



EFICACIA EN LA REDUCCIÓN DEL COLESTEROL DE UNA FORMULACIÓN EN YOGUR DE *LACTOBACILLUS REUTERI* NCIMB 30242 MICROENCAPSULADO, ACTIVADO POR HIDROLASA DE SAL BILIAR, EN ADULTOS HIPERCOLESTEROLÉMICOS

Mitchell L. Jones^{1,2}, Christopher J. Martoni², Mathieu Parent² y Satya Prakash^{1*}

¹ Laboratorio de Investigación en Tecnología Biomédica y Terapia Celular, Departamento de Ingeniería Biomédica y Fisiología, Facultad de Medicina, Centro de Investigación de Células y Órganos Artificiales, Universidad McGill, 3775 University Street, Montreal, QC, Canadá H3A 2B4

² Micropharma Limited, 141 Avenue du President Kennedy, UQAM, Edificio de Ciencias Biológicas, 5to. piso, Oficina 5569, Montreal, QC, Canadá H2X 3Y7

(Presentado el 9 de mayo de 2011 –Revisión final recibida el 20 de julio de 2011 – Aceptado el 21 de julio de 2011 – Publicado en línea por primera vez el 9 de noviembre de 2011)

RESEÑA

Varios estudios han informado sobre la limitada o negativa reducción en los niveles séricos de colesterol en respuesta a formulaciones con probióticos. Recientemente, los probióticos han probado ser prometedores para el tratamiento de enfermedades metabólicas, gracias a una selección mejorada de las cepas y mejor tecnología de entrega. El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la eficacia para disminuir el colesterol de una formulación en yogur que contiene *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado activado por hidrolasa de sal biliar (BSH), tomada dos veces por día durante seis semanas por adultos hipercolesterolémicos. Un total de 114 sujetos completaron este estudio doble ciego, controlado con placebo, con distribución aleatoria, de brazos paralelos y multicéntrico. Este estudio de intervención incluyó dos semanas de reposo farmacéutico, dos semanas de preinclusión y seis semanas de tratamiento. Se distribuyó aleatoriamente a los sujetos para el consumo ya sea del yogur que contenía *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado o el yogur con placebo. Durante el período de intervención, los sujetos que consumieron yogur que contenía *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado alcanzaron reducciones significativas en el colesterol LDL (LDL-C) de 8,92% ($P = 0,016$), colesterol total (CT) de 4,81% ($P = 0,031$) y colesterol no HDL (HDL-C) de 6,01% ($P = 0,029$) comparadas con el placebo, y un cambio absoluto y significativo en apoB-100 de 20,19 mmol/l ($P = 0,049$). Las concentraciones séricas de TAG y HDL-C no cambiaron durante el curso del estudio. Los resultados presentes muestran que el consumo de yogur con *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado activado por BSH es eficaz y seguro para disminuir el LDL-C, CT, apoB-100 y HDL-no C en sujetos hipercolesterolémicos. La eficacia del yogur con *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado activado por BSH parece ser superior a la terapia tradicional con probióticos y similar a la de otros ingredientes que reducen el colesterol.

Palabras claves: Hipercolesterolemia: colesterol LDL: Hidrolasa de sal biliar: Probióticos microencapsulados

¹Abreviaciones: APA, algin-polilisina-algin; BSH, hidrolasa de sal biliar; EAD, enfermedad coronaria; GI, gastrointestinal; HDL-C, colesterol HDL; LDL-C, colesterol LDL; CT, colesterol total.

*Autor para correspondencia: Dr. S. Prakash, fax: + 1 514 398 7461, dirección de correo electrónico satya.prakash@mcgill.ca

La enfermedad coronaria (EAD) es la principal causa de muerte en los EE.UU., Europa, Canadá y en muchos otros países industrializados(1,2). De acuerdo con las tendencias actuales en los Estados Unidos, uno de cada dos hombres sanos de 40 años de edad y una de cada tres mujeres desarrollarán EAD a lo largo de su vida(3). Se espera que las ECV sean la principal causa de muerte en el mundo, debido al rápido aumento de sus tasas en los países en desarrollo y la creciente incidencia de obesidad y diabetes en el mundo industrializado(4,5). Los datos epidemiológicos revelan una relación log-lineal entre el aumento de la concentración del Colesterol LDL (LDL-C) y el riesgo relativo de EAD(6). Los ensayos clínicos han confirmado esta relación log-lineal, que muestra un patrón casi idéntico de asociación de riesgo(2).

Las recomendaciones nutricionales y el ejercicio son la primera línea de terapia para las personas con niveles elevados de LDL-C; sin embargo, al usar estos métodos solo se pueden lograr reducciones muy modestas en el LDL-C, incluso con los niveles más altos de cumplimiento(7). A los pacientes a quienes les resulta demasiado difícil hacer modificaciones a su estilo de vida, o aquellos que simplemente no pueden lograr una reducción de LDL-C suficiente, se les ofrece terapia con estatinas para reducir su perfil de riesgo(8-10). Desafortunadamente, menos de la mitad de los pacientes que califican para el tratamiento de modificación de lípidos lo están recibiendo, y solo una tercera parte de los pacientes tratados están logrando su LDL-C meta debido al costo asociado y a otras limitaciones(2). Por lo tanto, se está haciendo el esfuerzo de hacer productos alimenticios funcionales y desarrollar nutracéuticos que pueden ayudar a reducir el LDL-C y el riesgo de EAD.

Las bacterias probióticas están definidas por la OMS como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del anfitrión” y están siendo examinadas por su eficacia en la reducción de colesterol total (CT) y el LDL-C en los seres humanos. Un estudio cruzado, doble ciego, con distribución aleatoria y controlado con placebo, realizado por Schaafsma *et al.*(11), informó sobre una disminución del CT y LDL-C del 4,4 y 5,4%, respectivamente, después del consumo de yogur enriquecido con *Lactobacillus acidophilus* y fructo-oligosacáridos tres veces al día en treinta sujetos masculinos normolipidémicos. Un estudio cruzado, doble ciego, con distribución aleatoria, controlado con placebo, realizado por Bertolami *et al.*(12), informó sobre una disminución del CT y LDL-C del 5,3 y 6,15%, respectivamente, después del consumo de un producto de leche fermentada que contenía *Enterococcus faecium* por parte de treinta y dos sujetos con hipercolesterolemia leve a moderada. Un estudio doble ciego, con distribución aleatoria, controlado con placebo, realizado por Agerbaek *et al.*(13), informó sobre una disminución en el LDL-C del 10% después del consumo de un producto de leche fermentada que contenía *E. faecium* y dos cepas de *Streptococcus thermophilus*, en cincuenta y ocho hombres daneses no obesos, normocolesterolémicos. Un estudio paralelo, doble ciego, con distribución aleatoria, controlado con placebo, realizado por Agerholm-Larsen *et al.*(14) informó sobre una reducción significativa en el LDL-C, pero sólo después de ajustarlo por el peso corporal, después del consumo de un yogur fermentado con *E. faecium* y dos cepas de *S. thermophilus*. Si bien estos estudios han informado acerca de hallazgos positivos, varios estudios controlados con placebo han comunicado poco o ningún efecto después del consumo diario de diversos suplementos probióticos y alimentos que contienen bacterias probióticas(15-19).

Mediante un proceso riguroso se seleccionó al *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 por sus cualidades reductoras del colesterol y la seguridad general de la cepa. Se realizó una amplia caracterización *in vitro* de la cepa, utilizando una combinación de técnicas moleculares y metabólicas para respaldar su seguridad para uso en seres humanos(20). Una característica fenotípica de la cepa es su capacidad intrínseca para desconjugar los ácidos biliares debido a

la expresión de una enzima hidrolasa de sal biliar (BSH). La enzima BSH hidroliza el enlace amídico *N*-acil C-24 que une el ácido biliar libre con su conjugado de aminoácido glicina o taurina. Se ha planteado la hipótesis de que la desconjugación de ácidos biliares conduce a una reducción de colesterol sérico mediante el aumento de catabolismo de colesterol durante la formación de nuevos ácidos biliares, o a través de la reducción de la absorción del colesterol por parte de fuentes nutricionales y biliares en el lumen intestinal(21-23). Más recientemente, varios grupos han propuesto otros mecanismos por los que la bilis puede actuar para modular la absorción de colesterol y el metabolismo en los seres humanos(24-27).

Una amplia investigación sobre la supervivencia de los probióticos en el tracto gastrointestinal (GI) y en diversos productos alimenticios ha revelado reducción de la viabilidad celular bacteriana probiótica debido a la exposición a ácidos orgánicos, iones de hidrógeno, oxígeno y componentes antibacterianos(28,29). Por esta razón, el presente estudio se diseñó para evaluar el potencial del *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en algín-polilisina-algín (APA) para reducir el colesterol, que de esta forma permite la entrega de células altamente viables y metabólicamente activas al intestino delgado proximal. La microencapsulación proporciona una barrera física contra Ig y enzimas digestivas, amortigua contra un entorno gástrico ácido, concentra la bacteria dentro de la microcápsula y proporciona un microambiente que ayuda en la precipitación del desconjugado(30-32). De hecho, hemos demostrado que las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *L. reuteri* activadas por BSH y microencapsuladas en APA mantienen la viabilidad celular y la actividad de desconjugación de ácido biliar a través de un tránsito secuencial en un modelo GI simulado(33,34). Es más, en hámsteres BioF1B, se observó un efecto significativo de reducción de colesterol gracias al *Lactobacillus* microencapsulado en APA en comparación con el control tratado con placebo (vacío) microencapsulado en APA(35).

A pesar de las mejoras en la farmacoterapia para la hipercolesterolemia, existe aún una discrepancia entre los niveles de colesterol esperados y aquellos clínicamente logrados. Por lo tanto, se deben evaluar las modalidades de tratamiento adicionales, tales como los probióticos, en lo que respecta a su perfil de eficacia y seguridad en la reducción del colesterol. Por consiguiente, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar la eficacia clínica para reducir el colesterol y la seguridad del *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado, suplementado en una formulación de yogur, en un estudio multicéntrico, doble ciego, con distribución aleatoria y controlado con placebo.

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Sujetos

El presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki y todos los procedimientos que involucraron a seres humanos fueron aprobados por el comité central de ética (comité multicéntrico de ética) y el comité local de ética en la República Checa. Se obtuvo el consentimiento informado escrito de todos los sujetos. La prueba se registró en clinicaltrials.gov, USA, identificador NCT01185795.

Se reclutó a hombres y mujeres adultos hipercolesterolémicos, aunque sanos en los demás aspectos, en cinco diferentes centros en Praga, República Checa. Los criterios de inclusión para la distribución aleatoria fueron hombres y mujeres saludables en los demás aspectos, entre las edades de 18 y 74 años (inclusive); niveles de LDL-C >3,4 mmol/l con <15% de variación entre las sucesivas visitas de filtrado; niveles de TAG <4,0 mmol/l; BMI de 22-32 kg/m²; capacidad de comprender los procedimientos nutricionales; motivados, según el

juicio de los investigadores. Los criterios de exclusión para la distribución aleatoria fueron el uso de estatinas u otros medicamentos bajo prescripción para reducir el colesterol, en los últimos seis meses; uso de fitosteroles, ácidos grasos *n-3*, aceite de pescado, proteínas de soya, fibra de avena soluble, cáscara de semilla de cilio u otros suplementos reductores del colesterol en los últimos tres meses; antecedentes de uso crónico de alcohol (>2 bebidas/d); uso de anticuerpos, corticosteroides, andrógenos o fenitoína sistémicos; infarto al miocardio, bypass de la arteria coronaria u otros procedimientos quirúrgicos en los últimos seis meses; intolerancia a la lactosa o alergias a productos lácteos; historia de angina, insuficiencia cardíaca, enfermedad inflamatoria del colon, pancreatitis o diabetes; GI, enfermedad renal, pulmonar, hepática o biliar, o cáncer (evidencia de lesiones activas, quimioterapia o cirugía en el último año); uso crónico de probióticos o laxantes de fibra (>2 dosis/semana), o laxantes estimulantes; historia de trastornos alimenticios; ejercicios superiores a caminar 15 millas/semana, o un gasto de energía equivalente a 16.736 kJ/semana (4.000 kcal/semana); embarazo, lactancia o la intención de quedarse embarazada.

Preparación de yogures con tratamiento y con placebo

El *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 (Cardioviva™) se propagó en un fermentador FV8 y se concentró en cumplimiento con los procedimientos operativos estándar y procedimientos de control de calidad en Microbial Developments Limited (Malvern, Reino Unido). Inmediatamente después de cada lote de producción se confirmaron los análisis microbiológicos y la pureza del cultivo bacteriano. Las microcápsulas APA que contenían *L. reuteri* NCIMB 30242 se prepararon de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de y procedimientos de control de calidad en Brace GmbH (Karlstein, Alemania) a una viabilidad de 5×10^9 unidades formadoras de colonias/g de microcápsula. Los yogures con placebo y con tratamiento se produjeron y se prepararon en Milcom (Praga, República Checa) con las composiciones indicadas en el Cuadro 1. Los yogures con placebo se llenaron en frascos de plástico hasta un peso de 125 g. Los yogures del tratamiento contenían 115 g de yogur y 10 g de microcápsulas con *L. reuteri* NCIMB 30242 activado por BSH. Los yogures con placebo y con tratamiento se produjeron en cinco ocasiones durante el estudio, con números de lote del 1 al 5. La fecha de expiración de los yogures con placebo y con tratamiento se mantuvo en tres semanas después de la producción de los mismos. Para más detalles sobre los análisis de viabilidad celular y actividad de hidrolasa de sal biliar del *L. reuteri* NCIMB 30242 libre y microencapsulado en condiciones simuladas del tracto GI superior, véase el Apéndice A (que se encuentra el material complementario en línea; <http://journals.cambridge.org/bjn>).

Diseño del estudio

El diseño del estudio fue doble ciego, controlado con placebo, con distribución aleatoria, de brazos paralelos y multicéntrico, con una duración total de 10 semanas. Esto incluyó un período de reposo farmacéutico de dos semanas, en el que se siguieron las recomendaciones nutricionales generales (Guía de Alimentos de Canadá, Salud Canadá); seguido de un período de preinclusión de dos semanas, en el que se siguieron las recomendaciones nutricionales generales y los sujetos consumieron los yogures con placebo dos veces al día en el desayuno y en la cena; y un período de seis semanas de tratamiento, en el cual se siguieron las recomendaciones generales y los sujetos consumieron yogures con placebo o tratamiento dos veces al día en el desayuno y en la cena. Los sujetos se reunieron con el equipo de investigación en cinco diferentes puntos en el tiempo: Visita V0 (semana -4), V1 (semana -2), V2 (semana 0, distribución aleatoria y línea de base del tratamiento), V3

(semana 3, punto medio del tratamiento) y V4 (semana 6, punto final del tratamiento). La ingesta nutricional, incluyendo la información sobre la energía total, porcentaje de grasa total, porcentaje total de carbohidratos y porcentaje total de proteína, para los sujetos que consumieron yogures con placebo y yogures con tratamiento, se midió en la línea de base (semana 0) y al final (semana 6) del período de tratamiento.

Cuadro 1. Composición de yogures con placebo y con *L. reuteri*

	Yogur con placebo (125 g)	Yogur con <i>L. reuteri</i> (125 g)
Proteína (g)	7,9	7,2
Carbohidratos (g)	11,5	10,6
Lípidos (g)	1,3	1,2
Bacterias de yogur (CFU)*	1,25 x 10 ⁹	1,15 x 10 ⁹
Microcápsulas de <i>L. reuteri</i> (g)	0	10
<i>L. reuteri</i> microencapsulado (CFU)*	0	5,0 x 10 ¹⁰
<i>L. reuteri</i> microencapsulado (CFU)†	0	1,4 x 10 ⁹

CFU, unidad formadora de colonia.

* Medido después de la producción.

† Medido después del embarque internacional a 4°C.

Análisis de las muestras

En cada visita se recogió sangre para la evaluación del perfil lipídico. Las muestras de suero se analizaron enzimáticamente con respecto a LDL-C (variable primaria de eficacia), CT, Colesterol HDL (HDL-C), TAG y apoB-100. Los cambios absolutos en los parámetros lipídicos para cada sujeto en el punto medio y el punto final se calcularon restando el valor de línea de base (semana 0) del valor del punto medio (semana 3) o del punto final (semana 6), respectivamente. El cambio relativo en los parámetros lipídicos para cada sujeto en el punto medio y en el punto final se calculó dividiendo el cambio absoluto en el punto medio (semana 3) o en el punto final (semana 6) para los valores de la línea de base (semana 0) y multiplicándolo por 100%. En las visitas V1 (semana 2) y V4 (semana 6, punto final del tratamiento) se recolectó la sangre para la evaluación del perfil de seguridad. La bioquímica sérica se analizó con respecto a urea, creatinina, bilirrubina, aspartato aminotransferasa, alanina transaminasa, transpeptidasa, α -glutamyl, fosfatasa alcalina, glucosa, Ca²⁺, PO³⁻⁴, K⁺, Na⁺, Cl⁻, HCO₃⁻ y lipasa. El análisis del suero se realizó en un analizador de bioquímica Dimension RxL utilizando kits de reactivos apropiados (Dade Behring, Siemens, Munich, Alemania). Se analizó la sangre entera (hematología) con respecto a Hb, hematocrito, eritrocitos, leucocitos y plaquetas, utilizando un analizador de hematología Celltac F (Nihon Kohden, Tokio, Japón).

Las muestras fecales se recolectaron 3 días antes de las visitas V1 (semana 2) y V4 (punto final del tratamiento). La concentración de ácidos biliares fecales desconjugados se analizó en 10–15 µg de muestras de heces liofilizadas mediante GLC, tal como lo describe Batta *et al.* (36).

Métodos estadísticos



El número de sujetos se calculó teniendo en cuenta una diferencia crítica en LDL-C de 0,44 (DE 0,8) mmol/l entre los grupos con tratamiento y los grupos con placebo con $\alpha = 5\%$ y una potencia de 80%. Dadas estas restricciones, se requirieron los cincuenta y tres sujetos evaluables por grupo o 106 en total. Debido a la posibilidad de una retirada prematura, se planificó incluir a un total de 120 sujetos para la distribución aleatoria.

La hipótesis nula primaria fue que el tratamiento no era más efectivo que el placebo en la reducción de las concentraciones séricas de LDL-C. Todos los análisis se realizaron de acuerdo con el principio de intención de tratar. Las variables continuas se presentan como medias con errores estándar de la media. Se utilizó la prueba Shapiro-Wilk para determinar si las variables se distribuyeron de forma paramétrica. Las diferencias entre los grupos con respecto a las características de línea de base se analizaron mediante un ANOVA de una vía, para las variables continuas, o una prueba χ^2 , para las variables categóricas. Las diferencias en la ingesta nutricional de macronutrientes y en los ácidos biliares fecales desconjugados entre y dentro de los grupos se analizaron mediante un ANOVA de modelo mixto. Para las variables de lípidos, se utilizó la regresión lineal múltiple para identificar las variables que sistemáticamente contribuyeron a cualquier cambio con respecto a la línea de base. Para probar las diferencias entre grupos, se realizaron ANCOVA con el fin de ajustar por cualquier contribución sistemática a los cambios desde la línea de base, utilizando covariables identificadas por regresión lineal múltiple. Los parámetros lipídicos que no aceptan descripción paramétrica se analizaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis. Los análisis de datos se realizaron utilizando el paquete de software SPSS versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

Se completaron los modelos de selección hacia adelante, escalonada y hacia atrás utilizando el paquete de software SAS versión 9.2 (Instituto SAS, Cary, NC, EE.UU.).

RESULTADOS

Parámetros del estudio

Un total de 120 sujetos se distribuyeron aleatoriamente y 114 completaron el estudio como parte de la población con intención de tratar. Un sujeto, distribuido aleatoriamente al grupo con placebo, abandonó el estudio por razones personales y se excluyó a otros cinco, dos en el grupo con placebo y tres en grupo con tratamiento, por no cumplir con los criterios del estudio. En total, 109 sujetos completaron el estudio como parte de la población por protocolo. Todos los sujetos se consideraron hipercolesterolémicos y en riesgo límite, alto o muy alto de desarrollar enfermedad cardiaca en la línea de base, según las directrices del Programa Nacional de Educación en Colesterol^(1,2).

Características de los sujetos en la línea de base

Se evaluaron las características de la línea de base de los 114 sujetos de la población con intención de tratar fueron evaluadas y se presentan en el Cuadro 2. Los dos grupos producidos por la distribución aleatoria fueron homogéneos en cuanto a las características demográficas y clínicas. Los sujetos de estudio masculinos y femeninos se distribuyeron por igual, siendo 34:66% hombres-mujeres en el grupo con placebo y 38:62% hombres-mujeres en el grupo con tratamiento. No hubo diferencias significativas entre los grupos en la línea

base del estudio en cuanto a edad, peso corporal, BMI, presión sanguínea sistólica, diastólica y media, pulso y temperatura. Los sujetos se seleccionaron sobre la base de los valores séricos en ayunas de LDL-C (>3,4 mmol/l) y TAG (<4,0mmol/l). La concentración sérica media de LDL-C en la línea base no fue significativamente diferente entre los grupos con tratamiento y con placebo (4,23 (SEM 0,06) mmol/l en comparación con 4,37 (SEM 0,08) mmol/l, respectivamente; P=0,15). Adicionalmente, no hubo diferencias significativas entre los grupos con placebo y con tratamiento CT, HDL-C, TAG, apoB-100, LDL-C:HDL-C y HDL-no C. Las ingesta de estatinas y otras formulaciones reductoras de lípidos entre los sujetos fue del 0% en los seis meses antes de la fecha de inicio del estudio.

Cuadro 2. Características demográficas y clínicas en la línea de base (Valores medios con sus errores estándar)

	Yogur con placebo (n 58)		Yogur con <i>L. reuteri</i> (n 56)		p*
	Media	SEM	Media	SEM	
Caucásico (%)	100		100		1,00
Masculino (%)	34		38		0,74
Edad (años)	48,79	1,77	51,89	1,81	0,22
Peso corporal (kg)	76,02	1,54	76,05	1,49	0,99
BMI (kg/m ²)	26,09	0,36	26,04	0,39	0,93
BP sistólica (mmHg)	133,29	0,99	134,66	1,52	0,45
BP diastólica (mmHg)	79,97	0,76	81,48	0,81	0,17
BP Media (mmHg)	97,74	0,65	99,21	0,89	0,19
Pulso (bpm)	76,34	0,65	76,45	0,68	0,92
Temperatura (°C)	36,38	0,03	36,44	0,03	0,15
Ingesta de estatina (%)		0	0		1,00
CT (mmol/l)	6,65	0,09	6,68	0,12	0,80
LDL-C (mmol/l)	4,23	0,06	4,37	0,08	0,15
HDL-C (mmol/l)	1,48	0,05	1,42	0,05	0,44
Índice LDL-C:HDL-C	3,06	0,12	3,24	0,11	0,26
TAG (mmol/l)	1,60	0,10	1,62	0,10	0,90
Non-HDL-C (mmol/l)	5,17	0,08	5,26	0,10	0,48
ApoB-100 (mmol/l)	1,13	0,02	1,17	0,02	0,20

BP, presión sanguínea; bpm, pulsos por min; CT, colesterol total; LDL-C, colesterol LDL; HDL-C, colesterol HDL.

* ANOVA de una vía para variables continuas o prueba χ^2 para variables categóricas.

Evaluación nutricional

En la línea de base (semana 0) y al final del tratamiento (semana 6) se realizó una evaluación nutricional de la energía total, porcentaje total de los lípidos, porcentaje total de carbohidratos y porcentaje total de proteínas. No hubo diferencias significativas entre los grupos con placebo y con tratamiento en la línea base o al final, y no hubo diferencia entre los grupos durante el período de tratamiento (Cuadro 3).

Cuadro 3. Energía total nutricional e ingesta de macronutrientes

(Valores medios con sus errores estándar)

	Yogur con placebo (n 54)		Yogur con <i>L. reuteri</i> (n 53)		p*
	Media	SEM	Media	SEM	
Energía (total kJ)					
Semana 0	7755,20	285,66	7780,50	238,25	0,77
Semana 6	7870,36	231,38	8024,31	271,49	
Lípidos (%)					
Semana 0	34,89	0,68	36,15	0,74	0,51
Semana 6	36,08	0,73	35,86	0,82	
Proteínas (%)					
Semana 0	17,91	0,39	17,72	0,35	0,83
Semana 6	17,50	0,29	17,53	0,40	
Carbohidratos (%)					
Semana 0	47,21	0,78	46,15	0,88	0,64
Semana 6	46,43	0,72	46,63	0,84	

* ANOVA de modelo mixto.

Perfil de lípidos séricos

En el Cuadro 4 se resumen los cambios relativos medios de LDL-C, CT, HDL-C, TAG, apoB100, LDL-C: HDL-C y HDL-no C desde la línea de base hasta la semana 3 y semana 6. El efecto de reducción de LDL-C que se observó en el punto final en la semana 6 del período de intervención fue de -0,37 (SEM 0,11) mmol/l con un cambio promedio significativo sobre el placebo de 8,92% ($P = 0,016$). Durante el período de tratamiento de seis semanas, se observaron otros efectos reductores de lípidos para CT de -0,77 (SEM 0,13) mmol/l, apoB-100 de -0,19 (SEM 0,03) mmol/l y HDL-no C de -0,68 (SEM 1,11) mmol/l y cambios medios significativos sobre el placebo para CT de 4,81% ($P = 0,031$) y HDL-no C de 6,01% ($P = 0,029$). Las concentraciones séricas de TAG y HDL-C se mantuvieron sin cambios en el transcurso del estudio. Se utilizaron tres modelos de regresión multivariable para demostrar que el tratamiento fue el principal indicador de la reducción de LDL-C: un enfoque de selección escalonada mostró que el tratamiento se asoció con un cambio de -0,44 mmol/l en LDL-C ($P = 0,0008$); un enfoque de selección hacia adelante mostró que el tratamiento estaba asociado con un cambio de -0,39 mmol/l en LDL-C ($P = 0,0027$); y un enfoque de selección hacia atrás mostro que el tratamiento estaba asociado con un cambio de -0,40 mmol/l en LDL-C ($P = 0,0019$). Finalmente, una comparación directa de los cambios individuales en el punto final de LDL-C comparados con la línea de base, indica claramente el efecto reductor de LDL-C a lo largo de todo el espectro de las respuestas (Fig. 1).

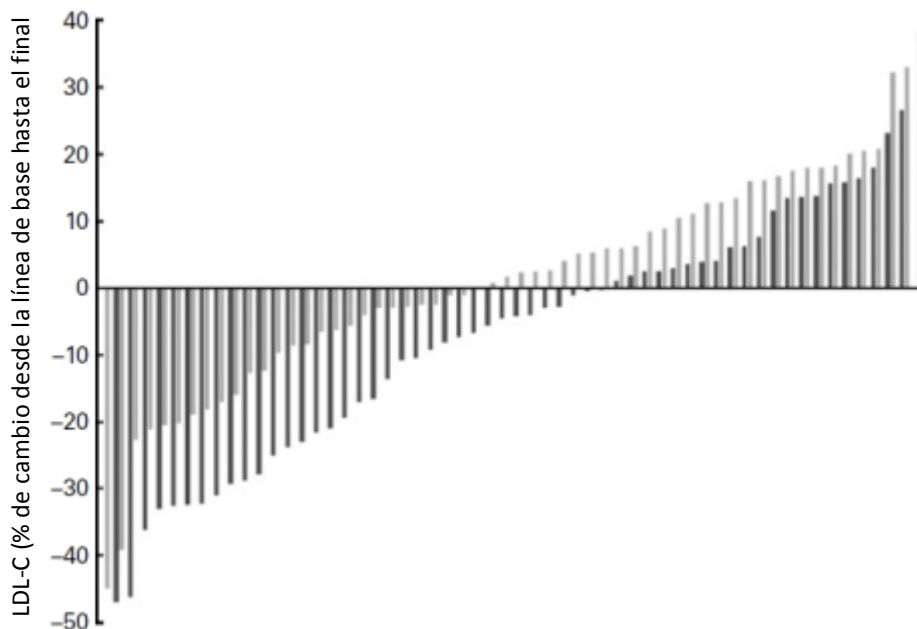


Fig. 1. Respuestas del LDL-colesterol (LDL-C) que muestra por sujeto el porcentaje de cambio desde la línea de base hasta el final del período de tratamiento para los grupos que consumieron yogur con placebo (n 58, □) y yogur con *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 (n 56, ■) en la población con intención de tratar.

Evaluación fecal

Se analizaron las muestras fecales recolectadas antes del tratamiento (semana -2) y al final del estudio (semana 6) con respecto a concentración de ácido biliar fecal desconjugado. Se consideró que un total de cuarenta muestras recolectadas eran adecuadas para el análisis; veintiuno en el grupo con tratamiento y diecinueve en el grupo con placebo. Se encontró que la concentración de ácido biliar fecal desconjugado media no era significativamente diferente entre los grupos, antes del tratamiento y al final del estudio, o dentro de los grupos durante el período de tratamiento (Cuadro 5).

Parámetros de seguridad

Los marcadores bioquímicos de seguridad se midieron en la línea de base y al final, y se analizaron sus cambios significativos. Los marcadores hematológicos se evaluaron mediante conteo total de células sanguíneas, plaquetas, hematocrito y Hb; la función renal se determinó mediante la urea y creatinina; la función del hígado se determinó mediante la alanina transaminasa, aspartato aminotransferasa, α -glutamyl transpeptidasa, fosfatasa alcalina y bilirrubina; la función pancreática se determinó mediante la lipasa; la función endocrina se determinó mediante la glucosa, Ca^{2+} and PO_4^{3-} ; y el equilibrio de electrolitos se determinó mediante K^+ , Na^+ , Cl^- y HCO_3^- . Los resultados muestran que los grupos con placebo y con tratamiento fueron comparables para los marcadores biológicos de seguridad en el punto final del estudio, y se determinó que el número de sujetos con valores clínicamente significativos, fuera del rango normal, era de seis sujetos en el grupo con placebo y un sujeto en el grupo con tratamiento. Ningún cambio en los marcadores bioquímicos de seguridad se consideró ser el resultado del tratamiento (datos no mostrados).

Cuadro 5. Ácidos biliares fecales desconjugados
(Valores medios con sus errores estándar)

	Yogur con placebo (n 19)		Yogur con <i>L. reuteri</i> (n 21)		p*
	Media	SEM	Media	SEM	
Ácidos biliares desconjugados ($\mu\text{mol/g}$)					
Semana 0	3,08	0,56	3,33	0,48	0,94
Semana 6	3,26	0,54	2,85	0,42	

* ANOVA de modelo mixto

DISCUSIÓN

Este estudio doble ciego, con distribución aleatoria, controlado con placebo, de brazos paralelos y multicéntrico demuestra el efecto reductor de colesterol de un novedoso probiótico microencapsulado activado por BSH durante 6 semanas. Los sujetos que consumieron yogures que contenían *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado lograron reducciones significativas, en comparación con el placebo, en los valores de LDL-C por 8,92%, CT por 4,81% y HDL-no C de 6,01%, y un cambio significativo y absoluto en los valores de apoB-100 por -0,19 (SEM 0,03) mmol/l durante el período de intervención. Las concentraciones séricas de TAG y HDL-C se mantuvieron sin cambios en el transcurso del estudio. Así mismo, se utilizaron tres modelos de regresión multivariable para demostrar que el tratamiento fue el indicador primario de la reducción de LDL-C. Finalmente, una comparación directa de las respuestas individuales de LDL-C en el punto final del estudio indica que, a pesar de que se observó que una proporción de sujetos experimentaron valores elevados de LDL-C, hubo un efecto reductor de LDL-C en todo el espectro de respuestas de LDL-C (Fig. 1).

Al examinar la tendencia a reducir el colesterol en el transcurso del estudio, es evidente que el tiempo requerido para lograr el efecto terapéutico máximo puede ser más largo que otras terapias para reducir el colesterol (8,37-41). Aunque solo se recolectaron datos en la línea de base y semanas 3 y 6, se observó una tendencia de reducción de colesterol en el transcurso del estudio, lo que indica que podría ser que no se alcanzó máximo efecto terapéutico en el punto final del estudio. Por lo tanto, los estudios futuros deberán evaluar la eficacia de reducción del colesterol del *L. reuteri* NCIMB 30242 en puntos posteriores. Además, se excluyeron del estudio los sujetos que estaban bajo monoterapia con estatinas, con el fin de determinar con precisión la eficacia del probiótico microencapsulado por sí solo en la reducción de lípidos. Sin embargo, existe evidencia sobre la efectividad mejorada de los agentes nutricionales reductores del colesterol en sujetos que tienen una alta absorción de colesterol y una baja biosíntesis(42). Así, se debería explorar el potencial para una mayor reducción de colesterol en sujetos con biosíntesis de colesterol reducida.

Un posible mecanismo de acción para reducir el colesterol con probióticos activados por BSH es que la actividad intraluminal BSH incrementada puede dar lugar al incremento de la excreción de ácidos biliares desconjugados y la posterior eliminación del colesterol sérico por parte del hígado, reemplazando los ácidos biliares perdidos desde la recirculación enterohepática (la síntesis *de novo* de ácidos biliares por el catabolismo del colesterol debido a 7 α -hidrolasa)(22,43). La conversión del colesterol a ácidos biliares en el hígado y su posterior

secreción y excreción fecal proporciona la ruta principal para la eliminación del exceso de colesterol. Previamente hemos demostrado que las cepas del *L. plantarum* y *L. reuteri* microencapsuladas en APA y activadas por BSH mantienen la viabilidad celular y la actividad desconjugante de los ácidos biliares en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal superior (33,34). En el presente estudio, a pesar de las reducciones significativas en el LDL-C sérico, en las muestras recolectadas no se vio cambio significativo alguno en la excreción fecal de ácidos biliares desconjugados. Una reciente prueba clínica con distribución aleatoria, controlada con placebo, realizada por Ooi *et al.* (44) mostró una reducción significativa en los niveles plásmicos de CT y LDL-C como resultado de la alimentación simbiótico de cápsulas que contenían *L. acidophilus* CHO-220 activado por BSH e inulina. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ácidos biliares primarios desconjugados plásmicos o ácidos biliares secundarios desconjugados plásmicos durante las 12 semanas del período de tratamiento. Los autores postularon que la actividad BSH del *L. acidophilus* CHO-220 que se muestra *in vitro*, no se exhibió en sujetos humanos o era mínima como para producir un efecto observable.

Estudios previos(43,45,46) realizados en animales han demostrado efectos hipocolesterolémicos de los probióticos activados por BSH excreción de ácidos biliares incrementada. En un modelo porcino, se demostró que la cepa *B. animalis* DN-173010, elegida de entre treinta y ocho cepas por su capacidad de desconjugación de ácidos biliares, aumentó los ácidos biliares séricos desconjugados después de una y dos semanas de tratamiento(47). Se ha sugerido que el aumento de la actividad de desconjugación de ácidos biliares en el intestino delgado podría hacer que los ácidos biliares primarios desconjugados sean más susceptibles a la actividad de deshidroxilación 7α por parte de la microflora residente, que potencialmente podría conducir a un aumento de los ácidos biliares secundarios. Sin embargo, no se observó un aumento en la formación de ácidos biliares secundarios en la vena porta de los cerdos(47) o en las heces de sujetos humanos sanos(48) luego de la intervención con *B. animalis* DN-173010. En la literatura no se ha informado sobre evidencia para la expresión de 7α -deshidroxilasa en bacterias de ácido láctico, y es un genotipo que parece estar limitado a las especies *Enterobacter* y *Clostridium* al interior de la microflora intestinal (49). También se ha informado de que la absorción activa y pasiva de los ácidos biliares se complementa entre sí y lleva a cabo la casi completa absorción de ácido biliar, ya sea conjugado o desconjugado, del contenido del intestino delgado de roedores(50). Por lo tanto, una hipótesis establece que la desconjugación de ácidos biliares proximales al íleon terminal no altera la circulación enterohepática de los ácidos biliares, sino más bien altera el acervo de ácidos biliares en circulación. Consecuentemente, estudios futuros deberán evaluar el perfil completo de ácidos biliares en circulación, así como en las heces.

Un estudio realizado por Jeun *et al.*(45) demostró un aumento en los cambios de la expresión génica junto con el incremento de la excreción de ácidos biliares, a causa de la alimentación de *L. plantarum* a los ratones. Se postularon varios mecanismos para explicar el efecto hipocolesterolémico *in vivo*, incluyendo la inhibición de la síntesis hepática de colesterol, la inducción de la captación celular de LDL-C, la disminución de la absorción de colesterol de la dieta y la elevación de la excreción de ácidos biliares. Tomando en cuenta el resultado en el presente estudio, se consideraron otros mecanismos de acción, incluyendo la subregulación del receptor farnesoide X (FXR, por sus siglas en inglés) y el consecuente efecto de subregulación del receptor de hígado X (LXR, por sus siglas en inglés) y los ácidos biliares desconjugados en el casete de unión de trifosfato de adenosina G5/ heterodímero eflujo de colesterol G8 en los hepatocitos y enterocitos (Fig. 2). Dicho mecanismo de acción resultaría en un aumento significativo en la excreción fecal total de esteroides neutros; por lo tanto, los estudios futuros también deberán evaluar la excreción de esteroides neutros en las heces.

En resumen, varios estudios clínicos con probióticos han demostrado cierta eficacia para reducir el colesterol(11-14), mientras que otros han mostrado resultados negativos(15-19) que se pueden haber debido a una mala selección de cepas, método de administración o diseño clínico. En la mayoría de casos, la actividad BSH no se menciona como una característica de la cepa administrada. Anteriormente, se demostró que una cepa activada por BSH disminuye significativamente el CT y LDL-C en los seres humanos cuando se toma como simbiótico(44). Para el presente estudio, se seleccionó al *L. reuteri* NCIMB 30242 utilizando un riguroso proceso de filtrado basado en la reducción del colesterol y la seguridad de la cepa, incluyendo actividad BSH; y se administró usando una tecnología de microencapsulación gastroprotectora. Los resultados presentes confirman la eficacia y seguridad de la formulación en la reducción de LDL-C, CT, apoB100 y HDL-no C en adultos hipocolesterolémicos durante 6 semanas. El efecto hipocolesterolémico del *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en yogur se compara favorablemente con otros ingredientes alimenticios que reducen el colesterol(38).

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a J. Lahovský, A. Vajikova, N. Barannikova, K. Beber, L. Coupal y S. Grover por sus contribuciones al estudio. Los autores también agradecen a todos los voluntarios que participaron en el estudio. M.L.J., S.P. y C.J.M. diseñaron el estudio y prepararon el manuscrito; J. Lahovský, A. Vajikova y N. Barannikova condujeron la investigación; K. Beber, M.P., L. Coupal y S. Grover realizaron el análisis estadístico. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final. Este trabajo tuvo el apoyo de Micropharma Limited. M.L.J., C.J.M., M.P. y S.P. son parte de Micropharma Limited e informan sobre un conflicto de intereses. Todos los otros contribuyentes no tienen conflictos de interés que informar.

REFERENCIAS

1. Panel de Expertos en Detección, Evaluación y Tratamiento del Colesterol Alto en la Sangre de Adultos (Panel de Tratamiento de Adultos III) del Programa Nacional de Educación sobre Colesterol (NCEP) (2002). Informe final del Tercer informe del Panel de Expertos en Detección, Evaluación y Tratamiento del Colesterol Alto en la Sangre de Adultos (Panel de Tratamiento de Adultos III) del Programa Nacional de Educación sobre Colesterol (NCEP). *Circulación* **106**, 3143-3421.
2. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CNB, *et al.* (2004) Implicaciones de pruebas clínicas recientes en los Lineamientos del Panel para el Tratamiento de Adultos III del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol. *Circulación* **110**, 227-239.
3. Durrington P (2003) Dislipidemia. *Lancet* **362**, 717-731.
4. Murray CJ & López AD (1997) Mortalidad global, discapacidad y la contribución de los factores de riesgo: Estudio Global sobre la Carga Global de Enfermedades. *Lancet* **349**, 1436-1442.
5. Organización Mundial de la Salud (2002) *Informe Mundial de la Salud 2002 - Reducir los Riesgos y Promover una Vida Sana*. Ginebra: OMS.
6. Jacobson TA (2000) "Cuanto menor sea, mejor" en la terapia de hipercolesterolemia: ¿una guía clínica confiable? *Ana Med Intern* **133**, 549-554.
7. Talbert RL (2002) Nuevas opciones terapéuticas en el Panel para el Tratamiento de Adultos III del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol. *R Am Cuid Admin* **8**, S301-S307.
8. Stancu C & Sima A (2001) Las estatinas: mecanismo de acción y efectos. *R Med Mol Celu* **5**, 378-387.
9. Oliver MF, Defeyter PJ, Lubsen J, *et al.* (1994) Efecto de la simvastatina en el ateroma coronario - el Estudio Multicéntrico Contra el Ateroma (Maas). *Lancet* **344**, 633-638.
10. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, *et al.* (1994) Prueba con distribución aleatoria sobre reducción del colesterol en 4.444 pacientes con enfermedad coronaria - Estudio Escandinavo de Supervivencia a la Simvastatina (4S). *Lancet* **344**, 1383-1389.
11. Schaafsma G, Meuling WJ, van Dokkum W, *et al.* (1998) Efectos de un producto lácteo, fermentado por *Lactobacillus acidophilus* con fructo-oligosacáridos añadidos, en los lípidos sanguíneos en voluntarios varones. *R Eur Nutr Clín* **52**, 436-440.
12. Bertolami MC, Faludi AA & Batlouni M (1999) Evaluación de los efectos de un nuevo producto de leche fermentada (Gaio) en la hipercolesterolemia primaria. *R Eur Nutr Clín* **53**, 97-101.
13. Agerbaek M, Gerdes LU & Richelsen B (1995) Efecto hipocolesterolémico de un nuevo producto de leche fermentada en hombres sanos de mediana edad. *R Eur Nutr Clín* **49**, 346-352.

14. Agerholm-Larsen L, Raben A & Haulrik N (2000) Efecto de la ingesta durante 8 semanas de productos lácteos probióticos en los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares. *R Eur Nutr Clín* **54**, 288–297.
15. Andersson H, Bosaeus I, Ellegard L, *et al.* (1995) Efectos de la leche baja en grasa y la leche baja en grasa fermentada en la absorción y excreción del colesterol en sujetos con ileostomía. *R Eur Nutr Clín* **49**, 274–281.
16. de Roos NM, Schouten G & Katan MB (1999) El yogur enriquecido con *Lactobacillus acidophilus* no disminuye los lípidos de la sangre en hombres y mujeres sanos con niveles de colesterol sérico de límite a normales. *R Eur Nutr Clín* **53**, 277–280.
17. Greany KA, Bonorden MJ, Hamilton-Reeves JM, *et al.* (2008) Las capsulas probióticas no reducen los lípidos plásmicos en mujeres y hombres jóvenes. *R Eur Nutr Clín* **62**, 232–237.
18. Lewis SJ & Burmeister S (2005) Estudio doble ciego controlado con placebo sobre los efectos del *Lactobacillus acidophilus* en los lípidos plásmicos. *R Eur Nutr Clín* **59**, 776–780.
19. Lin SY, Ayres JW, Winkler L Jr, *et al.* (1989) Efectos del *Lactobacillus* en el colesterol: resultados in vitro e in vivo. *R Cie Láctea* **72**, 2885–2899.
20. Branton WB, Jones ML, Tomaro-Duchesneau C, *et al.* (2011) Caracterización in vitro y seguridad de la cepa probiótica *Lactobacillus reuteri* cardioviva NCIMB 30242. *R Int Probióticos Prebióticos* **6**, 1–12.
21. Taranto MP, Sesma F, Polgado APD, *et al.* (1997) La hidrolasa de las sales biliares desempeña un papel clave en la eliminación de colesterol por parte del *Lactobacillus reuteri*. *Cart Biotecnol* **19**, 845–847.
22. De Smet I, Van Hoorde L, De Saeyer M, *et al.* (1994) Estudio in vitro de la actividad de la hidrolasa de sal biliar (BSH) de 80 cepas de *Lactobacillus plantarum* isogénicas a BSH y la estimación de la reducción del colesterol a través de la actividad mejorada de la BSH. *Ecol Microb Salud Enf* **7**, 315–329.
23. De Smet I, Van Hoorde L, Vande WM, *et al.* (1995) Importancia de las actividades hidrolíticas de las sales biliares de los lactobacilos. *R Bacteriol Apli* **79**, 292–301.
24. Davidson MH (2008) Interrupción de la manipulación de ácidos biliares y el control de los lípidos y la glucosa: efectos del colesvelam en los niveles de glucosa. *R Lipid Clín* **2**, S29–S33.
25. Johnson BJ, Lee JY, Pickert A, *et al.* (2010) Los ácidos biliares estimulan la hidrólisis de ATP en el transportador de colesterol purificado ABCG5/G8. *Bioquímica* **49**, 3403–3411.
26. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, *et al.* (2008) Enfoque en la señalización de los ácidos biliares para las enfermedades metabólicas. *Rev Nac Discub Medi* **7**, 678–693.
27. Watanabe M, Houten SM, Matakaki C, *et al.* (2006) Los ácidos biliares inducen el gasto de energía mediante la promoción de la activación intracelular de la hormona tiroidea. *Naturaleza* **439**, 484–489.
28. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, *et al.* (1998) Descripción general de la flora intestinal y los probióticos. *R Int Microbiol Alimen* **41**, 85–101.
29. Huang Y & Adams MC (2004) Evaluación in vitro de la tolerancia gastrointestinal superior de potenciales propionibacterias de probióticos lácteos. *R Int Microbiol Alimen* **91**, 253–260.
30. Chang TMS (2005) Aplicaciones terapéuticas de células artificiales poliméricas. *Ana Natura Discub Medic* **4**, 221–235.
31. Gugerli R, Cantana E, Heinzen C, *et al.* (2002) Estudio cuantitativo de la producción y las propiedades de microcapsulas de alginato/polilisina. *R Microencapsul* **19**, 571–590.
32. Jones ML, Chen HM, Wei OY, *et al.* (2004) *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) transgénico microencapsulado para desconjugación de ácidos biliares y su implicación en la reducción del colesterol. *R Biotecnol Biomed* **1**, 61–69.
33. Martoni C, Bhatena J, Jones ML, *et al.* (2007) Investigación de *Lactobacillus* microencapsulados activados por BSH en el tracto GI humano simulado. *R Biotecnol Biomed* **2007**, 13684.
34. Martoni C, Bhatena J, Urbanska AM, *et al.* (2008) *Lactobacillus reuteri* microencapsulado productor de hidrolasa de sal biliar para la administración oral dirigida al tracto gastrointestinal. *Biotecnol Microbiol Apli* **81**, 225–233.
35. Bhatena J, Martoni C, Kulamarva A, *et al.* (2009) La administración oral de la formulación de probióticos vivos microencapsulados disminuye los lípidos séricos en hámsteres hipercolesterolémicos. *R Alim Med* **12**, 310–319.
36. Batta AK, Salen G, Batta P, *et al.* (2002) Cuantificación simultánea de ácidos grasos, esteroides y ácidos biliares en las heces humanas mediante cromatografía capilar de gas-líquido. *R Cromatogr B Tecnol Analit Biomed Vida Cie* **775**, 153–161.
37. Andrews TC, Ballantyne CM, Hsia JA, *et al.* (2001) Cumplimiento y mantenimiento de las metas del el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol con respecto a colesterol de lipoproteína de baja densidad con cinco estatinas. *R Am Med* **111**, 185–191.
38. Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, *et al.* (2009) Relación de la respuesta a dosis continua del efecto reductor de colesterol LDL de la ingesta de fitosterol. *R Nutr* **139**, 271–284.
39. Patel J, Sheehan V & Gurk-Turner C (2003) Ezetimiba (Zetia): un nuevo tipo de agente reductor de lípidos. *Proc (Cent Med Univ Bayl)* **16**, 354–358.
40. Hou R & Goldberg AC (2009) Reducción del colesterol de lipoproteína de baja densidad: estatinas, ezetimiba, secuestradores de ácidos biliares y combinaciones: eficacia comparativa y seguridad. *Metab Endocrinol Clín Am Norte* **38**, 79–97.
41. Gagne C, Gaudet D & Bruckert E (2002) Eficacia y seguridad de ezetimiba coadministrada con atorvastatina o simvastatina en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica. *Circulación* **105**, 2469–2475.
42. Ostlund RE Jr (2004) Los fitoesteroides y el metabolismo del colesterol. *Opin Actu Lipidol* **15**, 37–41.
43. De Smet I, De Boever P & Verstraete W (1998) Reducción de colesterol en cerdos mediante la actividad mejorada de la hidrolasa de sal biliar bacteriana. *R Br Nutr* **79**, 185–194.
44. Ooi LG, Ahmad R, Yuen KH, *et al.* (2010) El *Lactobacillus acidophilus* CHO-220 y la inulina redujeron el colesterol total plásmico y el colesterol de lipoproteínas de baja densidad a través de la alteración de los transportadores de lípidos. *R Cie Láctea* **93**, 5048–5058.
45. Jeun J, Kim S, Cho SY, *et al.* (2010) Efectos hipocolesterolémicos de *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 por aumento de excreción de ácidos biliares en ratones C57BL/6. *Nutrición* **26**, 321–330.
46. Kumar R, Grover S & Batish VK (2011) Efecto hipocolesterolémico de inclusión en la dieta de dos cepas putativas probióticas de *Lactobacillus plantarum* productoras de hidrolasa de sal biliar en ratas Sprague-Dawley. *R Br Nutr* **105**, 561–573.



47. Lepercq P, Relano P, Cayuela C, *et al.* (2004) La cepa DN-173 010 de *Bifidobacterium animalis* hidroliza las sales biliares en el tracto gastrointestinal de los cerdos. *R Escan Gastroenterol* **39**, 1266–1271.
48. Marteau P, Cuillerier E, Meance S, *et al.* (2002) La cepa DN-173 010 de *Bifidobacterium animalis* acorta el tiempo de tránsito colónico en mujeres sanas: un estudio doble ciego, con distribución aleatoria, controlado. *Ter Farmacol Aliment* **16**, 587–593.
49. Begley M, Hill C & Gahan CGM (2006) Actividad de la hidrolasa de sal biliar en los probióticos. *Microbiol Amb Apli* **72**, 1729–1738.
50. Schiff ER, Small NC & Dietschy JM (1972) Caracterización de la cinética de los mecanismos de transporte pasivo y activo para la absorción de ácidos biliares en el intestino delgado y el colon de la rata. *R Invest Clin* **51**, 1351–1362.
51. Ridker PM, Glynn RJ & Hennekens CH (1998) La proteína C-reactiva aporta al valor predictivo de colesterol total y HDL en la determinación de riesgo del primer infarto al miocardio. *Circulación* **97**, 2007–2011.
52. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, *et al.* (2000) Proteína C-reactiva y otros marcadores de inflamación en la predicción de enfermedad cardiovascular en mujeres. *R Med N Engl* **342**, 836–843.
53. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, *et al.* (2001) Medición de la proteína C-reactiva para la focalización de la terapia con estatina en la prevención primaria de eventos coronarios agudos. *R Med N Engl* **344**, 1959–1965.
54. Ridker PM, Stampfer MJ & Rifai N (2001) Factores de riesgo novedosos para la arterioesclerosis sistémica –comparación de la proteína C-reactiva, fibrinógeno, homocisteína, lipoproteína(a) y el análisis estándar de colesterol como predictores de enfermedad arterial periférica. *JAMA* **285**, 2481–2485.
55. Roberts WL (2004) CDC/AHA Taller sobre Marcadores de Inflamación y Enfermedad Cardiovascular – Aplicación a la Práctica Clínica y de Salud Pública – Pruebas de laboratorio disponibles para evaluar el rendimiento de la inflamación y la normalización – Documento de antecedentes. *Circulación* **110**, E572–E576.