedicals® (USA). El fundamento de esta técnica se basó la fijación competitiva de las proteínas respecto a su ligando, por lo que el ácido fólico presente en la muestra del paciente compitió por su ligando con el ácido fólico marcado presente en el reactivo. Por lo tanto, el nivel de radiactividad ligada fue inversamente proporcional a la concentración de folato en la muestra del paciente y, tras la interpolación en la recta patrón, se pudo conocer la concentración de folato sérico. El folato eritrocitario se calculó teniendo en cuenta el hematocrito de cada paciente.

4.2.4.4. Determinación de vitamina B₆ en plasma

Para la detrmnación de la concentración de vitamina B₆ de los sujetos del estudio se utilizó el kit *Vitamin B₆-HPLC* proporcionado por la casa comercial Immundiagnostik[®] (Bensheim, Alemania). La determinación empezó con la precipitación de moléculas de mayor peso molecular mediante centrifugación. El sobrenadante se sometió a una derivatización durante 20 minutos a 60°C, transformándose la vitamina B₆ en un producto fluorescente. La muestra se inyectó en el HPLC y se usó un método isocrático a 30°C empleando una columna de fase reversa. La cuantificación de la vitamina se interpretó por medio de un calibrador.

4.2.4.5. Cálculo del índice de masa corporal

El índice de masa corporal (IMC) fue definido por el cociente entre el peso del individuo en kilogramos y el cuadrado de su talla expresado en metros (*WHO*, 1988). Los rangos de IMC establecidos son:

IMC<20: bajo peso

18<IMC<24.9: peso normal

25<IMC<30: sobrepeso

IMC>30: obesidad

4.2.4.6. Determinación de colesterol total en plasma

La cuantificación de CT se llevó a cabo empleando un kit enzimático proporcionado por la casa comercial BioSystems[®] (Barcelona, España). El método de la determinación de CT está basado en la liberación del colesterol esterificado mediante la enzima colesterol esterasa y la posterior oxidación de éste y el colesterol libre por la colesterol oxidasa. Esta reacción libera agua oxigenada que al reaccionar con 4-aminoantipirina y fenol produce quinonaimina, un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 500 nm (*Allain et al.*, 1974; *Meiattini et al.*, 1978).

Las determinaciones de CT se llevaron a cabo mezclando 10 μ L de plasma con 1 mL del reactivo cuya composición era: tampón PIPES 35 mM, cloruro sódico 0.5 mM, fenol 28 mM, colesterol esterasa 0.2 U/mL, colesterol oxidasa 0.1 U/mL, peroxidasa 0.8 U/mL, 4-aminoantipirina 0.5 mM, (pH7). La mezcla resultante se agitó en vórtex y se incubó durante 5 minutos en un bloque calefactor a 37°C. La absorbancia de la mezcla resultante se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm. Los valores de CT se obtuvieron por comparación de absorbancias con un patrón acuoso de colesterol de 200 mg/dL.

4.2.4.7. Determinación de triglicéridos en plasma

La cuantificación de TG se llevó a cabo empleando un kit enzimático proporcionado por la casa comercial BioSystems® (Barcelona, España). El método de determinación de TG está basado en la hidrólisis de los TG presentes en la muestra por la acción de la lipasa, liberando una molécula de glicerol que en presencia de ATP y de la enzima glicerol quinasa produce glicerol-3-fostato. Éste se oxida por la glicerol-3-fostato oxidasa liberando agua oxigenada, que al reaccionar con 4-aminoantipirina y fenol produce quinonaimina, un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 500 nm (*Bucolo y David, 1973; Fossati y Prencipe, 1982*).

Las determinaciones de TG se llevaron a cabo mezclando 10 μ L de plasma con 1 mL del reactivo cuya composición era: tampón PIPES 45 mM, 4-clorofenol 6 mM, cloruro magnésico 5 mM, lipasa 100 U/mL, glicerol quinasa 1.5 U/mL, glicerol-3-fostato oxidasa 4 U/mL, peroxidasa >0.8 U/mL, 4-aminoantipirina 0.75 mM, ATP 0.9 mM, (pH 7). La mezcla resultante se agitó en vórtex y se incubó durante 5 minutos en un bloque calefactor a 37°C. La absorbancia de la mezcla resultante se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm. Los valores de TGs se obtuvieron por comparación de absorbancias con un patrón acuoso de glicerol equivalente a 200 mg/dL de trioleína.

4.2.4.8. Determinación de colesterol de lipoproteínas de alta densidad en plasma

La cuantificación del C-HDL se llevó a cabo empleando un kit enzimático proporcionado por BioSystems[®] (Barcelona, España). El método está basado en la precipitación de las VLDLs y de las LDLs presentes en la muestra en presencia de fosfotungstato e iones magnesio. El sobrenadante contiene las HDLs, cuyo colesterol se cuantificó espectrofotométricamente (*Grove, 1979; Burstein et al., 1980*).

Las determinaciones de HDL se llevaron a cabo mezclando 200 µL de plasma con 0.5 mL de reactivo precipitante (solución acuosa de fosfotungstato 0.4 mM y cloruro de magnesio 20 mM). La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 50 µL del sobrenadante y se mezclaron con 1 mL de reactivo. La mezcla resultante se agitó en vórtex y se incubó durante 10 minutos en un bloque calefactor a 37°C. La absorbancia de la mezcla resultante se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm. Los valores de HDL se obtuvieron por comparación de absorbancias con un patrón acuoso de colesterol de 15 mg/dL.

4.2.4.9. Cálculo del colesterol de lipoproteínas de baja densidad en plasma

La cuantificación del C-LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald (*Friedewald et al., 1972*), que se empleó siempre para valores de TG menores de 500 mg/dL.

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

4.2.4.10. Determinación de malondialdehído en plasma

El malondialdehído (MDA) es un marcador de peroxidación lipídica en plasma y su determinación se ha llevado a cabo según el método descrito por Fukunaga (*Fukunaga et al., 1998*). Este método se basa en la reacción del MDA que transcurre durante la oxidación lipídica en el plasma con ácido tiobarbitúrico

(TBA) a pH ácido y a alta temperatura. Dicha reacción da lugar a la formación de un compuesto fluorescente que se puede analizar cuantitativamente mediante HPLC.

La determinación de MDA en plasma se llevó a cabo utilizando 20 μL de cada una de las muestras, que se dispusieron en tubos Eppendorf de rosca, a las que se adicionaron 0.5 mL de una disolución al 0.2% de TBA en tampón 2 M de acetato sódico a pH 3.5 y se agitó vigorosamente. La mezcla resultante se incubó durante una hora en un bloque calefactor a 95°C. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron a 10000 r.p.m. durante 2 minutos y a 4°C. A continuación se adicionaron 0.5 mL de un tampón 50 mM de KH_2PO_4 a pH 6.8 y se volvió a centrifugar a 13000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Para finalizar se tomaron 600 μL de sobrenadante y se mezclaron en un vial para HPLC con 600 μL de un tampón 50 mM de KH_2PO_4 a pH 3.5 agitando vigorosamente.

La mezcla se inyectó en un cromatógrafo HPLC con un detector de fluorescencia en las siguientes condiciones experimentales:

- Fase estacionaria: columna LiChroCart 250-4 (Superspher 100 RP-18) 250 x 4.6 mm, 5 μm .
- Fase móvil: 96 % tampón KH_2PO_4 50 mM pH 6.8 con 20% de acetonitrilo (fase A) + 4 % acetonitrilo/agua, 70/30 (fase B); flujo 0.5 mL/min.
- Volumen de inyección: 50 μL .
- Temperatura columna: 40.0 \pm 1.0°C.
- Detector: longitud de onda de medida de fluorescencia: excitación 515 nm/emisión 543 nm; ganancia 10.
- Duración del cromatograma: 12 minutos.
- Modo de medida: áreas.

Para llevar a cabo la cuantificación se preparó una recta con patrones de concentraciones crecientes de MDA: 0.0, 0.1, 0.25, 0.50, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 $\mu\text{mol/L}$. La concentración en la muestra se determinó mediante interpolación del área

correspondiente al pico de MDA en cada una de las muestras en la función de calibración obtenida con los patrones.

4.2.4.11. Determinación de vitamina E en plasma

La determinación de la concentración de vitamina E (α -tocoferol) en plasma se basa en la extracción líquido-líquido del compuesto a partir de la muestra acuosa empleando como disolvente heptano y una posterior etapa de concentración, descrito por Thurnham (*Thurnam et al., 1988*).

La determinación comenzó adicionando 500 μ L de muestra o patrón de Vitamina E de concentración conocida a tubos de ensayo a los que se les añadió 200 μ L de disolución metanólica de estándar interno (0.2 g/L). Se agitó en un vórtex durante un minuto a temperatura ambiente para homogeneizar la muestra/patrón y se extrajo con 5 mL de heptano. Para ello, se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 10 minutos a 1500 g. Se tomó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se llevó a un tubo de ensayo limpio. La extracción se repitió con 2 mL de heptano. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se evaporó el líquido disolvente en "Speed vac" a 45 °C. Por último, se resuspendió en 200 μ L de metanol calidad HPLC y se inyectó 50 μ L tras centrifugar a 14000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente en el HPLC en las siguientes condiciones experimentales:

- Fase estacionaria: Columna LiChroCart 250-4 (Superspher 100 RP-18) 250 x 4.6 mm, 5 μ m.
- Fase móvil (Isocrático): Mezcla 45% AcN / 45% MeOH / 10% CHCl₃ Flujo 1 mL/min.
- Volumen de inyección (μ L): 50 μ L.
 - Profundidad de la aguja: 2 mm.
 - Temperatura de la columna (°C): 45.0 \pm 1.0 °C.
- Detector FLD: longitud de onda de medida de fluorescencia: excitación 295 nm/emisión 330 nm; ganancia 10.

- Duración del cromatograma : 15 minutos .
- Modo de medida: cociente de áreas.

Los resultados se expresaron en miligramos de vitamina E por litro de plasma. Dicha concentración se determina mediante interpolación del cociente de áreas entre analito y patrón interno correspondiente a cada una de las muestras en la función de calibrado obtenida con los patrones de concentración conocida.

4.2.4.12. Determinación de homocisteína en plasma

La concentración de Hcy en plasma fue determinada mediante HPLC con detección de fluorescencia previa derivatización (*Araki y Sako, 1987; Ubbink et al., 1991*). Este método mide los niveles séricos totales de tHcy (libre y unida a proteínas plasmáticas).

El protocolo seguido comienza con la introducción en un tubo de ensayo de vidrio de 300 µL de plasma o del estándar correspondiente y la adición 30 µL de una solución de tri-N-butilfosfina al 10% en dimetilformamida. La mezcla se incubó a 4°C durante al menos 30 minutos para producir la reducción de la Hcy, de sus dímeros (bien dímeros de Hcy ó de Hcy-Cys) y para permitir el desacoplamiento de las proteínas plasmáticas. A continuación se adicionó 300 µL de una solución al 10% de ácido tricloroacético con 1 mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y tras agitación vigorosa se aseguró la precipitación de las proteínas plasmáticas. La muestra se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C y, transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 100 µL del sobrenadante, a la que se le adicionó en continua agitación 20 µL de hidróxido sódico (1.55 M), 250 µL de tampón borato con EDTA y 100µL de disolución de 4-fluoro-7-sulfobenzofurazanato (SBD-F) en tampón borato (1 mg/mL). La mezcla final se incubó durante 1 hora a 60 °C y en oscuridad para favorecer la reducción de la homocisteína y otros tioles plasmáticos. A continuación, se introdujo en un baño de hielo y se filtró a través de filtro de

nylon de 0.22 μm 13 mm de diámetro en viales cromatográficos con inserto, quedando listas para su inyección en un cromatógrafo HPLC con un detector de fluorescencia en las siguientes condiciones experimentales:

- Fase estacionaria: Columna Symmetry C18 250 x 4.6 mm 5 μm de Waters.
- Fase móvil: Gradiente mezcla de un tampón acetato 0.1 M pH = 4.0. (fase A), tampón fosfato 0.1M pH = 6.0. (fase B), MeOH (fase D) y agua milli-Q (fase D).
- Volumen de inyección (μL): 20 μL .
- Profundidad de la aguja: 2 mm.
- Temperatura de la columna ($^{\circ}\text{C}$): 30.0 ± 2.0 $^{\circ}\text{C}$.
- Detector: longitud de onda de medida de fluorescencia: excitación 385 nm/emisión 515 nm; ganancia 10.
- Duración del cromatograma: 15 minutos.
- Modo de medida: áreas.

Los resultados se expresan en $\mu\text{mol/litro}$ de Cys y tHcy en plasma. Dicha concentración se determinó mediante interpolación del área correspondiente a cada una de las muestras en la función de calibrado obtenida con los patrones de concentración conocida.

4.2.4.13. Determinación de moléculas de adhesión vascular en suero

La determinación cuantitativa de VCAM-1 soluble (sVCAM-1) en suero se llevó a cabo mediante reacción de ELISA usando un kit comercial suministrado por Biosource International[®] (California, USA). La determinación se basa en la adhesión de anticuerpos monoclonales frente sVCAM-1 previamente fijados a la placa y que permitió la unión de partículas sVCAM-1 presentes en la muestra (Mason *et al.*, 1993). La adición de conjugado de biotina inmoviliza el complejo antígeno-anticuerpo permitiendo la posterior unión la estreptavidina peroxidasa. Por último el cromógeno permitió dar color a la muestra. La

intensidad de dicho color es proporcional a la concentración de sVCAM-1 presente en la muestra, cuya absorbancia se midió a 450 nm. Para la determinación de la concentración de sVCAM -1 en el plasma se realizó la interpolación de la absorbancia resultante en la recta de calibrado estándar obtenida a partir de patrones de concentración conocida.

4.2.4.14. Determinación de proteína C reactiva en suero

Los niveles de esta proteína son realmente bajos en condiciones en los que no existe un proceso inflamatorio de relevancia clínica, por lo que se recurrió a una técnica de determinación ultrasensible por inmunonefelometría. Para ello se utilizó el kit *CardioPhase hsPCR* proporcionado por la casa comercial Dade Behring Marburg® (Marburg, Alemania). El proceso comenzó cuando las muestras de suero se mezclaron con partículas de poliestireno recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico contra la PCR humana y que originó la formación de agregados. Estos agregados provocaron la dispersión del rayo de luz incidente, cuya intensidad dependió de la concentración de la correspondiente proteína en la muestra. La valoración se hizo por comparación con un estándar de concentración conocida.

4.2.4.15. Determinación de la glucosa plasmática

La cuantificación de glucosa se llevó a cabo empleando un kit enzimático proporcionado por la casa comercial BioSystems® (Barcelona, España). El método de la determinación de glucosa está basado en la liberación de glucónico mediante la enzima glucosa esterasa. Esta reacción libera agua oxigenada que al reaccionar con 4-aminoantipirina y fenol produce quinonaimina mediante la enzima peroxidasa, un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 500 nm (Trinder, 1969).

Las determinaciones de glucosa se llevaron a cabo mezclando 10 µL de plasma con 1 mL del reactivo y la mezcla resultante se agitó en vórtex y se incubó durante 5 minutos en un bloque calefactor a 37°C. La absorbancia de la mezcla

resultante se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm. Los valores de glucosa se obtuvieron por comparación de absorbancias con un patrón acuoso de glucosa de 100 mg/dL.

4.2.4.16. Determinación de las transaminasas

La determinación de la alanina aminotransferasa (ALT o GPT) se realizó mediante el kit proporcionado por la casa comercial BioSystems[®] (Barcelona, España). El método de la determinación de glucosa está basado en la catalización por la GPT en la transferencia del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato, formando piruvato y glutamato. La concentración catalítica se determinó empleando la reacción acoplada de la lactato deshidrogenasa, a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm (SEQC, 1987).

La aspartato aminotransferasa (AST o GOT) se determinó de una manera similar pero mediante el proceso que se produjo cuando la GOT catalizó la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La concentración catalítica se determinó, empleando la reacción acoplada de la malato deshidrogenada, a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm (SEQC, 1987).

En cambio, la gamma-glutamilttransferasa o GGT se basó en la transferencia del grupo γ -glutamilo de la γ - glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina mediante la catalización de la GGT, liberando 3-carboxi-4-nitroanilina. La concentración catalítica se determinó a partir de la velocidad de formación de la 3-carboxi-4- nitroanilina (*Beleta y Gella, 1990*).

4.2.4.17. Determinación de 25-hidroxivitamina D en suero

La concentración de 25-hidroxivitamina D de los sujetos del estudio se usó un método radioisotópico mediante el kit de Biosource Internacional[®] (California, USA) para esta vitamina. El método seguido fue descrito por Preece (*Preece et al., 1975*) y comenzó con la extracción de la vitamina D de las muestras mediante la adición de acetonitrilo y la reconstitución de patrones y controles

lío-filizados con agua destilada. La adición del trazador y del tampón de incubación dio paso a un período de incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Tras el lavado se llevó a un contador gamma durante un minuto. La concentración en la muestra se determinó mediante interpolación de cada uno de los datos obtenidos por el contador de cada una de las muestras en la función de calibración obtenida con los patrones.

4.2.4.18. Determinación de calcio en suero

La determinación de calcio se llevó a cabo empleando un kit enzimático proporcionado por la casa comercial BioSystems® (Barcelona, España). El calcio presente en la muestra reaccionó con el azul de metiltimol en medio alcalino y originó un complejo coloreado que pudo cuantificarse por espectrofotometría a 610 nm (*Barnett et al., 1973*).

4.2.4.19. Determinación de osteoprotegerina en plasma

La determinación cuantitativa de la OPG soluble en plasma se llevó a cabo mediante reacción de ELISA usando un kit comercial suministrado por Biomedica-Gruppe® (Viena, Austria). La determinación se basó en la adhesión de anticuerpos monoclonales frente OPG previamente fijados a la placa y que permitió la unión de partículas OPG presentes en la muestra (*Lipton et al., 2002; Jung et al., 2001*). La adición de conjugado de biotina inmovilizó el complejo antígeno-anticuerpo permitiendo la unión con la estreptavidina peroxidasa, lo que originó un compuesto coloreado siendo intensidad de dicho color proporcional a la concentración de OPG presente en la muestra, cuya absorbancia se midió a 450 nm. Para la determinación de la concentración de OPG en el plasma se realizó la interpolación de la absorbancia resultante en la recta de calibrado estándar obtenida a partir de patrones de concentración conocida.

4.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El ensayo nutricional contó antes de ser realizado con un informe favorable del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada y en todo momento se realizó bajo condiciones de respeto a los derechos fundamentales de la persona y a los postulados éticos que afectan a la investigación biomédica con seres humanos, siguiéndose a estos efectos los contenidos en la normativa del Real Decreto 223/2004, el Convenio de Oviedo y la Declaración de Helsinki. Los voluntarios firmaron antes de su inclusión en el estudio un consentimiento informado, libremente expresado, en los términos del artículo 12 del Real Decreto 561/1993 de 16 de abril.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo empleando el programa SPSS (versión 12.0, Chicago, EEUU). Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media. Valores de P menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

La normalidad de los datos se determinó empleando el test de Kolmogorov-Smirnov. Cuando la distribución de los datos se alejó de la normalidad (P menor a 0.05 en el test de Kolmogorov-Smirnov), las comparaciones de los grupos al inicio del estudio se llevaron a cabo empleando el test de Mann-Whitney. En este caso, las diferencias estadísticas dentro de cada grupo de ensayo (intragrupo) y entre los 2 grupos de ensayo (intergrupo) se llevaron a cabo empleando el test de Wilcoxon y test de Kruskal-Wallis, respectivamente. Para determinar los tiempos de estudio en el que los valores de los parámetros entre los grupos mostraban diferencias significativas se aplicó el test de Mann-Whitney.

Cuando los datos presentaban una distribución gaussiana, las comparaciones de los grupos de inicio se llevaron a cabo empleando un test “t” de muestras independientes. El efecto longitudinal de cada producto lácteo dentro de cada grupo (diferencia intragrupo) a los diferentes tiempos de estudio se analizó mediante ANOVA de una vía de muestras repetidas, seguida de un test “post-hoc” de Tukey. Las diferencias estadísticas producidas por el consumo de cada producto lácteo (efecto intergrupo) se ensayaron empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas. La relación entre el incremento de la concentración de los nutrientes en el plasma y los cambios en los parámetros del estudio se analizaron usando un test de correlaciones bivariadas de Pearson.

5

Resultados

5.1. CAPTACIÓN, SEGUIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO

El período de captación de los sujetos se llevó a cabo durante 4 meses (entre febrero y mayo) y se preseleccionaron 94 pacientes siguiendo los criterios de inclusión descritos en el apartado 4.2.2.3. De los cuáles, 8 sujetos fueron excluidos por padecer diabetes tipo 2 y 7 por padecer algún tipo de ECV. Los restantes 79 pacientes fueron aleatoriamente asignados a los 2 grupos de intervención: 40 se incluyeron en el grupo control (C) que consumieron 500 mL/día de leche semidesnatada y 39 se incluyeron en el grupo enriquecido (E) que consumieron 500 mL/día del preparado lácteo enriquecido con AGPIs-CL omega-3, ácido oleico y vitaminas. Transcurridos 3 meses después del inicio del estudio, 3 sujetos causaron baja (2 del grupo C y 1 del grupo E) por incumplimiento en la pauta de consumo de los productos y una paciente del grupo C fue excluida por embarazo. Por lo tanto, el estudio continuó con 75 pacientes (37 pacientes del grupo C y 38 del grupo E), 60 mujeres y 15 varones, que permanecieron durante los 6 meses de intervención, cómo se muestra en el siguiente diagrama del desarrollo de la intervención nutricional (figura 5.1.1.).

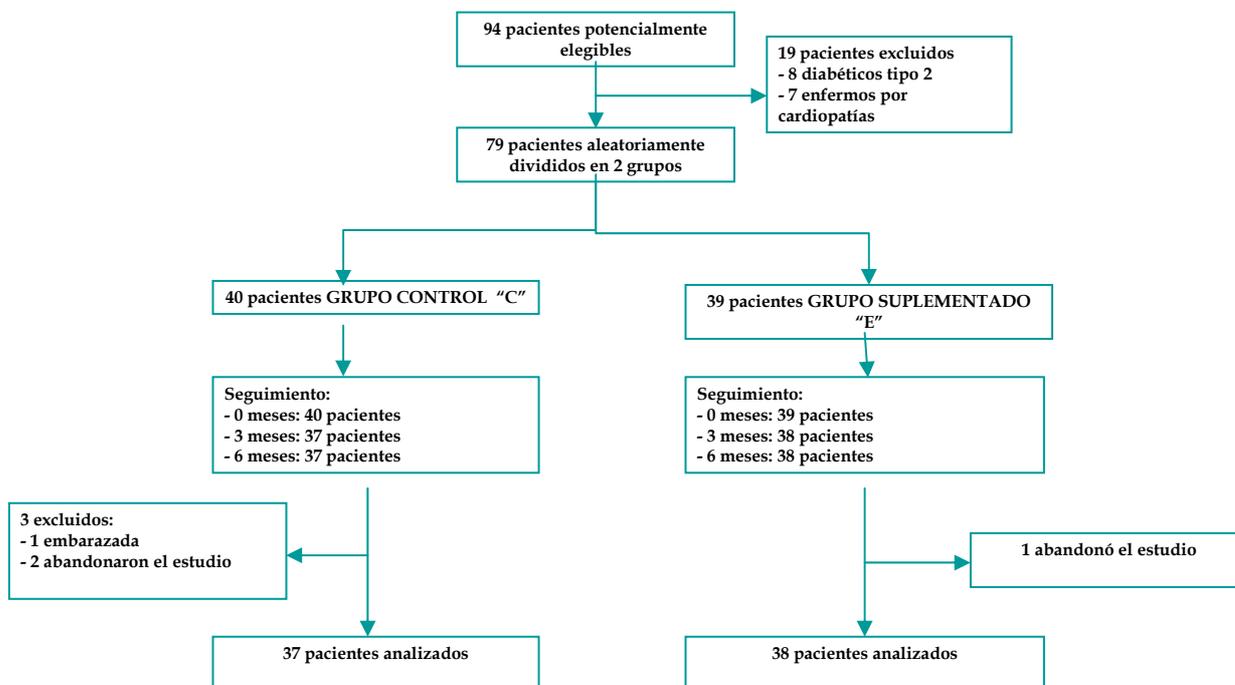


Figura 5.1.1. Captación y seguimiento de los sujetos del estudio.

Las características basales de los 75 pacientes que completaron el estudio se muestran en la tabla 5.1.1.

Tabla 5.1.1. Características de los sujetos de los grupos control y enriquecido al inicio del estudio.

CARACTERÍSTICA	GRUPO CONTROL "C"	GRUPO ENRIQUECIDO "E"
NÚMERO DE SUJETOS "n"	37	38
"n" Mujeres (%)	31 (84%)	30 (79%)
"n" Hombres (%)	6 (16%)	8 (11%)
EDAD (años)	47 ± 10	51 ± 10
INDICE DE MASA CORPORAL "IMC" (kg/m ²)	31.7 ± 6.9	30.6 ± 6.3
18 < IMC < 25 "normalidad" (%)	13	18
25 < IMC < 30 "sobrepeso" (%)	30	34
IMC > 30 "obesidad" (%)	57	47
FUMADORES (%)	8	18
ACTIVIDAD FÍSICA		
Sedentarismo (%)	13	16
Esporádica: 1 ó 2 días/semana (%)	27	18
Regular: 3 ó + días/semana (%)	60	66
ANTECEDENTES FAMILIARES		
Diabetes tipo 2 (%)	49	40
Hipertensión (%)	49	47
Enfermedad cardiovascular (%)	32	32
Dislipemia (%)	35	32

Los resultados de la edad y el índice de masa corporal se expresan como media ± EEM.

El cumplimiento de la ingesta de los preparados lácteos fue controlado mediante la entrega a domicilio de los mismos, un seguimiento telefónico mensual y la recogida de los envases consumidos. El análisis de las encuestas nutricionales realizadas al inicio (semana 0) y al final del estudio (semana 22) mostraron que los pacientes del estudio no modificaron de forma significativa su patrón dietético (tabla 5.1.2.).

Tabla 5.1.2. Cálculo de la ingesta diaria de nutrientes al inicio y en la semana 22 del estudio.

NUTRIENTE	Semana 0		Semana 22	
	CONTROL	ENRIQUECIDO	CONTROL	ENRIQUECIDO
Proteínas (g)	79.3 ± 1.7	80.1 ± 2.1	78.3 ± 1.6	81.2 ± 2.7
Carbohidratos (g)	207.2 ± 4.8	201.2 ± 5.2	204.3 ± 3	202.2 ± 3.1
Grasa total (g)	76.5 ± 4	80.2 ± 3.2	80.1 ± 2.1	78.9 ± 4.1
Calcio (mg)	802.4 ± 8.1	810.2 ± 7.3	802 ± 9.5	805 ± 7.4
Hierro (mg)	9.8 ± 0.8	9.5 ± 0.6	10.1 ± 0.3	9.4 ± 0.5
Vitamina A (µg)	840 ± 90	829 ± 53	810 ± 57	818 ± 34
Vitamina B6 (mg)	1.62 ± 0.11	1.50 ± 0.20	1.66 ± 0.10	1.42 ± 0.23
Vitamina B12 (µg)	8.4 ± 0.65	7.9 ± 0.41	9.1 ± 0.69	8.3 ± 0.56
Ácido fólico (µg)	198.4 ± 5.1	202 ± 6.7	196 ± 4.8	201 ± 5.5
Vitamina C (mg)	134.1 ± 12.4	120 ± 10.2	124.9 ± 10.2	131 ± 13.6
Vitamina D (µg)	3.2 ± 0.14	2.9 ± 0.09	3.4 ± 0.44	2.8 ± 0.2
Vitamina E (mg)	6.8 ± 0.65	6.4 ± 0.43	7.4 ± 0.42	6.8 ± 0.31

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

El consumo diario del producto lácteo enriquecido conteniendo los nutrientes ya descritos, originó un incremento de las concentraciones plasmáticas de los mismos. El aumento de estos biomarcadores de ingesta mostró el cumplimiento de los protocolos de consumo del producto y una incorporación efectiva de los nutrientes al organismo.

5.2. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL PLASMA

Las cantidades de ácido oleico, DHA y EPA contenidos en 500 mL del preparado lácteo enriquecido fueron 5.17 g, 0.14 g y 0.20 g, respectivamente, mientras que en la leche semidesnatada del estudio la cantidad de ácido oleico fue de 2.05 g y no se detectó EPA ni DHA. El consumo de los productos lácteos del estudio modificó significativamente el perfil de los ácidos grasos del plasma de los pacientes que consumieron el producto enriquecido.

Respecto a los AGSs totales, se encontraron diferencias entre los grupos C y E a los 3 meses ($P=0.010$), pero no a los 6 meses. A tiempo 3 se observaron diferencias en la proporción de ácido palmítico entre los 2 grupos ($P=0.004$), y un incremento en el grupo E respecto al tiempo 0 ($P=0.022$) (tabla 5.2.1.).

Tabla 5.2.1. Ácidos grasos saturados plasmáticos (expresados como porcentaje del total de ácidos grasos).

% ÁCIDOS GRASOS	GRUPO	TIEMPO (meses)		
		0	3	6
Saturados totales	C	29.14 ± 0.36	29.23 ± 0.35	29.53 ± 0.45
	E	29.13 ± 0.56	28.06 ± 0.29 ¥	28.64 ± 0.46
Ácido palmítico	C	20.37 ± 0.37	20.62 ± 0.33	20.62 ± 0.38
	E	20.02 ± 0.35	19.34 ± 0.29 * ¥	19.85 ± 0.40

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Significación intergrupo respecto al control (¥ $P < 0.05$, ¥¥ $P < 0.01$, ¥¥¥ $P < 0.001$).

Los AGMIs totales no experimentaron cambios a lo largo del estudio en ninguno de los grupos. Se encontró que las concentraciones plasmáticas de ácido oleico de ambos grupos partían de valores iniciales significativamente diferentes (grupo E vs grupo C, $P=0.014$) como resultado de la aleatorización. Se observó un incremento del 6% de las cantidades plasmáticas de ácido oleico en

el grupo enriquecido a los 3 meses ($P=0.030$) y a los 6 meses ($P=0.05$) (figura 5.2.2.).

Tabla 5.2.2. Ácidos grasos monoinsaturados plasmáticos (expresados como porcentaje del total de ácidos grasos).

% ÁCIDOS GRASOS	GRUPO	TIEMPO (meses)		
		0	3	6
Monoinsaturados totales	C	30.10 ± 0.58	29.56 ± 0.48	29.33 ± 0.51
	E	28.51 ± 0.63	29.26 ± 0.69	29.44 ± 0.79
Ácido oleico	C	25.94 ± 0.56	25.21 ± 0.41	25.28 ± 0.48
	E	24.05 ± 0.51 ¥	25.53 ± 0.64 *	25.48 ± 0.73 *

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Significación intergrupo respecto al control (¥ $P < 0.05$, ¥¥ $P < 0.01$, ¥¥¥ $P < 0.001$).

No se detectaron variaciones significativas en el perfil de los diferentes AGPIs del grupo C analizados durante el transcurso del estudio (tabla 5.2.3.). En el grupo E no se observaron cambios significativos en los AGPIs totales, en el ácido α -linolénico y en el ácido araquidónico. Respecto al ácido linoleico, se encontraron diferencias entre ambos grupos a tiempo 0 ($P=0.001$) y se observó una reducción de este ácido graso en el grupo E a los 3 meses ($P=0.001$) y a los 6 meses ($P=0.000$) (tabla 5.2.3.)

Por otro lado, las cantidades plasmáticas de DHA y EPA del grupo E se incrementaron en un 11% ($P=0.020$) y un 36% ($P=0.001$) a los 3 meses y en un 18% ($P=0.000$) y un 56% ($P=0.000$) a los 6 meses de consumo del producto, respectivamente (tabla 5.2.3.).

Tabla 5.2.3. Ácidos grasos poliinsaturados plasmáticos (expresados como porcentaje del total de ácidos grasos).

% ÁCIDOS GRASOS	GRUPO	TIEMPO (meses)		
		0	3	6
Poliinsaturados totales	C	40.74 ±0.78	41.26 ±0.66	41.41 ±0.72
	E	42.96 ±0.87	42.68 ±0.78	41.65 ±0.92
Ácido linoleico	C	28.03 ±0.76	28.10 ±0.62	28.56 ±0.74
	E	31.41 ±0.65 ¥¥	29.44 ±0.72 ***	28.87 ±0.71 ***
Ácido α-linolénico	C	0.318 ±0.049	0.314 ±0.046	0.335 ±0.054
	E	0.360 ±0.060	0.409 ±0.067	0.365 ±0.048
AA	C	6.86 ±0.27	6.93 ±0.24	6.76 ±0.27
	E	6.81 ±0.25	6.71 ±0.20	6.52 ±0.23
EPA	C	0.922 ± 0.120	1.059 ±0.111	1.013 ±0.119
	E	0.864 ± 0.065	1.176 ± 0.058 ***	1.344 ± 0.106 ¥ ***
DHA	C	2.475 ± 0.137	2.614± 0.154	2.505 ±0.145
	E	2.369 ± 0.091	2.645 ± 0.093 *	2.794 ± 0.123 ***

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001). AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico.

Las variaciones encontradas de los AGs del plasma más relevantes del grupo E se muestran en la figura 5.2.1.

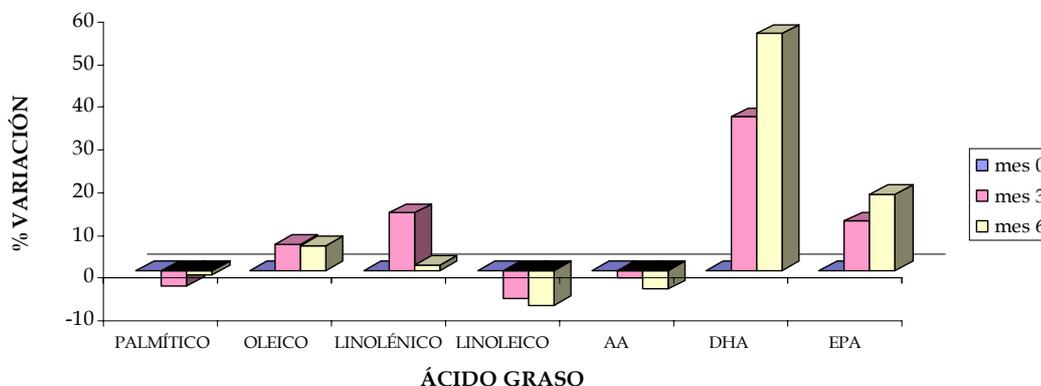


Figura 5.2.1. Variación promedio los ácidos grasos del plasma más importantes del grupo que consumió el producto enriquecido (expresado en porcentaje).

Se analizó la relación ácidos grasos de la familia omega-3/ ácidos grasos de la familia omega-6 (ratio n-3/n-6) y la relación ácido araquidónico/ácido eicosapentaenoico (ratio AA/EPA), ambos sustratos de las familias de AGs n-6 y n-3, respectivamente para la producción de eicosanoides (tabla 5.2.4).

Tabla 5.2.4. Ratios relacionados con los ácidos grasos polinsaturados.

RATIO	GRUPO	TIEMPO (meses)		
		0	3	6
n3/n6	C	0.155 ± 0.0065	0.162 ± 0.006	0.161 ± 0.0095
	E	0.142 ± 0.0065	0.168 ± 0.007 ***	0.177 ± 0.009 ***
AA/EPA	C	9.594 ± 1.021	9.420 ± 1.504	10.637 ± 1.750
	E	9.546 ± 0.987	6.209 ± 0.355 *** ¥	5.878 ± 0.487 *** ¥

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P < 0.05, ¥¥ P < 0.01, ¥¥¥ P < 0.001).

En el grupo E de la intervención se observó un incremento en el ratio n-3/n-6 del 18% y el 25% a los 3 y 6 meses respecto al tiempo 0, respectivamente ($P=0.000$). En cambio, el ratio AA/EPA disminuyó en un 35% en el grupo E a los 3 meses ($P=0.001$) y un 38% al final del estudio ($P=0.000$). Estas diferencias fueron significativas respecto al grupo control a los 3 meses ($P=0.014$) y 6 meses ($P=0.011$) (figura 5.2.2). El grupo C no mostró variaciones significativas en estos ratios durante la intervención.

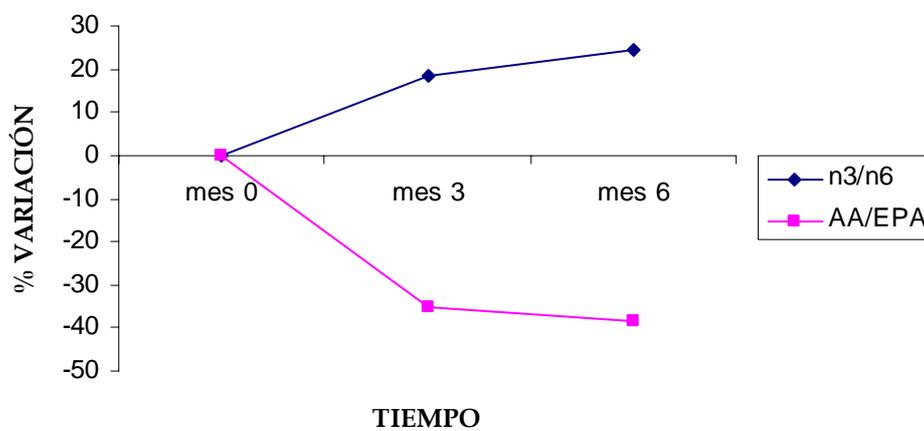


Figura 5.2.2. Variación del ratio n3/n6 y del ratio AA/EPA de los pacientes del grupo enriquecido (expresado en porcentaje).

5.3. VITAMINAS DEL GRUPO B

Los pacientes participantes en la intervención no presentaron deficiencia al inicio del estudio de ninguna de las vitaminas del grupo B analizadas y tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores iniciales de partida entre los 2 grupos de intervención. Las cantidades de ácido fólico y vitamina B₆ contenidas en 500 mL del producto enriquecido fueron de 150 µg y 1.5 mg, respectivamente. El consumo del producto lácteo enriquecido produjo un incremento del folato sérico de un 41.5% a los 3 meses (P=0.000) y en un 81.6% a los 6 meses (P= 0.000). Además, estas diferencias fueron significativas respecto al grupo C a los tiempos T3 y T6 (P= 0.000) (tabla 5.3.1.). El folato eritrocitario también aumentó un 32.7% (P=0.000) en el grupo E al final de la intervención (tabla 5.3.1.), existiendo diferencias con el grupo C a los 6 meses, pero no a los 3 meses.

Tabla 5.3.1. Vitaminas plasmáticas del grupo B.

VITAMINAS	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
FOLATO SÉRICO (µg/L)	C	8.69 ± 0.46	7.34 ± 0.32 **	7.57 ± 0.45 *
	E	9.74 ± 0.72	13.78 ± 0.69 *** ¥¥¥	17.69 ± 0.93 *** ¥¥¥
FOLATO ERITROCITARIO (µg/L)	C	552.21 ± 24.26	548.67 ± 25.88	493.80 ± 22.72
	E	543.80 ± 36.96	608.85 ± 29.30	721.68 ± 27.28 *** ¥¥¥
VITAMINA B ₆ (µg/L)	C	14.24 ± 1.47	13.24 ± 0.97	14.12 ± 1.16
	E	17.92 ± 2.04	26.29 ± 2.65 *** ¥¥¥	24.52 ± 2.03 *** ¥¥¥

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Valores de referencia en adultos: folato sérico (2.2-17 µg/L), folato eritrocitario (500-700 µg/L), vitamina B₆ (4-18 µg/L).

La concentración plasmática de vitamina B₆ en el grupo E se incrementó en un 47% a los 3 meses (P= 0.000) y en un 37% a los 6 meses del estudio (P=0.003) respecto al tiempo 0 (tabla 5.3.1.). Además, se observaron diferencias respecto al grupo C a los 3 meses y a los 6 meses (T3 y T6, P= 0.000).

Los porcentajes de los incrementos de cada una de las vitaminas plasmáticas en el grupo E durante el periodo de intervención se muestran en la figura 5.3.1.

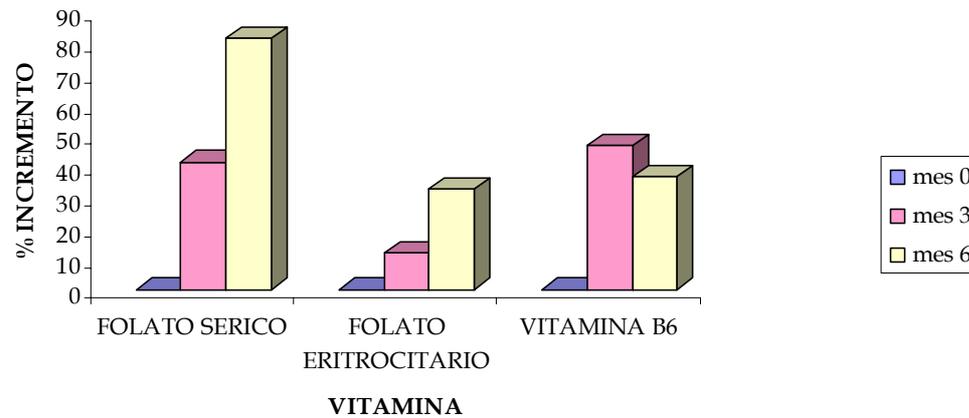


Figura 5.3.1. Incrementos en la concentración de vitaminas plasmáticas del grupo B a lo largo del estudio del grupo enriquecido (expresados en porcentaje).

PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

5.4. INDICE DE MASA CORPORAL

Los valores medios iniciales de IMC de los pacientes de ambos grupos se encontraban en el intervalo de obesidad (IMC>30). El IMC de los pacientes a lo largo del estudio disminuyó de manera significativa en el grupo E a los 3 meses (P=0.020) y en el grupo C a los 3 meses (P= 0.009) y al final del estudio (P=0.014) (tabla 5.4.1.).

Tabla 5.4.1. Índice de masa corporal.

	GRUPO	Tiempo		
		0	3	6
ÍNDICE DE MASA CORPORAL	C	32.02 ± 1.16	31.19 ± 1.12 **	31.18 ± 1.06 *
	E	30.23 ± 0.97	29.71 ± 1.01*	29.79 ± 1.05

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

5.5. COLESTEROL TOTAL, COLESTEROL LDL, COLESTEROL HDL Y TRIGLICÉRIDOS EN PLASMA

El 59% de los pacientes del estudio tenían concentraciones iniciales de CT mayores a 200 mg/dL y C-LDL mayor de 130 mg/dL, el 9% padecían una hipertrigliceridemia aislada (TG mayor de 150 mg/dL) y el 32% de los sujetos presentaban dislipemia mixta (TG mayor de 150 mg/dL y CT mayor de 200 mg/dL). El consumo de la leche control no modificó significativamente las concentraciones plasmáticas de TG durante el periodo de intervención. En

cambio, el grupo que consumió el preparado enriquecido experimentó un descenso de sus valores de TG del 10.6% (P=0.050) a los 6 meses (tabla 5.5.1.).

Respecto al CT, no se observaron variaciones en el grupo control mientras que el grupo E experimentó una disminución del 9.8% (P=0.005) a los 6 meses.

Tabla 5.5.1. Composición lipídica en plasma.

	GRUPO	TIEMPO (meses)		
		0	3	6
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	C	148.8 ± 11.2	154.6 ± 11.2	164.2 ± 17.1
	E	130.5 ± 7.3	121.4 ± 8	116.7 ± 6.1 *
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	C	217.00 ± 4.37	217.63 ± 4.89	216.07 ± 3.68
	E	234.19 ± 3.85	218.07 ± 4.64	211.22 ± 3.96 **
COLESTEROL LDL (mg/dL)	C	138.6 ± 6.8	140.7 ± 6.8	135.8 ± 5.4
	E	156.7 ± 5.4 ¥	143.4 ± 6.3	136.7 ± 6 **
COLESTEROL HDL (mg/dL)	C	50.69 ± 2.03	48.77 ± 1.86	51.94 ± 1.99
	E	51.51 ± 2.29	50.06 ± 2.53	51.01 ± 2.42
RATIO CT/HDL	C	4.59 ± 0.23	4.53 ± 0.21	4.28 ± 0.19
	E	4.60 ± 0.18	4.59 ± 0.18	4.43 ± 0.19

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Valores de referencia para adultos: TG (50-150 mg/dL), CT (120-220 mg/dL), C-LDL (50-150 mg/dL), C-HDL (45-65 mg/dL).

Respecto al C-LDL, los grupos de intervención mostraron valores significativamente diferentes al inicio del estudio. No se observaron cambios en el grupo C pero si en el grupo E, que mostró un descenso del 12.8 % (P=0.003) a los 6 meses. Ninguno de los dos grupos experimentó cambios en la concentración plasmática de C-HDL a lo largo del estudio. Se determinó la relación colesterol total/colesterol HDL en los dos grupos de intervención y ninguno de los dos grupos sufrió diferencias significativas.

Las variaciones de los parámetros lipídicos analizados se representan en las siguientes figuras (figura 5.5.1., figura 5.5.2., figura 5.5.3. y figura 5.5.4.):

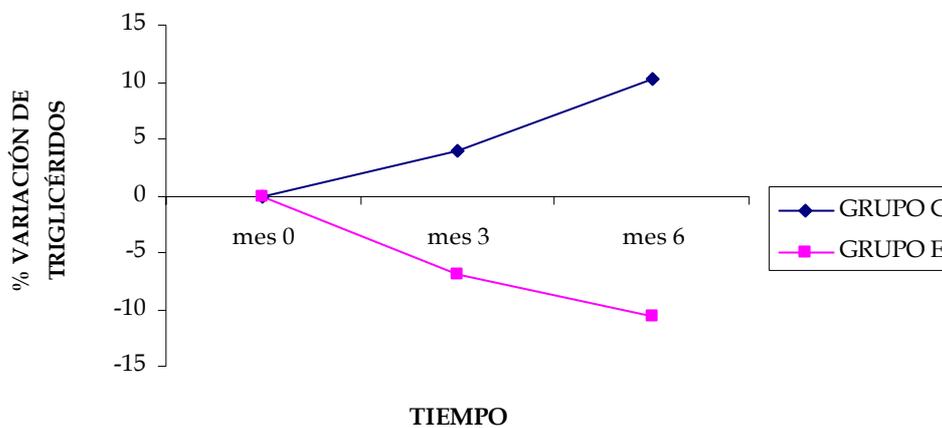


Figura 5.5.1. Variación observada de triglicéridos plasmáticos a los 3 y 6 meses de intervención respecto a los 0 meses (expresada en porcentaje).

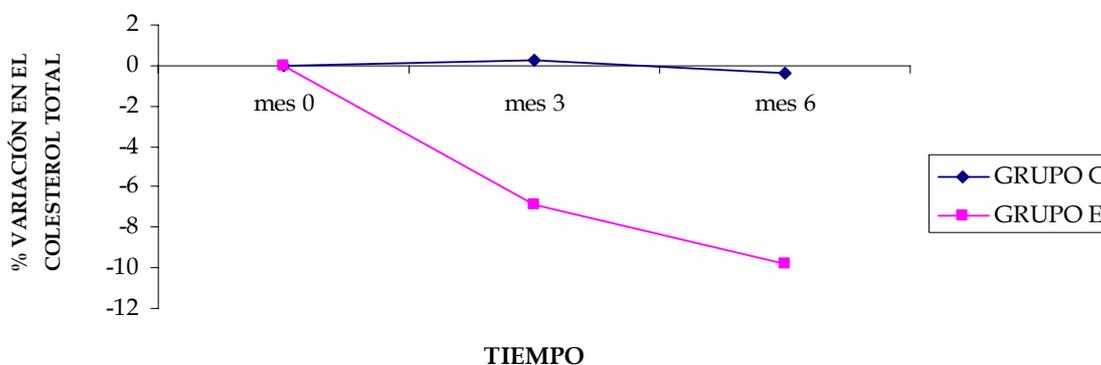


Figura 5.5.2. Variación observada de colesterol plasmático a los 3 y 6 meses de intervención respecto a los 0 meses (expresada en porcentaje).

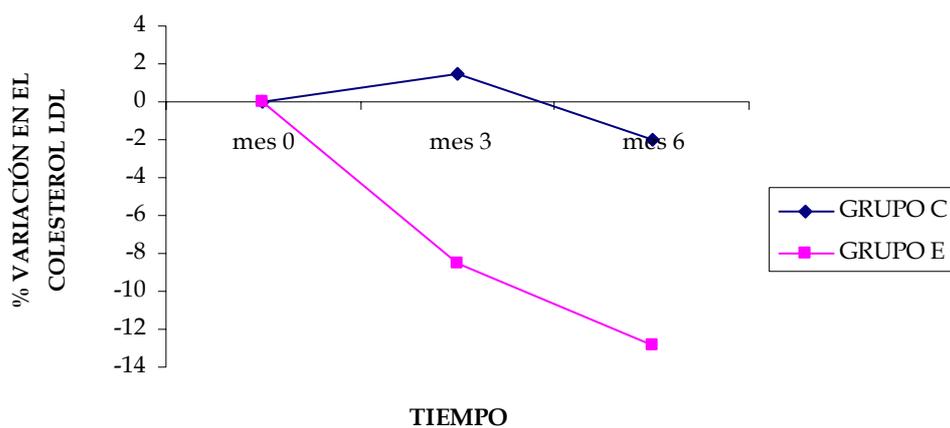


Figura 5.5.3. Variación observada de colesterol LDL a los 3 y 6 meses de intervención respecto a los 0 meses (expresada en porcentaje).

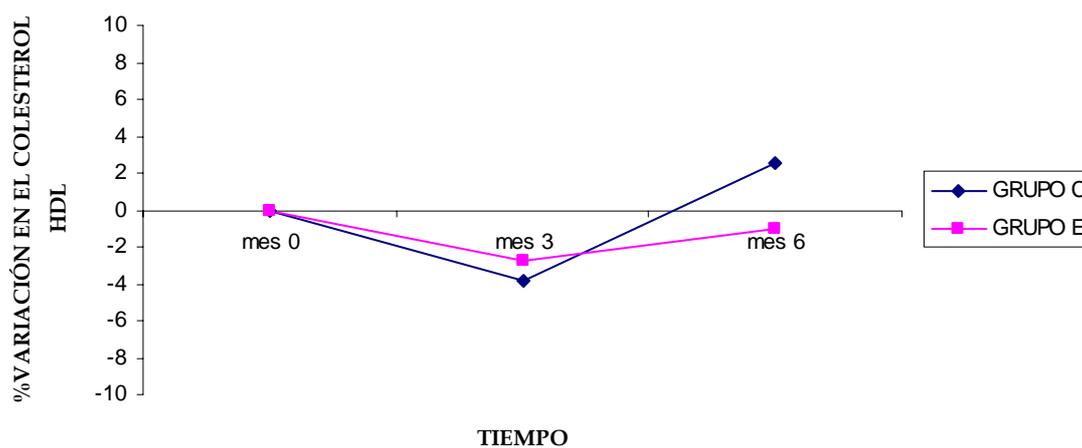


Figura 5.5.4. Variación observada de colesterol HDL a los 3 y 6 meses de intervención respecto a los 0 meses (expresada en porcentaje).

En las tablas 5.5.2., 5.5.3 y 5.5.4 están clasificados las concentraciones de lípidos según los criterios la NCEP (2002) y se puede observar la evolución de cada grupo a lo largo del estudio.

Tabla 5.5.2. Concentraciones plasmáticas de colesterol total de los pacientes clasificados según la NCEP (2002).

COLESTEROL TOTAL	GRUPO	TIEMPO 0	TIEMPO 3	TIEMPO 6
LIMITE DESEABLE (<200)	C (n=12)	177 ± 6.3	208.6 ± 20.2	216 ± 17.5
	E (n=8)	179.7 ± 8.7	178.3 ± 12.4	175.5 ± 12.7
LIMITE ALTO (200-239)	C (n=15)	215.6 ± 3	209.5 ± 9.6	203.9 ± 8.7
	E (n=16)	216.2 ± 3.4	208 ± 12.6	216.3 ± 7.7
ALTO (>239)	C (n=10)	266.6 ± 12.1	232.1 ± 16.8	220.9 ± 11.6
	E (n=14)	273.2 ± 6.3	230.5 ± 11	223.8 ± 10.4

Los resultados se expresan como media ± EEM. Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Tabla 5.5.3. Concentraciones plasmáticas de colesterol LDL de los pacientes clasificados según la NCEP (2002).

COLESTEROL LDL	GRUPO	TIEMPO 0	TIEMPO 3	TIEMPO 6
ÓPTIMO (<100)	C (n=5)	80.5 ± 8.8	120.6 ± 9	123.9 ± 17.9
	E (n=2)	86.6 ± 14.8	78.8 ± 10	88.5 ± 39
LIMITE BAJO (<100-129)	C (n=13)	116.7 ± 2	128 ± 13.1	118 ± 6.8
	E (n=3)	125.6 ± 2.3	130.8 ± 13.6	123.4 ± 23.3
LIMITE ALTO (130-159)	C (n=7)	141.9 ± 3.1	135.5 ± 12.9	137.3 ± 9.8
	E (n=12)	139.5 ± 1.6	136.5 ± 6.4	135.2 ± 7.7
ALTO (>160-189)	C (n=10)	173.7 ± 3.7	160.5 ± 12.7	151.9 ± 9.3
	E (n=14)	166.3 ± 3.3	155.4 ± 12.6	143.4 ± 11.1
MUY ALTO (>190)	C (n=2)	238.8 ± 21.9	196.7 ± 25.2	197.4 ± 23.2
	E (n=7)	206.2 ± 7	150.3 ± 23.2	164.8 ± 16.5

Los resultados se expresan como media ± EEM. Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Tabla 5.5.4. Concentraciones plasmáticas de triglicéridos de los pacientes clasificados según la NCEP (2002).

TRIGLICERIDOS	GRUPO	TIEMPO 0	TIEMPO 3	TIEMPO 6
NORMAL (<150)	C (n=20)	78.7 ± 6	94.6 ± 7	99 ± 11
	E (n=27)	97.7 ± 5.8	91 ± 6.1	95 ± 6.9
LEVEMENTE ELEVADOS (150-199)	C (n=9)	176.8 ± 5.6	208.9 ± 31.1	175.8 ± 21.7
	E (n=6)	176.7 ± 6.6	188.2 ± 32.4	173.2 ± 17.3
ELEVADOS (200-499)	C (n=8)	292.8 ± 23.1	245.3 ± 33.4	314.1 ± 45.6
	E (n=5)	252 ± 23.7	205.8 ± 49.1	166.6 ± 34.2

Los resultados se expresan como media ± EEM. Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

5.6. PARÁMETROS DE OXIDACIÓN PLASMÁTICA

Se investigaron los efectos producidos por el consumo de los productos lácteos en la oxidación del plasma para excluir la posibilidad de la presencia de efectos no deseables producidos por la ingesta grasa poliinsaturada (EPA y DHA) adicionada al preparado lácteo enriquecido. No se observaron cambios significativos en la concentración de MDA en el plasma del grupo E, aunque sí existió una disminución no significativa del 5% (P=0.349) a los 6 meses. En el grupo C se observó un aumento significativo del MDA plasmático del 15% a los 3 meses, pero descendió a los 6 meses (tabla 5.6.1.).

Los 7.5 mg de vitamina E añadida al producto lácteo enriquecido incrementó las concentraciones vitamina E en plasma en un 14.8 % a los 6 meses (P=0.107) en el grupo E, existiendo diferencias significativas respecto al grupo C (P=0.039) (tabla 5.6.1.).

Tabla 5.6.1. Marcadores de oxidación plasmática.

	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
MALONDIALDEHIDO ($\mu\text{mol/L}$)	C	0.900 \pm 0.060	1.037 \pm 0.067 *	0.979 \pm 0.070
	E	0.950 \pm 0.061	0.944 \pm 0.061	0.901 \pm 0.060
VITAMINA E (mg/L)	C	12.087 \pm 1.031	11.734 \pm 0.733	10.877 \pm 0.629
	E	11.433 \pm 0.908	11.848 \pm 0.762	13.120 \pm 0.876 ¥
RATIO VITAMINA E/ COLESTEROL TOTAL	C	5.680 \pm 0.513	5.586 \pm 0.414	5.200 \pm 0.334
	E	4.956 \pm 0.383	5.421 \pm 0.313 **	6.375 \pm 0.440 * ¥

Los resultados se expresan como media \pm EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Valores de referencia: MDA (0.700-1.240 $\mu\text{mol/L}$), vitamina E (5-21 mg/L), vitamina E/CT (5.2).

Cuando se expresó la concentración de vitamina E en función de los valores de CT (ratio vitamina E/CT), se observó un claro incremento de este ratio en el grupo E a los 3 meses (P= 0.009) y a los 6 meses (P=0.029) y también fue diferente respecto al grupo control al final de estudio (P= 0.037) (tabla 5.6.1.).

5.7. HOMOCISTEINA PLASMÁTICA

Los sujetos del estudio mostraron concentraciones plasmáticas de homocisteína comprendidas entre 7-9 $\mu\text{mol/L}$ al inicio del estudio, no superando ninguno de ellos concentraciones superiores a 15 $\mu\text{mol/L}$ (hiperhomocisteinemia). Se observó una tendencia a la disminución en el grupo E del 4.6% (P=0.192) a los 6 meses respecto a tiempo 0, mientras que, el grupo C experimentó un incremento a los 3 meses (P=0.010) y a los 6 meses (P=0.010) (tabla 5.7.1.), siempre dentro de los límites de la normalidad.

Tabla 5.7.1. Homocisteína plasmática.

	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
HOMOCISTEÍNA ($\mu\text{mol/L}$)	C	7.453 \pm 0.413	8.260 \pm 0.483 **	8.356 \pm 0.446 **
	E	8.048 \pm 0.513	7.845 \pm 0.470	7.683 \pm 0.384

Los resultados se expresan como media \pm EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Valores de referencia: Homocisteína (< 15 $\mu\text{mol/L}$).

5.8. MARCADORES DE INFLAMACIÓN

Los valores promedio de la concentración plasmática de PCR ultrasensible al inicio del estudio fueron de $3.74 \pm 0.69 \mu\text{g/L}$ y $3.19 \pm 0.77 \mu\text{g/L}$, para el grupo C y E, respectivamente, dentro de los valores fisiológicos normales. Los valores de PCR del grupo C no sufrieron cambios a lo largo de la intervención (tabla 5.8.1.), mientras que en el grupo E se observó una disminución del 14% a los 3 meses en el grupo E ($P=0.031$).

Los cambios obtenidos en la concentración plasmática de VCAM-1 a lo largo del estudio están representados en la tabla 5.8.1. Se observó una disminución del 10%, tanto en el grupo C ($P=0.009$) como en el grupo E ($P=0.009$) a los 6 meses, que no fue significativa entre ambos grupos.

Tabla 5.8.1. Marcadores de inflamación.

	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
PCR (mg/L)	C	3.74 ± 0.69	3.72 ± 0.96	3.83 ± 0.96
	E	3.19 ± 0.77	$2.74 \pm 0.75^*$	3.03 ± 0.71
VCAM-1 (μg/L)	C	1716 ± 6.79		$1506 \pm 6.70^{**}$
	E	1749 ± 8.23		$1562 \pm 8.83^{**}$

Los resultados se expresan como media \pm EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Significación intergrupo respecto al control (¥ $P < 0.05$, ¥¥ $P < 0.01$, ¥¥¥ $P < 0.001$).

Valores de referencia: PCR ($< 5 \text{ mg/L}$).

5.9. GLUCOSA PLASMÁTICA

Los sujetos de la intervención presentaron concentraciones plasmáticas de glucosa en el tiempo 0 dentro del intervalo de la normalidad (65-110 mg/dL). Durante los 6 meses del estudio no se observaron variaciones significativas en ninguno de los dos grupos (tabla 5.9.1.).

Tabla 5.9.1. Glucosa plasmática.

	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
GLUCOSA (mg/dL)	C	86.24 ± 2.15	86.05 ± 2.81	87.27 ± 2.35
	E	85.10 ± 2.20	84.05 ± 2.48	85.13 ± 1.71

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001). Valores de referencia: glucosa (65-110 mg/dL).

5.10. FUNCIÓN HEPÁTICA: TRANSAMINASAS

Los individuos que participaron en el estudio presentaron unas concentraciones plasmáticas de transaminasas dentro del intervalo de la normalidad. La concentración plasmática de la GGT en el grupo C aumentó el 16% a los 3 meses (P=0.001) respecto al tiempo 0, aunque posteriormente descendió un 9% (P=0.007) al final del estudio respecto al inicio. En el grupo E se observó una disminución significativa del 20% tanto a los 3 meses como a los 6 meses (P=0.001 y P=0.007), respectivamente.

Respecto a la GPT, el grupo C no presentó diferencias significativas a lo largo de la intervención pero el grupo E si experimentó un descenso significativo del 11% a los 3 meses (P=0.013).

Respecto a la GOT, en el grupo C se observó un descenso del 11.6 % (P=0.003) y del 13.6% (P=0.008) a los 3 meses y 6 meses, respectivamente. En el grupo E el descenso fue de un 11.5% en el tiempo 3 (P=0.003) y de un 14% en el tiempo 6 (P=0.008) (tabla 5.10.1.).

Tabla 5.10.1. Transaminasas.

TRANSAMINASAS	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
GGT (U/L)	C	36.62 ± 9.22	42.65 ± 19.28 ***	33.24 ± 11.84 **
	E	32.79 ± 3.56	26.16 ± 2.37 ***	26.29 ± 2.56 **
GPT (U/L)	C	30.19 ± 3.26	25.41 ± 2.10	24.95 ± 3.03
	E	29.76 ± 4.19	26.21 ± 3.27 *	26.39 ± 3.01
GOT (U/L)	C	25.65 ± 1.81	22.68 ± 1.50 **	22.16 ± 2.05 **
	E	27.26 ± 2.11	24.13 ± 1.39 **	23.45 ± 1.26 **

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001). GGT, gamma-glutamilttransferasa; GPT, alaninoaminotransferasa o ALT ; GOT, aspartatoaminotransferasa o AST.

Valores de referencia: GGT (7-50 U/L), GPT (0-35 U/L), GOT (0-32 U/L).

PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL METABOLISMO ÓSEO

5.11. CALCIO Y 25-HIDROXIVITAMINA D

Se investigaron los efectos de los nutrientes consumidos sobre diferentes parámetros relacionados con el metabolismo óseo. La ingesta diaria de 3.75 µg/500 mL de vitamina D produjo un aumento de la concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D en ambos grupos (tabla 5.11.1. y figura 5.11.1.). El incremento fue del 6% (P= 0.337) y del 47% (P=0.000) para el grupo C; y del 13.6% (P=0.000) y del 55.6% (P=0.000) para el grupo E a los 3 meses y 6 meses, respectivamente.

Tabla 5.11.1. Parámetros relacionados con el metabolismo óseo.

	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
25- HIDROXIVITAMINA D (nmol/L)	C	50 ± 2.9	53 ± 2.9	73.5 ± 3.6 ***
	E	51.3 ± 3.3	58.3 ± 3.6 ***	79.8 ± 3.5 ***
CALCIO (mg/dL)	C	9.04±0.05	9.13±0.06	9.24 ± 0.05 ***
	E	9.01 ± 0.06	9.19±0.08 *	9.29 ± 0.07 ***

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001). Valores de referencia en adultos: 25-hidroxivitamina D (12-80 ng/mL), calcio (8,5-11 mg/dL).

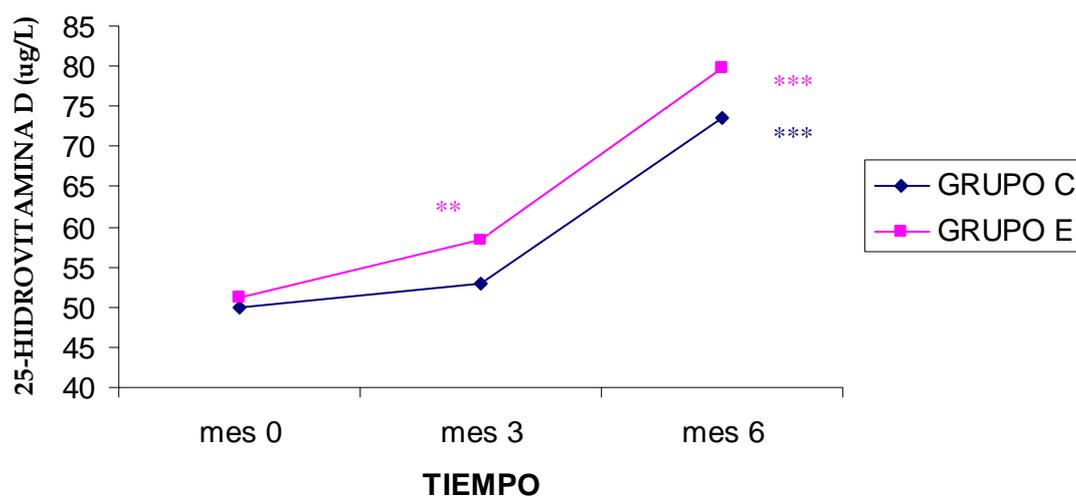


Figura 5.11.1. Valores de 25-hidroxivitamina D en grupos control y enriquecido a lo largo de la intervención de todos los pacientes del estudio.

El calcio plasmático también aumentó en ambos grupos significativamente, en el grupo C a los 6 meses ($P=0.000$) y en el grupo E tanto a los 3 meses ($P=0.024$) como al final del estudio ($P=0.000$) (tabla 5.11.1. y figura 5.11.2.):

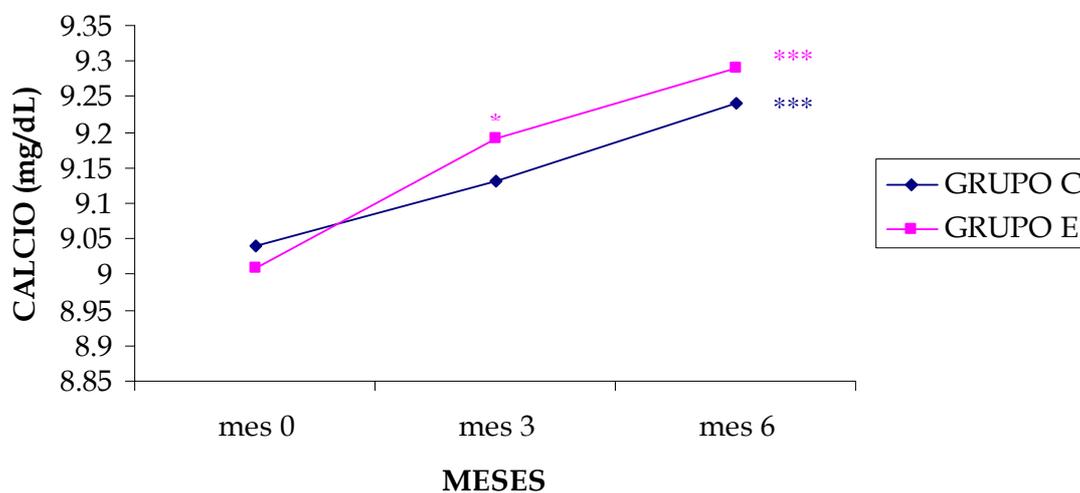


Figura 5.11.2. Valores de calcio en grupos control y enriquecido a lo largo de la intervención de todos los pacientes del estudio.

Los resultados según intervalos de normalidad, deficiencia o insuficiencia de hidroxivitamina D se observan en la tabla 5.11.2.:

Tabla 5.11.2. Clasificación de los pacientes según su concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D.

VITAMINA D	GRUPO	TIEMPO 0	TIEMPO 3	TIEMPO 6
NORMAL (>50 nmol/L)	C (n=15)	68.4 ± 2.8	60.0 ± 2.8 **	85.0 ± 6.7 ***
	E (n=18)	66.8 ± 4.4	71.5 ± 5.4 ¥	87.3 ± 6.3 ***
DEFICIENCIA BAJA (50-37 nmol/L)	C (n=13)	43.1 ± 0.9	53.1 ± 5.7 ***	70.2 ± 4.6***
	E (n=13)	45.8 ± 2.6	51.8 ± 3.1 ***	73.6 ± 4.6***
DEFICIENCIA ALTA (37-25nmol/L)	C (n=8)	30.5 ± 0.9	44.3 ± 6 ***	56.8 ± 4.5 ***
	E (n=6)	33.5 ± 1	45 ± 3.8 ***	68.1 ± 4.8 ***¥¥
INSUFICIENCIA (<25 nmol/L)	C (n=1)	18	20.1	36
	E(n=1)	20.8	17.2	38

Los resultados se expresan como media ± EEM.. Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Clasificación según *Aguado y colaboradores (2000)*.

Las concentraciones de calcio y 25-hidroxivitamina-D de las 60 mujeres que participaron en el estudio (31 del grupo control y 30 del grupo enriquecido) se pueden ver según si eran mujeres premenopausicas o posmenopausicas en las tabla 5.11.3. y tabla 5.11.4.

Tabla 5.11.3. Parámetros relacionados con el metabolismo óseo de mujeres premenopáusicas del estudio.

PREMENOPAUSICAS (n=25)	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
25-HIDROXIVITAMINA D (nmol/L)	C	44.2 ± 4.8	46.8 ± 4.1	70.5 ± 5.1 ***
	E	49.9 ± 7.4	60.8 ± 7.7 **	82.4 ± 6.1 ***¥
CALCIO (mg/dL)	C	8.87±0.07	9.07±0.07 **	9.06 ± 0.08 **
	E	8.96 ± 0.09	9.12±0.06 *	9.14 ± 0.06 **

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=13 (C), n=12 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001). Valores de referencia en adultos: 25-hidroxivitamina D (12-80 ng/mL), calcio (8,5-11 mg/dL).

Tabla 5.11.4. Parámetros relacionados con el metabolismo óseo de mujeres posmenopáusicas del estudio.

POSMENOPAUSICAS (n=35)	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
25-HIDROXIVITAMINA D (nmol/L)	C	53.7 ± 3.9	56.1 ± 3.8	78.8 ± 6.2 ***
	E	50.2 ± 4.1	54.3 ± 4.2	76.5 ± 5 ***
CALCIO (mg/dL)	C	9.01±0.08	9.13±0.08	9.31 ± 0.07 **
	E	8.98 ± 0.09	9.09±0.11	9.29 ± 0.08 **

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=18 (C), n=17 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001). Valores de referencia en adultos: 25-hidroxivitamina D (12-80 ng/mL), calcio (8,5-11 mg/dL).

5.12. MARCADORES DE FORMACIÓN Y RESORCIÓN ÓSEA

Se determinó la OPG como marcador de formación ósea y se observó que su concentración plasmática aumentó en el grupo que consumió el producto enriquecido un 12 % de manera significativa transcurridos 6 meses ($P=0.001$), mientras que el grupo C mantuvo constantes sus niveles a los largo del estudio (tabla 5.12.1. y figura 5.12.1.).

Tabla 5.12.1. Concentración plasmática de OPG.

	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
OPG (pg/ml)	C	97.58 ± 7.04		95.02 ± 7.18
	E	95.76 ± 6.46		107.64 ± 7.34 ***

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Significación intergrupo respecto al control (¥ $P < 0.05$, ¥¥ $P < 0.01$, ¥¥¥ $P < 0.001$).

Valores de referencia en adultos: OPG (0-280 pg/mL).

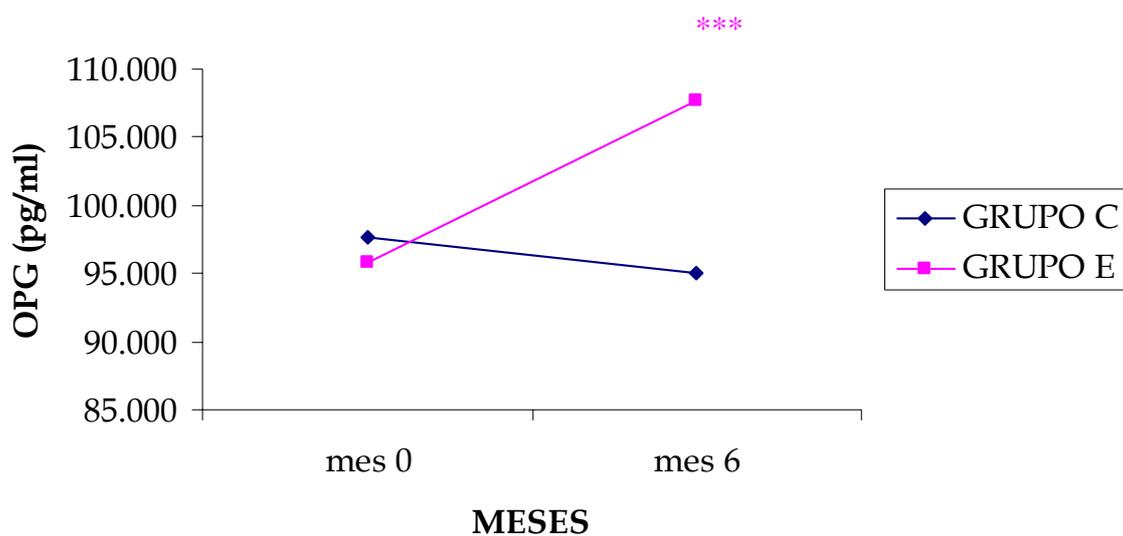


Figura 5.12.1. Valores de OPG en grupos control y enriquecido al principio y final del estudio en todos los sujetos del estudio.

La concentración de OPG en mujeres premenopáusicas o posmenopáusicas se pueden observar en las tabla 5.11.2. y tabla 5.11.3.

Tabla 5.12.2. Parámetros de formación ósea en mujeres premenopáusicas.

PREMENOPAUSICAS	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
OPG (pg/ml)	C	87.26 ± 8.03		84.49 ± 7.78
	E	116.78 ± 10.94 ¥¥		119.51 ± 13.23 ¥¥¥

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Valores de referencia en adultos:OPG (0-280 pg/mL).

Tabla 5.12.3. Parámetros de formación ósea en mujeres posmenopáusicas.

POSMENOPAUSICAS	GRUPO	Tiempo (meses)		
		0	3	6
OPG (pg/ml)	C	112.01 ± 11.07		109.24 ± 11.93
	E	90.69 ± 11.71 ¥		106.76 ± 12.97 **

Los resultados se expresan como media ± EEM. n=37 (C), n=38 (E). Significación intragrupo respecto a tiempo 0 (* P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001). Significación intergrupo respecto al control (¥ P< 0.05, ¥¥ P< 0.01, ¥¥¥ P< 0.001).

Valores de referencia en adultos:OPG (0-280 pg/mL).

6

Discusión

La evidencia científica avala el papel positivo que una alimentación saludable tiene en la reducción de la incidencia de enfermedades crónicas como la ECV y la osteoporosis. Sin embargo, la sociedad moderna, incluyendo en ella a países como el nuestro considerados típicamente mediterráneos, parece alejarse de este patrón. El incremento en la ingesta de grasas saturadas, ácidos poliinsaturados omega-6 y ácidos grasos *trans*; la disminución en el consumo de ácidos poliinsaturados omega-3, carbohidratos, fibra, frutas y verduras (ricas en antioxidantes) provocan un aumento del consumo energético que, unido al sedentarismo, cooperan a este distanciamiento del patrón dietético saludable.

La presente Memoria Doctoral tuvo como objetivo evaluar los efectos del consumo continuado de cantidades dietéticas la mezcla de nutrientes EPA, DHA, ácido oleico y vitaminas B₆, D, E y ácido fólico, administrada de manera conjunta en una matriz láctea, en la reducción de diversos factores de riesgo cardiovascular y su influencia en marcadores relacionados con el metabolismo óseo en una población dislipidémica.

Aceptación y cumplimiento de la ingesta

De los 79 pacientes que participaron en la intervención nutricional, sólo 4 de ellos abandonaron el estudio, lo que mostró una gran aceptación en lo referente al consumo de los productos nutricionales. El cumplimiento de la pauta de consumo se controló mediante la entrega a domicilio y la recogida de envases consumidos, por lo que también se aseguró que la ingesta de los productos estudiados fue la correcta.

Los pacientes de ambos grupos partían de un IMC dentro del intervalo de la obesidad (IMC mayor de 30) según los criterios de clasificación empleados por la OMS en 1988 (*WHO, 1988*), confirmando la relación entre obesidad y dislipemia (*Velasco et al., 2000; Formiguera y Cantón, 2004*).

Un gran número de evidencias científicas han establecido una relación clara entre la inactividad física y un incremento del riesgo de padecer enfermedades como diabetes, obesidad, ECV, cáncer, hipertensión y osteoporosis (WHO, 2003). En este sentido, se ha sugerido que el riesgo de mortalidad por ECV es 3 veces mayor en personas que realizan una actividad física de duración inferior a 30 minutos semanales (Martinson et al., 2001). Aproximadamente el 40% de los pacientes de nuestro estudio no realizaban ningún tipo de actividad física o lo hacían de forma esporádica, lo que unido a la dislipemia y un IMC mayor de 30, es concluyente para afirmar que la población del estudio presentaba un alto riesgo de padecer algún tipo de ECV.

Se emplearon biomarcadores nutricionales para investigar la incorporación al organismo de los nutrientes administrados en el producto lácteo. Estos biomarcadores nutricionales han ido cobrando especial relevancia en los últimos años en lo que se refiere a la ingesta y al metabolismo de nutrientes procedentes de la dieta, pues dan una idea más fiel de la relación causa-efecto entre la ingesta o el perfil dietético seguido y el efecto biológico producido (Potischman y Freudenheim, 2003). El uso de biomarcadores nutricionales puede ofrecer una estimación más exacta del estatus nutricional que la elaboración de un cuestionario de ingesta, puesto que soluciona posibles limitaciones como la variabilidad con que cada individuo cumple el protocolo de ingesta o cumplimenta las encuestas dietéticas, o aquellos casos en que la combinación de ciertos alimentos ingeridos al mismo tiempo o cocinados de determinada manera pueda influenciar sobre la absorción y disponibilidad del contenido del nutriente objeto de estudio (Potischman, 2003).

Perfil lipídico

Existen multitud de estudios científicos que sugieren que la sustitución de grasas saturadas por insaturadas pueden proporcionar efectos beneficiosos sobre factores de riesgo de ECV (Kris-Etherton, 1999a), al influir sobre procesos como la trombogénesis, la agregación plaquetaria, la arritmia, la susceptibilidad

a la oxidación de las LDLs y el control del binomio glucosa-insulina (*Wahrburg, 2004; DGCA Report, 2005*), entre otros.

Durante los 6 meses que duró la intervención, el grupo control que consumió leche semidesnatada, no experimentó ningún cambio significativo en su perfil de ácidos grasos, lo cual ya ha sido descrito en trabajos anteriores (*Carrero et al., 2004, Baró et al., 2003*), mientras que el consumo de 500 mL del producto enriquecido incrementó las concentraciones de ácido oleico, EPA, DHA y el ratio n3/n6 y disminuyó las concentraciones plasmáticas de ácido palmítico, ácido linoléico y el ratio AA/EPA.

El incremento significativo al final de la intervención de las proporciones plasmáticas de DHA y EPA por parte del grupo E en más de un 18% y 56%, respectivamente, es similar al de otros estudios anteriores usando una matriz láctea como vehículo de administración (*Visioli et al, 2000, Carrero et al., 2005*). El ratio AA/EPA, frecuentemente utilizado en otros estudios (*Rupp et al., 2004; Fontani et al., 2005*) disminuyó en este grupo un 38% a los 6 meses. Estos resultados reflejan la absorción efectiva de la grasa adicionada en el preparado lácteo y sugieren la consiguiente incorporación de los AGPIs-CL omega-3 a la composición de las membranas celulares, con una serie de implicaciones biológicas que pueden ser parcialmente responsables del descenso de algunos factores de riesgo (*Calder, 2004*). Tanto el EPA como el DHA poseen propiedades antiinflamatorias debido a su competición con el AA por la inserción en los fosfolípidos de membrana, que se traduce en la producción de unos eicosanoides menos activos. Por lo tanto, la ingesta de aceite de pescado puede influir en el proceso de inflamación que acompaña a la aterosclerosis, mediante una alteración en la producción de LTB₄ y PGE₂. El LTB₄ estimula la producción de citocinas inflamatorias, mientras que la PGE₂ la disminuye. Por ello, una disminución del ratio LTB₄/PGE₂ conllevaría un descenso en la producción de citocinas. La prostaglandina I₃ (PGI₃) producida en el endotelio a partir del EPA es un vasodilatador más activo y un mejor inhibidor de la agregación plaquetaria que la prostaglandina I₂ (PGI₂) producida a partir del

AA. Un descenso en el ratio AA/EPA se ha relacionado con vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria (Vicaut, 1995; Segal-Isaacson y Wylie-Rosett, 1999), además de estabilizar la placa aterosclerótica y reducir la infiltración de macrófagos, ralentizando así la progresión de la lesión vascular y el proceso aterosclerótico (Thies et al., 2003). Diversos estudios han mostrado la disminución del riesgo de cardiopatías producido por el consumo regular de pescado (Harper y Jacobson, 2001; He et al., 2004; Schmidt et al., 2001) y también la reducción de factores de riesgo de ECV mediante el consumo de alimentos enriquecidos (Trautwein, 2001, Baró et al., 2003). Un metaanálisis que incluía 39 ensayos clínicos aleatorizados realizados administrando suplementos de AGPIs-CL y otros estudios observacionales donde se cuantificaba la ingesta de pescado concluyó que el consumo de n-3 podía reducir la mortalidad por ECV (Wang et al., 2004). Rupp y colaboradores (2004) determinaron en 1 gramo/día la cantidad de DHA y EPA necesarias para obtener efectos beneficiosos mientras que el Comité Experto del "Joint Health Claims Initiative" (JHCI, 2004) sugirió que la cantidad necesaria para ello es de 450 mg/día. En este sentido, los 330 mg de EPA+DHA suministradas en 500 mL del producto lácteo enriquecido están próximos a estas cantidades recomendadas.

Aunque el producto lácteo enriquecido contenía un 56% de AGMIs, principalmente ácido oleico, la concentración de este AG se incrementó en el plasma solo modestamente, a diferencia de los DHA y EPA. La adhesión de los individuos al modelo de dieta mediterránea podría ser la responsable de este hecho, pues la cantidad promedio de ácido oleico que el resto de alimentos de la dieta proporcionaba es relativamente mucho mayor, en torno a los 21 g/día. El consumo del oleico en 500 mL del producto enriquecido supuso una ingesta de 5.2 g al día, es decir, aproximadamente un 20% del total del oleico ingerido en la dieta. Autoridades sanitarias como la WHO (2004) y numerosas sociedades científicas (NDA, 2004) sugieren que la sustitución de grasas saturadas por AGMIs puede producir efectos beneficiosos en la reducción del C-LDL. En nuestro estudio encontramos reducciones significativas de CT y

C-LDL que podrían estar relacionadas con el incremento de la ingesta de grasa monoinsaturada. Esta reducción de colesterol quizá habría sido más marcada si el estudio se hubiese realizado en un grupo de población no mediterráneo, donde la ingesta de oleico de la dieta es más reducida.

La concentración elevada de colesterol en sangre constituye uno de los principales factores de riesgo que intervienen en la formación de la placa ateromatosa. Esta relación se estableció en el estudio "Framingham" (*Dawber y Kannel, 1966*), en el que se identificó la hipercolesterolemia como uno de los factores de riesgo mayores de las ECVs. Posteriormente se confirmó esta relación en el estudio "Multiple Risk Factor Intervention Trial-MRFIT" acerca de la hipercolesterolemia y la mortalidad por enfermedad coronaria (*Multiple Risk Factor Intervention Trial Group. 1982., 1997*).

El consumo de los nutrientes del producto enriquecido produjo un efecto en el perfil lipídico de los pacientes del estudio. Los pacientes del grupo E redujeron de forma significativa los TG y el CT en un 10% y en un 12.8% de C-LDL a los 6 meses. Se observó además que la reducción era mayor cuando los niveles iniciales de lípidos sanguíneos de los pacientes eran más elevados (TG > 200 mg/dL, CT>239 mg/dL y/o C-LDL > 160 mg/dL) que aquellos que partían de concentraciones plasmáticas cercanas a la normalidad o en los límites bajos establecidos por la *NCEP ATP-III (2002)*. Efecto similar se observó un estudio de 8 semanas de intervención administrando 0.33 g/día de EPA y DHA a pacientes de edades comprendidas entre 45 y 65 años de edad que padecían hiperlipidemia moderada (*Carrero et al., 2004*). Estas observaciones sugieren que el uso de una nutrición adecuada contribuye en mayor medida a la estabilización del perfil lipídico cuando dicho perfil se encuentra alterado. Asimismo, nos permite formular la hipótesis de la existencia de una regulación fisiológica de la acción de los nutrientes, en función del grado de alteración de la variable fisiológica objeto, ya que el colesterol total y los triglicéridos sólo disminuyeron tras la intervención nutricional en aquellos sujetos con valores de

partida elevados. Este hecho podría justificar también el papel beneficioso de una dieta equilibrada en aquellas enfermedades donde los nutrientes puedan desempeñar un papel potencial.

Los efectos hipotrigliceridémicos del EPA y DHA y los hipocolesterémicos del ácido oleico han sido descritos anteriormente (*Adler y Holub, 1997; Feldman, 1999; Connor, 2000; Kris-Etherton et al., 1999; Visioli et al., 2000*). Sin embargo, debemos subrayar que las cantidades de EPA, DHA y ácido oleico suministradas son muy reducidas en comparación con otros estudios que mostraron efectos hipolipémicos significativos. Así, reducciones similares en la concentración plasmática de TG se alcanzaron con la ingesta de 4.5 gramos/día de aceite de pescado en forma de cápsulas durante 5 semanas (*Coniac et al., 1991*) o 20 gramos/día de aceite de oliva en cucharadas junto a su dieta habitual en una población no mediterránea durante 6 semanas (*Haban et al., 2004*). Otros estudios similares que utilizaron la leche como vehículo de administración obtuvieron resultados parecidos, como el de *Visioli y colaboradores (2000)*, que observaron en voluntarios normolipémicos reducciones del 19% de TG producidas por la ingesta durante 6 semanas de un preparado lácteo enriquecido con DHA y EPA en cantidades similares a las del preparado lácteo de nuestro estudio. Un metaanálisis reciente que revisa los efectos de los AGPIs sobre los lípidos en sangre a partir de 17 estudios de intervención (*Hooper et al., 2005*) también sugiere que la disminución de TGs es efecto de la ingesta de AGPIs-CL omega-3, mientras que el ácido oleico parece ejercer efectos reductores en el C-LDL (*Fito et al., 2002; Gimeno et al., 2002*).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el efecto hipotrigliceridémico de los AGPIs-CL, efecto que además parece ser dosis dependiente (*de Deckere et al., 1998*). En primer lugar está el efecto que este tipo de grasa ejerce sobre la respuesta lipémica postprandial: en general, a mayor grado de insaturación de la grasa de la dieta se produce una menor elevación postprandial de los triglicéridos. En este sentido, el efecto es máximo para la grasa omega-3 de cadena larga, lo cual se considera beneficioso especialmente

en pacientes con niveles reducidos de C-HDL (BNF, 1999). En segundo lugar, la ingesta de omega-3 de cadena larga ejerce un efecto sobre la reducción de triglicéridos en el ayuno. Este efecto parece estar mediado por el receptor nuclear PPAR que al unirse a este tipo de AGs estimula la beta-oxidación en mitocondrias y peroxisomas e inhibe la síntesis de AGs y de lipoproteínas VLDL endógenas, con el consiguiente efecto global de reducción de los TGs (Harris, 1996; Williams, 1997; Roche, 1999). Así, una ingesta de 2 a 3 gramos/día de omega-3 de cadena larga suele producir una reducción de TGs de un 20-30% (BNF, 1999) y de ahí surgieron recientemente las recomendaciones de sociedades nutricionales y asociaciones profesionales como la "American Heart Association" de ingestas específicas de DHA y EPA para la prevención primaria y secundaria de ECV y la reducción de TGs (Kris-Etherton et al., 2003).

Respecto a la disminución de CT, la relación entre la ingesta de oleico en sustitución de la grasa saturada y el efecto hipocolesteremiante ya se ha comentado anteriormente. Numerosos estudios llevados a cabo en humanos han mostrado que la sustitución de las grasas saturadas en la dieta por el aceite de oliva dió lugar a un descenso de los niveles de CT y de C-LDL (Kris-Etherton et al., 1999) que fue acompañado de un aumento de C-HDL (Thomsen et al., 1999). En un estudio reciente realizado con 14 mujeres posmenopausicas de 28 días de duración se observaron descensos en el colesterol total al sustituir el 62% de la grasa diaria por ácido oleico (Rodenas et al., 2005). Estévez-González y colaboradores (1998) realizaron un estudio de 7 meses de duración en el que una población infantil consumía leche desnatada enriquecida en ácido oleico y la disminución en las concentraciones plasmáticas de CT, TG y C-LDL fueron de 7.2%, 13.25% y 9.5%, respectivamente.

El mecanismo por el cual se produce la acción hipocolesteremiante del ácido oleico no está totalmente dilucidado pero se han sugerido efectos a nivel de la excreción biliar de colesterol (como tal o en forma de ácidos biliares), disminución de la síntesis de colesterol, efectos sobre la síntesis de lipoproteínas e incremento de la incorporación de colesterol plasmático a las membranas

celulares para regular cambios en la fluidez producidos por la incorporación de ácido oleico a dichas membranas.

Oxidabilidad del plasma

Un aspecto importante a tener en cuenta cuando se fortifican alimentos con ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo los EPA y DHA, es que estos son susceptibles a la oxidación cuando se exponen a condiciones o agentes oxidantes como el oxígeno del aire. Por esta razón, es frecuente la adición de antioxidantes a los aceites de pescado usados en alimentación para prevenir el enranciamiento, mal olor e inestabilidad del alimento.

En nuestro estudio investigamos si el consumo continuado de los AGPIs adicionados al producto enriquecido produciría un incremento en marcadores de oxidación y estado antioxidante del organismo para así excluir efectos biológicos no deseables. Para ello, hemos empleado la concentración plasmática de MDA, medido por HPLC, marcador muy aceptado por la comunidad científica en este sentido, para evaluar los efectos de la ingesta de los productos en la peroxidación lipídica. Este es un subproducto estable y cuantificable originado en el proceso de peroxidación lipídica. Además también se cuantificó la concentración plasmática de vitamina E para evaluar el estado antioxidante de los pacientes del estudio.

Los valores de MDA obtenidos de los voluntarios en los distintos tiempos del estudio se encontraron dentro de los valores de referencia (0.36-1.24 mmol/L). No se encontraron variaciones significativas en la concentración plasmática de MDA a lo largo de la intervención a pesar del consumo de la grasa poliinsaturada. Ello pudo ser debido a que bien la cantidad suministrada de DHA y EPA fue demasiado reducida para inducir cambios en la oxidación plasmática, bien la administración conjunta de vitamina E (7.5 mg/día) pudo compensar los posibles efectos pro-oxidantes.

Por otro lado, se ha demostrado que la ingesta de cantidades moderadas de omega-3 en el contexto de una dieta rica en grasa monoinsaturada (ácido oleico) no incrementa la peroxidación lipídica, particularmente las de las

lipoproteínas LDLs (*Kratz et al., 2002*). Otros estudios en los que se han utilizado el MDA como marcador de peroxidación lipídica han demostrado que la administración de AGPIs-CL no aumenta este parámetro (*Wander y Hu, 2000*) e incluso puede disminuirlo. Así, la administración de 1,080 mg de EPA y 720 mg de DHA al día durante 2 meses a 34 pacientes diabéticos no produjo cambios en este sentido (*Kesayulu et al., 2002*), ni tampoco la ingesta de 2.0 g EPA y 1.4 g DHA al día en 15 mujeres durante 5 semanas (*Hidgon et al., 2000*).

La concentración plasmática de vitamina E del grupo enriquecido se incrementó de forma significativa con respecto al grupo control al final del estudio. Este resultado contrasta con otros estudios de duración similar en los que se usaron dosis mayores que no consiguieron aumentos claros en la concentración plasmática de esta vitamina (*Meydani et al., 1998; Hayes et al., 2001*). Una posible explicación de nuestro incremento a pesar de que las cantidades de vitamina E usadas para fortificar la leche fueron de solo de 7.5 mg/500 mL podría ser su administración en el vehículo lácteo, donde la grasa se encuentra dispersa en forma de micelas (donde se situaría la vitamina E liposoluble) y la superficie de absorción puede verse incrementada considerablemente.

Algunos estudios han relacionado la ingesta o el incremento en plasma de vitamina E con efectos cardiovasculares beneficiosos. Así en el "Cambridge Heart Antioxidant Study" ("CHAOS"), llevado a cabo en 2002 hombres y mujeres con enfermedad coronaria, se observó un 47% de reducción de mortalidad por ECV y un 77% de reducción de infartos de miocardio no mortales, entre los pacientes tratados durante 17 meses con vitamina E respecto del placebo (*Stephens et al., 1996*). Sin embargo esta asociación fue cuestionada tras la publicación del estudio GISSI, de 3.5 años de duración llevado a cabo en 11.000 pacientes con historia de infarto de miocardio, donde no se encontró ninguna relación entre ingesta de vitamina E y reducción del riesgo cardiovascular (*Hopper et al., 1999*).

El ratio vitamina E/colesterol total se ha descrito como mejor marcador de estatus de vitamina E y supone un mejor marcador de estrés oxidativo que la propia concentración de vitamina E (*Kadiiska, 2000; Morrissey y Sheehy, 1999*). Se considera déficit vitamínico a valores de ratio menores de 5.2 (*Meydani et al., 1998*). La intervención con el alimento funcional permitió aumentar este ratio en los sujetos del grupo E, lo que sugiere una mejora del estado antioxidante del organismo. Efectos similares se han descrito en el estudio realizado por *Tholstrup y colaboradores (2005)*, en donde la administración a 60 pacientes entre 35 y 75 años de una dieta rica en n-3 no afectó a los marcadores de oxidación del plasma. Resultados similares se han descrito en otros estudios en los que también se utilizaban DHA y EPA adicionados en una matriz láctea funcional (*Visioli et al., 2000; Baró et al., 2003*).

Vitaminas

La ingesta de 150 µg diarios de ácido fólico y 1.5 mg de vitamina B₆ procedente del preparado lácteo enriquecido representó aproximadamente el 75% de las Ingesta Diaria Recomendada o IDR (*EVN, 2003*). Los biomarcadores utilizados para el seguimiento de la ingesta de ácido fólico fueron el folato sérico, que refleja de manera directa la ingesta de ácido fólico a partir de la cuarta semana de intervención (*Arder, 2002*) y el folato eritrocitario, que muestra el estado de las reservas y que se emplea con frecuencia para intervenciones nutricionales cuya duración es mayor a 3 meses (*Stranger, 2002*). Estudios nutricionales de intervención con ácido fólico sugieren una asociación inversa entre la ingesta de folato y el riesgo de padecer ECV por su efecto reductor de la homocisteína plasmática (*Chambers, 2000; Title et al, 2000; Hackman et al., 2000*). Una concentración de tHcy elevada en sangre (>15 µmol/L) se ha asociado a una mayor agregación plaquetaria, incremento del estrés oxidativo (por afectar a los sistemas antioxidantes endógenos), proliferación de células del músculo liso, disminución de la producción de óxido nítrico y estimulación de la producción de citocinas del endotelio vascular. Por todo ello, la concentración sanguínea

de tHcy se considera desde hace algunos años un factor de riesgo independiente de la ECV (Lusis, 2000; Cleophas *et al.*, 2000). La relación entre el ácido fólico y la tHcy se debe a que la molécula de folato actúa como coenzima en la regulación metabólica de la concentración de tHcy a través de una reacción de remetilación en que también están involucradas las vitaminas B₆ y B₁₂.

En la intervención realizada con 75 pacientes dislipémicos no se observaron cambios significativos en los niveles de tHcy del grupo E, aunque sí una tendencia al descenso de este grupo. En este sentido, es probable que no se encontrasen reducciones significativas durante la intervención debido a que los pacientes del estudio presentaban valores de tHcy dentro del intervalo de la normalidad (tHcy < 15 $\mu\text{mol/L}$). Por otra parte, la ingesta de vitaminas del tipo B adicionadas al preparado lácteo enriquecido incrementaron de forma significativa las concentraciones plasmáticas de las mismas en los sujetos del grupo E, diferenciándose del grupo C y confirmando la absorción y disponibilidad de dichas vitaminas durante y al final de la intervención.

Los efectos que la ingesta de ácido fólico ejerce sobre la reducción de la tHcy han sido descritos en numerosos estudios llevados a cabo con diferentes grupos de población (HLTC, 1998; van den Berg *et al.*, 1994). Aunque el ácido fólico parece ser el mayor responsable en esta reducción, el efecto parece potenciarse considerablemente cuando se ingiere en combinación con vitaminas B₆ y B₁₂ (Bronstrup *et al.*, 1998). Un reciente metaanálisis estimó que la reducción de los niveles de tHcy en aproximadamente 3 $\mu\text{mol/L}$ e independientemente del valor de partida, puede reducir el riesgo de enfermedad isquémica del corazón en un 16%, el riesgo de trombosis en un 25% y el riesgo de infarto en un 24% (Wald *et al.*, 2002). Por otro lado, un estudio realizado con 80 voluntarios de entre 50 y 87 años de edad a los que se suministró el 100% de la IDR de vitaminas del grupo B durante 8 semanas produjo 40% de incremento del folato sérico, un 36% de vitamina B₆ y una reducción de la concentración sanguínea de tHcy del 9% (McKay *et al.*, 2000). En otro estudio en el que se suministraron

solamente 75 µg de ácido fólico y 250 µg de vitamina B6 durante 2 años a un grupo de población de riesgo que redujo sus niveles de tHcy desde un promedio de 14 umol/L hasta 7 umol/L al final del periodo de intervención (Vermeulen *et al.*, 2000). El efecto reductor de la tHcy producido por estas vitaminas parece ser más marcado cuando la concentración de tHcy al inicio del estudio es más elevada (de Leo *et al.*, 2000). Aunque Krishnaswamy y Madhavan-Nair (2001) establecieron en 350 µg/día la ingesta de ácido fólico necesaria para ejercer un efecto reductor de homocisteína, cantidades mucho menores (150 µg) suministradas también en un preparado lácteo similar al del estudio produjeron reducciones significativas del 13% en un grupo de población de 25 a 45 años con valores iniciales de tHcy > 12 umol/L (Baró *et al.*, 2003) y de un 17% en un grupo de población hiperhomocisteinémica de edades comprendidas entre 45 y 65 años de edad (Carrero *et al.*, 2004).

Marcadores de inflamación

En años recientes se está relacionando la extensión de la enfermedad arteriosclerótica con la concentración plasmática de ciertas moléculas de adhesión celular (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina) que intervienen en el proceso de trans migración monocitaria hacia el espacio subendotelial. Cuando el endotelio vascular se enfrenta a diferentes estímulos (como una molécula de LDL oxidada, radicales libres, Hcy, hipertensión arterial), se desencadena una serie de cambios en el endotelio vascular (“activación endotelial”), que resulta en un incremento de la expresión y síntesis de moléculas de adhesión y citocinas pro-inflamatorias (Brown y Hu, 2001). La activación endotelial es crucial en el desarrollo de la aterosclerosis, y es responsable de la atracción de monocitos a la pared del vaso por acción de las quimiocinas. Una vez allí, las células penetran en la matriz subendotelial y se diferencian a macrófagos. Estos macrófagos pueden interactuar con las LDL oxidadas, para luego transformarse en células espumosas, y contribuir de esa manera al inicio del desarrollo de la estría grasa que marca el inicio del proceso de aterosclerosis

(Ross, 1999). Por ello, la medida de las formas solubles las moléculas de adhesión y marcadores de inflamación se abordó para investigar los efectos posibles del producto enriquecido en el proceso inflamatorio subyacente al proceso aterosclerótico. Se ha sugerido que VCAM-1 parece tener un papel más relevante en los primeros estadios del inicio de la lesión aterosclerótica (Cybulsky *et al.*, 2001), mientras que ICAM-1 parece estar más implicada en etapas posteriores cuando la lesión aterosclerótica está más establecida (de Caterina *et al.*, 2000). Tras el "The Physician's Health Study" se ha sugerido que la concentración plasmática de ICAM-1 podría usarse para predecir el riesgo de eventos cardiovasculares secundarios (Morris *et al.*, 1995). En nuestra intervención por lo tanto se investigó el efecto producido por el consumo de los productos lácteos en VCAM-1 solo, al ser una población que no tenía instaurada ninguna ECV en especial. En los sujetos de la intervención realizada en este estudio, ambos grupos respondieron de la misma manera, disminuyendo significativamente los valores de VCAM-1 un 10% en el tiempo 6 meses.

Estudios previos de intervención con dietas enriquecidas con distintos tipos de grasa han mostrado efectos significativos en la concentración de formas solubles de moléculas de adhesión. Así, en un estudio de 2 meses llevado a cabo en el reino unido donde se administró una dieta rica en AGMIs se observó un claro descenso en la concentración plasmática de ICAM-1 (Yaqoob *et al.*, 1998). Otro estudio de 12 semanas realizado con suplementos de aceite de pescado (1.2 g de EPA y DHA) en sujetos sanos mostró un descenso significativo de VCAM-1 pero no de ICAM-1 (Miles *et al.*, 2001).

Entre los marcadores biológicos del proceso inflamatorio de la aterosclerosis está la proteína C reactiva (PCR). La evidencia acumulada hasta el momento actual sugiere que la PCR ultrasensible representa un predictor de riesgo cardiovascular, tanto en pacientes con enfermedad coronaria como en sujetos aparentemente sanos ((Tracy *et al.*, 1997; Arroyo-Espliguero *et al.*, 2004). De hecho, recientemente se ha sugerido que la PCR es un predictor de riesgo más potente que los valores C-LDL y añade valor pronóstico al de la escala convencional de

Framingham (Koenig *et al.*, 2004). Según los resultados del estudio realizado por Ridker y colaboradores (2001), valores elevados de PCR es predictor del riesgo cardiovascular y la determinación de la PCR unida al *screening* lipídico mejora la valoración global del riesgo. Recientemente se ha postulado que la PCR quizá no sea un mero marcador biológico, sino un factor de riesgo cardiovascular directamente implicado en la génesis de la placa aterosclerótica vulnerable. La PCR se puede encontrar en la pared arterial del vaso arteriosclerótico y ayuda a la fagocitosis de las partículas LDL por el macrófago para formar la célula espumosa e interviene en el proceso trombótico. La PCR ejerce una multitud de efectos en la biología endotelial, favoreciendo un fenotipo proinflamatorio y proaterogénico: aumenta los valores de endotelina 1, promueve la expresión de moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1, VCAM-1) y de proteínas quimiotácticas (MCP-1), así como la producción de radicales libres de oxígeno (Libby *et al.*, 2002).

Los valores de PCR de los pacientes de nuestro estudio se encontraban en el intervalo de la normalidad. Si bien el grupo control no experimentó cambios durante la intervención, el grupo que consumió el producto enriquecido mostró una tendencia a la disminución significativa a los 3 meses). Un estudio anterior también mostró reducciones de PCR tras la administración oral durante 4 semanas de EPA a pacientes con pancreatitis (Wigmore *et al.*, 1997), aunque existen pocos estudios que establezcan una relación entre la ingesta EPA y DHA y la reducción de PCR.

Glucosa plasmática

Los efectos producidos por la ingesta de distintos tipos de grasa en el control de la glucosa e insulina han sido extensamente estudiados en diversos grupos de población. Se ha estudiado cómo una dieta rica en ácido oleico y omega-3 favorecen la utilización de glucosa y pueden prevenir la aparición de diabetes (Louheranta *et al.*, 2002) y cómo la sustitución de grasas saturadas por monoinsaturadas durante 2 meses en "The KANWU study" aumentaba la sensibilidad a la insulina en 162 sujetos (Vessby *et al.*, 2001). En el metaanálisis

realizado por *Friedberg y colaboradores(1998)*, el consumo de 3g/día de AGPIs-CL por diabéticos no producía ninguno efecto sobre la glucosa y si producía un descenso del 25% en TG, pero cada incremento de 1gramo/día a partir de esta cifra producía un incremento de la glucosa del 0.74mmol/L. El consumo de los productos lácteos del estudio no produjo cambios significativos en la concentración de glucosa ninguno de los 2 grupos, que se mantuvo dentro de los niveles de la normalidad. En nuestro estudio se emplearon dosis reducidas de EPA y DHA (0.34 g/día) por lo que no era esperable un efecto en este sentido, o a lo sumo un efecto marginal, especialmente porque los pacientes participantes no padecían alteraciones en el metabolismo glucídico, y partían de valores normales de glucosa en sangre, siendo éste uno de los criterios de inclusión.

Transaminasas

Se investigó el efecto del producto enriquecido en la función hepática. Las enzimas GOT y GGT de los pacientes del grupo E experimentaron un descenso significativo tanto a los 3 como a los 6 meses, mientras que la GPT no se modificó. Los efectos producidos por el consumo de AGPIs sobre el metabolismo hepático han sido objeto de intenso estudio en años recientes y se ha llegado a relacionar la deficiencia de AGPIs-CL con concentraciones elevadas de GPT en enfermos cirróticos (*Okita et al., 2002*) y se han descrito beneficios de dietas hipocalóricas ricas en AGPIs-CL omega-3 y antioxidantes en enfermos obesos con hígado graso. Por otra parte, el consumo de AGPIs-CL n-3 a largo plazo parece no ejercer ningún beneficio en el metabolismo del hígado (*Eristland et al, 1995*).

Metabolismo óseo

En relación al metabolismo óseo, los estudios demuestran que los suplementos de vitamina D pueden retrasar o reducir la pérdida de masa ósea (*Iwamoto et al., 2005; Vieth, 2005*), además de ser imprescindible para una absorción efectiva del

calcio (*Steingrimsdottir et al., 2005*). Una estrategia conjunta para conseguir un buen pico de masa ósea mediante la prevención consiste en suplementos de calcio y vitamina D, evitar tabaco y actividad física (*Rosen, 2005*); además, se recomienda el consumo de 400 a 800 UI/día para mujeres posmenopausicas si se quiere disminuir el riesgo de fractura (*Raisz LG, 2005*).

En el estudio realizado, el enriquecimiento con 150 UI al día de vitamina D y unos 600 mg/día de calcio en los dos tipos de preparado lácteo produjo un incremento significativo de los valores de 25-hidroxivitamina D en ambos grupos de pacientes a los 6 meses de intervención, aunque es posible que este aumento fuera debido al efecto de una mayor exposición solar durante los meses finales del estudio (agosto-septiembre-octubre). Además, ambos grupos tuvieron modificaciones similares según la clasificación realizada por valores medios iniciales de vitamina D plasmática de normalidad, deficiencia o insuficiencia. El calcio plasmático aumenta en los dos grupos de igual manera, poniéndose de manifiesto la biodisponibilidad del calcio contenido en los productos lácteos (*Zhu et al., 2005*) que se incorpora de manera efectiva al plasma, y por lo tanto, al hueso. Este efecto se observó también en un estudio similar al realizado con leche semidesnatada enriquecida en calcio, fósforo, lactosa y vitamina D en 80 mujeres postmenopausicas durante 6 meses con edades entre 49 y 71 años, que recibieron 5.7 µg de vitamina D y 1.200 mg de calcio, dónde aumentó la vitamina D plasmática y mejoró los marcadores óseos medidos (*Palacios et al., 2005*). Por lo tanto, los suplementos de calcio y vitamina D deben ser recomendados dentro de las medidas preventivas en todos los individuos de riesgo (*Muñoz-Torres et al., 2003*). Así, pacientes con hipovitaminosis D presentan un aumento del remodelado óseo negativo e incremento del riesgo de fracturas (*Thomas y Demay, 2000; Reginster, 2005*). Además, en un estudio reciente de 15 ensayos clínicos con calcio con mujeres posmenopausicas con osteoporosis se observó un incremento del 2% en la densidad mineral ósea tras la ingesta de suplementos de calcio de 1200 a 1500 mg/día (*Shea et al., 2002*). Según un estudio realizado por *Leboff y colaboradores*

(1999) el 60% de los pacientes con fractura de cadera tenían deficiencia de vitamina D (<37nmol/L). Otros estudios han mostrado que una concentración plasmática de 25-hidroxivitamina D mayor a 80 nmol/L puede disminuir el riesgo de padecer fracturas por osteoporosis (Heany, 2005).

En los últimos años se ha intentado relacionar los AGPIs con el metabolismo óseo. En estudios en animales la ingesta de AGPIs omega-3 disminuye la osteoclastogénesis y la pérdida de masa ósea en ratones ovariectomizados (Sun *et al.*, 2003; Watkins *et al.*, 2001). Aunque los estudios que relacionan los AGPIs con el hueso son limitados, se observó en un estudio de intervención en mujeres de 65 años con dieta pobre en calcio, que el consumo de suplementos de AGs n-6 y n-3 con calcio disminuyó la degradación de hueso y producía el incremento de la densidad ósea (Kruger *et al.*, 1998); aunque en otros estudios como el realizado por Bassey y colaboradores (2000), la ingesta de un suplemento de n-6, n-3 y calcio en mujeres posmenopausicas no produjo ningún tipo de efecto sobre la densidad mineral ósea. Otros estudios demuestran cómo el DHA y el EPA aumentan la absorción de calcio y disminuyen la excreción urinaria de calcio, inhibiendo la osteoporosis en ratas (Sagakuchi *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 2004), mientras que la ingesta de grasas saturadas interfiere con la absorción de calcio y predisponen a la osteoporosis (Das, 2000). En estudios en humanos, la reducción del AA de los fosfolípidos resultó beneficiosa en pacientes con osteoporosis (Priante *et al.*, 2002) y, además, se ha estudiado la posible relación que existe entre un exceso en la producción de PGE₂ con un aumento de resorción ósea. Esto es debido a que la PGE₂ sintetizada por los osteoblastos activa la resorción osteoclástica del hueso, así como la formación osteoblástica del hueso, pero a altas concentraciones de PGE₂, inhibe la formación de hueso (Ono *et al.*, 2005). Por lo tanto, la grasa de la dieta influye en la composición del ácido graso de la membrana del osteoblasto, si es rica en AGPIs omega-3 se producirá PGE₂ (derivado del AA) en menor cantidad y más PGE₃ (derivado del AA). Aunque sí se ha observado que niveles bajos del ratio omega-6/omega-3 conllevan efectos beneficiosos sobre la densidad mineral

ósea (Claassen et al., 1995; Albertazzi y Coupland, 2002), aún son necesarios más estudios para establecer una clara relación entre los AGPIs n-3 y la osteoporosis.

Respecto a la relación del ácido oleico y el metabolismo óseo, son muy pocas los estudios es los que se compare el efecto de la ingesta de diferentes tipos de grasa sobre la composición mineral del hueso, pero sí se sabe que una ingesta lipídica equilibrada es necesaria para la correcta absorción de calcio y fósforo, lo que permitirá una adecuada osificación y crecimiento. El tipo de grasa es importante ya que el ácido oleico y los AGs esenciales estimulan la absorción de calcio, mientras que un exceso de AGSs de cadena larga deprimen la absorción de calcio (Laval y Laval, 1996). Así, un estudio realizado por Trichopoulou y colaboradores (1997) observó la existencia de una asociación positiva, tanto en hombres como en mujeres adultas, entre al ingesta de grasa monoinstaurada y la densidad mineral del hueso, aunque hacen falta más ensayos que nos permitan profundizar en el tema con el fin de confirmar dichos resultados.

Respecto a los marcadores óseos, altos niveles de OPG se asocian de forma positiva con la densidad mineral ósea en columna lumbar y de forma negativa con la presencia de fracturas vertebrales de modo que, a menor concentración de OPG sérico, mayor prevalencia de fracturas vertebrales (Mezquita-Raya et al., 2005). Un estudio realizado en mujeres posmenopausicas, la administración directa de OPG aumentó la formación ósea (Bekker et al., 2001).

En el estudio de esta memoria doctoral, se observó un aumento significativo de OPG en el grupo E a los 6 meses y destacado en mujeres posmenopausicas y no tan marcado en mujeres premenopausicas. Existen pocos estudios que relacionen los AGPIs-CL con la OPG, aunque si se ha demostrado cómo el tipo y cantidad de AGPIs-CL influyen en la formación del hueso en ratas en desarrollo mediante una dieta con omega-3, al disminuir la acción de la PGE₂ producida por el AA (Watkins et al., 2003); conclusión similar a la obtenida por

Brandstrom y colaboradores (1998) al realizar un estudio sobre cómo la PGE₂ inhibe la formación de OPG y estimula la resorción ósea.

El estudio del efecto de los productos administrados sobre el metabolismo óseo se completaría mediante la medición de la masa ósea por densitometría ósea y la determinación de otros parámetros de formación ósea (osteocalcina, isoenzimas de la fosfatasa alcalina, propéptido N-terminal del procolágeno tipo I o PINP) y de resorción ósea (RANKL, actividad de la fosfatasa acida tartrato resistente o TRAP, telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I o CTX).

Resumen final

A pesar del gran número de alimentos enriquecidos con AGPIs-CL n-3 disponibles, los efectos sobre la salud derivados del consumo regular de estos productos suponen aún un reto en muchos casos aunque existen algunos estudios al respecto (*Gustafsson et al., 1996; Layne et al., 1996; Lovegrove et al., 1997; Mantzioris et al., 2000*). En nuestra intervención, en comparación con otras realizadas, se han adicionado cantidades reducidas de AGPIs-CL n-3 y ácido oleico a en una matriz láctea. Está descrito que la grasa de la leche se absorbe en el intestino con gran facilidad y eficiencia por lo que quizá el uso de este vehículo para la administración de los AGPIs-CL n-3 y ácido oleico, además de ser un alimento de consumo regular, sea responsable de los efectos beneficiosos cardiovasculares encontrados a bajas dosis.

A lo largo de la intervención se ha comprobado que el consumo diario de cantidades dietéticas de AGPIs-CL omega-3, ácido oleico, ácido fólico y vitaminas B₆, D y E, aumentó de manera positiva sus concentraciones plasmáticas en los sujetos estudiadas. El aumento de estos biomarcadores de ingesta muestra el cumplimiento de los protocolos de ingesta del producto y debe interpretarse como una incorporación efectiva de los nutrientes al organismo. Es importante subrayar que las cantidades de los nutrientes suministrados con el preparado son reducidas y en el contexto de una dosis alcanzable mediante una dieta equilibrada. El uso de la leche como vehículo

transportador de estos nutrientes, puede haber contribuido a este hecho, puesto que: 1) La leche es un alimento de uso diario, lo que facilita su acceso y consumo, y puede facilitar el cumplimiento del protocolo; 2) La leche se consume en contextos espaciados a lo largo del día (en el desayuno, la merienda, la cena...) y se ha demostrado que la absorción en el intestino de los AGPIs-CL omega-3 mejora cuando éstos se ingieren asociados a otras grasas y en pequeñas dosis distribuidas a lo largo del día (*Lawson y Hughes, 1988*); 3) La caseína de la leche favorece la dispersión de la grasa y productos liposolubles en micelas, incrementando de esta manera la superficie de absorción y por consiguiente la biodisponibilidad potencial de las grasas y vitaminas adicionadas (*Visioli et al., 2000*).

La ingesta de alimentos enriquecidos en AGPIs-CL omega-3 (EPA y DHA) es una opción disponible que puede ser eficaz en la reducción de factores de riesgo de enfermedades, sustituyendo a los suplementos y sin originar cambios en los hábitos alimentarios del consumidor. Aunque el mercado de alimentos funcionales está en constante expansión, se necesitan muchos más estudios que evalúen en qué medida el consumo de alimentos funcionales produce efectos beneficiosos para la salud, un área de investigación que con toda seguridad continuará desarrollándose en los próximos años.

Perspectivas

Los estudios descritos en esta memoria de Tesis Doctoral, describen el papel que determinados nutrientes pueden desempeñar en la disminución del riesgo cardiovascular y en el metabolismo óseo. Los resultados de esta Memoria Doctoral han originado el inicio de investigaciones posteriores en otros grupos de población:

a) Evaluación de un programa de alimentación saludable en combinación con el consumo del producto lácteo enriquecido en individuos con Síndrome

Metabólico, en colaboración con departamento de Medicina Interna del Hospital Reina Sofía de Córdoba.

b) Estudio de los mecanismos de acción por los que cada nutriente suministrado ha podido contribuir a la mejora en los parámetros óseos observados en mujeres postmenopáusicas y modelos animales.

c) El uso de alimentos funcionales como herramienta de alimentación saludable abre un campo interesante en la prevención a largo plazo de este tipo de enfermedades. En la actualidad se están llevando a cabo desarrollos de alimentos funcionales a escala “piloto” empleando otras matrices alimentarias y diferentes tipos de aceites de pescado.

7

Conclusiones

1. El consumo continuado durante seis meses de dosis dietéticas de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico, vitaminas B₆, E y ácido fólico administradas de manera conjunta en una matriz láctea, contribuyó a la reducción de diversos factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular en individuos dislipémicos, al reducir las concentraciones plasmáticas de colesterol total, colesterol-LDL, triglicéridos, ratio AA/EPA, proteínas de fase aguda y formas solubles de moléculas de adhesión. Además, contribuyó al aumento del ratio vitamina E/colesterol total y a la mejora del status vitamínico de los pacientes, al incrementar las concentraciones plasmáticas de ácido fólico y vitamina B₆.
2. El consumo de estos nutrientes contribuyó a mejorar marcadores relacionados con el metabolismo óseo, aumentando las concentraciones plasmáticas de OPG, calcio y 25-vitamina D, factores muy importantes en la salud ósea y en la prevención de la osteoporosis.
3. El uso de alimentos funcionales puede suponer una herramienta sencilla y efectiva para promover el consumo de nutrientes que ayuden a mantener un equilibrio dietético y la obtención de un beneficio para nuestra salud.

8

Bibliografía

-
- **Abe-Amer Y.** Advances in osteoclast differentiation and function. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2005 Sep; 5(3):347-55.
 - **Adler AJ, Holub BJ.** Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65: 445-450.
 - **Aguado P, del Campo MT, Garces MV, Gonzalez-Casaus ML, Bernad M, Gijon-Banos J, Martin Mola E, Torrijos A, Martinez ME.** Low vitamin D levels in outpatient postmenopausal women from a rheumatology clinic in Madrid, Spain: their relationship with bone mineral density. *Osteoporos Int.* 2000; 11(9):739-44.
 - **Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, Ruskin JN, Manson JE.** Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA.* 1998; 279: 23-8.
 - **Albertazzi P, Coupland K.** Polyunsaturated fatty acids. Is there a role in postmenopausal osteoporosis prevention? *Maturitas.* 2002 May 20; 42(1): 13-22.
 - **Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC.** Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974 Apr; 20(4):470-5.
 - **Alvarez-Sala LA, Suarez C, Mantilla T, Franch J, Ruilope LM, Banegas JR, Barrios V; Grupo PREVENCAT.** PREVENCAT study: control of cardiovascular risk in primary care. *Med Clin (Barc).* 2005 Mar 26; 124(11):406-10.
 - **Andreotti F, Bruzota F, Manzoli A, Robinson K.** Homocysteine and risk of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2000 Jan; 9(1):13-21.
 - **Appel LJ, Miller ER 3rd, Seidler AJ, Whelton PK.** Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch Int Med.* 1993; 153: 429-438.

- **Araki A, Sako Y.** Determination of free and total homocysteine in human plasma by HPLC with fluorescence detection. *J. of Chrom.* 1987; Vol 422, 43-52.
- **Aranceta J, Serra-Majem LI (ed.).** Guías Alimentarias para la población española. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, 2001.
- **Aranceta J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, Tur Mari J, Mataix Verdu J, Llopis Gonzalez J, Tojo R, Foz Sala M; Grupo colaborativo para el Estudio de la Obesidad en España.** Prevalencia de Obesidad en España: Estudio SEEDO 2000. *Med Clin (Barc).* 2003 May 3; 120(16):608-12.
- **Aranceta J, Perez Rodrigo C, Foz Sala M, Mantilla T, Serra Majem L, Moreno B, Monereo S, Millan J; Grupo Colaborativo para el estudio DORICA fase 2.** Tables of coronary risk evaluation adapted to the Spanish population: the DORICA study. *Med Clin.* 2004; 123(18):686-691.
- **Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Kaski JC.** Atherosclerotic coronary artery disease: usefulness of C-reactive protein for the identification of the vulnerable plaque and the vulnerable patient. *Rev Esp Cardiol.* 2004 May; 57(5):375-8.
- **Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M.** Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Aug; 19(8):1819-24.
- **Aubin JE, Bonnelye E.** Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for the regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteopor Int.* 2000; 11: 905-913.
- **Aviram M, Elias K.** Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the

- lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Ann Nutr Metab.* 1993; 37(2):75-84.
- **Banegas JR, Villar F, Pérez C, Jiménez R, Gil E, Muñoz J, Juane R.** Estudio epidemiológico de los factores de riesgo cardiovascular en la población española de 35 a 64 años. *Rev San Hig Pub.* 1993; 67:419-445.
 - **Banegas JR, Rodríguez Artalejo F, Cruz JJ, Guallar P, Rey J.** Blood pressure in Spain: distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. *Hypertension.* 1998; 32: 998-1002.
 - **Banegas JR, Rodríguez Artalejo F.** El problema de la hipertensión arterial en España. *Rev Clín Esp.* 2002; 202: 12-15.
 - **Barnett RN, Skodon SB and Goldberg MH.** Performance of kits used for clinical chemical analysis of calcium in serum. *Am J Clin Path* 1973; 59: 836-843.
 - **Baro L, Fonolla J, Pena JL, Martinez-Ferez A, Lucena A, Jiménez J, Boza JJ, Lopez-Huertas E.** N-3 Fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin Nutr.* 2003; 22: 175–182.
 - **Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM.** Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004 Oct 15; 95(8):764-72.
 - **Bassey EJ, LITTLEWOOD JE, Rothwell MC, Pye DW.** Lack of effects of supplementation with essential fatty acids on bone mineral density in healthy pre and post menopausal women. Two randomized controlled trials of Efacal® v calcium alone. *Br J Nutr.* 2000 83; 629–635.
 - **Bazzano LA, Serdula MK, Liu S.** Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2003 Nov; 5(6):492-9.

-
- **Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR.** The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001 Feb; 16(2):348-60.
 - **Beleta J, Gella FJ.** Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la γ -glutamyltransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1990; 9:58-61.
 - **Bennett MR.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res.* 1999 Feb; 41(2):361-8.
 - **Berliner JA, Heinecke JW.** The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(5):707-27.
 - **Berliner J.** Introduction: Lipid oxidation products and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2002 Apr; 38(4):187-91.
 - **Binkoski AE, Kris-Etherton PM, Wilson TA, Mountain ML, Nicolosi RJ.** Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. *J Am Diet Assoc.* 2005 Jul; 105(7):1080-6.
 - **BNF-British Nutrition Foundation's Task Force.** Unsaturated fatty acids: Nutritional and physiological significance. Chapman & Hall. Londres, 1992.
 - **BNF-British Nutrition Foundation.** Diet and heart disease, a round table of factors. Segunda Edición, Chapman & Hall, Londres, 1997.
 - **BNF-British Nutrition Foundation.** Nutrient requirements. 1999.
 - **BNF-British Nutrition Foundation's Task Force.** N-3 fatty acids and health. The British Nutrition Foundation. Chapman & Hall. New York & London, 1999.

-
- **Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL.** Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest.* 1998 Jun 15; 101(12):2658-64.
 - **Bostom AG, Cupples LA, Jenner JL, Ordovas JM, Seman LJ, Wilson PW, Schaefer EJ, Castelli WP.** Elevated plasma lipoprotein(a) and coronary heart disease in men aged 55 years and younger. A prospective study. *JAMA.* 1996 Aug 21; 276(7):544-8.
 - **Breier MC, Stroes E, Rabelink TJ.** Folates and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Jan; 22(1):6-13.
 - **Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljunghall S, Ljunggren O.** Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jun 18; 247(2):338-41.
 - **Bronstrup A, Hages M, Prinz-Langenohl R, Pietrzik K.** Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B-12 on plasma homocysteine concentrations in healthy, young women. *Am J Clin Nutr.* 1998 Nov; 68(5):1104-10.
 - **Brown AA, Hu FB.** Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2001, 73: 673-686.
 - **Browner WS, Lui LY, Cummings SR.** Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:631-637.
 - **Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL.** Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset

- osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998 May 1; 12(9):1260-8.
- **Bucolo G, David H.** Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem.* 1973 May; 19(5):476-82.
 - **Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM.** Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet.* 1989; 2: 757-761.
 - **Burstein M, Scholnick HR, Morfin R.** Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *Scand J Clin Lab Invest.* 1980; 40: 583-9.
 - **Cade JE, Burley VJ, Greenwood DC. UK Women's Cohort Study Steering Group.** The UK Women's Cohort Study: comparison of vegetarians, fish-eaters and meat-eaters. *Public Health Nutr.* 2004 Oct; 7(7):871-8.
 - **Calder PC.** N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Adv Enzyme Regul* 1997; 37:197-237.
 - **Calder PC.** N-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci.* 2004; 107: 1-11.
 - **Cancer-Gaspar E, Ruiz-Echarri Zelaya M, Labarta Aizpun JI, Mayayo Dehesa E, Ferrandez Longas A.** Study of bone mass in patients with growth hormone deficiency. *An Pediatr (Barc).* 2005 Sep; 63(3):219-23.
 - **Capita R, Alonso-Calleja C.** Intake of nutrients with an increased risk of cardiovascular disease in a Spanish population. *Int J Food Sci Nutr.* 2003; 54:57-75.
 - **Carrero JJ, Lopez-Huertas E, Salmeron LM, Baro L, Ros E.** Daily supplementation with (n-3) PUFAs, oleic acid, folic acid, and vitamins B-

- 6 and E increases pain-free walking distance and improves risk factors in men with peripheral vascular disease. *J Nutr.* 2005 Jun; 135(6):1393-9.
- **Carrero JJ, Baro L, Fonolla J, Gonzalez-Santiago M, Martinez-Ferez A, Castillo R, Jimenez J, Boza JJ, Lopez-Huertas E.** Cardiovascular effects of milk enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and vitamins E and B6 in volunteers with mild hyperlipidemia. *Nutrition.* 2004 Jun; 20(6):521-7.
 - **Chambers JC, Ueland PM, Obeid OA, Wrigley J, Refsum H, Kooner JS.** Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: An effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation.* 2000 Nov 14; 102(20):2479-83.
 - **Cheng SW, Ting AC, Wong J.** Fasting total plasma homocysteine and atherosclerotic peripheral vascular disease. *Ann Vasc Surg.* 1997; 11, 217-223.
 - **Claassen N, Coetzer H, Steinmann CM, Kruger MC.** The effect of different n-6/n-3 essential fatty acid ratios on calcium balance and bone in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995 Jul; 53(1):13-9.
 - **Cleophas TJ, Hornstra N, van Hoogstraten B, van der Meulen J.** Homocysteine, a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. 2000. *Am J Cardiol* 86, 1005- 1009.
 - **Connor WE.** Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 171S-175S.
 - **Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, Genant HK, Palermo L, Scott J, Vogt TM.** Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet.* 1993 Jan 9; 341(8837):72-5.
 - **Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS.** A major role for

- VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1255-1262.
- **Das UN.** Essential fatty acids and osteoporosis. *Nutrition*. 2000 May; 16 (5):386-90.
 - **Daviglus ML, Stamler J, Orenca AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, Walsh MK, Morris D, Shekelle RB.** Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1997, 336: 1046-1053.
 - **Dawber TR, Kannel WB.** The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation*. 1966 Oct; 34(4):553-5.
 - **de Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Cats VM, Orth-Gomer K, Perk J, Pyorala K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D.** European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Atherosclerosis*. 2004; 173(2):381-391.
 - **de Bree A, Mennen LI, Hercberg S, Galan P.** Evidence for a protective (synergistic?) effect of B-vitamins and omega-3 fatty acids on cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr*. 2004 May; 58(5):732-44.
 - **de Caterina R, Liao J K, Libby P.** Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 213S-223S
 - **de Caterina R, Zampolli A, Madonna R, Fioretti P, Vanuzzo D.** New cardiovascular risk factors: homocysteine and vitamins involved in homocysteine metabolism. *Ital Heart J*. 2004 Jun; 5 Suppl 6:19S-24S.
 - **de la Pena Fernandez A, Suarez Fernandez C, Cuende Melero I, Munoz Rodriguez M, Garre Canovas J, Camafort Babkowski M, Roca Villanueva B, Alcala Pedraja J; Grupo estudio CIFARC; Grupo Riesgo Vascular SEMI.** Integral control of risk factors in patients of high and

- very high cardiovascular risk in Spain. CIFARC project. *Med Clin (Barc)*. 2005 Jan 22; 124(2):44-9.
- **de Leo V, La Marca A, Morgante G, Ciani F, Zammarchi E, Setacci C.** *Am J Obstet Gynecol*. 2000 Oct; 183(4):945-7.
 - **de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P, Delaye J.** Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*. 1994 Jun 11; 343(8911):1454-9.
 - **de Lorgeril M, Salen P, Caillat-Vallet E, Hanauer MT, Barthelemy JC, Mamelle N.** Control of bias in dietary trial to prevent coronary recurrences: The Lyon Diet Heart Study. *Eur J Clin Nutr*. 1997 Feb; 51(2):116-22.
 - **Delmas PD, Garnero P.** **Utility of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis.** *Osteoporosis*. Marcus R (ed.) Academic Press, San Diego 1996; pp 1075-1088.
 - **Den Heijer M, Brower IA, Bos GM, Blom HJ, van der Put NM, Spaans AP, Rosendal FR, Thomas CM, Haak HL, Wijermans PW, Gerrits WB.** Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels: a controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18:356-361.
 - **Devaraj S, Jialal I.** **Antioxidants and vitamins to reduce cardiovascular disease.** *Curr Atheroscler Rep*. 2000 Jul; 2(4):342-51.
 - **DGAC Report (Dietary Guidelines for Americans).** Part D. Science base, 2005. Sect. 4. Fats. USDA.
 - **di Daniele N, Carbonelli MG, Candeloro N, Iacopino L, De Lorenzo A, Andreoli A.** Effect of supplementation of calcium and vitamin D on bone mineral density and bone mineral content in peri- and post-menopause women; a double-blind, randomized, controlled trial. *Pharmacol Res*. 2004 Dec; 50(6):637-41.

- **Dodds RA, Catterall A, Bitensky L, Chayen J.** Abnormalities in fracture healing induced by vitamin B6-deficiency in rats. *Bone*. 1986; 7:489-95.
- **Drin PJ.** The importance of parathyroid hormone and vitamin D status in the treatment of osteoporosis and renal insufficiency. *J Am Med Dir Assoc*. 2004 Nov-Dec; 5(6):382-6.
- **Drouet L.** Atherothrombosis as a systemic disease. *Cerebrovasc Dis*. 2002; 13 Suppl 1:1-6.
- **Epstein S.** The roles of bone mineral density, bone turnover, and other properties in reducing fracture risk during antiresorptive therapy. *Mayo Clin Proc*. 2005 Mar; 80(3):379-88.
- **Erdemli B, Serin-Kelicoglu S, Erdemli E.** A new approach to the treatment of osteoporosis. *Orthopedics*. 2005 Jan; 28(1):59-62.
- **Estevez-Gonzalez MD, Saavedra-Santana P, Betancor-Leon P.** Reduction of serum cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels in a juvenile population after isocaloric substitution of whole milk with a milk preparation (skimmed milk enriched with oleic acid). *J Pediatr*. 1998; 132(1):85-9.
- **EVN-Expert group on vitamins and minerals.** Safe upper levels for vitamins and minerals: report of the expert group on vitamins and minerals. ISBN 1-904026-11-7. Food Standards Agency Publications. May 2003.
- **Fairfield KM, Fletcher RH.** Vitamins for chronic disease prevention in adults: scientific review. *JAMA*. 2002 Jun 19; 287(23):3116-26.
- **Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S.** Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normally elderly men. *J Clin Invest* 2000; 106:1553-1560.

-
- **Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy TC, Ackert-Bicknell C, Hart CM, Rosen C, Nanes MS, Rubin J.** Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology*. 2004 Feb; 145(2):751-9. Epub 2003 Oct 16. .
 - **Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, Suh J, Frei B, Mudge GH, Selwyn AP, Ganz P.** Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet*. 2002 Mar 30; 359(9312):1108-13.
 - **Feldman EB.** Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 953-4.
 - **Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L, Guida L, Dello Russo A, Marotta T.** Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med*. 2000 Mar 27; 160(6):837-42.
 - **Fito M, Gimeno E, Covas MI, Miro E, Lopez-Sabater Mdel C, Farre M, de TR, Marrugat J.** Postprandial and short-term effects of dietary virgin olive oil on oxidant/antioxidant status. *Lipids*. 2002 Mar; 37(3):245-51.
 - **Fontani G, Corradeschi F, Felici A, Alfatti F, Bugarini R, Fiaschi AI, Cerretani D, Montorfano G, Rizzo AM, Berra B.** Blood profiles, body fat and mood state in healthy subjects on different diets supplemented with Omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Clin Invest*. 2005 Aug; 35(8):499-507.
 - **Formiguera X, Canton A.** Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004 Dec; 18(6):1125-46.
 - **Friedberg CE, Janssen MJ, Heine RJ, Grobbee DE.** Fish oil and glycemic control in diabetes. A meta-analysis. *Diabetes Care*. 1998 Apr; 21(4):494-500.

-
- **Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS.** Estimation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentration with use of preparative ultracentrifugation. *Clin Chem.* 1972; 18:499-509.
 - **Flynn CA.** Calcium supplementation in postmenopausal women. *Am Fam Physician.* 2004 Jun 15; 69(12):2822-3.
 - **Fossati P, Prencipe L.** Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982 Oct; 28(10):2077-80.
 - **Fukunaga K, Yoshida M, Nakazono N.** A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 1998 Sep-Oct; 12(5):300-3.
 - **Gaddy-Kurten D, Coker JK, Abe E, Jilka RL, Manolagas SC.** Inhibin suppresses and activin stimulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *Endocrinology.* 2002 Jan; 143(1):74-83.
 - **Garg A.** High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 1998 Mar; 67(3 Suppl):577S-582S.
 - **Genest J Jr, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Silberman SR, Wilson PW, Schaefer EJ.** Prevalence of lipoprotein (a) [Lp(a)] excess in coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1991 May 15; 67(13):1039-145.
 - **Gerhard GT, Duell PB.** Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1999 Oct; 10(5):417-28.
 - **Ghiselli A, D'Amicis A, Giacosa A.** The antioxidant potential of the Mediterranean diet. *Eur J Cancer Prev.* 1997 Mar; 6 Suppl 1:S15-9.
 - **Gil A, Rueda R.** Interaction of early diet and the development of the immune system. *Nutr Res* 2002; 15:263-292

-
- **Gil A.** Molecular basis of atherosclerosis. 27th Congress of internal Medicine. September 26th – October 1st. Granada 2004.
 - **Gillespie WJ, Gillespie LD, Handoll HH, Madhok R.** The Cochrane Musculoskeletal Injuries Group. *Acta Orthop Scand Suppl.* 2002 Oct; 73(305):15-9.
 - **Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, Covas M, Farre M, de La Torre-Boronat MC, Lopez-Sabater MC.** Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur J Clin Nutr.* 2002. Feb; 56(2):114-20.
 - **Giugliano D.** Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2000 Feb; 10(1):38-44.
 - **Glass CK, Witztum JL.** Atherosclerosis. The road ahead. *Cell.* 2001 Feb 23; 104(4):503-16.
 - **Glassman AH, Shapiro PA.** Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry.* 1998 Jan; 155(1):4-11.
 - **Goday A.** Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:657-670.
 - **Goerss JB, Kim CH, Atkinson EJ, Eastell R, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd.** Risk of fractures in patients with pernicious anemia. *J Bone Miner Res* 1992; 7:573-9.
 - **Goldbourt U, Neufeld HN.** Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1986; 6:357-77.
 - **Gonzalez-Santiago M, Martin-Bautista E, Carrero JJ, Fonolla J, Baro L, Bartolome MV, Gil-Loyzaga P, Lopez-Huertas E.** One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis.* 2005 Nov 17; [Epub ahead of print].

- **Gordon DJ, Rifkind BM.** High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989 Nov 9; 321(19):1311-6. 165.
- **Goulding A, Grant AM, Williams SM.** Bone and body composition of children and adolescents with repeated forearm fractures. *J Bone Miner Res.* 2005 Dec; 20(12):2090-6.
- **Grove TH.** Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem.* 1979 Apr; 25(4):560-4.
- **Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith Jr S, Fuster V.** Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 1281-1292.
- **Gustafsson IB, Ohrvall M, Ekstrand B.** Moderate amounts of n-3 fatty acids enriched seafood products are effective in lowering serum tryglycerides and blood pressure in healthy subjects. *J Hum Nutr Diet.* 1996; 9: 135-145.
- **Gutiérrez Fuentes JA, Gómez Gerique J, Gómez de la Cámara A, Rubio MA, García Hernández A, Arístegui I.** Dieta y riesgo cardiovascular en España (DRECE II). Descripción de la evolución del perfil cardiovascular. *Med Clin (Barc)* 2000; 115: 726-729.
- **Haban P, Klvanova J, Zidekova E, Nagyova A.** Dietary supplementation with olive oil leads to improved lipoprotein spectrum and lower n-6 PUFAs in elderly subjects. *Med Sci Monit.* 2004; 10(4):PI49-54.
- **Hackam DG, Peterson JC, Spence JD.** What level of plasma homocyst(e)ine should be treated? Effects of vitamin therapy on

- progression of carotid atherosclerosis in patients with homocyst(e)ine levels above and below 14 micromol/L. *Am J Hypertens*. 2000 Jan; 13(1 Pt 1):105-10.
- **Halperin RO, Sesso HD, Ma J, Buring JE, Stampfer MJ, Gaziano JM.** Dyslipidemia and the Risk of Incident Hypertension in Men. *Hypertension*. 2005 Dec 12; [Epub ahead of print].
 - **Hamerman D.** Osteoporosis and atherosclerosis: biological linkages and the emergence of dual-purpose therapies. *QJM*. 2005 Jul; 98(7):467-84.
 - **Hansson GK.** Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21; 352(16):1685-95.
 - **Harper CR and Jacobson TA.** The fats of life. The role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 2001; 161: 2185-2192.
 - **Harris A, Devaraj S, Jialal I.** Oxidative stress, alpha-tocopherol therapy, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2002 Sep; 4(5):373-80.
 - **Harris WS.** N-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids*. 1996; 31: 243-252.
 - **Harris WS.** N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*. 1997; 65: 1645 S-1654 S.
 - **Hayes KC, Pronckuk A, Perlman D.** Vitamin E in fortified cow milk uniquely enriches human plasma lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 211-218.
 - **He K, Song Y, Daviglius ML, Liu K, Van Horn L, Dyer AR, Greenland P.** Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a metaanalysis of cohort studies. *Circulation*. 2004; 109: 2705-2711.

-
- **Heaney RP.** The Vitamin D requirement in health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Oct; 97(1-2):13-9.
 - **Heinecke JW, Rosen H, Chait A.** Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest.* 1984 Nov;74(5):1890-4.
 - **Henry N. Ginsberg, Ira J. Goldberg.** *Principios de Medicina Interna. Harrison (Interamericana. 15ª edición. Año 2001)*
 - **Herrmann M, Widmann T, Herrmann W.** Homocysteine - a newly recognised risk factor for osteoporosis. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43(10):1111-7.
 - **Higdon JV, Liu J, Du SH, Morrow JD, Ames BN, Wander RC.** Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F(2)-isoprostanes. *Am J Clin Nutr.* 2000 Sep; 72(3):714-22.
 - **HLTC-Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration.** Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 1998 Mar 21; 316(7135):894-8.
 - **Hodgson SF, Watts NB, Bilezikian JP, Clarke BL, Gray TK, Harris DW, Johnston CC Jr, Kleerekoper M, Lindsay R, Luckey MM, McClung MR, Nankin HR, Petak SM, Recker RR, Anderson RJ, Bergman DA, Bloomgarden ZT, Dickey RA, Palumbo PJ, Peters AL, Rettinger HI, Rodbard HW, Rubenstein HA; AACE Osteoporosis Task Force.** American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: 2001 edition, with selected updates for 2003. *Endocr Pract.* 2003 Nov-Dec; 9(6):544-64.

-
- **Hofbauer LC, Lacey DL, Dunston CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S.** Interleukin- 1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*. 1999; 25:255-259.
 - **Hofbauer LC, Heufelder AE.** The role of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic diseases. *Clinical Review. J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85 (7): 2355-2363.
 - **Holick MF.** Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. *South Med J*. 2005 Oct; 98(10):1024-7.
 - **Hopper L, Ness A, Higgins JP, Moore T, Ebrahim S.** GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*. 1999; 354: 447-455.
 - **Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Moore H, Worthhington HV, Durrington PN, Ness AR, Capps NE, Davey Smith G, Rimmersma RA, Ebrahim SBJ.** Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease. *The Cochrane Library*. 2005, issue 3.
 - **Hu H, Pierce GN, Zhong G.** The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest*. 1999 Mar; 103(5):747-53.
 - **Hughes DA, Pinder AC.** N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigenpresentingfunction of human monocytes. *Am J Clin Nutr*. 2000 Jan; 71(1 Suppl):357S-60S.
 - **Hulshof KF, van Erp-Baart MA, Anttolainen M, Becker W, Church SM, Couet C, Hermann-Kunz E, Kesteloot H, Leth T, Martins I, Moreiras O, Moschandreas J, Pizzoferrato L, Rimestad AH, Thorgeirsdottir H, van Amelsvoort JM, Aro A, Kafatos AG, Lanzmann-Petithory D, van Poppel G.** Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on

- trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. *Eur J Clin Nutr*, 1999, 53: 143-157.
- **Iwamoto J, Takeda T, Sato Y.** Interventions to prevent bone loss in astronauts during space flight. *Keio J Med*. 2005 Jun; 54(2):55-9.
 - **Jamal SA, Ridout R, Chase C, Fielding L, Rubin LA, Hawker GA.** Bone mineral density testing and osteoporosis education improve lifestyle behaviors in premenopausal women: a prospective study. *J Bone Miner Res*. 1999 Dec; 14(12):2143-9.
 - **JHCI Expert Committee.** Eating long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids, as part of healthy lifestyle, has been shown to help maintain heart health. May, 2004.
 - **Jung K, Lein M, von Hosslin K, Brux B, Schnorr D, Loening SA, Sinha P.** Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer. *Clin Chem*. 2001 Nov; 47(11):2061-3.
 - **Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Dikalova AE, Sohal RS, Hatch GE, Jones DP, Mason RP, Barrett JC.** Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl(4) poisoning? *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 838-845.
 - **Kanatani M, Sugimoto T, Sowa H, Kobayashi T, Kanzawa M, Chihara K.** Thyroid hormone stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of RANKL-RANK interaction. *J Cell Physiol*. 2004 Oct; 201(1):17-25.
 - **Karlsson MK, Ahlborg HG, Karlsson C.** Female reproductive history and the skeleton-a review. *BJOG*. 2005 Jul; 112(7):851-6.
 - **Kesavulu MM, Kameswararao B, Apparao Ch, Kumar EG, Harinarayan CV.** Effect of omega-3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*. 2002 Feb; 28(1):20-6.

-
- **Keys A.** Seven Countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease. A commonwealth fund book. Cambridge. Harvard University Press, 1980.
 - **Khosla S, Atkinson EJ, Dunston CR, O'Fallen WM.** Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *JCEN.* 2002; 87 (4): 1550-1554.
 - **Koenig W, Lowel H, Baumert J, Meisinger C.** C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. *Circulation.* 2004 Mar 23; 109(11):1349-53.
 - **Kok FJ, Kromhout D.** Atherosclerosis--epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr.* 2004 Mar; 43 Suppl 1: I/2-5.
 - **Kratz M, Cullen P, Kannenberg F, Kassner A, Fobker M, Abuja PM, Assmann G, Wahrburg U.** Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(1):72-81.
 - **Kris-Etherton PM.** Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 1999; 100: 1253-1258. (a)
 - **Kris-Etherton PM, Pearson TA, Wan Y, Hargrove RL, Moriarty K, Fishell V, Etherton TD.** High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(6):1009-15. (b)
 - **Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD.** Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 179S-188S
 - **Kris-Etherton P, Eckel RH, Howard BV, St Jeor S, Bazzarre TL; Nutrition Committee Population Science Committee and Clinical Science Committee of the American Heart Association.** AHA Science

- Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2001 Apr 3; 103(13): 1823-5.
- **Kris-Etherton P, Harris WS, Appel LJ.** Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002; 106:2747-2757.
 - **Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ; AHA Nutrition Committee.** American Heart Association. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(2):151-152.
 - **Krishnaswamy K, Madhavan Nair K.** Importance of folate in human nutrition. *Br J Nutr*. 2001 May; 85 Suppl 2:S115-24.
 - **Kromhout D, Bosschieter EB, de Lezenne Coulander C.** The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*, 1985, 312: 1205-1209.
 - **Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J.** Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation*. 1999 Sep 14; 100(11):1154-60.
 - **Kruger MC, Horrobion DF.** Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: a review. *Prog Lipid Res*. 1997 Sep; 36(2-3):131-51.
 - **Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, Gericke G, van Papendorp DH.** Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging*. 1998 Oct; 10: 385-394.
 - **Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R (Austrian Study Group on Normative Values of Bone**

- Metabolism**). Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone*. 2003 Jun; 32(6):681-6.
- **Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H.** Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999 Sep 21; 100(12):1280-4.
 - **Laval AM, Laval M.** Lipid calcium interactions in experimental and human nutrition. *Pathol Biol*, 1996. 24:212-25.
 - **Lawson LD, Hughes BG.** Absorption of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil triacylglycerols or fish oil ethyl esters co-ingested with a high-fat meal. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 156: 960-963.
 - **Layne KS, Goh YK, Jumpsen JA, Ryan EA, Chow P, Clandinin MT.** Normal subjects consuming physiological levels of 18:3(n-3) and 20:5(n-3) from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. *J Nutr*. 1996; 266: 2130-2140.
 - **LeBoff MS, Kohlmeier L, Hurwitz S, Franklin J, Wright J, Glowacki J.** Occult vitamin D deficiency in postmenopausal US women with acute hip fracture. *JAMA*. 1999 Apr 28; 281(16):1505-11.
 - **Lee RT, Libby P.** The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Oct; 17(10):1859-67.
 - **Lee SK, Lorenzo JA.** Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. 1999; 140: 3552-3561.
 - **Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE.** Vitamin E in the primary prevention of

- cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005 Jul 6; 294(1):56-65.
- **Lehmann B.** The vitamin D3 pathway in human skin and its role for regulation of biological processes. *Photochem Photobiol*. 2005 Feb 1.
 - **Lepage G, Roy CC.** Direct trans-esterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res*. 1986 Jan; 27(1):114-20.
 - **Libby P, Ridker PM, Maseri A.** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Mar 5; 105(9):1135-43.
 - **Lipton Ali SM, Leitzel K, Chinchilli V, Witters L, Engle L, Holloway D, Bekker P, Dunstan CR.** Serum Osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. *Cancer Res*. 2002; 8: 2306-2310.
 - **Lobby P.** Principios de Medicina Interna. Harrison. (15.^a edición. Año 2001).
 - **Louheranta AM, Sarkkinen ES, Vidgren HM, Schwab US, Uusitupa MI.** Association of the fatty acid profile of serum lipids with glucose and insulin metabolism during 2 fat-modified diets in subjects with impaired glucose tolerance. *Am J Clin Nutr*. 2002 Aug; 76(2):331-7.
 - **Lovegrove JA, Brooks CN, Murphy MC, Gould BJ, Williams CM.** Use of manufactured foods enriched with fish oils as a means of increasing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid intake. *Br J Nutr*. 1997; 78: 193-5.
 - **Lucock M.** Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab*. 2000 Sep-Oct; 71 (1-2): 121-38.
 - **Luft FC.** Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens*. 1998 Dec; 16(12 Pt 2):1871-8.
 - **Lumbers M, New SA, Gibson S, Murphy MC.** Nutritional status in elderly female hip fracture patients: comparison with an age-matched

- home living group attending day centres. *Br J Nutr.* 2001 Jun; 85(6):733-40.
- **Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA.** Textbook of Cardiovascular Medicine. Ed Topol. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1998; 2340-2413.
 - **Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature.* 2000 Sep 14; 407(6801):233-41.
 - **Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A.** Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Apr; 88(4):1523-7.
 - **Malinow MR, Duell PB, Williams MA, Kruger WD, Evans AA, Anderson PH, Block PC, Hess DL, Upson BM, Graf EE, Irvin-Jones A, Wang L.** Short-term folic acid supplementation induces variable and paradoxical changes in plasma homocyst(e)ine concentrations. *Lipids.* 2001; 36 Suppl: S27-32.
 - **Mantzioris E, Cleland LG, Gibson RA, Neumann MA, Demasi M, James MJ.** Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72: 42-48.
 - **Marchioli R, Schweiger C, Tavazzi L, Valagussa F.** Efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: results of GISSI-Prevenzione trial. *Lipids.* 2001; 36 Suppl: S119-26.
 - **Martin TJ.** Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation. *J Clin Invest.* 2005 Sep 1; 115(9):2322-2324.
 - **Martinson BC, O'Connor PJ, Pronk NP.** Physical inactivity and short-term all-cause mortality in adults with chronic disease. *Arch Intern Med.* 2001 May 14; 161(9):1173-80.
 - **Mason JC, Kapahi P, Haskard DO.** Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus

- erythematosus. Lack of correlation with levels of circulating vascular cell adhesion molecule 1. *Arthritis and Rheumatism*. 1993; 36 (4): 519-527.
- **Massaro M, Carluccio MA, De Caterina R.** Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: a clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet. *Cardiologia*. 1999 Jun; 44(6):507-13.
 - **Massaro M, De Caterina R.** Vasculoprotective effects of oleic acid: epidemiological background and direct vascular antiatherogenic properties. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2002; 12(1):42-51.
 - **Mata P, Varela O, Alonso R, Lahoz C, de Oya M, Badimon L.** Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Oct; 17(10):2088-95.
 - **Mataix J, Mañas, M, Llopis J, Martinez-Victoria E.** Tabla de composición de alimentos españoles. 1998. Universidad de Granada. ed., Granada.
 - **Mataix J, Gil A.** Libro blanco de los omega-3. 2002. Editor: PULEVA Food. ISBN: 84-699-7618-4.
 - **McCully KS.** Vascular pathology of homocystinemia. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
 - **McKay DL, Perrone G, Rasmussen H, Dallal G, Blumberg JB.** Multivitamin/mineral supplementation improves plasma B-vitamin status and homocysteine concentration in healthy older adults consuming a folate-fortified diet. *J Nutr*. 2000 Dec; 130(12):3090-6.
 - **Meiattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G, Tarli P.** The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin Chem*. 1978 Dec; 24(12):2161-5.)

-
- **Meier C, Woitge HW, Witte K, Lemmer B, Seibel MJ.** Supplementation with oral vitamin D3 and calcium during winter prevents seasonal bone loss: a randomized controlled open-label prospective trial. *J Bone Miner Res.* 2004 Aug; 19(8):1221-30. Epub 2004 May 24.
 - **Melhus H, Michaelsson K, Holmberg L, Wolk A, Ljunghall S.** Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res* 1999; 14:129–35.
 - **Menéndez A, Fernández-Britto JE.** Metabolismo de la homocisteína y su relación con la aterosclerosis. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999; 12:155.
 - **Meydani M, Natiello F, Goldin B, Free N, Woods M, Schaefer E, Blumberg JB, Gorbach SL.** Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. 1991 April; *J Nutr* 121, 484–491.
 - **Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Pedrosa M, Diamond R, Schaefer EJ.** Assessment of the safety of supplementation with different amounts of vitamin E in healthy older adults. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(2):311-318
 - **Mezquita-Raya P, Muñoz Torres M, Luna JD, Luna V, López-Rodríguez F, Torres-Vela E, Escobar-Jimenez F.** Relation between vitamin D insufficiency, bone density and bone metabolism in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1-8.
 - **Mezquita-Raya P, de la Higuera M, Garcia DF, Alonso G, Ruiz-Requena ME, de Dios Luna J, Escobar-Jimenez F, Munoz-Torres M.** The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2005 Nov; 16(11):1368-74.
 - **Miles EA, Thies F, Wallace FA, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA, Calder PC.** Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble

- adhesion molecule concentrations. *Clin Sci (Lond)*. 2001 Jan; 100(1):91-100.
- **Millán Núñez-Cortés J, Valderrama Rojas M, Torres Segovia F, Álvarez-Sala Walter L.** Aspectos generales de la patogenia de la arteriosclerosis. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2000; 12(2):3-13.
 - **MSC-Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección general de salud pública. Subdirección general de promoción de la salud y epidemiología.** Encuesta Nacional de Salud de España 2001. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
 - **Molloy AM.** Folate Bioavailability and Health. *Int J Vitamin Res* 2001, 71 (6), 27-31.
 - **Moreno JJ, Mitjavila MT.** The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis. *J Nutr Biochem*. 2003; 14(4):182-195.
 - **Morris M C, Manson J E, Rosner B, Buring J E, Willett W C, Hennekens C H.** Fish consumption and cardiovascular disease in the Physicians' Health Study: a prospective study. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 166-175.
 - **Morrissey PA, Sheehy PJ.** 1999 Optimal nutrition: vitamin E. *Proc Nutr Soc* 58, 459-468.
 - **Muñoz-Torres M, Mezquita Raya P.** New approaches to the role of estrogens in bone metabolism. *Med Clin (Barc)*. 1999 Sep 18; 113(8):292-3.
 - **Muñoz-Torres M, Mezquita-Raya P, Lopez-Rodriguez F, Torres-Vela E, de Dios Luna J, Escobar-Jimenez F.** The contribution of IGF-I to skeletal integrity in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001 Dec; 55(6):759-66.
 - **Muñoz-Torres M, Alonso G, Mezquita-Raya P.** Prevención y tratamiento de la osteoporosis. *Endocrinol Nutr* 2003; 50 (1):00-0.

-
- **Muñoz-Torres M, de la Higuera Lopez-Frias M, Fernandez Garcia D.** Advances in osteochlast biology: the osteoprotegerin-RANK ligand system. *Med Clin (Barc)*. 2004 Jan 24; 122(2):75-7.
 - **Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. 1982.** Multiple Risk Factor Intervention Trial. Risk factor changes and mortality results. *JAMA*. 1997 Feb 19; 277(7):582-94.
 - **Nabel EG.** Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2003; 349:60-72.
 - **Nakamura MT, Nara TY.** Essential fatty acid síntesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leuk Essent Fatty Acids* 2003; 68:145-150.
 - **Nakashima A, Nakashima R, Ito T, Masaka T, Yorioka N.** HMG-CoA reductase inhibitors prevent bone loss in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2004 Sep; 21(9):1020-4.
 - **Nappo F, De Rosa N, Marfella R, De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF, Farzati B, Giugliano D.** Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA*. 1999; 281, 2113-2118.
 - **Nathan L, Chaudhuri G.** Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37:477-515.
 - **NCEP-National Cholesterol Education Program. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. (Adult Treatment Panel III).** Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16; 285(19):2486-97.
 - **NCEP-National Cholesterol Education Program. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III).** Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and

- Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec 17; 106(25):3143-421.
- **NDA (Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies).** Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the presence of *trans* fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of *trans* fatty acids. *The EFSA Journal*. 2004; 81, 1-49.
 - **NIH-Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy.** Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001 Feb 14; 285(6):785-95.
 - **Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P.** Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem*. 1997 Jul; 43(7):1209-14.
 - **NOF-National Osteoporosis Foundation.** Osteoporosis: Review of the evidence for prevention, diagnosis and treatment and cost-effectiveness analysis. *Osteoporos Int* 1998; 8(Suppl4):S1
 - **Okita M, Hayashi M, Sasagawa T, Takagi K, Suzuki K, Kinoyama S, Ito T, Yamada G.** Effect of a moderately energy-restricted diet on obese patients with fatty liver. *Nutrition*. 2001 Jul-Aug; 17(7-8):542-7.
 - **Okita M, Sasagawa T, Tomioka K, Hasuda K, Ota Y, Suzuki K, Watanabe A.** Habitual food intake and polyunsaturated fatty acid deficiency in liver cirrhosis. *Nutrition*. 2002 Apr; 18(4):304-8.
 - **Olson RE.** Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J Nutr*. 1998 Feb;128(2 Suppl):439S-443S.
 - **Ono K, Kaneko H, Choudhary S, Pilbeam CC, Lorenzo JA, Akatsu T, Kugai N, Raisz LG.** Biphasic effect of prostaglandin E2 on osteoclast formation in spleen cell cultures: role of the EP2 receptor. *J Bone Miner Res*. 2005 Jan; 20(1):23-9.

-
- **Ortega RM, Aranceta J, Serra-Majem L, Entrala A, Gil A, Mena MC.** Nutritional risks in the Spanish population: results of the eVe study. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57 Suppl 1:S73-75.
 - **Ortega RM, Lopez Sobaler AM, Aranceta J, Serra Majem L.** Are there any nutritional deficiencies in the Mediterranean Diet? *Arch Latinoam Nutr.* 2004 Jun; 54(2 Suppl 1):87-91.
 - **Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H.** Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000; 1:107-112.
 - **Paffenbarger RS Jr, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB.** The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med.* 1993; 328:538-545.
 - **Palacios S, Castelo-Branco C, Cifuentes I, von Helde S, Baro L, Tapia-Ruano C, Menendez C, Rueda C.** Changes in bone turnover markers after calcium-enriched milk supplementation in healthy postmenopausal women: a randomized, double-blind, prospective clinical trial. *Menopause.* 2005 Jan-Feb;12(1):63-8.
 - **Panagiotakos DB, Pitsavos C, Polychronopoulos E, Chrysohoou C, Zampelas A, Trichopoulou A.** Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review. *Med Sci Monit.* 2004; 10(8):RA193-198.
 - **Parhami F, Garfinkel A, Demer L.** Role of Lipids in Osteoporosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2346-2348.
 - **Parhami F, Tintut Y, Patel JK, Mody N, Hemmat A, Demer LL.** Regulation of vascular calcification in atherosclerosis. *Z Kardiol.* 2001; 90 Suppl 3:27-30.

-
- **Perez-Jimenez F, Castro P, Lopez-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A, Lopez-Segura F, Velasco F, Marin C, Fuentes F, Ordovas JM.** Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat. *Atherosclerosis*. 1999 Aug; 145(2):351-8.
 - **Perona JS, Canizares J, Montero E, Sanchez-Dominguez JM, Catala A, Ruiz-Gutierrez V.** Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects. *Clin Nutr*. 2004 Oct; 23(5):1113-21.
 - **Potischman N, Freudenheim JL.** Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status: an overview. *J Nutr*. 2003; 133 Suppl 3:873S-874.
 - **Potischman N.** Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *J Nutr*. 2003; 133 Suppl 3:875S-880S.
 - **Preece MA, Tomlinson S, Ribot CA, Pietrek J, Korn HT, Davies DM, Ford JA, Dunnigan MG, O'Riordan JL.** Studies of vitamin D deficiency in man. *Q J Med*. 1975 Oct; 44(176):575-89.
 - **Priante G, Bordin L, Musacchio E, Clari G, Baggio B.** Fatty acids and cytokine mRNA expression in human osteoblastic cells: a specific effect of arachidonic acid. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Apr; 102(4):403-9.
 - **Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A.** Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr*. 2004 Oct; 80(4):1012-8.
 - **Qi L, Shen H, Ordovas JM.** Hearts and bones. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2003 Jun; 13(3):165-74.
 - **Rader JL.** Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine. *J Nutr* 2002; 132(8):2466S-2470S.
 - **Radi ZA, Khan NK.** Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. *Inflamm Res*. 2005 Sep; 54(9):358-66.

-
- **Raisz LG.** Clinical practice. Screening for osteoporosis. *N Engl J Med.* 2005 Jul 14; 353(2):164-71.
 - **Ranganathan R, Nicklas TA, Yang SJ, Berenson GS.** The nutritional impact of dairy product consumption on dietary intakes of adults (1995-1996): the Bogalusa Heart Study. *J Am Diet Assoc.* 2005 Sep; 105(9):1391-400.
 - **Refsum H.** Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. *British Journal of Nutrition.* 2001; 85, Suppl.2, S109-S113.
 - **Reginster JY.** The high prevalence of inadequate serum vitamin D levels and implications for bone health. *Curr Med Res Opin.* 2005 Apr; 1(4):579-86.
 - **Reynolds RM, Dennison EM, Walker BR, Syddall HE, Wood PJ, Andrew R, Phillips DI, Cooper C.** Cortisol Secretion and Rate of Bone Loss in a Population-Based Cohort of Elderly Men and Women. *Calcif Tissue Int.* 2005 Sep; 77(3):134-8.
 - **Reynolds TM, Marshall PD, Brain AM.** Hip fracture patients may be vitamin B6 deficient. Controlled study of serum pyridoxal-5'-phosphate. *Acta Orthop Scand.* 1992 Dec; 63(6):635-8.
 - **Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM Jr; Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study Investigators.** Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med.* 2001 Jun 28; 344(26):1959-65.
 - **Riggs BL.** Role of the vitamin D - endocrine system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. *J Cell Biochem* 2003; 88 (2): 209-215.

-
- **Roche HM.** Unsaturated fatty acids. *Proc Nutr Soc.* 1999 May; 58(2):397-401.
 - **Rodenas S, Rodriguez-Gil S, Merinero MC, Sanchez-Muniz FJ.** Dietary exchange of an olive oil and sunflower oil blend for extra virgin olive oil decreases the estimate cardiovascular risk and LDL and apolipoprotein AII concentrations in postmenopausal women. *J Am Coll Nutr.* 2005 Oct; 24(5):361-9.
 - **Rogers MJ.** New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des.* 2003; 9(32):2643-58..
 - **Ros Rahola E, Fisac C, Pérez-Heras A.** ¿Qué es realmente la dieta mediterránea? *FMC* 1998; 5: 557-571.
 - **Rosen CJ.** Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2005 Aug 11; 353(6):595-603.
 - **Ross R, Fuster V.** The pathogenesis of atherosclerosis. En: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editores. *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Filadelfia: Lippincott-Raven, 1996; 491-507.
 - **Ross R.** Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340(2):115-26.
 - **Rupp H, Wagner D, Rupp T, Schulte LM, Maisch B.** Risk stratification by the "EPA+DHA level" and the "EPA/AA ratio" focus on anti-inflammatory and antiarrhythmogenic effects of long-chain omega-3 fatty acids. *Herz.* 2004 Nov; 29(7):673-85.
 - **Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T.** 17- β Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin (OPG)/osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) by a mouse stromal cell line ST-2. *J Bone Miner Res.*1999; 14 (Suppl 1): FO 95.

-
- **Sakaguchi K, Morita I, Murota S.** Eicosapentaenoic acid inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1994 Feb; 50(2):81-4.
 - **Salam AM.** Lipid-lowering therapy in patients with average cholesterol and high cardiovascular risk, insights from the Heart Protection Study. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2004 Sep;18(5):387-9.
 - **Sanders TA.** Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 176S-180S.
 - **Sanders TA.** Olive oil and the Mediterranean diet. *Int J Vitam Nutr Res.* 2001; 71(3):179-184.
 - **Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K.** Effect of folate and mecobalamin on hip fractures in patients with stroke: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 2005; 293:1082-8.
 - **Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Davis CE, Abolafia JM, Lippel K, Levy RI.** Lipoprotein(a) levels and risk of coronary heart disease in men. The lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *JAMA.* 1994 Apr 6; 271(13):999-1003.
 - **Schlemmer CK, Coetzer H, Claassen N, Kruger MC.** Oestrogen and essential fatty acid supplementation corrects bone loss due to ovariectomy in the female Sprague Dawley rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1999 Dec; 61(6):381-90.
 - **Schmidt EB, Christensen JH, Aardestrup I, Madsen T, Riahi S, Hansen VE, Skou HA.** Marine n-3 fatty acids: basic features and background. *Lipids,* 2001, 36: 65S-8S.
 - **Schnell JW, Anderson RA, Stegner JE, Schindler SP, Weinberg RB.** Effects of a high polyunsaturated fat diet and vitamin E supplementation on high-density lipoprotein oxidation in humans. *Atherosclerosis* 2001; 159: 459-466.

- **Segal-Isaacson CJ, Wylie-Rosett J.** The cardiovascular effects of fish oils and omega-3 fatty acids. *Heart Dis.* 1999 Jul-Aug; 1(3):149-54.
- **SEIOMM- Sociedad Española de investigaciones óseas y metabolismo mineral.** Guía de Práctica Clínica “Osteoporosis postmenopáusica”.
- **SEQC-Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas.** Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la alanina aminotransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1987; 6: 241-244.
- **SEQC-Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas.** Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la aspartato aminotransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim Clin* 1987; 6: 235-239.
- **Seman LJ, DeLuca C, Jenner JL, Cupples LA, McNamara JR, Wilson PW, Castelli WP, Ordovas JM, Schaefer EJ.** Lipoprotein(a)-cholesterol and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Clin Chem.* 1999 Jul; 45(7):1039-46.
- **Sepúlveda-Sánchez JM, Matía-Francés R, Martínez-Salio A, de la Aleja-Tejera J, Rodríguez Peña Marín M, Porta-Etessam J.** Homocisteína y enfermedad cerebrovascular. *Rev Neurol* 2004; 38(4):347-358.
- **Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Perez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Pena Quintana L.** Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). *Med Clin (Barc).* 2003 Nov 29; 121(19):725-32.
- **Shea B, Wells G, Cranney A, Zytaruk N, Robinson V, Griffith L, Ortiz Z, Peterson J, Adachi J, Tugwell P, Guyatt G; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group.** Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VII. Meta-

- analysis of calcium supplementation for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev.* 2002 Aug; 23(4):552-9.
- **Simpoulous AP, Leaf A, Salem Jr N.** Statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2000; 63:119-121.
 - **Singleton CB, Walker BD, Cambell TJ.** n-3 Polyunsaturated fatty acids and cardiac mortality. *Aust NZ J Med.* 2000; 30: 246–251.
 - **Soot T, Jurimae T, Jurimae J, Gapeyeva H, Paasuke M.** Relationship between leg bone mineral values and muscle strength in women with different physical activity. *J Bone Miner Metab.* 2005; 23(5):401-6.
 - **Steinberg D, Witztum JL.** *Molecular Basis of Cardiovascular Disease.* Ed. Chien. Saunders. Philadelphia. 1999; 458-475.
 - **Steinberg D.** Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med.* 2002 Nov; 8(11):1211-7.
 - **Steingrimsdottir L, Gunnarsson O, Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G.** Relationship between serum parathyroid hormone levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *JAMA.* 2005 Nov 9; 294(18):2336-41.
 - **Stephens N, Parsons A, Schofield P, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson M.** Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781–6.
 - **Strain JJ, Dowey L, Ward M, Pentieva K, McNulty H.** B-vitamins, homocysteine metabolism and CVD. *Proc Nutr Soc.* 2004 Nov;63(4):597-603.
 - **Stringer MD, Gorog PG, Freeman A, Kakkar VV.** Lipid peroxides and atherosclerosis. *BMJ.* 1989; 298, 281-284.

-
- **Suda T, Kobayashi K, Jimi E, Udagawa N, Takahashi N.** The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp.* 2001; 232: 235-47; discussion 247-50.
 - **Sun D, Krishnan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernández G.** Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res.* 2003 Jul; 18(7):1206-16.
 - **Sun L, Tamaki H, Ishimaru T, Teruya T, Ohta Y, Katsuyama N, Chinen I.** Inhibition of osteoporosis due to restricted food intake by the fish oils DHA and EPA and perilla oil in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004 Dec; 68(12):2613-5.
 - **Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D.** George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May; 20(5):1185-8.
 - **Tanko LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, McNabb MA, Cummings SR.** Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2005 Nov; 20(11):1912-20.
 - **Teegarden D, Lyle RM, Proulx WR, Johnston CC, Weaver CM.** Previous milk consumption is associated with greater bone density in young women. *Am J Clin Nutr.* 1999 May; 69(5):1014-7.
 - **Terada S, Takizawa M, Yamamoto S, Ekazaki O, Itakura H, Akagawa KS.** Eicosapentaenoic acid inhibits CSF-induced human monocyte survival and maturation into macrophage through the stimulation of H₂O₂ production. *J Leukoc Biol.* 2002 Jun; 71(6):981-6.
 - **Terano T.** Effect of omega 3 polyunsaturated fatty acid ingestion on bone metabolism and osteoporosis. *World Rev Nutr Diet.* 2001; 88:141-7.
 - **Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble, RF.** Association of n-3

- polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003; 361:477-485.
- **Tholstrup T, Hellgren LI, Petersen M, Basu S, Straarup EM, Schnohr P, Sandstrom B.** A solid dietary fat containing fish oil redistributes lipoprotein subclasses without increasing oxidative stress in men. *J Nutr*. 2004 May; 134(5):1051-7.
 - **Thomas MK, Demay MB.** Vitamin D deficiency and disorders of vitamin D metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2000 Sep; 29(3):611-27.
 - **Thomsen C, Rasmussen O, Christiansen C, Pedersen E, Vesterlund M, Storm H, Ingerslev J, Hermansen K.** Comparison of the effects of a monounsaturated fat diet and a high carbohydrate diet on cardiovascular risk factors in first degree relatives to type-2 diabetic subjects. *Eur J Clin Nutr*. 1999 Oct; 53(10):818-23.
 - **Thurnham DI, Smith E, Flora PS.** Concurrent liquid- chromatographic assay of retinol, alfa tocopherol, beta-carotene, alfa-carotene, lycopene and beta-cryptoxanthin in plasma with tocopherol acetate as internal standard. *Clinical Chemistry*. 1988; 34: 377-381.
 - **Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ Jr, Nassar BA.** Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Sep; 36(3):758-65.
 - **Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN, Kuller LH.** Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Jun; 17(6):1121-7
 - **Trautwein EA.** n-3 Fatty acids-physiological and technical aspects for their use in food. *Eur J Lipid Sci Technol* . 2001; 103:45-55.

- **Trichopoulou A, Lagiou P.** Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev.* 1997 Nov; 55(11 Pt 1):383-9.
- **Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Lagiou A.** Mediterranean diet and coronary heart disease: are antioxidants critical? *Nutr Rev.* 1999 Aug; 57(8):253-5.
- **Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ocke MC, Peeters PH, van der Schouw YT, Boeing H, Hoffmann K, Boffetta P, Nagel G, Masala G, Krogh V, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bamia C, Naska A, Benetou V, Ferrari P, Slimani N, Pera G, Martinez-Garcia C, Navarro C, Rodriguez-Barranco M, Dorronsoro M, Spencer EA, Key TJ, Bingham S, Khaw KT, Kesse E, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Berglund G, Wirfalt E, Hallmans G, Johansson I, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Hundborg HH, Riboli E, Trichopoulos D.** Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ.* 2005 Apr 30; 330(7498):991. Epub 2005 Apr 8.
- **Trinder P.** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969; 6: 24-27.
- **Tsai MY, Arnett DK, Eckfeldt JH, Williams RR, Ellison RC.** Plasma homocysteine and its association with carotid intimal-medial wall thickness and prevalent coronary heart disease: NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis.* 2000; 151, 519-524.,
- **Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA, Kiel DP.** Low plasma vitamin B (12) is associated with lower BMD: The Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2005; 20:152-8.
- **Turan B, Can B, Delilbasi E.** Selenium combined with vitamin E and vitamin C restores structural alterations of bones in heparin-induced osteoporosis. *Clin Rheumatol.* 2003 Dec; 22(6):432-6.

-
- **Ubbink JB, Hayward Vermaak WJ, Bissbort S.** Rapid HPLC assay for total homocysteine levels in human serum. *J of Chrom.* 1991; Vol 565, 441-446.
 - **Urquiaga I, Guasch V, Marshall G, San Martin A, Castillo O, Rozowski J, Leighton F.** Effect of Mediterranean and Occidental diets, and red wine, on plasma fatty acids in humans. An intervention study. *Biol Res.* 2004; 37(2):253-61.
 - **van den Berg M, Franken DG, Boers GH, , Blom HJ, Jakobs C, Stehouwer CD, Rauwerda JA.** Combined vitamin B6 plus folic acid in young patients with atherosclerosis and hyperhomocysteinaemia. *J Vasc Surg* 1994; 20: 933-40.
 - **Varga F, Spitzer S, Klaushofer K.** Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int.* 2004 Apr; 74(4):382-7.
 - **Velasco JA, Cosin J, Maroto JM, Muniz J, Casasnovas JA, Plaza I, Abadal LT.** [Guidelines of the Spanish Society of Cardiology for cardiovascular disease prevention and cardiac rehabilitation] *Rev Esp Cardiol.* 2000 Aug; 53(8):1095-120.
 - **Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, van den Berg M, de Jong SC, Mackaay AJ, van Campen CM, Visser FC, Jakobs CA, Bulterjis EJ, Rauwerda JA.** *Lancet.* 2000 Feb 12; 355(9203):517-22.
 - **Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nalsen C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH; KANWU Study.** Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia.* 2001 Mar; 44(3):312-9.

-
- **Verhaar MC, Stroes E, Rabelink TJ.** Folates and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Jan; 22(1):6-13.
 - **Vicaut E.** Opposite effects of red blood cell aggregation on resistance to blood flow. *J. Cardiovasc. Surg.* 1995; 36:361-368.
 - **Vieth R.** The role of vitamin D in the prevention of osteoporosis. *Ann Med.* 2005; 37(4):278-85.
 - **Villar F, Banegas JR, Donado MM, Rodríguez-Artalejo F.** Sociedad Española de Aterosclerosis. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA, 2003.
 - **Visioli F, Galli C.** The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev.* 1998 May; 56(5 Pt 1):142-7.
 - **Visioli F, Rise P, Plasmati E, Pazzucconi F, Sirtori CR, Galli C.** Very low intakes of n-3 fatty acids incorporated into bovine milk reduce plasma triacylglycerol and increase HDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Pharmacol Res*, 2000, 41: 571-576.
 - **Visioli F, Galli C.** Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002; 42(3):209-221.
 - **Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C.** Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr.* 2004; 6:1-7.
 - **von Schacky C, Baumann K, Angerer P.** The effect of n-3 fatty acids on coronary atherosclerosis: results from SCIMO, an angiographic study, background and implications. *Lipids.* 2001; 36 Suppl: S99-102.
 - **Wald DS, Law M, Morris JK.** Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325(7374):1202.

-
- **Wander RC, Du SH.** Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am J Clin Nutr.* 2000 Sep; 72(3):731-7.
 - **Wang C, Chung M, Lichtenstein A, Balk E, Kupelnick B, DeVine D, Lawrence A, Lau J.** Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular disease. Evidence Report/ Technology Assessment No. 94 (Prepared by Tufts-New England Medical Center Evidence-based Practice Centre). AHQR Publication No. 04 E009-2. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.
 - **Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M.** Changes in physical activity, mortality, and incidence of coronary heart disease in older men. *Lancet.* 1998; 351:1603-1608.
 - **Wahrburg U.** What are the health effects of fat? *Eur J Nutr.* 2004; 43:1/6-1/11.
 - **Watkins BA, Shen CL, McMurtry JP, Xu H, Bain SD, Allen KG, Seifert MF.** Dietary lipids modulate bone prostaglandin E2 production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks. *J Nutr.* 1997 Jun; 127(6):1084-91.
 - **Watkins BA, Lippman HE, Le Bouteiller L, Li Y, Seifert MF.** Biochemical and molecular actions of fatty acids in bone modeling. *World Rev Nutr Diet.* 2001; 88:126-40.
 - **Watkins BA, Li Y, Lippman HE, Feng S.** Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 Jun; 68(6):387-98.
 - **Welch GN, Loscalzo J.** Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1042-1050.
 - **Weley AS.** Does milk make children grow? Relationships between milk consumption and height in NHANES 1999-2002. *Am J Hum Biol.* 2005 Jul-Aug; 17(4):425-41.

-
- **Whelan AP, Sutherland WH, McCormick MP, Yeoman DJ, de Jong SA, Williams MJ.** Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease. *Intern Med J.* 2004 May; 34(5):224-8.
 - **WHO.** Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994; 843: 1-129.
 - **WHO.** Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva, 1995. Technical report; 854.
 - **WHO/FAO expert consultation.** Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO technical Report Series n° 916. 2003.
 - **WHO.** Prevention of chronic diseases: WHO global strategy on diet, physical activity and health. Ginebra, 2003.
 - **WHO.** WHO Atlas of Heart Disease and Stroke, 2004.
 - **WHO.** Informe sobre la salud en el mundo 2001. Cambiemos el rumbo de la historia. Anexo estadístico. Pag 134. Ginebra 2004.
 - **Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Ross JA.** Down-regulation of the acute-phase response in patients with pancreatic cancer cachexia receiving oral eicosapentaenoic acid is mediated via suppression of interleukin-6. *Clin Sci (Lond).* 1997 Feb; 92(2):215-21.
 - **Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D.** Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61(6 Suppl):1402S-1406S.
 - **Williams CM, Moore F, Morgan L, Wright J.** Effects of n-3 fatty acids on postprandial triacylglycerol and hormone concentrations in normal subjects. *Br J Nutr,* 1992, 68: 655-666.
 - **Williams CM.** Postprandial lipid metabolism: effects of dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc.* 1997 Jul; 56(2):679-92.

- **Xu H, Watkins BA, Seifert MF.** Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry. *Calcif Tissue Int.* 1995 Oct; 57(4):293-300.
- **Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, Williams CM, Newsholme EA, Calder PC.** Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr.* 1998 Jan; 67(1):129-35.
- **Yamamoto Y, Noguchi T, Takahashi N.** Effects of calcitonin on osteoclast. *Clin Calcium.* 2005 Mar; 15(3):147-51.
- **Yavin E, Brand A, Green P.** Docosahexaenoic acid abundante in the brain: a bioevidence to combat oxidative stress. *Nutr Neurosci.* 2002; 5:149-157.
- **Zampelas A, Peel AS, Gould BJ, Wright J, Williams CM.** Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apoprotein levels in healthy men. *Eur J Clin Nutr.* 1994; 48: 842-848.
- **Zemel MB, Richards J, Milstead A, Campbell P.** Effects of calcium and dairy on body composition and weight loss in African-American adults. *Obes Res.* 2005 Jul; 13(7):1218-25.
- **Zhu K, Du X, Cowell CT, Greenfield H, Blades B, Dobbins TA, Zhang Q, Fraser DR.** Effects of school milk intervention on cortical bone accretion and indicators relevant to bone metabolism in Chinese girls aged 10-12 y in Beijing. *Am J Clin Nutr.* 2005 May; 81(5):1168-75.

Curriculum vitae

Elena C. Martín Bautista nació en Granada el 23 de Noviembre de 1977. Se licenció en Farmacia en el año 2003 con una nota media de expediente de 3´2. En el año 2003 le fue concedida una beca de la Fundación Universidad-Empresa para realizar su Tesis Doctoral en colaboración con la empresa PULEVA Biotech en el Departamento de Nutrición y Salud. Asistió a los cursos de Doctorado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, dónde desarrolló su Suficiencia Investigadora y consiguió el Diploma de Estudios Avanzados en junio de 2005 con la calificación de Sobresaliente. Actualmente, desarrolla su labor investigadora en el Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, disfrutando de una beca perteneciente al 6ª Programa Marco Europeo en el proyecto "The Early Nutrition Programming Project".

PUBLICACIONES

- González-Santiago M, Martín-Bautista E, Carrero JJ, Fonollá J, Baró L, Bartolomé MV, Gil-Loyzaga P, López-Huertas E. "*Administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, improves blood lipids, antioxidant status and reduces the development of atherosclerosis in hyperlipemic rabbits*". **Atherosclerosis**. 2005 Nov 17; *In press*.
- Carrero JJ, Martín-Bautista E, Baró L, Fonollá J, Jiménez J, Boza J, López-Huertas E. "*Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas de incrementar su ingesta*". **Nutrición Hospitalaria**. 2005 Jan; 20(1):56-62.

COMUNICACIONES A CONGRESOS PUBLICADAS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

- Martín-Bautista E, Martín-Matillas M, Dolz V, Pozuelo R, Quer J, Puidgeta I, Rivero M, Campoy C. "Atherogenic risk related to growth and physical activity parameters in healthy prepubertal andalusian children". **Annals of Nutrition and Metabolism (The Official South African Journal of Clinical Nutrition-SAJCN)**. 2005 September; 49 (Suppl.1):320.
- Martín-Matillas M, Martín-Bautista E, Dolz V, Pozuelo R, Quer J, Puidgeta I, Rivero M, Campoy C. "Relationship between biomarkers of bone remodelling anthropometric parameters and physical activity in healthy andalusian children". **Annals of Nutrition and Metabolism (The Official South African Journal of Clinical Nutrition-SAJCN)**. 2005 September; 49 (Suppl.1):381.
- E. Martín-Bautista, M. Muñoz-Torres, J.Fonollá, M. Quesada, J. J. Carrero, E. Lopez-Huertas. "Consumption of milk enriched with fish oils, oleic acid and vitamins B6, E and folic acid reduces cholesterol and improves nutritional status in hypercholesterolemic patients". **Clinical Nutrition**. 2005 August; 24 (4): 640.
- M. Gonzalez-Santiago, E. Martín-Bautista, JJ. Carrero, JJ. Boza, J. Fonollá, L. Baró, MV. Bartolomé, P. Gil-Loyzaga, E: López-Huertas. "The administration of hydroxytyrosol reduces the development of atherosclerosis in hyperlipemic rabbits ". **Clinical Nutrition**. 2005 August; 24 (4): 638.
- Carrero JJ, Baró L, Martín-Bautista E, Fonollá J, González-Santiago M, Castro Sor J, Lozano V, Marti JL, Jiménez J, Boza JJ and López-Huertas E. « Les acides gras oméga-3 et l'acide folique contribuent à la réduction des facteurs de risque cardiovasculaire chez les personnes ayant souffert un infarctus du myocarde: enrichissement diététique par l'intermédiaire d'un produit laitier fonctionnel ». **Nutrition Clinique et métabolisme**, Novembre 2003. 17(s1):29-30.

- Carrero JJ, Martín-Bautista E, Baró L, Fonollá J, Castro Sor J, Lozano V, Marti JL, Jiménez J, Boza JJ and López-Huertas E. "*N-3 fatty acids, oleic acid and folic acid supplementation strategy in secondary prevention of myocardial infarct*".

Nutrition, Noviembre 2003. 19(11/12): 1053-1054.

- Carrero JJ, Baró L, Martín-Bautista E, Fonollá J, González-Santiago M, Castro Sor J, Lozano V, Marti JL, Jiménez J, Boza JJ and López-Huertas E. "*Contribución de los ácidos grasos omega-3, ácido oleico y ácido fólico en la prevención secundaria del infarto de miocardio*". **Nutrición Hospitalaria**. 2003 sept.-oct. 18 (5) 269-324.