



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

***Efectos de los esteroides y estanoles
vegetales en el metabolismo
enterohepático del colesterol y los
triglicéridos***

Memoria para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular

presentada por:

Jesús Méndez González

Los directores de Tesis:

Dr. Francisco Blanco Vaca
*Servei de Bioquímica
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*

Dr. Joan Carles Escolà Gil
*Institut d'Investigació Biomèdica
Sant Pau*

Barcelona 2013

*A quienes de una u otra manera me han ayudado. Espero haberles hecho saber
quiénes son.*

ÍNDICE

ÍNDICE

1.- PRESENTACIÓN	11
2.- INTRODUCCIÓN	17
2.1.- Esteroles y estanoles vegetales. Estructura y fisiología	19
2.2.- Alimentos funcionales. Indicaciones y eficacia de los esteroles/estanoles vegetales	21
2.3.- Esteroles/estanoles vegetales. Mecanismo de acción	22
2.3.1.- Absorción intestinal de colesterol	23
2.3.2.- Síntesis endógena de colesterol	27
2.3.3.- Metabolismo del colesterol. Síntesis de ácidos biliares	28
2.3.4.- Síntesis/Absorción: Homeostasis del colesterol	30
2.3.4a.- Síntesis/Absorción y enfermedad cardiovascular	31
2.3.4b.- Síntesis/absorción y respuesta a estatinas	32
2.3.5.- Efectos de los esteroles vegetales en el intestino	33
2.3.6.- Efectos de los esteroles vegetales en el hígado	36
2.4.- Seguridad y controversia de los esteroles/estanoles vegetales (sitosterolemia)	37
2.4.1.- Sitosterolemia	38
2.4.2.- Datos a favor de los esteroles vegetales como factor de riesgo aterosclerótico	39
2.4.2a.- Evidencias en animales	39
2.4.2b.- Evidencias en humanos	40
2.4.3.- Datos en contra de los esteroles vegetales como factor de riesgo aterosclerótico	45
2.4.3a.- Evidencias en animales	45
2.4.3b.- Evidencias en humanos	46

2.4.4.- Conclusiones sobre la seguridad de los esteroles vegetales	48
2.5.- Metabolismo de los triglicéridos	49
2.5.1.- Absorción y secreción intestinal	49
2.5.2.- Síntesis de TG	51
2.5.3.- Catabolismo periférico	52
3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
4.- PUBLICACIONES	61
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN GLOBAL	93
<i>R.1.- Efectos del FMVP4 sobre el metabolismo del colesterol y los ácidos biliares en ratones C57/BL6</i>	95
R.1.a.- Efectos de FM-VP4 sobre la absorción intestinal de colesterol y sobre el colesterol plasmático y hepático	95
R.1.b.- Efectos de FM-VP4 sobre el metabolismo de los ácidos biliares	98
<i>R.2.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 en el metabolismo de los TG</i>	101
R.2.a.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre las concentraciones de lípidos en plasma (dieta estándar)	101
R.2.b.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre el catabolismo periférico de TG <i>in vivo</i>	102
R.2.c.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre la secreción hepática de TG	104
R.2.d.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre la absorción y secreción intestinal de TG	106

R.2.e Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre las concentraciones plasmáticas y hepáticas de lípidos en ratones alimentados con una dieta Western	108
6.- CONCLUSIONES	111
7.- BIBLIOGRAFÍA	115
8.- OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE LA ETAPA PREDOCTORAL	129

PRESENTACIÓN

1.- PRESENTACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son hoy en día la principal causa de muerte en los países occidentales. Y esto sucede a pesar de la disponibilidad de las estatinas como opción de tratamiento, que reducen eficazmente las concentraciones de colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) y que, consecuentemente, permiten disminuir la incidencia de enfermedades de causa aterosclerótica. Entre las posibles causas de este riesgo residual están el que el tratamiento prescrito no sea suficiente para conseguir los objetivos de colesterol de lipoproteína de baja densidad, LDLc, marcados por el panel de expertos NCEP [1] o que no todas las personas en riesgo estén recibiendo el tratamiento adecuado. Por ello, la administración de estatinas se acompaña a veces de otro tipo de terapias farmacológicas (como el ácido nicotínico o el ezetimibe) y de medidas dietéticas. Dentro de estas últimas podría incluirse la administración de los fitoesteroles/estanoles. Éstos son los análogos del colesterol en los vegetales, comparten con él la misma estructura y son considerados alimentos funcionales. Desde hace décadas se sabe que los esteroides vegetales reducen las concentraciones de LDLc al disminuir la absorción intestinal de colesterol – aunque parece que también podrían ejercer esta acción a través de otros efectos -. Aunque las dosis óptimas aún no han sido establecidas, se admite que 2 g/día de esteroides/estanoles vegetales disminuyen alrededor de un 10% las concentraciones plasmáticas de LDLc [2-4], independientemente de la administración concomitante de estatinas y sin aparentes efectos adversos. Sin embargo, su papel en la prevención de las enfermedades cardiovasculares todavía no ha sido estudiado en profundidad y los trabajos realizados hasta la fecha en humanos son todavía escasos a este respecto.

Un estudio reciente [5] apunta a la posibilidad de usar hasta 9 g/día de estanoles vegetales de forma segura para reducir hasta en un 17% las concentraciones de

LDLc. Sin embargo, uno de los objetivos de la industria continúa siendo el de desarrollar nuevos esteroides/estanoles vegetales más potentes que los empleados en la actualidad. Con este fin se desarrolló el compuesto llamado FM-VP4, formado por dos estanoles vegetales unidos por una molécula de ácido cítrico, lo que aumenta su solubilidad en el agua. El estudio del FM-VP4 constituye el primer objetivo de la presente tesis y resultó ser el primer trabajo publicado fruto de la misma. El FM-VP4 administrado a ratones demostró tener una acción muy potente sobre la absorción y perfil plasmático de colesterol. Además, alteró algunas vías del metabolismo del colesterol, como la recirculación de sales biliares, como veremos posteriormente.

Por otro lado, el perfil de seguridad de los esteroides/estanoles vegetales ha sido y continúa siendo objeto de debate [6]. El principal motivo del mismo viene dado por la existencia de una rara enfermedad que recibe el nombre de sitosterolemia. Ésta se caracteriza por una hiperabsorción de esteroides vegetales junto con su acumulación masiva en plasma y tejidos. A pesar de que las concentraciones finales son muy inferiores a las de colesterol, los enfermos sitosterolémicos desarrollan una clínica muy similar a la de la hipercolesterolemia familiar, con la presencia de xantomas tendinosos y aterosclerosis precoz. Tanto el Comité Científico de la Unión Europea como la FDA (Food and Drug Administration) han constatado la seguridad de la administración de esteroides vegetales y el panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) los recomienda como medida higiénico-dietética para reducir las concentraciones de LDLc [1]. Estas recomendaciones se basan en gran medida en que las cantidades recomendadas no son excesivas, y sobre todo a que, en sujetos no sitosterolémicos, la tasa de absorción de los esteroides y estanoles vegetales es muy reducida. Sin embargo, el hecho de que los enfermos sitosterolémicos desarrollen una aterosclerosis precoz con concentraciones séricas

de colesterol normales o ligeramente elevadas, hace pensar que los esteroides/estanoles vegetales puedan ser altamente aterogénicos cuando se encuentran en concentraciones elevadas.

Entre las acciones de los esteroides vegetales, se ha demostrado que algunos de ellos son capaces de activar al receptor nuclear LXR (Liver-X-receptor) [7-10]. La activación de este receptor, en general, tiene efectos beneficiosos sobre el perfil cardiovascular, a excepción de que produce un aumento en las concentraciones de triglicéridos (TG). Al revisar la bibliografía encontramos que, entre los pocos enfermos sitosterolémicos de los que se tiene un perfil lipídico completo, la mayoría presentaban concentraciones plasmáticas de TG notablemente superiores a las de sus familiares directos [11-16]. Así comenzamos a trabajar en el segundo objetivo de esta tesis, el de estudiar el metabolismo de los TG en ratones modelo de sitosterolemia. Las conclusiones, recientemente publicadas, son que la acumulación de esteroides vegetales altera dicho metabolismo afectando a múltiples vías, como son la síntesis hepática, el catabolismo periférico o la absorción intestinal. Y que muchos de estos efectos se aprecian también en ratones heterocigotos para la enfermedad, en los que la acumulación de esteroides vegetales es sensiblemente inferior.

INTRODUCCIÓN

2.- INTRODUCCIÓN

2.1- Esteroles y estanoles vegetales. Estructura y fisiología

Los esteroles vegetales, o fitosteroles, son componentes esenciales de las membranas celulares en los vegetales. Su estructura es muy parecida a la del colesterol, con el que comparten la misma estructura de anillo y del que sólo difieren en la composición de las cadenas laterales (Figura 1).

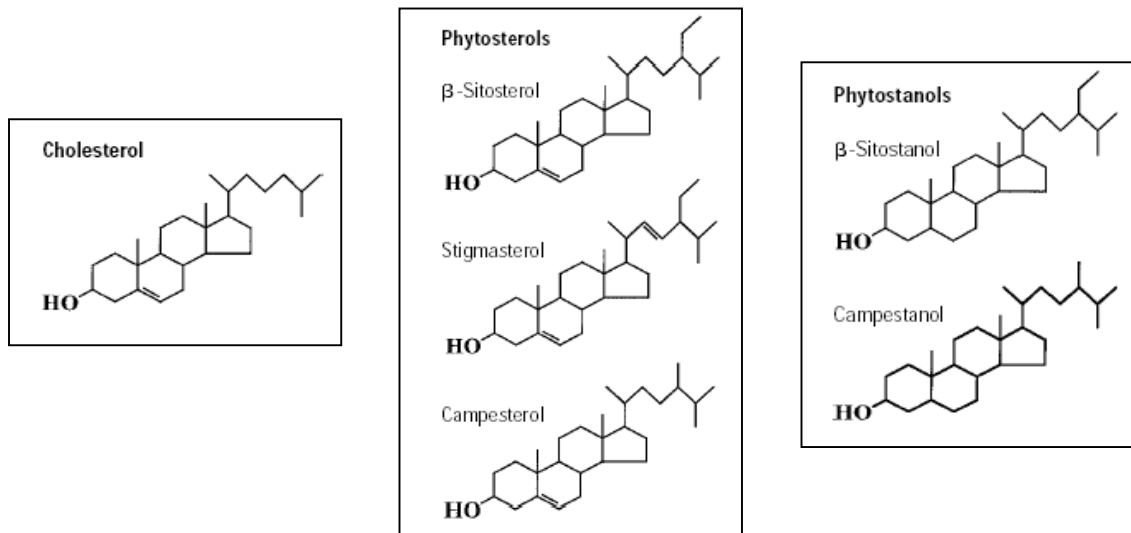


Figura 1. Estructura química del colesterol y de los principales fitosteroles y fitostanoles.

Se conocen más de 40 esteroles vegetales diferentes, los cuales se pueden clasificar en 4-desmetilesteroles y 4,4-dimetilesteroles. Tres de ellos suponen aproximadamente el 90% de los esteroles vegetales presentes en la dieta: el β -sitosterol (50%), el campesterol (33%) y el estigmasterol (5%), los cuales solamente se diferencian por sus cadenas laterales. Así, la presencia de un grupo metilo o etilo

en el carbono en posición 24 distingue el campesterol del sitosterol, mientras que el doble enlace en posición 22 es exclusivo del estigmasterol. Por otro lado, los estanoles vegetales (o fitostanoles), son mucho menos abundantes que los esteroides, y se diferencian de éstos en que no presentan dobles enlaces C-C en la estructura de anillo. Los estanoles vegetales proceden de la hidrogenación de los esteroides vegetales: por ejemplo, la saturación del campestanol en posición alfa da lugar a la formación del campestanol (Figura 1). Cabe destacar que salvo especificación, y dado que normalmente los estanoles se encuentran en cantidades mucho más reducidas que los esteroides, cuando se habla en términos generales de esteroides vegetales suele incluirse en el término también a los estanoles vegetales.

Los esteroides vegetales no pueden ser sintetizados por los humanos, por lo que siempre han de proceder de la dieta. En el caso de la dieta occidental, su cantidad es casi equivalente a la del colesterol (unos 400 mg/día), y es aún mayor en las dietas vegetarianas. Los esteroides vegetales se encuentran especialmente en legumbres, verduras, cereales, frutos secos y, en general, en los aceites de tipo vegetal (Tabla 1). Al contrario de lo que sucede con el colesterol, cuya absorción intestinal varía entre el 35 y el 70%, la absorción de los esteroides vegetales oscila entre el 0,4 y el 3,5%, y la de estanoles entre el 0,2 y el 0,3%. Además, la mayor parte de ellos son rápidamente excretados por el hígado, reteniéndose únicamente un 1% de lo absorbido. Todo esto hace que las concentraciones de esteroides vegetales en suero humano oscilen entre 0,3 y 1,7 mg/dL [17].

	Colesterol	Fitosteroles	Fitostanoles
Ingestión en la dieta (mg/día)	300-500	200-400	<10
Fuente dieta	Mantequilla, huevos, carne	Aceites vegetales, cereales	Aceite coco, otros aceites
Síntesis endógena	Colesterol biliar (800-1200 mg/día)	No	No
Tasa absorción (%)	40-60	<5	0,1-2
Concentración plasma (mg/dL)	140-320	0,3-1,7	0,3-0,6
Excreción (%)	40-60	>95	>98

Tabla 1. Resumen comparativo de los principales parámetros metabólicos del colesterol, fitosteroles y fitostanoles.

2.2- Alimentos funcionales. Indicaciones y eficacia de los esteroides/estanoles vegetales

En 1999, el ILSI (Internacional Life Sciences Institute) definió a los alimentos funcionales como aquéllos que “contienen un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, más allá de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable.” Estos alimentos pueden ser macronutrientes (como los ácidos grasos insaturados del aceite de oliva), micronutrientes (como las vitaminas) o compuestos sin valor nutritivo (como los flavonoides), pero siempre constituyen componentes naturales de los alimentos, ya sea porque estén presentes en el propio alimento no elaborado o porque sean añadidos mediante fortificación (como en el caso del calcio y la vitamina D en la leche). En los últimos años, los alimentos funcionales se han ido introduciendo con fuerza en la sociedad y conforman un segmento creciente en la industria alimenticia.

La administración de esteroides/estanoles vegetales disminuye la absorción intestinal de colesterol y reduce sus concentraciones plasmáticas. Este hecho motivó que los esteroides vegetales comenzaran a usarse como alimento funcional en la década de los 90. Poco después, el NCEP recomendó su consumo como opción terapéutica dietética para disminuir las concentraciones de colesterol plasmático de LDL [1].

El primer metaanálisis publicado sobre la eficacia de los esteroides vegetales en la reducción del colesterol plasmático se publicó en 2003 [4]. Los 41 estudios seleccionados mostraban que la ingesta de 2 g/día de esteroides vegetales disminuye una media del 10% el colesterol de LDL, y que dosis crecientes no muestran un efecto adicional significativo. Estudios posteriores han situado consistentemente su eficacia entre un 7-11% [2, 3, 18, 19] y han demostrado su utilidad incluso en enfermos de hipercolesterolemia familiar [20] como terapia adyuvante a la administración de estatinas [21]. Por otro lado, la administración de estanoles vegetales, que en dosis de 2 g/día tienen un efecto similar al de los esteroides, no parece tener un efecto umbral, y a dosis mayores parecen reducir las concentraciones de LDLc en un 17% [5].

2.3.- Esteroides/estanoles vegetales. Mecanismo de acción

Los esteroides y estanoles vegetales son más hidrofóbicos que el colesterol, por lo que tienen mayor afinidad por las micelas intestinales. Se ha propuesto, por tanto, que el mecanismo por el que actúan es a través de una competición con el colesterol por incorporarse a dichas micelas, disminuyendo con ello la absorción intestinal de colesterol [22]. Sin embargo, otros estudios sugieren que los esteroides vegetales pueden ejercer una acción a nivel molecular dentro de los enterocitos y

los hepatocitos, ya que no necesitan estar presentes en el lumen intestinal para ejercer su acción [23]. En este sentido se ha visto que fitosteroles inyectados subcutáneamente disminuyen las concentraciones de colesterol tanto en pollos como en hámsters de una forma similar a como lo hace su administración oral [24, 25]. Antes de entrar en detalle en estos mecanismos, repasaremos el metabolismo del colesterol en el organismo a través de su absorción, síntesis endógena y excreción.

2.3.1- Absorción intestinal de colesterol

En promedio, en un adulto que consume una dieta occidental, unos 1200-1700 mg de colesterol llegan a la luz intestinal diariamente. Sin embargo, sólo 300-500 mg provienen directamente de la dieta; el resto procede de la bilis y su recirculación enterohepática. Una vez en el lumen, el colesterol es solubilizado junto con los TG y fosfolípidos en forma de micelas mixtas, gracias al papel anfipático de los ácidos biliares. Entre las proteínas que participan en la absorción intestinal del colesterol cabe citar fundamentalmente a la proteína Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1), el heterodímero formado por los transportadores de membrana ATP Binding Casette G5 y G8 (ABCG5 y G8), el enzima acyl-coA:colesterol acyltransferase 2 (ACAT2) y el transportador ATP Binding Casette A1 (ABCA1).

La proteína NPC1L1 resulta trascendental para el proceso de absorción del colesterol (Figura 2). De hecho, en estudios con ratones deficientes en NPC1L1, la absorción fraccional de colesterol se ve reducida desde un 51% a un 16% [26]. Y también se encuentra disminuida la absorción de esteroides vegetales. Además, NPC1L1 es la diana molecular del fármaco ezetimibe [27], un inhibidor de la absorción de colesterol que es capaz de reducirla entre un 50 y un 90% [28-30],

disminuyendo también la entrada de esteroides vegetales [31]. Estos datos apuntan, no sólo a que la entrada de colesterol y esteroides vegetales en el enterocito sigue una vía común, sino también que deben ser eventos posteriores los que controlen la absorción neta de fitosteroides. De hecho, estudios con esteroides y estanoles deuterados administrados mediante sonda oral comprobaron que las concentraciones de colesterol en mucosa intestinal eran mayores que las de origen vegetal (colesterol > campesterol > sitosterol > campestanol > sitostanol) [32] y que tras 15 minutos de la aplicación de la sonda todos estos compuestos eran detectables en el intestino proximal. Sin embargo, la disponibilidad sistémica de los compuestos vegetales era drásticamente menor que la del colesterol. Estos hechos apuntan, por tanto, a que los procesos discriminatorios se encuentran en los mecanismos de eflujo, más que en los de captación.

Uno de los candidatos que parece mediar esta discriminación es el heterodímero formado por ABCG5/G8, ya que es capaz de excretar colesterol y esteroides vegetales de vuelta desde el enterocito hacia el lumen intestinal [33, 34]. Además, mutaciones en estos transportadores son las responsables de la sitosterolemia, una rara enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por la acumulación de esteroides vegetales tanto en plasma como en tejidos [35, 36].

Una vez que el colesterol es captado por el enterocito es mayoritariamente esterificado con ácidos grasos en C3 para formar ésteres de colesterol, en una reacción catalizada por el enzima ACAT2 [37]. Posteriormente dichos ésteres serán empaquetados en quilomicrones y secretados hacia la linfa (Figura 2), y seguirán la circulación portal hasta llegar al hígado.

Por último, cabe citar que la proteína ABCA1, que es capaz de transportar colesterol desde el interior celular hacia las apolipoproteínas (apos) unidas a la superficie celular (p. ej. la apo-AI) se expresa también en los enterocitos, concretamente en la membrana basolateral. De esta forma, las células intestinales pueden actuar como células periféricas capaces de participar en la formación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) [38].

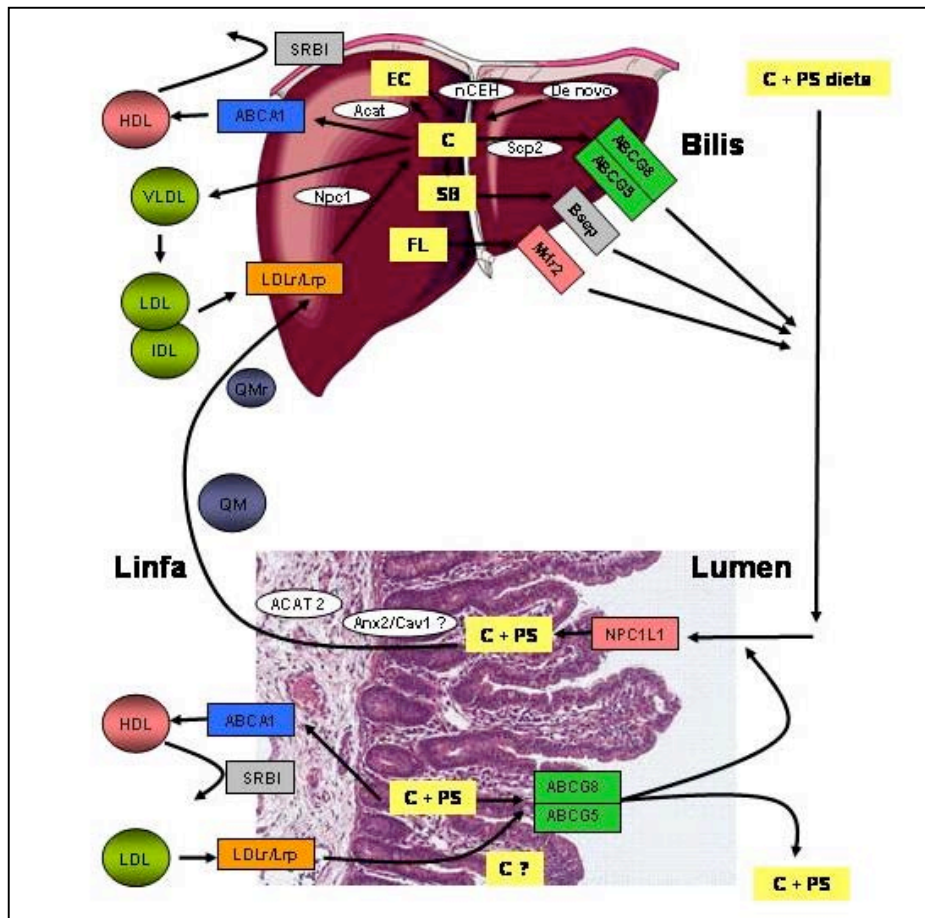


Figura 2. Visión esquemática de las principales rutas seguidas por el colesterol en hígado e intestino junto con las proteínas participantes.

ABCA1, ABCG5, ABCG8, *ABC-transporter A1, G5, G8*; ACAT, *acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase*; Anx2/Cav1, *annexina 2/caveolina 1*; BSEP, *bile salt export pump*; C, colesterol; EC, ésteres de colesterol; FL, fosfolípidos; HDL, lipoproteínas de alta densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLr, receptor de LDL; Lrp, *LDL-receptor related protein*; Mdr2, *multidrug resistance P-glycoprotein 2*; nCEH, *neutral cholesteryl ester hydrolase*; Npc1, *Niemann-Pick C1 protein*; NPC1L1, *Niemann-Pick C1 protein Like 1*; PS, esteroides vegetales; SB, sales biliares; Scp2, *sterol carrier protein 2*; SRBI, *scavenger receptor BI*; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

2.3.2- Síntesis endógena de colesterol

Es la segunda vía de aporte de colesterol y su proporción respecto a otras vías de abastecimiento de colesterol depende de la composición de la dieta y de la especie animal. Así, en humanos, aproximadamente la mitad del colesterol proviene de la absorción intestinal y la otra mitad de la síntesis endógena [39], mientras que en ratones esta última alcanza hasta el 70%.

La mayoría de los tejidos tienen la capacidad de sintetizar colesterol *de novo*, pero el principal órgano implicado en su biosíntesis es el hígado. El colesterol se sintetiza a partir de acetil CoA siguiendo la ruta del mevalonato. Ésta comienza con la formación de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG CoA) a partir de acetil CoA y acetoacetil CoA. HMG CoA es posteriormente reducido a mevalonato (Figura 3). Este paso resulta irreversible en la vía de síntesis y está regulado por el enzima HMG CoA reductasa. Los niveles de ARNm de este enzima se utilizan frecuentemente como indicador de la síntesis de colesterol, y esta proteína supone además la diana de las estatinas fármacos inhibidores de la HMGcoA reductasa que constituyen la primera línea de tratamiento de la hipercolesterolemia.

Los siguientes pasos de la vía incluyen entre otros, la conversión de mevalonato a isopentenil pirofosfato, la condensación a escaleno y la ciclación final de este último a lanosterol. El lanosterol es el precursor último del colesterol, así como del ergosterol, el principal esteroles en los hongos.

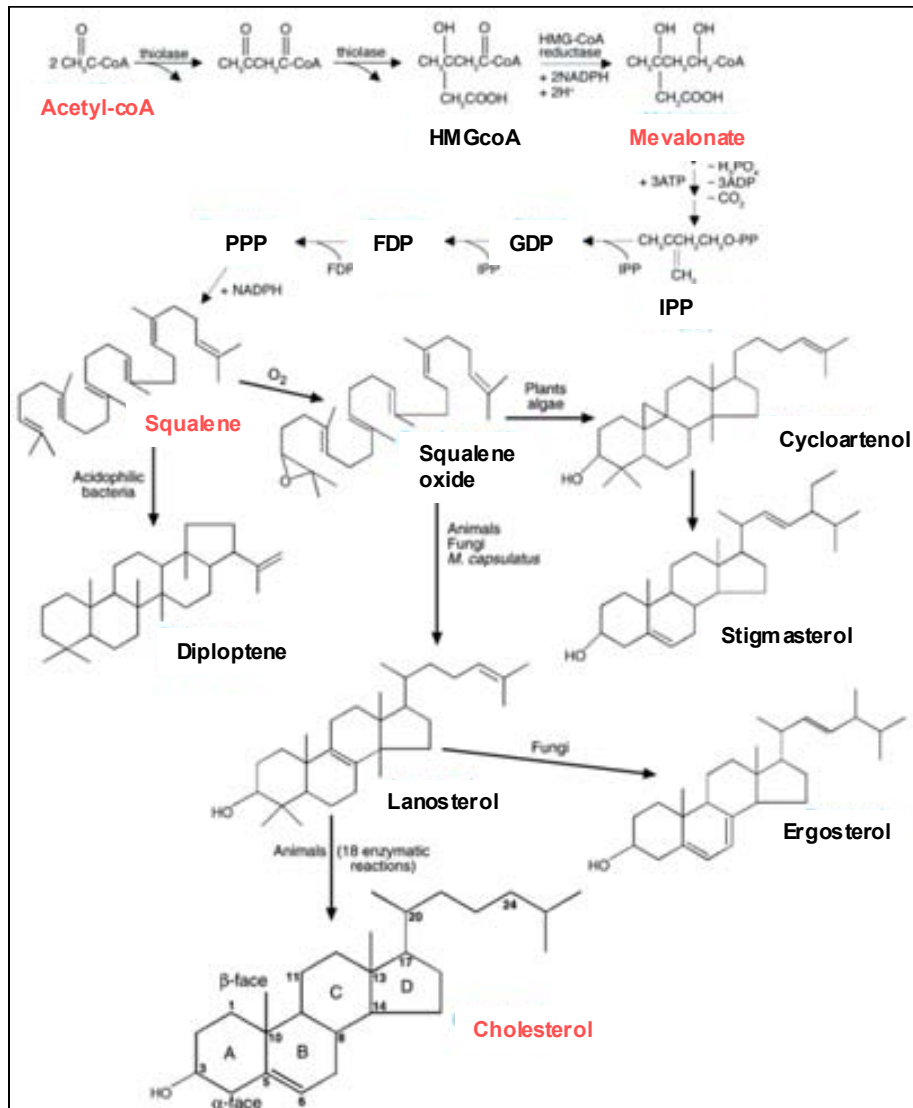


Figura 3. Principales rutas metabólicas en la síntesis endógena de colesterol.

2.3.3- Metabolismo del colesterol. Síntesis de ácidos biliares

El hígado es el órgano central encargado de la homeostasis del colesterol y supone el lugar de intersección de sus diversas rutas metabólicas. Es capaz de captar colesterol procedente de quilomicrones residuales (QMr), lipoproteínas de densidad

intermedia (IDL) y LDL por endocitosis a través del receptor de LDL (LDLR) y de la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP) [40, 41], así como de las partículas HDL a través del receptor *scavenger* SR-B1 [42]. Además, como hemos visto, el hígado es el principal lugar de síntesis *de novo* de colesterol.

Una vez en el interior del hepatocito, el colesterol puede convertirse en sales biliares, lo que constituye el destino final de la mayor parte del colesterol del organismo. En los humanos, unos 500 mg son transformados en sales biliares cada día. Este proceso implica la actuación de 17 enzimas diferentes, y pueden seguirse dos rutas diferentes: una principal, llamada clásica o neutra, y una secundaria, denominada alternativa o acídica. La vía clásica representa aproximadamente el 75% del total de la síntesis en ratones y hasta el 90% en los humanos [43].

En la vía clásica, el paso clave es la conversión del colesterol a 7 α -hidroxicolesterol por el enzima colesterol-7 α -hidroxilasa (CYP7A1) [44]. La regulación de este enzima es crucial, ya que este paso determina el flujo hacia la ruta clásica. Por ello, los niveles de CYP7A1 se utilizan como indicativos de la síntesis por medio de la vía clásica. Los productos finales de la vía son el colato y quenodesoxicolato en humanos y el colato y muricolato en ratones. En concreto, la síntesis de colato viene dada por la reacción mediada por el enzima 12 α -hidroxilasa (CYP8B1), por lo que la reacción entre el colato y el quenodesoxicolato o el muricolato viene determinada por la actividad hepática de CYP8B1.

En cuanto a la vía alternativa, el primer paso es la formación de 27-hidroxicolesterol, y está mediada por el enzima estero 27-hidroxilasa (CYP27) [44]. El producto final de la vía es el quenodesoxicolato.

Los ácidos biliares se conjugan tanto con taurina como con glicina antes de ser excretados a la bilis [45]. La secreción desde el hígado a la bilis tiene lugar mediante la bomba exportadora de sales biliares (BSEP) [46], mientras que el colesterol libre y los esteroides vegetales se secretan a través del heterodímero ABCG5/G8 [35, 47-49].

Una vez en el intestino, las sales biliares pueden ser modificadas por las bacterias intestinales, dando lugar a sales biliares secundarias como el desoxicolato o el litocolato. Como el 95% de las sales biliares son reabsorbidas durante la circulación enterohepática, principalmente a través del transportador I-BABP (Ileal-Bile Acid Binding Acid Protein), el "pool" final de sales biliares está formado por una mezcla de sales tanto primarias como secundarias.

2.3.4- Síntesis/Absorción: Homeostasis del colesterol

Para evaluar de forma indirecta la síntesis y la absorción de colesterol se puede aprovechar el hecho de que en plasma se hallan pequeñas concentraciones de lo que se ha dado en llamar "esteroides no colesterol". Éstos se pueden dividir en dos grandes grupos: uno es el de los precursores del colesterol, fundamentalmente escualeno, colestanol, desmosterol y latosterol, que reflejan la síntesis de colesterol, especialmente cuando se tiene en cuenta su proporción respecto al colesterol [50, 51]. Otro es el de los marcadores de absorción, donde se encuentran tanto el colestanol como algunos de los esteroides vegetales detectables en plasma: campesterol y sitosterol, fundamentalmente. Cuanto mayor sea la proporción de estos compuestos respecto al colesterol, reflejarán una mayor tasa de absorción de colesterol del organismo en cuestión [51-53]. Se ha visto que los marcadores más fiables son: el latosterol para la síntesis de colesterol y el colestanol para su

absorción [52, 54]. Ambos suelen correlacionarse negativamente, y el cociente sitosterol/colestanol es un buen reflejo del metabolismo o de lo que se ha dado en llamar la homeostasis del colesterol. La tasa de síntesis o absorción es un parámetro que puede ser de utilidad para distintos ámbitos. Uno es su relación con la enfermedad cardiovascular y el síndrome metabólico [55]. Otro es el hecho de que los pacientes no respondedores a estatinas parecen tener unas mayores tasas de absorción [56].

2.3.4a.- Síntesis/Absorción y enfermedad cardiovascular

Existe cierta controversia sobre cuál de los dos perfiles (de síntesis o de absorción) que se dan en el metabolismo del colesterol se correlaciona con un mejor estado cardiovascular. Un completo estudio finlandés, en el que se estudió a 864 adolescentes, comprobó que los marcadores de síntesis estaban asociados a un peor perfil cardiovascular, con un mayor índice de masa corporal (IMC), mayores concentraciones de triglicéridos, mayor presión arterial y menores concentraciones de colesterol de HDL (HDLc) 21 años después [53, 57]. Sin embargo, no se apreciaron diferencias en una subpoblación del estudio en la que se determinó el grosor íntima-media carotídeo. En el mismo sentido, otro estudio realizado a partir de la cohorte española EPIC concluyó que cuanto menor era la ratio sitosterol/colesterol, mayor era el riesgo cardiovascular de los participantes [58]. Por otro lado, existen diversos trabajos que señalan la relación contraria. Un estudio de 2009 que analizó a 2440 participantes de la cohorte LURIC (Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health: individuos que habían sido sometidos a una angiografía coronaria) [59] observó que una mayor tasa de absorción y una menor de síntesis se relacionaban de forma significativa con un mayor riesgo cardiovascular, incluso cuando se analizaron exclusivamente los pacientes que no habían tomado estatinas

[60]. Los mismos resultados se obtuvieron en otro estudio que analizó la cohorte Framingham (incluyendo únicamente sujetos con enfermedad cardiovascular) [61] y la misma relación se observó en pacientes con estenosis aórtica [62].

Aunque los datos no son consistentes entre diversos estudios, parece haber una tendencia subyacente que a nuestro entender no ha sido expuesta previamente y que esta tesis, aunque no disponga de datos propios, querría remarcar: los perfiles de aumento de síntesis parecen asociarse con un peor perfil metabólico en poblaciones jóvenes y/o sanas, mientras que los perfiles de alta absorción se relacionan con alto riesgo cardiovascular precisamente en aquellos estudios que engloban a pacientes ya enfermos o en alto riesgo. Es una observación que quizás debería tenerse en cuenta para intentar dilucidar el verdadero papel del perfil de la llamada homeostasis del colesterol en el riesgo cardiovascular.

2.3.4b.- Síntesis/absorción y respuesta a estatinas

Las estatinas constituyen el principal grupo de fármacos hipocolesterolemiantes. Como se ha mencionado previamente, actúan disminuyendo la síntesis de colesterol por inhibición de la HMG-coA reductasa. Sin embargo, existen pacientes que se benefician más de esta terapia que otros [63]. Una de las hipótesis sobre las diferencias en la respuesta es que las estatinas actúan mejor en aquellos pacientes que tienen bajas tasas de absorción de colesterol. Así se ha visto reflejado en diversos estudios que emplearon simvastatina a largo plazo [64-66] o simvastatina y fluvastatina [56]. Aunque no se ha demostrado la razón subyacente, una explicación podría ser que los sujetos con un perfil alto de absorción ya presentan una baja actividad de síntesis, por lo que las estatinas ven reducido su potencial de acción. De confirmarse esta relación, el perfil de homeostasis del colesterol abriría la

puerta a tratamientos más personalizados, donde bajos respondedores podrían beneficiarse de cotratamientos con inhibidores de la absorción de colesterol, como el ezetimibe y/o los estanoles vegetales. En este sentido, serían más recomendables estos últimos que los esteroides, ya que se ha visto que el tratamiento con estatinas tiende a aumentar la concentración plasmática de esteroides vegetales pero no así de estanoles [67].

2.3.5.- Efectos de los esteroides vegetales en el intestino

El mecanismo exacto de acción de los esteroides vegetales en el intestino no ha sido esclarecido. Aparte de competir con el colesterol por la incorporación en las micelas, parecen ejercer acciones moleculares concretas a nivel intestinal, hecho que ha motivado un gran número de estudios experimentales.

Los receptores nucleares LXR α y β parecen jugar un papel central en las acciones provocadas por los esteroides vegetales. Estos receptores se expresan de forma general en todo el organismo y actúan como reguladores globales de la homeostasis del colesterol, fundamentalmente protegiendo de la excesiva acumulación de colesterol en los tejidos [68]. De hecho, la activación de LXR en el intestino mediante ligandos específicos disminuye la absorción de colesterol y aumenta la expresión de ABCA1 y de ABCG5/G8 [69-71]. Además, se ha visto que los esteroides vegetales o algunos de sus derivados pueden actuar como ligandos de LXR tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que parecía que las acciones de los esteroides vegetales sobre el metabolismo del colesterol en el enterocito estaban mediadas por la activación de LXR [8-10]. En este sentido, se ha visto que un compuesto relacionado con el ergosterol y el brasicasterol, el llamado YT-32, tras ser administrado oralmente se comporta como un potente agonista de LXR e induce la

expresión de los transportadores ABC en el intestino del ratón [8]. También, y acorde con esta observación, se ha visto que los esteroides y estanoles vegetales de la familia 4-desmetilesteroides son capaces de activar tanto a LXR α como a LXR β *in vitro* [10]. Además, en el mismo estudio se comprobó que la expresión de ABCA1 era paralela a los niveles de activación de LXR en células Caco-2. De hecho, la activación de ABCA1 ya se había propuesto como el mecanismo por el cual los esteroides y estanoles vegetales mediaban su acción en la absorción intestinal de colesterol [9]. Sin embargo, otro estudio que usó ratones deficientes en ABCA1 mostró que la activación de LXR disminuía la absorción intestinal de colesterol independientemente de ABCA1, y sugería que probablemente se debía a la activación transcripcional de ABCG5/G8 [72], por lo que este heterodímero pasó a convertirse en el principal candidato que podría explicar la inhibición en la absorción de colesterol mediada por los fitosteroides [73]. Sin embargo, los cambios en la expresión de ABCG5/G8 y de ABCA1 no correlacionaban con la disminución en la absorción en ratones tratados con fitosteroides [74, 75] ni en hámsters alimentados con ésteres de estanoles [76]. Obviamente, los resultados de estos estudios no podían descartar que estos transportadores pudieran estar siendo alterados por los fitosteroides a través de mecanismos post-traduccionales. Por ello se usaron posteriormente animales modificados genéticamente, demostrándose que la inhibición de la absorción de colesterol por los fitosteroides es independiente tanto de ABCA1 [77] como de ABCG5/G8 [74, 78].

Los esteroides vegetales podrían estar también actuando a través del transportador NPC1L1. Sin embargo, la inhibición que provocan en la absorción de colesterol no está mediada por cambios en su expresión [74-76, 79]. En cualquier caso, dado que

aún no se han usado animales deficientes en esta proteína, no se puede descartar su posible papel.

Otros estudios valoran la posibilidad de que los esteroides vegetales actúen a través de otros mecanismos. Por ejemplo, se ha observado que el sitosterol es capaz de disminuir la expresión de la HMG-CoA reductasa en células Caco-2, reduciendo así la síntesis de colesterol [80]. Sin embargo, estudios *in vivo* en ratas a las que suplementaba la dieta con un 2% de sitosterol, no afectaron a su expresión en el íleo [81]. Hay que tener en cuenta que la absorción de sitosterol es menor del 5%, y que individuos con sitosterolemia, donde las concentraciones de sitosterol se elevan hasta 100 veces, sí que vieron una reducción en la actividad, por lo que parece que se necesitan grandes cantidades de esteroides vegetales para que puedan llegar a ejercer una inhibición del principal enzima de síntesis de colesterol.

Otra opción que se ha barajado es que los fitosteroides actúen disminuyendo la actividad del enzima ACAT en el intestino. Esta proteína (fundamentalmente en su forma ACAT2), es la encargada de esterificar el colesterol que será usado para el empaquetamiento en quilomicrones [82-85]. Además, se sabe que es activada por el colesterol de forma alostérica [86], mientras que la acción de los esteroides vegetales sobre ella es mucho menor [37, 86]. Por tanto, los fitosteroides podrían estar compitiendo con el colesterol y de esta forma reducir su actividad normal. Sin embargo, todavía no se han desarrollado estudios con animales deficientes en ACAT2 que hayan podido determinar su verdadero papel.

2.3.6.- Efectos de los esteroides vegetales en el hígado

Los efectos de los esteroides en el hígado pueden resumirse en su acción sobre la síntesis endógena de colesterol, la producción de partículas VLDL y LDL y su acción sobre la síntesis de ácidos biliares.

Tanto en pacientes sitosterolémicos como en ratones deficientes en ABCG5/G8 – un modelo murino de sitosterolemia - se ha observado una marcada reducción de la actividad HMG-CoA reductasa [87, 88]. Sin embargo, en individuos que habían seguido una dieta enriquecida con fitosteroides/fitostanoles, se produjo un aumento compensatorio en la síntesis endógena de colesterol [89-96]. Esta diferencia seguramente sea debida, en el primer caso, a una entrada masiva de esteroides vegetales, de entre los cuales se ha descrito que el estigmasterol impide la maduración post-traducciona de SREBP2 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2), encargado de regular genes que controlan la síntesis *de novo* de colesterol y, en el segundo, a una reacción compensatoria del organismo ante una disminución en la biodisponibilidad de colesterol.

La producción de partículas con apoB100 (LDL y VLDL) se redujo significativamente en hombres diabéticos a los que se habían administrado 3 g de fitostanoles diarios [97]. Además, el tratamiento con fitostanoles en ratones hipercolesterolémicos apoE3-Leiden redujo la secreción hepática de colesterol en partículas VLDL sin afectar a la tasa de producción de partículas con apoB [92]. Por otro lado, la administración de 4 g diarios de ésteres de fitostanoles a hombres normocolesterolémicos aumentó la expresión de LDLr en células mononucleares [91]. Por tanto, parece que la suplementación con esteroides vegetales no sólo afecta a la absorción intestinal de colesterol, sino que disminuye la producción hepática de partículas VLDL y la cantidad de partículas IDL y LDL a través del LDLr. Hay que

tener en cuenta, sin embargo, que esto último podría ser también una respuesta a la disminución del colesterol sérico en personas tratadas con fitosteroles y no un efecto primario de los mismos.

Por último, la acumulación de esteroides vegetales en pacientes sitosterolémicos inhibe significativamente la expresión del enzima CYP7A1, el principal enzima de síntesis de ácidos biliares [87, 98]. Sin embargo, la administración en la dieta de diferentes combinaciones de esteroides y/o estanoles vegetales no afectó a la excreción de sales biliares, colesterol o fosfolípidos en humanos o en ratones hipercolesterolémicos [75, 90, 92, 99-101].

2.4.- Seguridad y controversia de los esteroides/estanoles vegetales (sitosterolemia)

La seguridad de los alimentos enriquecidos con esteroides vegetales ha sido revisada por distintas autoridades reguladoras. De hecho, tanto el Comité Científico de la Unión Europea como la FDA (US Food and Drug Administration) concluyeron que dichos alimentos funcionales eran seguros [102, 103]. Además, no se han registrado efectos adversos en las más de 1800 personas que tomaron hasta 25 g/día de esteroides vegetales en ensayos clínicos de hasta 3 años de duración (UK Institute for Food Science and Technology). El único problema que se ha observado es que pueden reducir las concentraciones de carotenoides, ya que disminuyen su absorción, pero existen estudios que demuestran cómo una dieta rica en frutas y verduras es capaz de compensar dicha reducción [104]. Sin embargo, uno de los principales impedimentos que existen es que su administración podría promover la formación de aterosclerosis, como sugiere el hecho de que los enfermos

sitosterolémicos, que acumulan grandes cantidades de esteroides vegetales, desarrollan una aterosclerosis masiva y precoz.

2.4.1.- Sitosterolemia

La sitosterolemia es una rara enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en los transportadores ABCG5 o ABCG8 [35, 36].

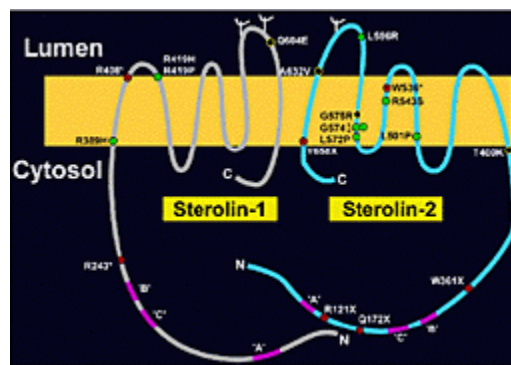


Figura 4. Estructura de los transportadores ABCG5 (sterolin-1) y ABCG8 (sterolin-2)

Debido a que los esteroides vegetales no son devueltos a la luz intestinal ni apenas excretados al árbol biliar, los pacientes sitosterolémicos acumulan una gran cantidad de esteroides vegetales tanto en plasma como en tejidos [105]. De hecho, los niveles de esteroides vegetales en sangre suelen oscilar entre los 12 y los 40 mg/dL [105], mientras que los individuos sanos no superan los 2 mg/dL. Sin embargo, las concentraciones de colesterol en plasma son normales o sólo están ligeramente elevadas [36], seguramente debido a una inhibición de la síntesis endógena y a que el transportador ABCG5/G8 tiene mayor especificidad por los esteroides vegetales que por el colesterol [88]. A pesar de esto, los pacientes sitosterolémicos presentan muchas de las características clínicas que muestran los aquejados de

hipercolesterolemia familiar, como la presencia de xantomas tendinosos y tuberosos y, sobre todo, el desarrollo de aterosclerosis precoz. Esto sugiere que la presencia de esteroides vegetales puede tener efectos proaterogénicos directos en la pared arterial, y es lo que ha llevado a cuestionar la seguridad de su administración como alimentos funcionales. En consonancia con esta hipótesis, se ha visto que lipoproteínas que contienen β -sitosterol provocan la muerte en macrófagos a concentraciones similares a las que presentan los individuos sitosterolémicos [106].

Además, se ha comprobado que el tratamiento con ezetimibe no sólo disminuye la absorción de colesterol, sino también de esteroides vegetales [11], y que dicho tratamiento fue capaz de revertir completamente la xantomatosis y de mejorar los signos clínicos cardiovasculares (incluyendo soplos carotídeos bilaterales) en un paciente aquejado de sitosterolemia [107]. Sin embargo, los individuos heterocigotos son clínicamente normales, a pesar de tener cantidades moderadamente elevadas de esteroides en plasma [12, 108-110], lo que sugiere que se necesitan cantidades masivas para que actúen como elemento proaterogénico. A continuación revisaremos los datos que se tienen con respecto a si los esteroides vegetales se pueden considerar o no un factor de riesgo vascular.

2.4.2.- Datos a favor de los esteroides vegetales como factor de riesgo aterosclerótico

2.4.2a.- Evidencias en animales

Hay pocas evidencias en modelos animales que sugieran un efecto proaterogénico de los esteroides vegetales. El principal estudio que lo sugiere comprobó que la

suplementación en la dieta con un 2% de esteroides vegetales aumentó el tamaño de las lesiones y disminuyó la relajación vascular dependiente del endotelio en ratones a los que se les había ocluido la arteria cerebral media. En plasma la concentración de esteroides vegetales estaba aumentada, pero no así la de colesterol, lo que sugiere que los primeros podrían agravar *per se* la lesión cerebral [111].

2.4.2b.- Evidencias en humanos

Diversos estudios parecen mostrar una correlación entre concentraciones plasmáticas de esteroides vegetales y enfermedad coronaria, aunque en algunos de ellos cabe añadir ciertos matices.

Un estudio que reunió a 506 pacientes hipercolesterolémicos demostró que los niveles plasmáticos de campesterol y estigmasterol estaban asociados con una historia personal/familiar de coronariopatía precoz independientemente del colesterol total (aunque los cocientes respecto al colesterol no fueron calculados) [17]. En el mismo sentido, otro estudio comprobó que las concentraciones de esteroides vegetales en 53 pacientes candidatos a un by-pass coronario eran mayores que en los respectivos controles, incluido el cociente con el colesterol y de forma independiente de otros factores de riesgo [112].

Otra evidencia proviene del estudio PROCAM (Prospective Cardiovascular Münster Study) [113], en el que se incluyeron 159 hombres que habían sufrido algún evento coronario y que se emparejaron cada uno con dos controles. Se observó que los participantes en el primer cuartil de sitosterol tenían un incremento de riesgo cardiovascular del 1,8. Sin embargo, no se vieron diferencias cuando se ajustaron

las concentraciones de sitosterol con las de colesterol y éstas únicamente se mantuvieron para los individuos de mayor riesgo.

Un estudio del año 2000 mostró una asociación independiente del campesterol y del β -sitosterol con la enfermedad coronaria en mujeres posmenopáusicas [114]. Sin embargo, las “odds ratios” de riesgo eran en realidad casi insignificantes y, además, las concentraciones de esteroides vegetales correlacionaban con menores IMC, triglicéridos, glucosa e insulina.

Otro trabajo comprobó que existía una correlación entre el cociente esteroides vegetales/colesterol en suero y su acumulación en las placas de aterosclerosis carotídea [115]. En el mismo sentido, un estudio mostró que existía una relación entre los esteroides vegetales en plasma y su acumulación en las válvulas aórticas estenóticas, un proceso cuyos factores de riesgo remedan los de la aterosclerosis [116]. Sin embargo, no se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de esteroides entre casos y controles.

Tabla 2. Estudios a favor y en contra de los esteroides vegetales como factor de riesgo cardiovascular en animales y humanos

A FAVOR	EN CONTRA
Estudios en animales	
Ratones C57BL/6. La administración oral de ésteres de fitosteroides alteró la relajación vascular dependiente del endotelio y aumentó el tamaño de la lesión tras isquemia cerebral [111]	Hámsters. La administración junto con la alimentación de ésteres de fitosteroides redujo significativamente la formación de células espumosas a nivel aórtico [117]
	Conejos. La administración de sitostanol redujo el crecimiento de la placa aterosclerótica en las arterias coronarias y la aorta ascendente [118]
	Ratas Zucker. El consumo de fitosteroides mejoró la función endotelial [119]
	Ratones deficientes en apoE. La ingesta de fitosteroides se asoció con una reducción en el área de la lesión [75, 120, 121]
	Ratones sitosterolémicos deficientes en G5/G8. No se encontró asociación entre concentraciones muy elevadas de fitosteroides y aterosclerosis [122]
	Ratones heterocigotos deficientes en LDLr. El aumento de las

	<p>concentraciones de esteroides vegetales en plasma (normalizadas respecto a las de colesterol) no fue aterogénico en ratones alimentados con una dieta enriquecida en fitosteroles/fitostanoles junto con atorvastatina [123]</p>
	<p>Ratones deficientes en apoE. Los oxifitosteroides administrados en la dieta no promovieron aterosclerosis [124]</p>
<p>Estudios en humanos</p>	
<p>Pacientes sitosterolemicos. Aterosclerosis precoz en pacientes con concentraciones plasmáticas de fitosteroides entre 12 y 40 mg/dL [105]</p>	<p>Heterocigotos para defectos funcionales en ABCG5G8. Ausencia de evidencia de aterosclerosis, a pesar de presentar incrementos moderados en las concentraciones plasmáticas de esteroides vegetales [12, 108, 109]</p>
<p>Sujetos hipercolesterolemicos. Concentraciones plasmáticas elevadas de campesterol y estigmasterol se asociaron con historia personal o familiar de coronariopatía precoz [17]</p>	<p>Mujeres con coronariopatía. La "odds ratio" de riesgo ajustada para coronariopatía no mostró ninguna influencia por parte de los esteroides vegetales [125]</p>
<p>Sujetos con indicación de bypass carotídeo. Aquellos con una historia</p>	<p>Hombres y mujeres del estudio prospectivo EPIC-Norfolk.</p>

<p>familiar de coronariopatía tuvieron niveles significativamente más altos de campesterol y sitosterol plasmáticos, así como de sus cocientes con colesterol [112]</p>	<p>Concentraciones plasmáticas fisiológicas pero elevadas de esteroles vegetales no se relacionaron con enfermedad cardiovascular [126]</p>
<p>Hombres que habían sufrido un evento coronario y controles. Los sujetos en el primer cuartil de sitosterol tenían un riesgo relativo de 1,8 en comparación con los sujetos de los tres cuartiles inferiores [113]</p>	<p>Sujetos de edad avanzada. Las concentraciones plasmáticas de esteroles vegetales eran menores en pacientes con coronariopatía [127]</p>
<p>Mujeres postmenopáusicas con coronariopatía y controles. El campesterol y sitosterol plasmáticos mostraron una ligera pero significativa asociación con coronariopatía [114]</p>	<p>Sujetos de edad intermedia. No se encontró relación entre los fitosteroles plasmáticos e historia familiar de coronariopatía o calcio coronario [122]</p>
<p>Sujetos sometidos a endarterectomía carotídea. Se encontró una correlación entre el cociente fitosteroles/colesterol en plasma y en la pared de la arteria carótida [115]</p>	<p>Pacientes programados para angiopatía coronaria. El cociente campesterol/colesterol en plasma correlacionó con la severidad de la enfermedad cardiovascular, pero no lo hizo con el cociente sitosterol/colesterol [59]</p>
<p>Pacientes con estenosis aórtica severa y controles. Se encontró correlación entre el cociente fitosteroles/colesterol en plasma y el grado de estenosis valvular [116]</p>	

2.4.3. Datos en contra de los esteroides vegetales como factor de riesgo aterosclerótico

2.4.3a.- Evidencias en animales

Se han usado numerosos modelos animales para evaluar el efecto de los esteroides vegetales en la disminución de colesterol, el desarrollo de aterosclerosis o el daño endotelial. Así, en hámsters a los que se había alimentado con una dieta enriquecida en esteroides vegetales (hasta un 2,8% peso/peso), aunque las concentraciones de dichos esteroides en plasma aumentaron significativamente, se observó que se producía una inhibición en la formación de células espumosas a nivel aórtico –una medida de aterosclerosis- [117]. Del mismo modo, se observó un menor crecimiento de placas ateroscleróticas en las coronarias y en la aorta ascendente de conejos que habían sido alimentados con una dieta rica en sitostanol (0,8% peso/peso) [118], o que la suplementación de la dieta con una mezcla de esteroides (1% peso/peso) en ratas obesas tipo Zucker mejoraba considerablemente la función endotelial [119]. En cuanto a los estudios con ratones, existen un gran número de ellos que apuntan a que los esteroides vegetales previenen el desarrollo de aterosclerosis. Así, varios estudios que usaron ratones hipercolesterolémicos deficientes en apoE o ratones transgénicos apoE3-Leiden muestran que la lesión aterosclerótica se reduce tras la incorporación en la dieta de una mezcla tanto de fitosteroides como de fitostanoles [75, 92, 120, 121]. Eso sí, estos estudios no permiten dilucidar si este efecto se debe únicamente a la disminución en la absorción de colesterol, lo que podría haber enmascarado un posible efecto perjudicial de los esteroides vegetales *per se* [111].

Otro tipo de estudios desarrollados en ratones son los que aprovechan la deficiencia en los transportadores ABCG5 o ABCG8 para obtener un modelo murino de sitosterolemia, con concentraciones plasmáticas de esteroides vegetales de hasta 100 veces los valores normales. Uno de ellos observó que no había diferencias en las lesiones ateroscleróticas a nivel del arco aórtico entre estos ratones y los animales control, así como que cuando se cruzaban con animales deficientes en el receptor de LDL, la aterosclerosis no se agravaba [122]. Sin embargo, este trabajo no empleó un modelo murino C57BL/6 susceptible a aterosclerosis —que constituye el modelo más habitual para este tipo de estudios—, por lo que sus resultados no pueden considerarse del todo concluyentes.

Otra posibilidad es que el consumo de esteroides vegetales dé lugar a un aumento en plasma de fitosteroides oxidados (oxifitosteroides), de los cuales se desconoce si pueden ser aterogénicos. Aunque todavía existen muy pocos datos sobre este tema, un estudio que evaluó el efecto que tenía el añadir una mezcla de oxifitosteroides a la dieta (0,02 % p/p) de ratones deficientes en apoE no observó diferencias en la lesión aterosclerótica a nivel del arco aórtico, concluyendo que los oxifitosteroides exógenos no promueven el desarrollo de aterosclerosis [124].

2.4.3b.- Evidencias en humanos

Existen varios estudios en humanos que van en contra de que aumentos moderados en las concentraciones de esteroides vegetales puedan suponer un factor de riesgo cardiovascular. Por ejemplo, en un estudio de casos y controles sobre enfermedad coronaria en mujeres [128] no se observó que hubiera diferencias en las concentraciones de esteroides vegetales entre ambos grupos. Y la misma conclusión se alcanzó en el estudio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and

Nutrition) [126], en el que niveles plasmáticos elevados de esteroides vegetales no se asociaron con el futuro riesgo coronario en pacientes sanos. De hecho, las concentraciones de sitosterol tendían a estar inversamente asociadas con este riesgo. También se observaron correlaciones negativas entre las concentraciones de esteroides vegetales y riesgo cardiovascular en una cohorte de 1242 ancianos que participaron en el llamado estudio LASA (Longitudinal Aging Study Amsterdam) [127], aunque en este caso los resultados no se ajustaron por el índice de masa corporal. Por otro lado, otro estudio que incluyó a 2542 individuos de mediana edad encontró asociaciones significativas entre las concentraciones plasmáticas de colesterol y una historia familiar de enfermedad coronaria, pero no observó ninguna correlación con las concentraciones de los principales esteroides vegetales [122].

En un trabajo del 2009, el llamado estudio LURIC [59] se midieron los esteroides no colesterol en 2440 participantes que habían sido sometidos a una angiografía para determinar el estado de sus arterias coronarias. En este caso, la asociación entre el ratio sitosterol/colesterol y la enfermedad coronaria no fue estadísticamente significativa, aunque sí se apreció una correlación de esta última con el ratio campesterol/colesterol.

Finalmente, un estudio de casos y controles que se llevó a cabo con 50 individuos sanos, estudió el efecto de la administración de una margarina enriquecida con ésteres de fitostanol durante dos años en diversos marcadores subclínicos de aterosclerosis. Se observó que había una relación dosis-respuesta entre la ingesta de margarina enriquecida y la elasticidad carotídea, y que a mayor tiempo de administración mayores beneficios se conseguían [129].

2.4.4 Conclusiones sobre la seguridad de los esteroides vegetales

El hecho de que la mayor parte de los enfermos de sitosterolemia presenten aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares de forma temprana ha dado lugar a que sea razonable pensar que el aumento en las concentraciones de esteroides vegetales —como las que tienen lugar con la toma de suplementos— pueda conllevar un aumento en el riesgo vascular. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, a las dosis recomendadas, estos suplementos incrementan muy ligeramente dichas concentraciones (entre 0,6 y 2 mg/dL, de 20 a 100 veces menos que las concentraciones alcanzadas por los individuos sitosterolémicos). Esta elevación es incluso menor que la que suelen presentar los sujetos heterocigotos, que no muestran un riesgo aumentado [130]. Es cierto que algunos estudios han encontrado una relación entre niveles elevados de esteroides vegetales en plasma y riesgo cardiovascular. Sin embargo, la mayor parte de estas asociaciones desaparecían cuando se tenía en cuenta el cociente esteroides vegetales/colesterol, una medida de la relación síntesis/absorción que, como hemos visto, constituye un buen reflejo de la homeostasis del sistema. Por otro lado, numerosos estudios en animales apuntan a una reducción en el desarrollo de aterosclerosis con la toma de esteroides vegetales. Y diversos trabajos en humanos no han encontrado asociaciones entre concentraciones plasmáticas elevadas de fitosteroides y riesgo cardiovascular. Por tanto, parece ser que los esteroides vegetales son perjudiciales cuando se encuentran en concentraciones extremadamente elevadas. Y que el pequeño riesgo potencial que podrían presentar en niveles moderados sería claramente compensado (e invertido) por la disminución en las concentraciones de LDLc a que dan lugar. Sin embargo, serán necesarios ensayos clínicos de intervención que dilucidan definitivamente la relación riesgo/beneficio [6].

2.5.- Metabolismo de los triglicéridos

Parte del trabajo desarrollado en esta tesis se centra en el papel que tiene la acumulación de esteroides vegetales sobre el metabolismo de los triglicéridos. Por eso se ha creído conveniente tratar brevemente los principales rasgos de su metabolismo en la presente introducción.

Al igual que sucede con el colesterol, en el metabolismo de los TG se pueden diferenciar distintos apartados: absorción intestinal, síntesis endógena y catabolismo periférico.

2.5.1.- Absorción y secreción intestinal

Antes de ser absorbidos, los TG procedentes de la dieta son hidrolizados en dos grandes pasos. Por un lado, la acción mecánica de la boca y el estómago rompe los grandes agregados originales, que después serán solubilizados en micelas junto con los ácidos biliares. Al mismo tiempo, los TG son digeridos por toda una serie de lipasas provenientes fundamentalmente del páncreas, descomponiéndolos en monoacilglicéridos (MAG) y ácidos grasos [131]. Cuando las concentraciones de estos dos productos son altas, ambos pueden difundir a través de la membrana de los enterocitos. Sin embargo, también pueden ser transportadas en contra de gradiente con la ayuda de determinadas proteínas, las cuales se pueden agrupar en tres categorías: proteínas de membrana que unen ácidos grasos (“peripheral plasma membrane fatty acid-binding protein” (FABP_{pm})), proteínas de transporte de ácidos grasos (“fatty acid transport proteins” (FATPs)) y translocasas de ácidos grasos incluyendo CD36 (“fatty acid translocase/cluster determinant 36” (FAT/CD36)) [132-134] + (Figura 5). Una vez en el interior del enterocito, los ácidos grasos libres y los monoglicéridos se reesterifican para formar de nuevo TG gracias fundamentalmente a la acción de las enzimas MGAT y DGAT (mono y diacilglicerol aciltransferasa,

respectivamente) en lo que se conoce como la vía de síntesis del monoacilglicerol. Los triglicéridos serán luego conducidos hacia el retículo endoplásmico, donde tendrá lugar su empaquetamiento en quilomicrones maduros (Qm).

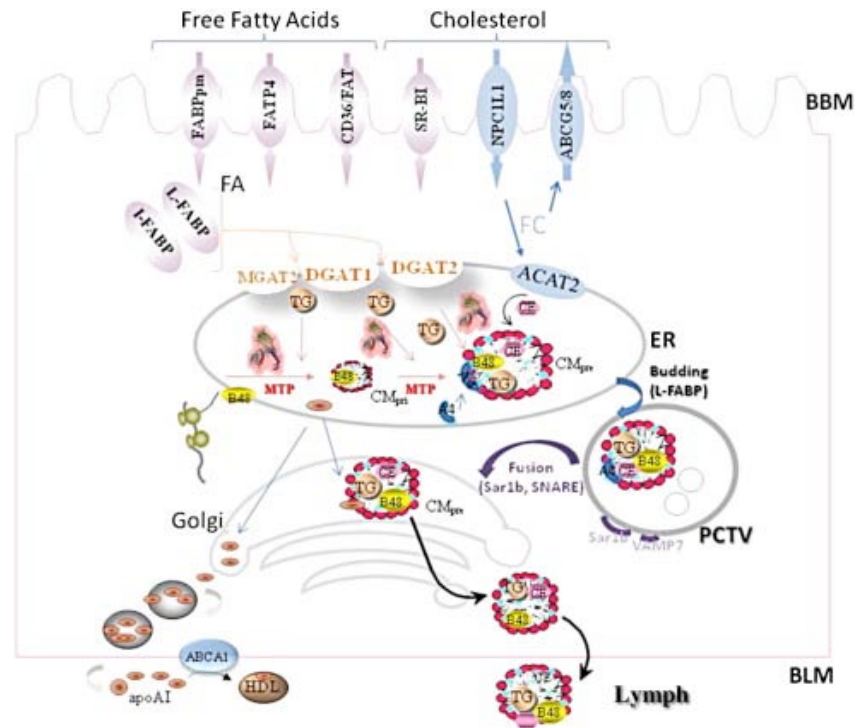


Figura 5. Visión esquemática de los principales mecanismos celulares relacionados con la absorción intestinal de TG Tomado de: Pan, X. and M.M. Hussain, *Gut triglyceride production*. Biochim Biophys Acta. **1821**(5): p. 727-35.

ABCA1, ABC transporter A1; ABCG5/G8, ABC transporter G5/G8; ACAT, acyl CoA cholesterol acyltransferase; BBM, brush border membrane; BLM: basolateral membrane CD36/FAT, fatty acid translocase; CM, chylomicrons; DGAT, diacyl glycerol transferase; ER, endoplasmic reticulum; FA, fatty acids; FABPpm, plasma membrane fatty acid binding protein; FATP, fatty acid binding protein; HDL, high density lipoprotein; I-FABP and L-FABP, cytosolic fatty acid binding proteins; MGAT, monoacyl glycerol transferase; MTP, microsomal transfer protein; NPC1L1, Niemann-Pick C1 Like 1; PCTV, chylomicron transport vesicle; SRBI, scavenger receptor BI.

Los Qm se sintetizan preferentemente en el intestino delgado durante el periodo postprandial. Son partículas muy ricas en TG, ya que éstos suponen entre el 80 y el

95% de su composición total. El ensamblaje de los Qm comienza en el retículo endoplásmico mediante la unión entre la proteína apoB48 y los lípidos que le cede la denominada proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP). A medida que la apoB va uniéndose a más lípidos se va separando de la membrana del retículo endoplásmico, conformando lo que se denomina una “partícula primordial”, que contiene lípidos neutros en su núcleo y que posteriormente irá aumentando de tamaño mediante la adición de nuevos lípidos por parte de la MTP o por la fusión directa de vesículas lipídicas preformadas. Además de lípidos, estas partículas adquieren distintas apolipoproteínas. Una de las más importantes es la apoAIV, que contribuye a la estabilización de su superficie y que se ha mostrado como un marcador de la absorción intestinal de TG [135]. Tras pasar al aparato de Golgi, estos *prequilomicrones* reciben nuevos lípidos, así como la unión de apoA1, con lo que se convierten en Qm nacientes, que se almacenan en vesículas y acabarán pasando a la circulación linfática tras su fusión con la membrana basolateral del enterocito. Una vez que alcancen el torrente sanguíneo adquirirán, entre otras, apoCII y apoE, completando su maduración.

2.5.2.- Síntesis de TG

La síntesis de TG puede darse a través de dos vías fundamentales: una es la vía del monoacilglicerol, que acabamos de describir sucintamente y que tiene lugar fundamentalmente en el intestino mediante la reesterificación de MAG y ácidos grasos para producir TG. Otra la vía del glicerol fosfato - o de Kennedy -, que sería propiamente una síntesis *de novo*, y que tiene lugar fundamentalmente a nivel del hígado y, en menor medida, en el tejido adiposo. En este caso los ácidos grasos pueden sintetizarse a partir de glucosa, concretamente de acetil-coA, gracias

fundamentalmente al papel de los enzimas FAS (fatty acid synthase) y ACAC (acetyl-CoA carboxylase).

A continuación los triglicéridos son empaquetados en partículas VLDL gracias a la acción del enzima MTP, que transfiere lípidos procedentes del citosol o del retículo endoplásmico a partículas apoB nacientes [136].

2.5.3.- Catabolismo periférico

El catabolismo periférico tiene lugar mediante la hidrólisis de los TG presentes en el core de las partículas ricas en TG (TRLPs), constituidas fundamentalmente por los QMs y las partículas de VLDL secretadas por el hígado. Esta hidrólisis depende fundamentalmente del enzima lipoproteína lipasa (LPL). Brevemente, la LPL es sintetizada mayoritariamente por el tejido adiposo y el músculo, y, mediante transcitosis, pasa a la parte luminal de la membrana, donde la visión clásica sostenía que se unía a los proteoglicanos de la pared endotelial [137]. Una vez anclada, la LPL puede interactuar con las TRLPs, hidrolizando sus TG y dando lugar a partículas residuales tanto de quilomicrones como de partículas VLDL. La actividad LPL está regulada por la acción de diferentes apoproteínas que pueden intervenir en su funcionamiento. Destacan especialmente la apoCII, que actúa como activador, y la apoCIII, que inhibe su acción. Las partículas residuales serán entonces retiradas de la circulación por el hígado, a nivel del espacio de Disse, y en dicho proceso parecen jugar un papel relevante el LDLr, la LRP o incluso la apoE [138-140].

En los últimos años, esta visión clásica se ha visto matizada por nuevos estudios que han añadido nuevos actores al escenario tradicional. Entre ellos destaca el

papel de la proteína GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein), sintetizada por la células endoteliales. La GPIHBP1 se une directamente a la LPL en el espacio luminal (con mayor afinidad que los proteoglicanos) y es fundamental para que ésta pueda llevar a cabo su acción de hidrólisis [141]. También cabe tener en cuenta el papel que desempeñan las proteínas ANGPTL3 (angiopoietin-related protein) y 4. La primera es sintetizada fundamentalmente por el hígado y su expresión viene regulada por LXR. La segunda se produce en su mayoría en el tejido adiposo tras la activación del receptor PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). Ambas actúan como inhibidores importantes de la acción de la LPL [142].

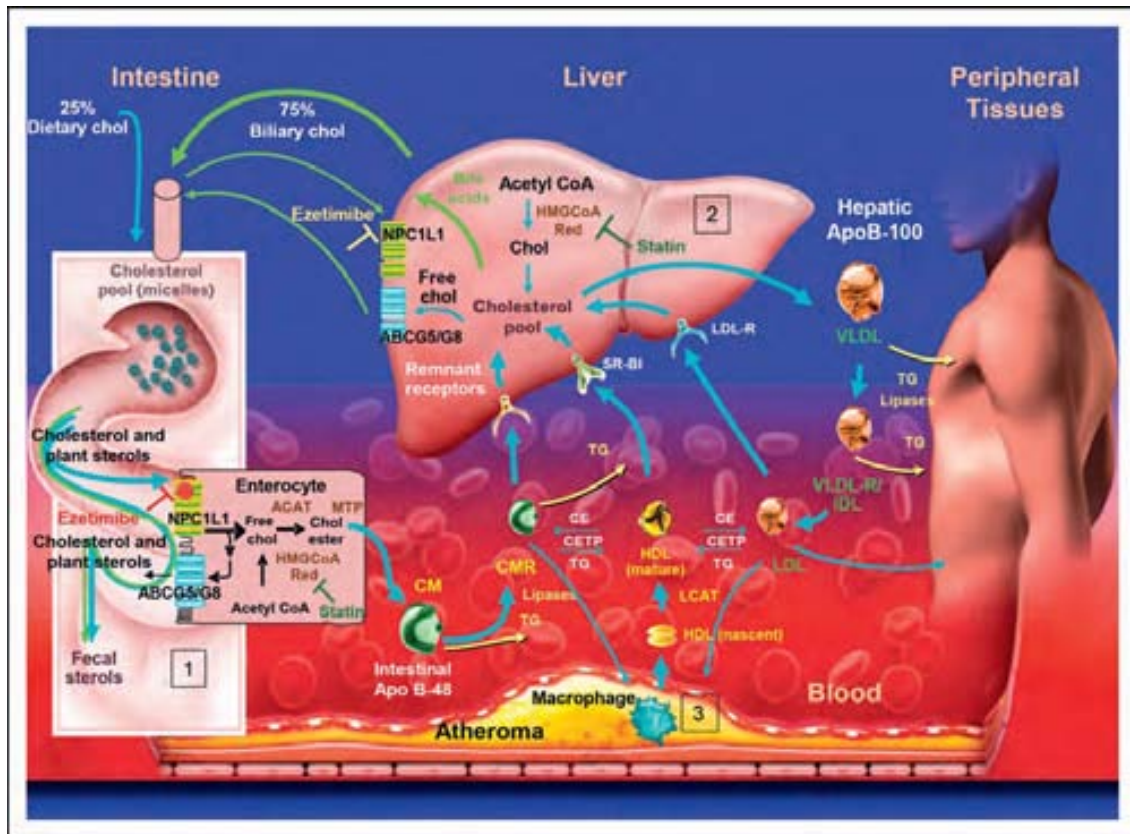


Figura 6. Visión esquemática de las principales vías metabólicas que regulan el metabolismo del colesterol y los TG en el plasma y su relación con el metabolismo enterohepático del colesterol. (Tomado de Davis, H.R., Jr., et al., *Intestinal sterol transporters and cholesterol absorption inhibition*. *Curr Opin Lipidol.* **22**(6): p. 467-78) .

ABCG5/G8, adenosine-binding cassette transporters G5 and G8; ACAT, acyl-CoA-cholesterol transferase; ApoB, apolipoprotein B; chol, cholesterol; CE, cholesterol ester; CETP, cholesterol-ester transfer protein; CM, chylomicron; CMR, chylomicron remnants; HMGCoA, hydroxymethylglutaryl-CoA; IDL, intermediate-density cholesterol lipoprotein; LCAT, Lecithin-cholesterol acyltransferase; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; NPC1L1, Niemann-Pick C1-like 1 protein; TG, triglycerides.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la presente tesis se pueden distinguir dos líneas de trabajo diferenciales que mantienen como nexo común el estudio de los esteroides y estanoles vegetales. Sin embargo, por su finalidad y desarrollo, podemos separarlas en dos hipótesis con sus correspondientes objetivos.

1) Las dosis de esteroides/estanoles vegetales recomendadas actualmente para disminuir las concentraciones de LDLc son de 2 g/d, lo que reduce aproximadamente en un 10% dichos niveles. A pesar de que estudios recientes afirman que pueden consumirse hasta 9 g/d de estanoles vegetales para llegar a una reducción del 17% sin aparentes efectos secundarios, se continúa investigando en el desarrollo de nuevas moléculas relacionadas que otorguen una mayor potencia hipocolesterolemia. Una de ellas es el compuesto llamado FM-VP4, formado por una molécula de sitostanol y otra de campestanol unidas covalentemente a una de ácido ascórbico. Esta estructura otorga una mayor solubilidad al FM-VP4, que ha demostrado ser un agente hipocolesterolemia más potente que otros esteroides/estanoles vegetales, al menos en hámsters y en ratones deficientes en apoE. Sin embargo, los mecanismos responsables de esta mayor eficacia son todavía desconocidos. Nuestra hipótesis es que el mayor efecto hipocolesterolemia de FM-VP4 debe poder objetivarse estudiando la absorción y el metabolismo enterohepático del colesterol en ratones sujetos a una dieta de mantenimiento. El objetivo de este primer estudio fue pues:

- Determinar el efecto de FM-VP4 en la inhibición de la absorción intestinal de colesterol, la concentración de colesterol plasmático, el contenido lipídico hepático e intestinal y el metabolismo enterohepático de colesterol y ácidos

biliares, así como su excreción fecal en ratones C57BL/6J. Para ello se determinó también la expresión de una serie de genes relacionados con el metabolismo del colesterol y su circulación enterohepática.

2) Algunos esteroides vegetales, como el estigmasterol, son capaces de activar al receptor LXR α , al menos *in vitro*, y diversos derivados de fitosteroides actúan como ligandos de LXR en los enterocitos. Entre las diversas acciones de LXR se encuentra el regular el metabolismo de los TG, provocando su activación un aumento de TG plasmáticos. Aunque la administración de esteroides vegetales a sujetos no sitosterolémicos no parece contribuir al desarrollo de hipertrigliceridemia, ningún trabajo ha estudiado con detalle el papel que pueda tener su acumulación masiva. Sin embargo, existen precedentes que muestran que ratones modelo de sitosterolemia presentan niveles plasmáticos elevados de TG y que la sobreexpresión de los transportadores ABCG5/G8 reduce las concentraciones plasmáticas y hepáticas de TG en ratones hipercolesterolémicos. Por ello, nuestra hipótesis es que la acumulación masiva de esteroides vegetales en ratones modelo de sitosterolemia es capaz de alterar dicho metabolismo a través, fundamentalmente, de la activación del receptor LXR. Como consecuencia, nos proponemos los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto de la deficiencia de ABCG5 y G8 sobre la concentración de TG. Estudiar el perfil lipídico de ratones deficientes en los transportadores ABCG5/G8, modelo de sitosterolemia, así como en ratones heterocigotos para dicha deficiencia. Para ello se evaluará la alteración producida por la acumulación de esteroides vegetales en dichos modelos murinos sobre la producción hepática de TG, el catabolismo periférico de TG y la absorción

intestinal de TG. Este objetivo incluye el estudio de la expresión génica de los principales genes involucrados en el metabolismo de los TG.

PUBLICACIONES

**DISODIUM ASCORBYL PHYTOSTANOL PHOSPHATE (FM-VP4), A
MODIFIED PHYTOSTANOL, IS A HIGHLY ACTIVE
HYPOCHOLESTEROLAEMIC AGENT THAT AFFECTS THE
ENTEROHEPATIC CIRCULATION OF BOTH CHOLESTEROL AND BILE
ACIDS IN MICE**

J. Méndez-González, S. Sören-Castillo, L. Calpe-Berdiel, N. Rotllan, M. Vázquez-Carrera, J. C. Escolà-Gil, F. Blanco-Vaca.

British Journal of Nutrition 2010 Jan;103(2):153-60

Impact factor: **3,072**

Resumen:

FM-VP4 (disodium ascorbyl phytostanol phosphate) es un compuesto sintético derivado del sitostanol y campestanol que ha demostrado su efectividad como agente hipocolesterolemiante tanto en ratones como en humanos. Sin embargo, su mecanismo de acción es todavía desconocido. El presente trabajo estudia la capacidad de FM-VP4 para alterar la homeostasis del colesterol en ratones, fundamentalmente a nivel hepático e intestinal. Ratones hembra C57BL/6J fueron alimentados, o bien con una dieta estándar o bien con la misma dieta enriquecida en un 2% con FM-VP4 durante 4 semanas. FM-VP4 redujo la absorción intestinal de colesterol *in vivo*, así como las concentraciones plasmáticas y hepáticas de colesterol 2,2, 1,5 y 1,6 veces, respectivamente, en comparación con los ratones control. Además, FM-VP4 también alteró la homeostasis de los ácidos biliares. En los ratones alimentados con FM-VP4, el contenido hepático e intestinal de los mismos aumentó 1,3 y 2,3 veces, respectivamente, mientras que la excreción fecal disminuyó 3,3 veces. Además, FM-VP4 también aumentó la captación intestinal del ácido H³ taurocólico *in vivo*. Por otro lado, la inhibición en la absorción intestinal de colesterol ejercida por FM-VP4 fue independiente de aumentos en la expresión de los genes intestinales LXR α , ABCA1 y ABCG5/G8 o de una disminución en la de NPC1L1. En cambio, FM-VP4 incrementó la expresión de los genes hepáticos LXR α , ABCA1 y ABCG5/G8, así como de SRB1 y HMGCoA-R, mientras que disminuyó la de algunos de los genes diana de FXR, como CYP7A1 y NTCP. Como conclusión, FM-VP4 redujo la absorción intestinal de colesterol, así como sus concentraciones plasmáticas y hepáticas, alteró la homeostasis de los ácidos biliares aumentando su reabsorción intestinal y cambió la expresión hepática de genes que juegan un papel principal en la homeostasis del colesterol. Se trata del primer estero/estanol vegetal que altera el metabolismo de los ácidos biliares y que

es capaz de disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol en ratones normocolesterolémicos.

PUBLICACIÓN 1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822032>)

**P.2 ATP-BINDING CASSETTE G5/G8 DEFICIENCY CAUSES
HYPERTRIGLYCERIDEMIA BY AFFECTING MULTIPLE METABOLIC
PATHWAYS**

J. Méndez-González, Josep Julve, Noemí Rotllan, Gemma Llaverias,
Francisco Blanco-Vaca, Joan Carles Escolà-Gil

Biochim Biophys Acta. 2011 Dec;1811(12):1186-93.

Impact factor: **5,084**

Resumen:

Mutaciones en los transportadores ABCG5/G8 causan sitosterolemia, una rara enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por la acumulación masiva de esteroides vegetales. El objetivo de este estudio era investigar los efectos de la deficiencia de ABCG5 y ABCG8 sobre el metabolismo de los TG en ratones. Los experimentos fueron efectuados en ratones control (G5/G8 +/+), heterocigotos para la deficiencia en ABCG5 y ABCG8 (G5/G8 +/-) y homocigotos para dicha deficiencia (G5/G8 -/-), todos ellos alimentados con una dieta estándar. Las concentraciones plasmáticas de TG en ayunas fueron 2,6 y 4,3 veces más altas en los ratones G5/G8 +/- y G5/G8 -/- que en los animales G5/G8 +/+. Las concentraciones plasmáticas de TG en condiciones posprandiales fueron 5 veces superiores en los ratones G5/G8 -/-. Los estudios efectuados acerca del metabolismo de los TG indican que: 1) la tasa catabólica fraccional fue significativamente más baja en los ratones G5/G8 +/- (1,3 veces) y G5/G8 -/- (1,5 veces) que en los G5/G8 +/+ y la actividad de la lipoproteína lipasa plasmática tras la administración de heparina fue también significativamente más baja en los ratones G5/G8 +/- (1,8 veces) y G5/G8 -/- (5,4 veces) que en los G5/G8 +/+. 2) La secreción hepática de TG fue 1,3 veces mayor en los ratones G5/G8 +/- y G5/G8 -/- que en los animales G5/G8 +/+, lo cual se asoció con un aumento en la expresión génica a nivel hepático de los genes LXR, FAS, ACAC y CD36. 3) La secreción intestinal de TG, determinada tras la administración de un bolo oral de glicerol tri[9,10(n)-H³] oleato fue 5,8 veces superior en los ratones G5/G8 -/- que en los ratones G5/G8 +/+. Además, el índice HOMA fue 2,6 veces más alto en los animales G5/G8 -/- que en los G5/G8 +/+, lo que reflejó un cierto grado de resistencia a la insulina en los primeros. En conclusión, la deficiencia de ABCG5/G8 en ratones alimentados con una dieta estándar aumenta de forma notoria las concentraciones plasmáticas de TG a través de una

disminución de su catabolismo periférico y un aumento de su secreción hepática e intestinal.

PUBLICACIÓN 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21855652>).

Online Table 1. Real-time RT-PCR quantification of relative mRNA expression in perigonadal WAT (pWAT) of G5/G8 +/+, G5/G8 +/- and G5/G8 -/- mice.

	G5/G8 +/+	G5/G8 +/-	p	G5/G8 -/-	p
Relative LXR level	100 (65.1-)	198.8 (155.1-352.0)	0.025*	625.3 (423.8-1183.5)	0.025*
Relative LPL level	100 (84.7-149.0)	107.3 (91.2-158.9)	0.386	98.8 (73.1-)	0.724
Relative ANGPTL4 level	100 (53.8-132.0)	112.2 (104.0-127.5)	0.773	139.8 (90.0-180.3)	0.248
Relative PPAR- γ level	100 (54.2-189.0)	115.5 (92.6-153.6)	0.773	93.0 (75.5-111.1)	1.0
Relative CD 36 level	100 (58.1-161.0)	119.6 (91.3-141.9)	0.564	85.7 (69.7-150.0)	0.773

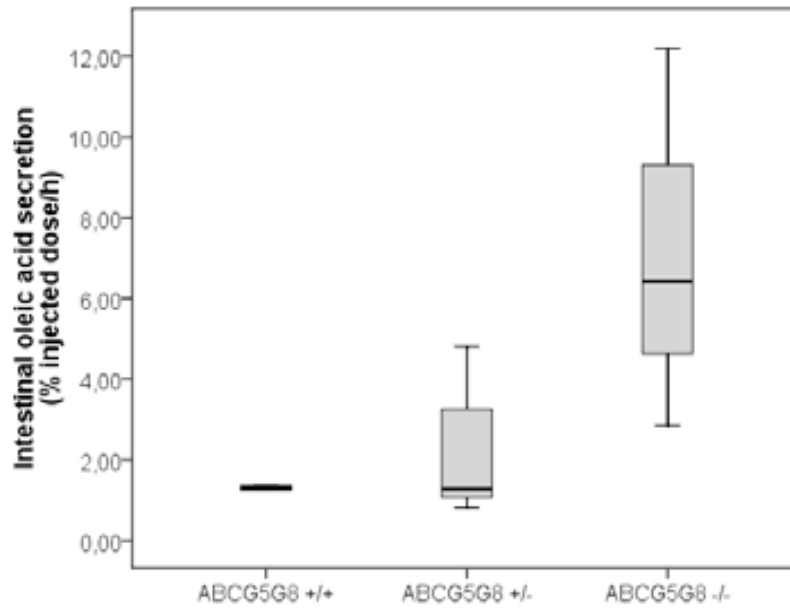
The signal of G5/G8 +/+ was set at a normalized value of 100 arbitrary units.

GAPDH was used as internal control. * $p < 0.05$ vs. G5/G8 +/+ mice (n=5 in each group).

Online Table 2. Real-time RT-PCR quantification of relative mRNA expression in small intestines of G5/G8 +/+, G5/G8 +/- and G5/G8 -/- mice. The signal of G5/G8 +/+ was set at a normalized value of 100 arbitrary units. GAPDH was used as internal control. * p<0.05 vs. G5/G8 +/+ mice (n=5 in each group).

		G5/G8 +/+	G5/G8 +/-	p	G5/G8 -/-	p
Relative level	LXR	100 (89.7-209.6)	181.4 (166.5-)	0.297	127.0 (71.3-168.7)	0.465
Relative level	MTP	100 (66.1-172.5)	45.1 (42.0-57.1)	0.043*	67.4 (56.6-73.2)	0.142
Relative AIV level	APO-	100 (69.8-241.9)	81.1 (35.4-165.3)	0.386	96.4 (68.8-175.6)	1.0
Relative level	FAS	100 (63.1-159.8)	37.6 (23.1-118.2)	0.149	52.3 (30.6-116.0)	0.142

Online Figure 1. Intestinal TG secretion of G5/G8 +/+, G5/G8 +/- and G5/G8 -/- mice determined by scintillation counting 2h after an OFG of 10 μ Ci [9,10(n)- 3 H] oleic acid in 150 μ L of olive oil and triton WR-1339 injection. † p<0.05 vs. G5/G8 +/+ mice (n=5 in each group).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

R.1 Efectos del FMVP4 sobre el metabolismo del colesterol y los ácidos biliares en ratones C57/BL6

R.1.a.- Efectos de FM-VP4 sobre la absorción intestinal de colesterol y sobre el colesterol plasmático y hepático

La absorción intestinal de colesterol en los ratones tratados durante 4 semanas con FM-VP4 fue 2,2 veces inferior a la de los ratones control y la actividad del [¹⁴C]colesterol a las 48 h de su administración intragástrica fue hasta 100 veces inferior en los ratones tratados. En cuanto a los niveles plasmáticos y hepáticos de colesterol fueron 1,5 y 1,6 veces inferiores en los animales tratados que en los animales control, respectivamente. Todo ello sin que se apreciaran diferencias significativas en cuanto al peso de los animales o a la cantidad de alimento ingerido (Tabla 1).

Los datos sobre absorción intestinal de colesterol (Tabla 1) son consistentes con otros estudios previos que se habían efectuado administrando FM-VP4 a ratas [143]. Sin embargo, FM-VP4 redujo también las concentraciones hepáticas y plasmáticas de colesterol (Tabla 1), hecho que no había sucedido cuando se administraron otro tipo de esteroides/estanoles vegetales o incluso ezetimibe a ratones normocolesterolémicos [48, 74, 75, 77].

Una de las posibles explicaciones para este efecto podría ser el hecho de que la acción inhibitoria de FM-VP4 sobre la absorción intestinal de colesterol en animales es algo más potente que la de otros esteroides/estanoles vegetales o incluso que la del ezetimibe [48, 74, 75]. Sin embargo, estas diferencias no parecen lo suficientemente importantes como para ser las responsables de estos efectos. Por tanto, es muy probable que otros mecanismos estén aconteciendo simultáneamente.

En este sentido, cabe destacar la gran diferencia observada en la actividad de [¹⁴C]colesterol 48 h después de su administración intragástrica (Tabla 1). El hecho de que dicha actividad fuera hasta 100 veces inferior en los ratones tratados que en los ratones control indica que ésta se debe, no sólo a una disminución en la absorción intestinal, sino también a una incorporación enormemente acelerada a los tejidos. De forma consistente con esto, los perfiles hepáticos de expresión génica mostraron un aumento en la expresión de LXR α , del heterodímero formado por los transportadores ABCG5/G8 y del receptor SR-BI (Figura 3b). Los dos primeros están relacionados con un aumento en la excreción hepatobiliar de colesterol, mientras que el último participa en la captación hepática del colesterol [49, 72, 144-147]. Ninguno de estos cambios se observó cuando otros esteroides/estanoles vegetales o incluso cuando el ezetimibe fueron usados [48, 74, 75]. Por tanto, parecen específicos de FM-VP4. La pregunta que nos hicimos entonces fue por qué esas acciones eran tan singulares, teniendo en cuenta que su composición se basa fundamentalmente en dos estanoles vegetales ya conocidos y estudiados, como el sitostanol y el campestanol.

Lo primero que cabe decir es que estos efectos parecen dependientes directamente de la estructura de FM-VP4, ya que otros estudios han demostrado que el ácido ascórbico no afecta a la absorción de colesterol por sí mismo [148] y que FM-VP4 es más potente que la combinación de los estanoles que lo forman y el ácido ascórbico por separado [148]. Por otro lado, se ha visto que la biodisponibilidad de FM-VP4 en ratas es de hasta el 6,5%, una cantidad notablemente más alta que la que presentan otros estanoles [149], mientras que un estudio clínico en pacientes dislipémicos mostró que FM-VP4 era detectable en plasma tras su administración oral [150]. Teniendo en cuenta, además, que algunos fitosteroles como el estigmasterol, o incluso diversos derivados de fitosteroles son capaces de activar LXR *in vivo* [151], es posible que FM-VP4 pueda actuar directamente sobre el metabolismo hepático.

Además, los resultados muestran un aumento en la expresión génica de hasta 6 veces del gen HMGCoA-R a nivel del hígado (Figura 3b), mientras que estudios previos que usaron mezclas de esteroides y estanoles vegetales no mostraron ninguna variación [75, 91, 92, 152]. Este hecho parece ser debido a un intento de compensación por parte del organismo ante la disminución de los niveles de colesterol y podría ser debido tanto a la inhibición en la absorción intestinal de colesterol, como a una mayor excreción hepatobiliar.

En cuanto al perfil de expresión de genes intestinales, los datos contrastan con los de los genes hepáticos, pero están en consonancia con diversos estudios que se habían efectuado usando mezclas de esteroides y estanoles vegetales [48, 74, 75]. Se observó que había una disminución en la expresión intestinal de LXR, ABCG5 y G8 y una tendencia a disminuir en la de ABCA1 en los ratones tratados (Figura 3a).

Las causas de esta disminución no son conocidas, pero podrían deberse a un mecanismo compensatorio del organismo ante una reducción en la absorción de colesterol. Además, y como también se observó en dichos estudios, se puede descartar que en este caso la inhibición de dicha absorción intestinal de colesterol por parte de FM-VP4 sea mediada por cambios en la expresión del transportador NPC1L1. Sin embargo, como se comentó en la introducción, mientras que el papel de ABCA1 [77] y ABCG5/G8 [74, 78] en dicha inhibición ha sido descartado mediante estudios con animales modificados genéticamente, el verdadero rol de NPC1L1 se encuentra aún por determinar.

R 1.b.- Efectos de FM-VP4 sobre el metabolismo de los ácidos biliares

FM-VP4 incrementó las cantidades de ácidos biliares presentes en hígado e intestino delgado 1,3 y 2,3 veces, respectivamente (Figura 1a y b). Por el contrario, los niveles de ácidos biliares en las heces de los animales tratados fueron 3,3 veces más bajos que en los ratones control (Figura 1c). Además, cuando analizamos la distribución del ácido [3H]-taurocólico a las 48 h de su administración intragástrica, observamos que sus niveles fueron 3,3 veces más altos en el intestino de los ratones tratados en comparación con los animales control y que FM-VP4 provocaba una tendencia no significativa a que aumentara su presencia en plasma, hígado y vesícula biliar. Sin embargo, no observamos diferencias al analizar su contenido en heces, probablemente porque el tiempo transcurrido no fue suficiente para que el ciclo enterohepático se completara, como se puede deducir del hecho de que la actividad detectada fue notablemente baja en ambos grupos de animales (Figura 2).

Estos resultados son en cierta medida sorprendentes, ya que ninguno de los trabajos previos que se habían realizado sobre tratamientos con esteroles o estanoles vegetales en ratones había presentado variaciones en el metabolismo de ácidos biliares o en su excreción fecal [74, 75, 92]. Además, este hecho abriría la posibilidad a nuevos tratamientos en combinación con secuestrantes de ácidos biliares, con los que FM-VP4 podría presentar efectos sinérgicos. Los datos presentados muestran que en los ratones tratados con FM-VP4 se produce un aumento en la reabsorción de ácidos biliares a nivel intestinal. Teniendo en cuenta que la síntesis de ácidos biliares es la vía más importante de excreción de colesterol, nuestra hipótesis es que estos cambios responden a un mecanismo de compensación del organismo ante el gran efecto hipocolesterolemiante de FM-VP4, mediante el cual tratar de minimizar las pérdidas.

En cuanto al perfil de expresión génica de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos biliares, cabe destacar el papel de FXR, un receptor nuclear activado por ácidos biliares [153]. Aunque FM-VP4 no alteró su expresión, sí lo hizo con una serie de genes por él regulados, como son Cyp7A1, NTCP y BSEP (Figura 4). Así, se produjo una disminución en la expresión de Cyp7A1, el principal enzima de síntesis de ácidos biliares [153, 154], así como de la expresión de NTCP [153, 154], un transportador asociado a la recaptación de ácidos biliares por parte del hígado, en un intento por proteger el parénquima hepático de una posible acumulación y toxicidad. Por el contrario, se observó un aumento no significativo en la expresión de BSEP, una bomba exportadora de ácidos biliares hacia los canalículos biliares. En cuanto a los datos sobre la expresión de Cyp7A1, podrían entrar en confrontación con el hecho de que la activación de LXR –también presente en el hígado de los animales tratados- da lugar a un aumento de su expresión génica. Sin embargo,

está descrito que la actividad de FXR es superior a la de LXR cuando ambos receptores se encuentran sobreexpresados [153]. Por otro lado, el llamado “crosstalk” de FXR con otros receptores nucleares podría haber atenuado la inducción esperada de otros genes por parte de FXR. Entre ellos se encontrarían el ya mencionado BSEP, y también I-BABP, del cual se piensa que es el principal transportador de ácidos biliares a nivel intestinal [155] y cuya expresión únicamente presentó una tendencia no significativa a aumentar (Figura 4).

Finalmente, cabe citar que también se estudió el papel que FM-VP4 podría tener sobre la vía alternativa de síntesis de ácidos biliares. Sin embargo, parece que esta ruta no se ve afectada, como se desprende del hecho de que no se observaron diferencias en la expresión de CYP7B1 y CYP27A1, dos de sus enzimas clave [153] (datos no mostrados). Tampoco se observaron cambios en la expresión de la proteína MDR3, implicada en la protección hepática frente al daño por colestasis, ni en PXR, su principal regulador [156]. Por tanto, se puede decir que el tratamiento con FM-VP4 no mostró evidencias de provocar toxicidad hepática.

En conclusión, FM-VP4 es, por lo que conocemos, el primer estero/estanol vegetal capaz de disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol en ratones normocolesterolémicos. Además, y probablemente como consecuencia de ello, es también el primero en incrementar la recirculación enterohepática de ácidos biliares, lo cual abriría las puertas a posibles sinergias en el co-tratamiento con, por ejemplo, secuestrantes de ácidos biliares en el caso de que estos resultados se repitieran en humanos.

R.2.- Efectos de la deficiencia de ABCG5G8 en el metabolismo de los TG

R.2.a.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre las concentraciones de lípidos en plasma (dieta estándar)

Entre los pocos enfermos sitosterolémicos de los que se tiene un perfil lipídico completo, la mayoría presentan concentraciones plasmáticas de TG superiores a las de sus familiares directos [11-16]. Del mismo modo, estudios previos con ratones deficientes en ABCG5/G8 (modelo de sitosterolemia) han mostrado que éstos tienden a presentar un aumento en las concentraciones plasmáticas de TG en ayunas [157, 158]. Sin embargo, ninguno de estos trabajos tenía como objetivo el análisis del metabolismo de los TG.

En nuestro estudio, basado en ratones alimentados con una dieta estándar, las concentraciones plasmáticas de esteroides totales en ayunas fueron 1,6 y 1,1 veces significativamente superiores en los ratones G5/G8 $-/-$ y G5/G8 $+/-$ que en los animales G5/G8 $+/+$, respectivamente (Tabla 1). Y ello sin que se apreciaran diferencias significativas en el peso entre los distintos grupos –aunque sí se observó una tendencia a que fuera menor en los ratones G5/G8 $-/-$. Más concretamente, los estudios mediante cromatografía reprodujeron los fenotipos previamente publicados, con un aumento dosis-dependiente de las concentraciones de β -sitosterol y campesterol y una disminución en los niveles de colesterol plasmático (Tabla 1).

En cuanto a las concentraciones plasmáticas de TG, éstas fueron, en ayunas, 2,6 y 4,3 veces significativamente más altas en los ratones G5/G8 $-/-$ que en los animales

G5/G8 +/- y G5/G8 -/-, respectivamente (Figura 1a). Los análisis mediante FPLC mostraron que, como era de esperar, los TG se acumulaban preferentemente en la fracción VLDL (Figura 1b). Además, los TG también se encontraban alterados en condiciones postprandiales (Figura 1c). Para estudiarlo, se administraron intragástricamente 150 μ L de aceite de oliva y se determinaron las concentraciones de TG a determinados intervalos de tiempo. El área bajo la curva calculada fue 5 veces más alta en los ratones G5/G8 -/- que en los animales control, mientras que no se observaron diferencias significativas entre éstos y los ratones G5/G8 +/- (Figura 1c). Tampoco se observaron diferencias en las concentraciones de FFA en plasma entre los tres grupos.

El siguiente paso fue investigar las posibles causas de estas alteraciones metabólicas. Para ello estudiamos los tres principales procesos implicados en el metabolismo de los TG: el catabolismo periférico, su síntesis hepática y la absorción intestinal.

R.2.b.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre el catabolismo periférico de TG in vivo

El primer experimento consistió en estudiar el aclaramiento plasmático de partículas TRL marcadas radiactivamente con trioleína. A las 2 horas de su administración intragástrica, la tasa catabólica fraccional estaba significativamente reducida tanto en los ratones G5/G8 -/- como en los G5/G8 +/-, en comparación con los animales control (Figura 2a). Las dos principales causas de esta disminución podían ser: o bien una menor actividad total del enzima LPL, el principal enzima encargado de la

hidrólisis de TG, o bien una alteración en las partículas TRL que afectara a este proceso.

La actividad de la LPL, estudiada mediante un sustrato radioactivo artificial, fue significativamente más baja, tanto en los ratones G5/G8 -/- (5,4 veces) como en los ratones G5/G8 +/- (1,8 veces) respecto a los animales control (Figura 2b). Sin embargo, esta reducción de la actividad no dependía de la composición de las TRL: la formación de FFA cuando se usó LPL bovina frente a partículas TRL procedentes de cada uno de los grupos de ratones no presentó diferencias significativas.

Los análisis de expresión génica del tejido adiposo perigonadal no determinaron la causa de esta disminución en la actividad LPL (Tabla Online 1). La expresión de LXR estaba aumentada significativamente 6,4 veces en los ratones G5/G8 -/- y 2 veces en los ratones G5/G8 +/- respecto a los animales control, seguramente como consecuencia de la acumulación directa de esteroides vegetales. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de LPL y de PPAR γ - un receptor nuclear implicado en el desarrollo del tejido adiposo -, así como tampoco en la expresión del transportador CD36 o de la proteína ANGPTL4, relacionada esta última con la inhibición del enzima LPL [159]. Asimismo, los estudios mediante ELISA no mostraron diferencias significativas en la cantidad de ANGPTL3, una proteína soluble de síntesis hepática que se encuentra directamente regulada por LXR y que también se ha relacionado con la inhibición de la LPL [160].

Dos son los datos que permiten explicar, al menos en parte, la disminución de la actividad LPL en los animales deficientes en G5/G8. Por un lado, se observó que el peso del tejido adiposo perigonadal - considerado como un reflejo del peso del tejido adiposo global - en los ratones G5/G8 -/- era 6,3 veces significativamente más

bajo que en los ratones control (Figura 2c). Teniendo en cuenta que este tejido supone una de las principales fuentes de LPL [161], esta reducción podría estar explicando la gran disminución observada en la actividad del enzima. Sin embargo, este estudio no puede determinar cuál es la causa inicial de dicha disminución, ya que nuestros datos no permiten discriminar si es la falta de tejido adiposo la que provoca la disminución del enzima, o si es ésta la que contribuye a la falta de desarrollo del tejido. Por otro lado, se observó que los ratones G5/G8 *-/-* presentaban un cierto grado de resistencia a la insulina, ya que el índice HOMA era significativamente más alto que el de los animales control (Figura 5c). Sin embargo, las mediciones de glucosa e insulina en condiciones basales no mostraron diferencias significativas. Estos datos apuntan a que los ratones deficientes en G5/G8 presentan un cierto grado de resistencia a la insulina. Una explicación a este comportamiento podría estar en la activación de LXR. Aunque diversos estudios han mostrado un papel beneficioso de LXR sobre el perfil glucémico [162], se ha descrito también que su activación crónica induce la apoptosis de las células β del islote pancreático por hiperactivación de la lipogénesis [163] y que inhibe su proliferación al detener su ciclo celular [164], por lo que podría contribuir al desarrollo de diabetes de tipo 2 [165].

R.2.c.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre la secreción hepática de TG

La secreción hepática de TG 2 h después de bloquear la actividad del enzima LPL con Triton WR-1339 fue 1,3 veces superior tanto en los ratones G5/G8 *-/-* como en los G5/G8 *+/-* respecto a los animales control (Figura 3a). Estos datos son, en cierta

medida, sorprendentes: teniendo en cuenta que la concentración de β -sitosterol y de campesterol en el hígado fue dosis-dependiente (Tabla 1), los datos sobre secreción parecen indicar que la acumulación de esteroides vegetales tendría un efecto umbral sobre la producción hepática de TG.

En cuanto a los perfiles de expresión génica, y como era esperable, LXR presentó una expresión 2,4 veces superior en ambos grupos de ratones modificados respecto a los ratones control, lo que estaría en consonancia con el efecto umbral antes comentado (Figura 3b). Del mismo modo, la expresión de FAS y ACAC, dos genes implicados en la síntesis de TG y dependientes de LXR estaban altamente sobreexpresados en el hígado de los animales G5/G8 $-/-$ y G5/G8 $+/-$ con respecto a los animales control (9 y 7,7 veces en los G5/G8 $-/-$ y 7,2 y 4,7 en los G5/G8 $+/-$, respectivamente). Sin embargo, y contrariamente a lo esperado, la acumulación de esteroides vegetales, a pesar de activar LXR y promover la síntesis de TG en el hígado, no alteró la expresión del gen SREBP1c (Figura 3b). Éste es un gen activado por LXR que es capaz de activar a más de 30 genes, fundamentalmente relacionados con la síntesis de TG, por lo que su sobreexpresión se ha demostrado implicada en la hipertrigliceridemia desarrollada por el uso de activadores de LXR [7, 151, 153]. Nuestros resultados indican, por el contrario, que la acumulación de esteroides vegetales podría activar la producción de TG a nivel hepático a través del aumento en la expresión de CD36 (1,9 y 2,1 veces más alta en los ratones G5/G8 $-/-$ y G5/G8 $+/-$ respecto a los ratones control, respectivamente) (Figura 3b), un transportador que es también diana de LXR y cuya activación no sólo se ha demostrado capaz de aumentar la producción de TG por una vía independiente de SREBP1c, sino que además es capaz de promover la secreción de TG hacia el torrente circulatorio [166-168]. De hecho, esto último, junto con la alteración en el

catabolismo periférico, podría explicar la gran disminución de TG presentes en el parénquima hepático de los ratones deficientes en G5/G8 (Tabla 1). Sin embargo, nuestro estudio no es capaz de discriminar cuáles son los esteroides vegetales específicos, en caso de haberlos, responsables de la activación de LXR y sus posteriores consecuencias.

R.2.d.- Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre la absorción y secreción intestinal de TG

Sorprendentemente, la absorción intestinal de TG, determinada mediante el cálculo de la fracción de absorción de los lípidos de la dieta fue de un 95,1 % en los ratones G5/G8 *-/-*, significativamente superior a la de los ratones G5/G8 *+/-* y G5/G8 *+/+* (92,4 y 92,3 %, respectivamente) (Figura 4a). En cuanto a la secreción intestinal de TG, medida a las dos horas de haber administrado intragástricamente 10 μ Ci de 3 H trioleína – y tras bloquear la acción de la LPL –, fue 5,8 veces significativamente más alta en los animales G5/G8 *-/-* que en los ratones G5/G8 *+/-* y G5/G8 *+/+* (Figura 4b). Como se puede observar, se aprecia una considerable distancia en cuanto a las diferencias observadas entre ambos experimentos. Sin embargo, y teniendo en cuenta que la secreción intestinal se determinó únicamente a las 2 h tras la administración de trioleína, es probable que los cambios estén reflejando una aceleración en la secreción de las partículas, más que un incremento global significativo en la absorción intestinal de TG.

Las causas de este aumento no han podido ser aclaradas en su totalidad. Los estudios de expresión génica no mostraron diferencias en la expresión del transportador CD36 o de la apoAIV, proteína que ha sido vinculada recientemente

con la absorción de TG [135] (Tabla Online 2). Del mismo modo, no se apreciaron diferencias en la expresión intestinal de MTP o FAS, por lo que parece que el aumento en la absorción no puede explicarse por un incremento en la síntesis y empaquetamiento de TG por parte del enterocito. Sin embargo, y como es obvio, estos estudios no descartan la posibilidad de que estas enzimas se encuentren alterados por los esteroides vegetales mediante mecanismos postranscripcionales.

Cuando repetimos el experimento de secreción intestinal usando ácido oleico – que no precisa ser hidrolizado para su absorción - marcado radiactivamente en lugar de trioleína, observamos unos resultados absolutamente parejos a los del experimento original (Figura Online 1). Esto permite descartar un papel relevante de las lipasas en el aumento de absorción observado en los ratones G5/G8 -/-. Del mismo modo, los estudios de determinación de ácidos biliares mediante la técnica 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que no mostraron diferencias significativas en el contenido intestinal de los diferentes grupos de animales, permiten descartar un posible rol diferencial en la solubilización y posterior asimilación de TG por esta causa (Figura 4c).

Sin embargo, es posible que la mayor acumulación de esteroides vegetales en el enterocito de los ratones G5/G8 sí influya directamente en el ensamblaje de Qm y su posterior secreción, afectando por tanto a la absorción no sólo de los propios esteroides vegetales sino también de los TG. En este sentido, puede ser importante el papel de ACAT2, la isoforma predominante de ACAT en el intestino delgado. ACAT2 se encarga de sintetizar ésteres de colesterol para que pueda tener lugar dicho ensamblaje y secreción de los Qm, por lo que participa directamente en la absorción, no sólo de esteroides, sino también de TG [84]. ACAT2 presenta

fundamentalmente una regulación alostérica, en la que el colesterol sirve como principal activador, pero donde los esteroides vegetales también ejercer una cierta acción [86]. Así, en los ratones deficientes en G5/G8, la acumulación masiva, tanto de colesterol como sobre todo de esteroides vegetales en el enterocito, podría estar ejerciendo una activación de ACAT2 que determinase un mayor empaquetamiento y secreción de TG en el intestino.

Por otro lado, aunque los mecanismos desencadenantes no han sido aún completamente dilucidados, la resistencia a la insulina se ha asociado con un aumento en la producción intestinal de lipoproteínas, juntamente con un aumento en el transporte de TG [169, 170]. Por tanto, dicha resistencia observada en los ratones G5/G8 -/- podría estar contribuyendo al aumento en la absorción y secreción intestinal de TG en este grupo de animales.

R.2.e Efectos de la deficiencia de ABCG5/G8 sobre las concentraciones plasmáticas y hepáticas de lípidos en ratones alimentados con una dieta Western

Un grupo independiente de 12 ratones (6 G5/G8 +/+ y 6 G5/G8 -/-) fue alimentado durante ocho semanas con una dieta Western, rica en colesterol y ácidos grasos saturados, en lugar de la dieta estándar administrada a los animales pertenecientes a los estudios previos. En ayunas, las medianas de las concentraciones plasmáticas de TG en los ratones G5/G8 +/+ y G5/G8 -/- fueron significativamente diferentes: 0,27 (0,21-0,86) y 0,98 (0,5-2,23) mM, respectivamente (p=0,049), mientras que en hígado no se observaron diferencias significativas: 31,1 (28,3-53,1) y 28,3 (23,1-

34,9) mmol/hígado, respectivamente ($p=0.02$). Como se puede apreciar, y en cierto modo de una forma contraintuitiva, los efectos de la deficiencia de G5/G8 sobre las concentraciones de TG son menos pronunciados cuando se administra una dieta rica en grasas. Sin embargo, es posible que los efectos de la deficiencia de G5/G8 en algunos genes regulados por LXR se encuentren atenuados en animales alimentados con este tipo de dieta, lo que reduciría las diferencias con los animales control. En este sentido, un estudio reciente mostró que la sobreexpresión de LXR en el hígado de ratones que habían sido alimentados con una dieta estándar empeoró el perfil de TG en plasma [171]. Sin embargo, produjo el efecto contrario cuando los ratones fueron alimentados con una dieta Western, ya que en este caso la sobreexpresión de LXR aumentó el aclaramiento periférico de TG sin afectar a su síntesis.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de los estudios incluidos en esta tesis son:

1.a. FM-VP4 inhibe con gran eficacia la absorción intestinal de colesterol en ratones C57BL/6. Además, es el primer estero/estanol vegetal capaz de disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol en ratones normocolesterolémicos. Sus acciones parecen dependientes de su estructura completa, y en ellas parece desempeñar un papel importante la activación de LXR a nivel hepático.

1.b. FM-VP4 es el primer estero/estanol vegetal capaz de alterar la recirculación enterohepática de ácidos biliares en ratones, aumentando su reabsorción intestinal.

2.a. La acumulación de esteroides vegetales en ratones deficientes en los transportadores ABCG5/G8 aumenta las concentraciones plasmáticas de TG tanto en ayunas como en condiciones posprandiales.

2.b. La deficiencia de ABCG5/G8 altera el metabolismo de los TG disminuyendo su catabolismo periférico y aumentando su secreción tanto a nivel hepático como a nivel intestinal.

BIBLIOGRAFÍA

1. NCEP, E.P., *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. *Jama*, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
2. Abumweis, S.S., R. Barake, and P.J. Jones, *Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials*. *Food Nutr Res*, 2008. **52**.
3. Demonty, I., et al., *Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake*. *J Nutr*, 2009. **139**(2): p. 271-84.
4. Katan, M.B., et al., *Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels*. *Mayo Clin Proc*, 2003. **78**(8): p. 965-78.
5. Mensink, R.P., et al., *Plant stanols dose-dependently decrease LDL-cholesterol concentrations, but not cholesterol-standardized fat-soluble antioxidant concentrations, at intakes up to 9 g/d*. *Am J Clin Nutr*. **92**(1): p. 24-33.
6. Calpe-Berdiel, L., et al., *Increased plasma levels of plant sterols and atherosclerosis: a controversial issue*. *Curr Atheroscler Rep*, 2009. **11**(5): p. 391-8.
7. Yang, C., et al., *Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(38): p. 27816-26.
8. Kaneko, E., et al., *Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 36091-8.
9. Plat, J. and R.P. Mensink, *Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption*. *Faseb J*, 2002. **16**(10): p. 1248-53.
10. Plat, J., J.A. Nichols, and R.P. Mensink, *Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(11): p. 2468-76.
11. Salen, G., et al., *Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia*. *Circulation*, 2004. **109**(8): p. 966-71.
12. Hidaka, H., et al., *Increased plasma plant sterol levels in heterozygotes with sitosterolemia and xanthomatosis*. *J Lipid Res*, 1990. **31**(5): p. 881-8.
13. Wang, J., et al., *Phenotypic heterogeneity of sitosterolemia*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(12): p. 2361-7.
14. Su, Y., et al., *Clinical and molecular genetic analysis of a family with sitosterolemia and co-existing erythrocyte and platelet abnormalities*. *Haematologica*, 2006. **91**(10): p. 1392-5.
15. Salen, G., et al., *Increased sitosterol absorption, decreased removal, and expanded body pools compensate for reduced cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis*. *J Lipid Res*, 1989. **30**(9): p. 1319-30.
16. Lutjohann, D., et al., *Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment*. *J Lipid Res*, 1995. **36**(8): p. 1763-73.
17. Glueck, C.J., et al., *Relationships of serum plant sterols (phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of*

- phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives.* *Metabolism*, 1991. **40**(8): p. 842-8.
18. Wu, T., et al., *The effects of phytosterols/stanols on blood lipid profiles: a systematic review with meta-analysis.* *Asia Pac J Clin Nutr*, 2009. **18**(2): p. 179-86.
 19. Musa-Veloso, K., et al., *A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials.* *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **85**(1): p. 9-28.
 20. Moruosi, K.G., W. Oosthuizen, and A.M. Opperman, *Phytosterols/stanols lower cholesterol concentrations in familial hypercholesterolemic subjects: a systematic review with meta-analysis.* *J Am Coll Nutr*, 2006. **25**(1): p. 41-8.
 21. Scholle, J.M., et al., *The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: systematic review and meta-analysis.* *J Am Coll Nutr*, 2009. **28**(5): p. 517-24.
 22. Law, M., *Plant sterol and stanol margarines and health.* *Bmj*, 2000. **320**(7238): p. 861-4.
 23. Calpe-Berdiel, L., J.C. Escola-Gil, and F. Blanco-Vaca, *New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism.* *Atherosclerosis*, 2009. **203**(1): p. 18-31.
 24. Konlande, J.E. and H. Fisher, *Evidence for a nonabsorptive antihypercholesterolemic action of phytosterols in the chicken.* *J Nutr*, 1969. **98**(4): p. 435-42.
 25. Vanstone, C.A., M. Raeini-Sarjaz, and P.J. Jones, *Injected phytosterols/stanols suppress plasma cholesterol levels in hamsters.* *J Nutr Biochem*, 2001. **12**(10): p. 565-574.
 26. Altmann, S.W., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption.* *Science*, 2004. **303**(5661): p. 1201-4.
 27. Garcia-Calvo, M., et al., *The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1).* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(23): p. 8132-7.
 28. Sudhop, T., et al., *Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans.* *Circulation*, 2002. **106**(15): p. 1943-8.
 29. van Heek, M., et al., *Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663.* *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(8): p. 1748-54.
 30. Van Heek, M., et al., *In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461.* *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. **283**(1): p. 157-63.
 31. Tsubakio-Yamamoto, K., et al., *Current therapy for patients with sitosterolemia--effect of ezetimibe on plant sterol metabolism.* *J Atheroscler Thromb*. **17**(9): p. 891-900.
 32. Igel, M., et al., *Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice.* *J Lipid Res*, 2003. **44**(3): p. 533-8.
 33. Lu, K., et al., *Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and*

- sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively.* Am J Hum Genet, 2001. **69**(2): p. 278-90.
34. Klett, E.L. and S. Patel, *Genetic defenses against noncholesterol sterols.* Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(4): p. 341-5.
 35. Berge, K.E., et al., *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters.* Science, 2000. **290**(5497): p. 1771-5.
 36. Lee, M.H., K. Lu, and S.B. Patel, *Genetic basis of sitosterolemia.* Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 141-9.
 37. Temel, R.E., et al., *Compared with Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol.* J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 47594-601.
 38. Ohama, T., et al., *Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(3): p. 625-30.
 39. Andersen, J.M., S.D. Turley, and J.M. Dietschy, *Relative rates of sterol synthesis in the liver and various extrahepatic tissues of normal and cholesterol-fed rabbits. Relationship to plasma lipoprotein and tissue cholesterol levels.* Biochim Biophys Acta, 1982. **711**(3): p. 421-30.
 40. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.* Science, 1986. **232**(4746): p. 34-47.
 41. Herz, J. and D.K. Strickland, *LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor.* J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 779-84.
 42. Varban, M.L., et al., *Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4619-24.
 43. Russell, D.W., *The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis.* Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 137-74.
 44. Javitt, N.B., *Cholesterol, hydroxycholesterols, and bile acids.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(5): p. 1147-53.
 45. Falany, C.N., et al., *Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase.* J Biol Chem, 1994. **269**(30): p. 19375-9.
 46. Gerloff, T., et al., *The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver.* J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 10046-50.
 47. Yu, L., et al., *Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16237-42.
 48. Repa, J.J., J.M. Dietschy, and S.D. Turley, *Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA for ABCA1, ABCG5, or ABCG8 in the enterocyte.* J Lipid Res, 2002. **43**(11): p. 1864-74.
 49. Yu, L., et al., *Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol.* J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 671-80.

50. Miettinen, T.A., *Detection of changes in human cholesterol metabolism*. Ann Clin Res, 1970. **2**(4): p. 300-20.
51. Miettinen, T.A., R.S. Tilvis, and Y.A. Kesaniemi, *Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population*. Am J Epidemiol, 1990. **131**(1): p. 20-31.
52. Miettinen, T.A., R.S. Tilvis, and Y.A. Kesaniemi, *Serum cholestanol and plant sterol levels in relation to cholesterol metabolism in middle-aged men*. Metabolism, 1989. **38**(2): p. 136-40.
53. Miettinen, T.A., et al., *Synthesis and absorption of cholesterol in Finnish boys by serum non-cholesterol sterols: the cardiovascular risk in Young Finns Study*. Atherosclerosis, 2008. **200**(1): p. 177-83.
54. Bjorkhem, I., et al., *Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver*. J Lipid Res, 1987. **28**(10): p. 1137-43.
55. Miettinen, T.A., et al., *Relation of non-cholesterol sterols to coronary risk factors and carotid intima-media thickness: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. Atherosclerosis. **209**(2): p. 592-7.
56. Nissinen, M.J., et al., *Applicability of non-cholesterol sterols in predicting response in cholesterol metabolism to simvastatin and fluvastatin treatment among hypercholesterolemic men*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. **20**(5): p. 308-16.
57. Miettinen, T.A., et al., *Adolescent cholesterol metabolism predicts coronary risk factors at middle age: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. Transl Res, 2008. **151**(5): p. 260-6.
58. Escurriol, V., et al., *Phytosterol plasma concentrations and coronary heart disease in the prospective Spanish EPIC cohort*. J Lipid Res. **51**(3): p. 618-24.
59. Silbernagel, G., et al., *The relationships of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with the severity of coronary artery disease*. J Lipid Res, 2009. **50**(2): p. 334-41.
60. Silbernagel, G., et al., *The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause and cardiovascular mortality*. J Lipid Res. **51**(8): p. 2384-93.
61. Matthan, N.R., et al., *Alterations in cholesterol absorption/synthesis markers characterize Framingham offspring study participants with CHD*. J Lipid Res, 2009. **50**(9): p. 1927-35.
62. Weingartner, O., et al., *Alterations in cholesterol homeostasis are associated with coronary heart disease in patients with aortic stenosis*. Coron Artery Dis, 2009. **20**(6): p. 376-82.
63. Pearson, T.A., et al., *The lipid treatment assessment project (L-TAP): a multicenter survey to evaluate the percentages of dyslipidemic patients receiving lipid-lowering therapy and achieving low-density lipoprotein cholesterol goals*. Arch Intern Med, 2000. **160**(4): p. 459-67.
64. Miettinen, T.A., et al., *Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in subgroup of Scandinavian simvastatin survival study*. Finnish 4S Investigators. Bmj, 1998. **316**(7138): p. 1127-30.
65. Miettinen, T.A., T.E. Strandberg, and H. Gylling, *Noncholesterol sterols and cholesterol lowering by long-term simvastatin treatment in coronary patients:*

- relation to basal serum cholestanol*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(5): p. 1340-6.
66. Miettinen, T.A. and H. Gylling, *Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment*. *Eur J Clin Invest*, 2003. **33**(11): p. 976-82.
 67. Miettinen, T.A. and H. Gylling, *Effect of statins on noncholesterol sterol levels: implications for use of plant stanols and sterols*. *Am J Cardiol*, 2005. **96**(1A): p. 40D-46D.
 68. Cummins, C.L. and D.J. Mangelsdorf, *Liver X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland*. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**(Pt 6): p. 1110-3.
 69. Repa, J.J., et al., *Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers*. *Science*, 2000. **289**(5484): p. 1524-9.
 70. Repa, J.J., et al., *Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18793-800.
 71. Murthy, S., et al., *LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(7): p. 1054-64.
 72. Plosch, T., et al., *Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 33870-7.
 73. Duan, L.P., H.H. Wang, and D.Q. Wang, *Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice*. *J Lipid Res*, 2004. **45**: p. 1312-1323.
 74. Plosch, T., et al., *Reduction of cholesterol absorption by dietary plant sterols and stanols in mice is independent of the abcg5/8 transporter*. *J Nutr*, 2006. **136**(8): p. 2135-40.
 75. Calpe-Berdiel, L., et al., *Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet*. *Atherosclerosis*, 2005. **181**(1): p. 75-85.
 76. Field, F.J., E. Born, and S.N. Mathur, *Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(12): p. 2252-9.
 77. Calpe-Berdiel, L., J.C. Escola-Gil, and F. Blanco-Vaca, *Phytosterol-mediated inhibition of intestinal cholesterol absorption is independent of ATP-binding cassette transporter A1*. *Br J Nutr*, 2006. **95**(3): p. 618-22.
 78. Calpe-Berdiel, L., J.C. Escola-Gil, and F. Blanco-Vaca, *Are LXR-regulated genes a major molecular target of plant sterols/stanols?* *Atherosclerosis*, 2007. **195**: p. 210-1.
 79. Jain, D., et al., *Corn fiber oil and sitostanol decrease cholesterol absorption independently of intestinal sterol transporters in hamsters*. *J Nutr Biochem*, 2008. **19**(4): p. 229-36.
 80. Field, F.J., E. Born, and S.N. Mathur, *Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells*. *J Lipid Res*, 1997. **38**(2): p. 348-60.
 81. Nguyen, L.B., et al., *Deficient ileal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in sitosterolemia: sitosterol is not a feedback inhibitor of intestinal cholesterol biosynthesis*. *Metabolism*, 1994. **43**(7): p. 855-9.

82. Chang, T.Y., et al., *Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2*. *Curr Opin Lipidol*, 2001. **12**(3): p. 289-96.
83. Repa, J.J., et al., *ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: impact on hepatic cholesterol homeostasis*. *Hepatology*, 2004. **40**(5): p. 1088-97.
84. Buhman, K.K., et al., *Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice*. *Nat Med*, 2000. **6**(12): p. 1341-7.
85. Temel, R.E., et al., *Intestinal cholesterol absorption is substantially reduced in mice deficient in both ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and Acyl-CoA:Cholesterol O-acyltransferase 2 (ACAT2)*. *J Lipid Res*, 2005.
86. Liu, J., et al., *Investigating the allostereism of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) by using various sterols: in vitro and intact cell studies*. *Biochem J*, 2005. **391**(Pt 2): p. 389-97.
87. Shefer, S., et al., *Competitive inhibition of bile acid synthesis by endogenous cholestanol and sitosterol in sitosterolemia with xanthomatosis. Effect on cholesterol 7 alpha-hydroxylase*. *J Clin Invest*, 1988. **82**(6): p. 1833-9.
88. Yu, L., et al., *Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(2): p. 301-7.
89. Gylling, H. and T.A. Miettinen, *Serum cholesterol and cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolaemic NIDDM patients before and during sitostanol ester-margarine treatment*. *Diabetologia*, 1994. **37**(8): p. 773-80.
90. Gylling, H., et al., *Serum sterols during stanol ester feeding in a mildly hypercholesterolemic population*. *J Lipid Res*, 1999. **40**(4): p. 593-600.
91. Plat, J. and R.P. Mensink, *Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women*. *Faseb J*, 2002. **16**(2): p. 258-60.
92. Volger, O.L., et al., *Dietary plant stanol esters reduce VLDL cholesterol secretion and bile saturation in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(6): p. 1046-52.
93. Ling, W.H. and P.J. Jones, *Enhanced efficacy of sitostanol-containing versus sitostanol-free phytosterol mixtures in altering lipoprotein cholesterol levels and synthesis in rats*. *Atherosclerosis*, 1995. **118**(2): p. 319-31.
94. Ntanios, F.Y. and P.J. Jones, *Dietary sitostanol reciprocally influences cholesterol absorption and biosynthesis in hamsters and rabbits*. *Atherosclerosis*, 1999. **143**(2): p. 341-51.
95. Grundy, S.M., E.H. Ahrens, Jr., and J. Davignon, *The interaction of cholesterol absorption and cholesterol synthesis in man*. *J Lipid Res*, 1969. **10**(3): p. 304-15.
96. Jones, P.J., et al., *Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(5): p. 697-705.
97. Ho, S.S. and S. Pal, *Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells*. *Atherosclerosis*, 2005. **182**(1): p. 29-36.

98. Nguyen, L.B., et al., *Competitive inhibition of hepatic sterol 27-hydroxylase by sitosterol: decreased activity in sitosterolemia*. Proc Assoc Am Physicians, 1998. **110**(1): p. 32-9.
99. Normen, L., et al., *Soy sterol esters and beta-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(4): p. 908-13.
100. Weststrate, J.A., et al., *Safety evaluation of phytosterol esters. Part 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine*. Food Chem Toxicol, 1999. **37**(11): p. 1063-71.
101. Miettinen, T.A., et al., *Serum, biliary, and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(5): p. 1095-102.
102. Commission, E., *Opinion of the scientific committee on food on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads*. Published on line in http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out144_en.pdf, 2002.
103. Administration, U.F.a.D., *Summary of all GRAS notices*. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Published on line in <http://www.foodsafety.gov/~rdb/opa-gras.html>, 2000.
104. Noakes, M., et al., *An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations*. Am J Clin Nutr, 2002. **75**(1): p. 79-86.
105. Salen, G., et al., *Sitosterolemia*. J Lipid Res, 1992. **33**(7): p. 945-55.
106. Bao, L., et al., *Sitosterol-containing lipoproteins trigger free sterol-induced caspase-independent death in ACAT-competent macrophages*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33635-49.
107. Salen, G., et al., *Intestinal cholesterol absorption inhibitor ezetimibe added to cholestyramine for sitosterolemia and xanthomatosis*. Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1853-7.
108. Nguyen, L.B., et al., *Regulation of cholesterol biosynthesis in sitosterolemia: effects of lovastatin, cholestyramine, and dietary sterol restriction*. J Lipid Res, 1991. **32**(12): p. 1941-8.
109. Lutjohann, D., I. Bjorkhem, and L. Ose, *Phytosterolaemia in a Norwegian family: diagnosis and characterization of the first Scandinavian case*. Scand J Clin Lab Invest, 1996. **56**(3): p. 229-40.
110. Nguyen, L., et al., *Unexpected failure of bile acid malabsorption to stimulate cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. Comparison with lovastatin*. Arteriosclerosis, 1990. **10**(2): p. 289-97.
111. Weingartner, O., et al., *Vascular effects of diet supplementation with plant sterols*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(16): p. 1553-61.
112. Sudhop, T., B.M. Gottwald, and K. von Bergmann, *Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease*. Metabolism, 2002. **51**(12): p. 1519-21.
113. Assmann, G., et al., *Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16**(1): p. 13-21.

114. Rajaratnam, R.A., H. Gylling, and T.A. Miettinen, *Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(5): p. 1185-91.
115. Miettinen, T.A., et al., *Plant sterols in serum and in atherosclerotic plaques of patients undergoing carotid endarterectomy*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): p. 1794-801.
116. Helske, S., et al., *Accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves*. J Lipid Res, 2008. **49**(7): p. 1511-8.
117. Ntanios, F.Y., et al., *Effects of various amounts of dietary plant sterol esters on plasma and hepatic sterol concentration and aortic foam cell formation of cholesterol-fed hamsters*. Atherosclerosis, 2003. **169**(1): p. 41-50.
118. Ntanios, F.Y., P.J. Jones, and J.J. Frohlich, *Dietary sitostanol reduces plaque formation but not lecithin cholesterol acyl transferase activity in rabbits*. Atherosclerosis, 1998. **138**(1): p. 101-10.
119. Vaskonen, T., et al., *Supplementation of plant sterols and minerals benefits obese Zucker rats fed an atherogenic diet*. J Nutr, 2002. **132**(2): p. 231-7.
120. Moghadasian, M.H., et al., *"Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(1): p. 119-26.
121. Moghadasian, M.H., et al., *Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action*. Circulation, 1999. **99**(13): p. 1733-9.
122. Wilund, K.R., et al., *No association between plasma levels of plant sterols and atherosclerosis in mice and men*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2326-32.
123. Jansen, P.J., et al., *Dietary plant sterols accumulate in the brain*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(4): p. 445-53.
124. Tomoyori, H., et al., *Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. J Nutr, 2004. **134**(7): p. 1690-6.
125. Windler, E., et al., *Association of plasma phytosterol concentrations with incident coronary heart disease Data from the CORA study, a case-control study of coronary artery disease in women*. Atherosclerosis, 2008.
126. Pinedo, S., et al., *Plasma levels of plant sterols and the risk of coronary artery disease: the prospective EPIC-Norfolk Population Study*. J Lipid Res, 2007. **48**(1): p. 139-44.
127. Fassbender, K., et al., *Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk--the LASA study*. Atherosclerosis, 2008. **196**(1): p. 283-8.
128. Windler, E., et al., *Association of plasma phytosterol concentrations with incident coronary heart disease Data from the CORA study, a case-control study of coronary artery disease in women*. Atherosclerosis, 2009. **203**(1): p. 284-90.
129. Raitakari, O.T., P. Salo, and M. Ahotupa, *Carotid artery compliance in users of plant stanol ester margarine*. Eur J Clin Nutr, 2008. **62**(2): p. 218-24.
130. Kwiterovich, P.O., Jr., et al., *Response of obligate heterozygotes for phytosterolemia to a low-fat diet and to a plant sterol ester dietary challenge*. J Lipid Res, 2003. **44**(6): p. 1143-55.

131. Pan, X. and M.M. Hussain, *Gut triglyceride production*. Biochim Biophys Acta. **1821**(5): p. 727-35.
132. Glatz, J.F., J.J. Luiken, and A. Bonen, *Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease*. Physiol Rev. **90**(1): p. 367-417.
133. Stahl, A., *A current review of fatty acid transport proteins (SLC27)*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 722-7.
134. Su, X. and N.A. Abumrad, *Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(2): p. 72-7.
135. Black, D.D., *Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(3): p. G519-24.
136. Wu, X., et al., *Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10277-81.
137. Goldberg, I.J., *Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis*. J Lipid Res, 1996. **37**(4): p. 693-707.
138. Medh, J.D., et al., *Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro*. J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17073-80.
139. Medh, J.D., et al., *Lipoprotein lipase- and hepatic triglyceride lipase-promoted very low density lipoprotein degradation proceeds via an apolipoprotein E-dependent mechanism*. J Lipid Res, 2000. **41**(11): p. 1858-71.
140. Fernandez-Borja, M., et al., *Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway*. J Lipid Res, 1996. **37**(3): p. 464-81.
141. Dallinga-Thie, G.M., et al., *The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight*. Atherosclerosis. **211**(1): p. 1-8.
142. Mattijssen, F. and S. Kersten, *Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins*. Biochim Biophys Acta.
143. Wasan, K.M., et al., *Assessing plasma pharmacokinetics of cholesterol following oral coadministration with a novel vegetable stanol mixture to fasting rats*. J Pharm Sci, 2001. **90**(1): p. 23-8.
144. Wilund, K.R., et al., *High-level expression of ABCG5 and ABCG8 attenuates diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice*. J Lipid Res, 2004. **45**(8): p. 1429-36.
145. Kozarsky, K.F., et al., *Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 721-7.
146. Kozarsky, K.F., et al., *Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 414-7.
147. Naik, S.U., et al., *Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo*. Circulation, 2006. **113**(1): p. 90-7.
148. Lukic, T., et al., *Disodium ascorbyl phytostanyl phosphate reduces plasma cholesterol concentrations and atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice*. Metabolism, 2003. **52**(4): p. 425-31.

149. Wasan, K.M., et al., *Assessing the plasma pharmacokinetics, tissue distribution, excretion and effects on cholesterol pharmacokinetics of a novel hydrophilic compound, FM-VP4, following administration to rats*. J Pharm Pharm Sci, 2001. **4**(3): p. 207-16.
150. Vissers, M.N., et al., *Efficacy and safety of disodium ascorbyl phytostanol phosphates in men with moderate dyslipidemia*. Eur J Clin Pharmacol, 2008.
151. Yang, C., et al., *Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 813-22.
152. Xu, Z., K. Le, and M.H. Moghadasian, *Long-term phytosterol treatment alters gene expression in the liver of apo E-deficient mice*. J Nutr Biochem, 2007.
153. Chiang, J.Y., *Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors*. Endocr Rev, 2002. **23**(4): p. 443-63.
154. Chiang, J.Y., *Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms*. J Hepatol, 2004. **40**(3): p. 539-51.
155. Alrefai, W.A. and R.K. Gill, *Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications*. Pharm Res, 2007. **24**(10): p. 1803-23.
156. Teng, S. and M. Piquette-Miller, *Hepatoprotective role of PXR activation and MRP3 in cholic acid-induced cholestasis*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(3): p. 367-76.
157. Plosch, T., et al., *Sitosterolemia in ABC-transporter G5-deficient mice is aggravated on activation of the liver-X receptor*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 290-300.
158. Klett, E.L., et al., *A mouse model of sitosterolemia: absence of Abcg8/sterolin-2 results in failure to secrete biliary cholesterol*. BMC Med, 2004. **2**(1): p. 5.
159. Lichtenstein, L. and S. Kersten, *Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIIIBP1*. Biochim Biophys Acta. **1801**(4): p. 415-20.
160. Shimizugawa, T., et al., *ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33742-8.
161. Rodrigues, B., et al., *Regulation of lipoprotein lipase activity in cardiac myocytes from control and diabetic rat hearts by plasma lipids*. Can J Physiol Pharmacol, 1992. **70**(9): p. 1271-9.
162. Commerford, S.R., et al., *Dissection of the insulin-sensitizing effect of liver X receptor ligands*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(12): p. 3002-12.
163. Choe, S.S., et al., *Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1534-43.
164. Meng, Z.X., et al., *Activation of liver X receptors inhibits pancreatic islet beta cell proliferation through cell cycle arrest*. Diabetologia, 2009. **52**(1): p. 125-35.
165. Guerre-Millo, M., et al., *PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance*. Diabetes, 2001. **50**(12): p. 2809-14.
166. Zhou, J., et al., *Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 556-67.

167. Koonen, D.P., et al., *Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity*. Diabetes, 2007. **56**(12): p. 2863-71.
168. Zhou, J., et al., *A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway*. J Biol Chem, 2006. **281**(21): p. 15013-20.
169. Duez, H., et al., *Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(6): p. 1357-63.
170. Adeli, K. and G.F. Lewis, *Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states*. Curr Opin Lipidol, 2008. **19**(3): p. 221-8.
171. Lehrke, M., et al., *Diet-dependent cardiovascular lipid metabolism controlled by hepatic LXRalpha*. Cell Metab, 2005. **1**(5): p. 297-308.

**OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS
DURANTE LA ETAPA PREDOCTORAL**

- Heyn H*, **Méndez-González J***, Esteller M. *Epigenetic profiling joins personalized cancer medicine*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2013. **13**(5): p. 473-9.
- Sandoval J, Heyn H, **Méndez-González J**, Gomez A, Moran S, Baiget M, Melo M, Badell I, Nomdedéu JF, Esteller M. *Genome-wide DNA methylation profiling predicts relapse in childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2013. **160**(3): p. 406-9.
- Escolà-Gil JC, Llaverias G, Julve J, Jauhiainen M, **Méndez-González J**, Blanco-Vaca F. *The cholesterol content of Western diets plays a major role in the paradoxical increase in high-density lipoprotein cholesterol and upregulates the macrophage reverse cholesterol transport pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2493-9.
- **Méndez-González J**, Rodríguez-Millán E, Julve J, Blanco-Vaca F. *Vitamin treatments that lower homocysteine concentration: can they decrease cerebrovascular disease in primary prevention?* *Rev Neurol*, 2010. **50**(4): p. 235-44.
- Calpe-Berdiel L, **Méndez-González J**, Blanco-Vaca F, Carles Escolà-Gil J. *Increased plasma levels of plant sterols and atherosclerosis: a controversial issue*. *Curr Atheroscler Rep*, 2009. **11**(5): p. 391-8.
- **Jesús Méndez González**, Rosa Bonet Marqués, Jordi Ordóñez Llanos. *Lipid profile in ambulatory subjects using three point-of-care devices*. *Point of Care: The Journal of Near-patient and Technology*, 2009. **8**(3): p. 110-116.
- **Jesús Méndez González**, Marc Gallegos Marmolejo, Susana Martínez Figueroa et al. Assumpta Antonijuan-Parés, Silvia Martínez-Couselo, Josefina Mora-Brugués. *Application of a methylation panel for the diagnosis of lung cancer in bronchoaspirates*. *Laboratorio Clínico*, 2009. **2**(3): p. 107-114.
- **Méndez González J**, Martín Campos J, Ordóñez Llanos J. *The clinical laboratory and dyslipidemia*. *Endocrinol Nutr*, 2008. **55**(2): p. 89-96.