

ARTÍCULO ORIGINAL

REDUCCIÓN DEL COLESTEROL E INHIBICIÓN DE LA ABSORCIÓN DE ESTEROLES POR MEDIO DE *LACTOBACILLUS REUTERI* NCIMB 30242: PRUEBA CON DISTRIBUCIÓN ALEATORIA CONTROLADA

ML Jones^{1, 2}, CJ Martoni² y S Prakash^{1, 2}

ANTECEDENTES / OBJETIVOS: El porcentaje de personas hipercolesterolémicas que no llegan a su valor meta de colesterol LDL (LDL-C) sigue siendo alto, razón por la cual se deberían evaluar estrategias terapéuticas adicionales. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia y mecanismos de acción de las cápsulas de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 activado por hidrolasa de sal biliar en la reducción del colesterol en adultos hipercolesterolémicos.

SUJETOS / MÉTODOS: Un total de 127 sujetos completaron un estudio con distribución aleatoria, doble ciego, controlado con placebo, de brazos paralelos y multicéntrico. Se asignó aleatoriamente a los sujetos para que consuman cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 o cápsulas con placebo, durante un período de intervención de 9 semanas. El resultado primario fue el LDL-C en relación con el placebo al final del estudio.

RESULTADOS: Las cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 redujeron el LDL-C en 11,64% ($P < 0,001$), el colesterol total en 9,14%, ($P < 0,001$), el colesterol no-HDL (HDL-no C) en 11,30% ($P < 0,001$) y el apoB-100 en 8,41% ($P = 0,002$) en relación con el placebo. Los índices de LDL-C / colesterol HDL (HDL-C) y apoB-100/apoA-1 se redujeron en 13,39% ($P = 0,006$) y 9,00% ($P = 0,026$), respectivamente, en relación con el placebo. Los triglicéridos y el HDL-C no tuvieron cambios. La proteína de alta sensibilidad C reactiva y el fibrinógeno se redujeron en 1,05 mg/l ($P = 0,005$) y 14,25% ($P = 0,004$) en relación con el placebo, respectivamente. Los ácidos biliares desconjugados plásmicos medios se incrementaron en 1,00 mmol/l ($P = 0,025$) en relación con el placebo, mientras que los niveles de campesterol, sitosterol y estigmasterol plásmico se redujeron en 41,5%, 34,2% y 40,7%, respectivamente.

CONCLUSIONES: Los resultados presentes sugieren que la desconjugación de ácidos biliares intraluminales resulta en la absorción reducida de esteroides que no son de colesterol e indican que las cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 pueden ser útiles como terapia complementaria para el tratamiento de la hipercolesterolemia.

¹ Laboratorio de Investigación de Tecnología Biomédica y Terapia Celular, Departamento de Ingeniería Biomédica, Centro de Investigación de Células y Órganos Artificiales, Facultad de Medicina, Universidad McGill, Montreal, Quebec, Canadá y

² Micropharma Limited, UQAM, Montreal, Quebec, Canadá.

Correspondencia: profesor S. Prakash, Laboratorio de Investigación de Tecnología Biomédica y Terapia Celular, Departamento de Ingeniería Biomédica y Fisiología, Centro de Investigación de Células y Órganos Artificiales, Facultad de Medicina, Universidad McGill, 3775 University Street, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canadá. Correo electrónico: satyaparakash@mcgill.ca

Recibido el 18 de mayo de 2012; revisado 20 de agosto de 2012; aceptado el 20 de agosto de 2012; publicado en línea el 19 de septiembre de 2012

Revista Europea de Nutrición Clínica (2012) **66**, 1234-1241; doi:10.1038/ejcn.2012.126; publicada en línea el 19 de septiembre de 2012.

Palabras claves: Colesterol LDL; enfermedad de la arteria coronaria; absorción de colesterol; hidrolasa de sal biliar; *L. reuteri*; cápsula de suplemento

INTRODUCCIÓN

Varias décadas de evidencia han confirmado una relación logarítmica lineal entre el incremento del Colesterol LDL (LDL-C) y el riesgo relativo de enfermedad de la arteria coronaria (CAD, por sus siglas en inglés)^{1,2}. Programa de Tratamiento para Adultos III del Programa Nacional de Educación sobre Colesterol ha delineado concentraciones objetivo de LDL-C para la reducción del riesgo relativo³, habiendo recomendado objetivos más bajos para los pacientes con CAD, pacientes con niveles muy altos equivalentes al riesgo de CAD y pacientes asintomáticos con factores de riesgo múltiples para prevención primaria^{4,5}. Las estrategias terapéuticas dirigidas a la reducción del LDL-C se enfocan inicialmente en recomendaciones e intervenciones nutricionales.

Las bacterias probióticas están definidas por la OMS como *microorganismos vivos que, cuando se administran en las cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del anfitrión*. Ellas están siendo examinadas con respecto a su eficacia en la reducción del colesterol total (TC, por sus siglas en inglés) y el LDL-C en seres humanos⁶. En los años 60, se observó por primera vez que los animales libres de gérmenes acumulan colesterol en cantidades superiores y a un ritmo más rápido que sus aquellas convencionalmente elevadas de sus contrapartes⁷. La explicación propuesta era que los animales libres de gérmenes catabolizan el colesterol a un ritmo más lento y que la microflora intestinal fue responsable de acelerar el catabolismo del colesterol a través de una incrementada eliminación de los ácidos biliares⁸. Esto estuvo fundamentado mediante la demostración de que los animales libres de gérmenes tienen niveles elevados de ácidos biliares conjugados a lo largo del intestino, excreción fecal biliar significativamente reducida y tres veces la concentración de ácido biliar en la bilis^{9,10,11}. Es más, se demostró que los ratones tratados con antibióticos orales durante 3 días triplicaron los resultados de sus ácidos biliares en la bilis, mientras que el resultado fecal se redujo en 70%¹². Adicionalmente, estudios en cerdos han demostrado que la creciente actividad de la hidrolasa de sal biliar (BSH) de la microflora intestinal resulta en un incremento significativo en el grupo de ácidos biliares desconjugados¹³ y una reducción en el colesterol circulante¹⁴. A pesar de la evidencia preclínica en el sentido de que la desconjugación intraluminal de los ácidos biliares podría llevar a un catabolismo incrementado del colesterol hepático y a una absorción reducida de colesterol, todavía no hay evidencia disponible sobre un mecanismo de reducción del colesterol en seres humanos.

Varios grupos han informado sobre reducciones significativas en el LDL-C después del consumo diario de yogur enriquecido con probióticos en pruebas con distribución aleatoria y controladas^{15,16,17,18,19}. Sin embargo, la mayoría de pruebas con distribución aleatoria y controladas no han informado sobre efectos significativos^{20,21,22,23,24,25} y ninguna prueba clínica ha informado sobre reducciones significativas de LDL-C debido a una formulación de suplemento con probióticos, a menos que se lo administre como simbiótico²⁶. Previamente

hemos informado sobre la eficacia en la reducción del colesterol de una formulación de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado activado por BSH¹⁸. Es más, se ha confirmado la seguridad y tolerancia clínica del *L. reuteri* NCIMB 30242 en formulaciones de yogur²⁷ y cápsulas²⁸. Sin embargo, no se conocía si se encontraría una eficacia similar en un formato de cápsula; si se hubiera visto eficacia adicional durante un período de intervención más largo; o, si la entrega de la cepa activada por BSH resultaría en ácidos biliares desconjugados circulantes incrementados o en una absorción reducida de los esteroides que no son de colesterol. En concordancia con lo mencionado, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar la eficacia clínica en la reducción del colesterol e investigar el mecanismo de acción de las cápsulas de suplemento de *L. reuteri* NCIMB 30242 activado por BSH durante un período de intervención de 9 semanas, en una prueba con distribución aleatoria y controlada.

SUJETOS Y MÉTODOS

Sujetos

El presente estudio se condujo de conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki. Se reclutaron adultos hipercolesterolémicos, sanos en los demás aspectos, en seis centros en Praga, CZ. El protocolo fue aprobado el Comité de Ética para Pruebas Clínicas Multicéntricas de la Universidad Hospital Motol, CZ (registro en FDA/OHRP IORG No. IORG0000612). La prueba se registró en www.clinicaltrials.gov, con el número de estudio NCT01341613.

Se incluyó a sujetos hipercolesterolémicos, sanos en los demás aspectos, de entre 20 y 75 años de edad (inclusive) con LDL-C >3,4 mmol/l (<15% de variación entre visitas sucesivas de selección), triglicéridos (TG) <4,0 mmol/l, índice de masa corporal de 22-32 kg/m², sin recibir o recibiendo una dosis estable de monoterapia de estatina (≥3 meses) y por lo menos 80% de cumplimiento con el consumo del producto (verificado después del período de preinclusión). Se excluyó a diabéticos, sujetos que recibían suplementos sin prescripción o medicamentos bajo prescripción para reducir el colesterol, diferentes a la monoterapia con estatina en los últimos 3 o 6 meses, respectivamente y aquellos que habían experimentado cualquier evento cardiovascular en los últimos 6 meses. Los criterios adicionales de exclusión fueron historia de uso crónico de alcohol; ingesta actual de anticuerpos, corticosteroides, andrógenos o fenitoína sistémicos; participación actual en una prueba clínica o en un período de exclusión posterior a una prueba clínica; historia de angina, insuficiencia cardíaca, enfermedad inflamatoria del colon, pancreatitis, enfermedad gastrointestinal, renal, pulmonar, hepática y biliar, o cáncer; uso crónico de probióticos o laxantes de fibra o laxantes estimulantes; e historia de desórdenes alimenticios. Además se excluyó a aquellos sujetos que se ejercitaban >15 millas por semana o 16.766 kJ por semana, y a mujeres embarazadas, lactantes o intentando quedarse embarazadas. Se permitió a los sujetos tomar dosis estables de hormona tiroidea y agentes antihipertensivos, siempre y cuando continúen igual durante el estudio. El protocolo del estudio se explicó en detalle y todos los sujetos proporcionaron su consentimiento escrito informado antes de su inclusión.

Preparación de las cápsulas de suplemento y placebo

El *L. reuteri* NCIMB 30242 (cardioviva) se propagó en un fermentador 5000-L, se concentró y liofilizó en cumplimiento con los procedimientos operativos estándar y de control de calidad en Probiotal S.p.A (Novara, Italia). Probiotal S.p.A preparó las cápsulas de placebo y suplemento (DRcaps de color blanco opaco tamaño '0' (Capsugel, Colmar, Francia)). Después de la producción se confirmaron los análisis microbiológicos y la pureza del cultivo bacteriano. Las cápsulas de placebo contenían 0 mg de bacterias liofilizadas y 300 mg de excipiente de maltodextrina / dióxido de silicio. Las cápsulas de suplemento contenían $2,9 \times 10^9$ CFU por cápsula de *L. reuteri* NCIMB 30242 en la línea de base del estudio y $2,0 \times 10^9$ CFU por cápsula de *L. reuteri* NCIMB 30242 en el punto final del estudio, según lo medido por Exova (Portland, OR, EE.UU.). Las cápsulas de placebo y suplemento eran idénticas en sabor y apariencia y estaban embotelladas en frascos de polietileno de alta densidad, sellados y con desencante.

Diseño del estudio

El diseño del estudio fue multicéntrico, con distribución aleatoria, doble ciego, controlado con placebo, de brazos paralelos y con una duración total de 13 semanas. Esto incluyó un período de reposo farmacéutico de 2 semanas, un período de preinclusión de 2 semanas, en el cual los sujetos consumieron cápsulas de placebo dos veces al día en el desayuno y la cena, y un período de intervención, en el que los sujetos consumieron ya sea cápsulas de placebo o suplemento dos veces al día en el desayuno y cena. Para todo el período de 13 semanas se proporcionaron los lineamientos nutricionales del Programa de Tratamiento para Adultos III del Programa Nacional de Educación sobre Colesterol. El reposo farmacéutico previó un período adicional de 2 semanas para que los sujetos se aclimaten a las recomendaciones de estilo de vida, mientras que el período de preinclusión previó un período de 2 semanas para evaluación del filtro de elegibilidad y cumplimiento con el consumo del producto. Los sujetos se reunieron con el equipo investigador en siete ocasiones: la visita V0 (semana -4), V1 (semana -2), V2-1 (semana 0 día 1), V2-2 (semana 0, aleatorización y línea de base de la intervención), V3 (semana 3), V4 (semana 6) y V5 (semana 9, punto final de la intervención). El programa de software NutriDan (Instituto Danone, Praga, República Checa) evaluó la ingesta nutricional de más de 30 micronutrientes en la línea de base y en el punto final en lo que respecta a energía total (kJ), lípidos totales (%), proteínas totales (%) y carbohidratos totales (%).

Análisis de las muestras

En las visitas V0, V1, V2-1, V3, V4 y V5 se tomaron muestras de sangre después de 12 horas de ayuno, mediante venopunción. El suero y el plasma se transportaron inmediatamente desde cada centro a un laboratorio central (Prevedig s.r.o., Praga, República Checa) para análisis. Se analizaron el LDL-C, TC, HDL-C, TG, apoB-100 y apoA-1 séricos en un analizador bioquímico Dimensión RxL, usando juegos de reactivos (Dade Behring, Siemens, Munich, Alemania). Se calculó el colesterol no HDL (HDL-no C) sustrayendo el HDL-C del TC y se calcularon los índices LDL-C/HDL-C y apoB-100/apoA-1. Se evaluaron la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) en el suero así como el fibrinógeno plásmico en la línea de base y al final de estudio, utilizando un inmunoensayo altamente sensible y un ensayo de coagulación funcional estándar, respectivamente. Los ácidos biliares plásmicos desconjugados y conjugados y los fitosteroles (campesterol, sitosterol y estigmasterol) en la línea de base y al final del estudio mediante cromatografía líquida - espectrometría de masa

en tándem o cromatografía de gases – espectrometría de masa en tándem, según lo descrito por Sherer *et al*²⁹.

Análisis estadístico

Se calculó el número de sujetos tomando en cuenta una diferencia en el LDL-C de 0,34 (0,64) mmol/l entre los grupos con placebo y con suplemento, con $\alpha = 5\%$ y una potencia de 80%. Dadas estas restricciones, se requirieron 57 sujetos evaluables por grupo o 114 en total. Para tomar en cuenta posibles retiros prematuros, se incluyó a 131 sujetos para asignación aleatoria. Un estadístico “ciego” preparó 16 listas únicas aleatorias utilizando el diseño completamente aleatorio generado por el paquete de software SAS, versión 9, procedimiento PLAN (Instituto SAS, Cary, NC, EE.UU.). El productor de las cápsulas escogió una lista y preparó los frascos de cápsulas para ella. Los registros del número de distribución aleatoria correspondiente al placebo o al suplemento estuvieron accesibles únicamente para el productor de las cápsulas hasta el cierre de la base de datos.

La primera hipótesis nula fue que una cápsula de suplemento no es más efectiva que una cápsula de placebo para reducir el LDL-C sérico después de 9 semanas. Se realizó el análisis primario de conformidad con el principio de intención de tratar. Las estadísticas descriptivas se presentan como medias (d.e.) o como medias geométricas y rangos intercuartiles para variables continuas o como un porcentaje para variables cualitativas. Se utilizó la prueba Shapiro-Wilk para determinar si las variables estaban distribuidas paramétricamente. Las diferencias entre grupos en cuanto a las características de la línea de base se analizaron usando análisis de varianza de una vía o un prueba Wilcoxon no paramétrica Mann-Whitney para variables continuas o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas. Para los lípidos, apolipoproteínas y fibrinógenos se utilizó una regresión lineal múltiple para identificar variables que sistemáticamente contribuían a cualquier cambio con relación a la línea de base. Para probar las diferencias entre los grupos de tratamiento, se realizó un análisis de covarianza para ajuste por cualquier contribución sistemática a los cambios con respecto a la línea de base, usando covariables identificadas por regresión lineal múltiple. Los parámetros que no aceptan descripción paramétrica se analizaron mediante pruebas Wilcoxon de Mann-Whitney. El análisis de hs-CRP se realizó sobre datos logarítmicamente transformados, utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas de dos factores. Las diferencias entre grupos en la ingesta nutricional de macronutrientes, ácidos biliares y fitosteroles se evaluaron utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas de dos factores, en la que los dos factores fueron el tiempo y la intervención. Los fitosteroles se transformaron logarítmicamente antes del análisis estadístico. Se utilizó una correlación de rangos de Spearman para evaluar la asociación entre los cambios en los ácidos biliares desconjugados plásmicos y los cambios en el LDL-C sérico durante el período de intervención. Los análisis de lípidos, apolipoproteínas, fibrinógeno e ingesta nutricional se realizaron usando el paquete de software SAS, versión 9 (Instituto SAS). Todos los otros análisis de datos se realizaron *post-hoc* utilizando el paquete de software SPSS, versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

Cuadro 1. Características demográficas y clínicas en la línea de base			
	Placebo (n = 61)	<i>L. reuteri</i> (n = 66)	P

	Media (d.e.)	Media (d.e.)	
Caucásico (%)	100%	100%	1,00
Hombre (%)	44%	42%	0,859
Edad (años)	47,59 (12,88)	50,48 (14,03)	0,230
Peso corporal (kg)	81,66 (12,41)	78,55 (11,38)	0,145
BMI (kg/m ²)	27,62 (2,81)	26,83 (3,05)	0,133
PS Sistólica (mm Hg)	131,56 (11,58)	130,12 (11,22)	0,359
PS Diastólica (mm Hg)	77,61 (6,85)	78,48 (5,35)	0,296
Pulso (bpm)	72,59 (6,06)	73,30 (7,12)	0,614
Ingesta de estatinas (%)	14,80%	7,6%	0,260
TC (mmol/l)	5,89 (0,59)	6,36 (0,79)	0,001
LDL-C (mmol/l)	4,14 (0,49)	4,53 (0,65)	<0,001
HDL-C (mmol/l)	1,24 (0,30)	1,33 (0,46)	0,545
HDL-no C (mmol/l)	4,64 (0,55)	5,03 (0,65)	<0,001
TG (mmol/l)	1,50 (0,73)	1,50 (0,79)	0,837
ApoB-100 (g/l)	1,20 (0,14)	1,28 (0,17)	0,005
ApoA-1 (g/l)	1,61 (0,27)	1,66 (0,38)	0,394
LDL-C / HDL-C	3,51 (0,92)	3,77 (1,21)	0,227
ApoB-100/apoA-1	0,77 (0,18)	0,81 (0,22)	0,286
Fibrinógeno (g/l)	2,50 (0,66)	2,63 (0,87)	0,482
hs-CRP (mg/l) ^a	1,63 (0,90–3,25)	2,00 (0,80–4,43)	0,161
Campesterol (ng/ml)	2840,8 (1471,0)	3064,2 (1860,9)	0,668
Sitosterol (ng/ml)	1368,9 (682,1)	1520,1 (891,1)	0,408
Estigmasterol (ng/ml)	68,3 (51,3)	68,4 (49,4)	0,855
PS Total (ng/ml)	4278,0 (2156,1)	4652,7 (2756,9)	0,559
Abreviaciones: apoA-1, apolipoproteína A-1; apoB-100, apolipoproteína B-100; BP, presión sanguínea; bpm, pulsos por min; BMI, índice de masa corporal; HDL-C, HDL-colesterol; hs-CRP, proteína C-reactiva de alta sensibilidad; LDL-C, Colesterol LDL; HDL-no C, colesterol no-HDL; PS, fitosterol; TC, colesterol total; TG, Triacilglicerol. ^a Media geométrica (rango intercuartil).			

RESULTADOS

Parámetros de estudio

Se distribuyó aleatoriamente a un total de 131 sujetos y 127 sujetos completaron el estudio como parte de la población que se intentaba tratar. Cuatro sujetos, tres en el grupo con placebo y uno en el grupo con suplemento, se excluyeron pues no cumplían con los criterios del estudio. En general, 116 sujetos completaron el estudio según el protocolo (Figura Suplementaria 1). Todos los sujetos se consideraron hipercolesterolémicos y en riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas en la línea de base, de conformidad con los lineamientos del Programa de Tratamiento para Adultos III del Programa Nacional de Educación sobre Colesterol³.

Características de los sujetos en la línea de base

Se evaluaron las características de la línea de base de la población que se intentaba tratar, las mismas que se muestran en el Cuadro 1. Los dos grupos producidos mediante distribución aleatoria eran mayormente homogéneos en términos de características demográficas y clínicas. Los sujetos masculinos y femeninos se distribuyeron igualmente con una proporción de 44:56% y 42:58% hombres:mujeres en los grupos con placebo y suplemento, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre grupos en cuanto a edad, peso corporal, índice de masa corporal, presión sanguínea sistólica, diastólica y media y pulso. Los valores de LDL-C, TC, HDL-no C y apoB-100 séricos fueron significativamente diferentes entre los grupos con placebo y suplemento en la línea de base ($P < 0,01$). No hubo otras diferencias significativas entre los grupos con placebo y suplemento en la línea de base para variables continuas o categóricas ($P > 0,05$).

Evaluación nutricional

Se realizó una evaluación nutricional de macronutrientes en la línea de base y al final del estudio. No hubo diferencias significativas entre los grupos con placebo y suplemento durante el período de intervención en la ingesta nutricional de energía, lípidos, proteínas o carbohidratos totales ($P > 0,05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ingesta total nutricional de energía y macronutrientes			
	<i>Placebo (n=61)</i>	<i>L. reuteri (n = 66)</i>	<i>p^a</i>
	<i>Media (d.e.)</i>	<i>Media (d.e.)</i>	
Energía (kJ)			
Semana 0	8 510,6 (2 689,5)	8 685,1 (2 888,3)	0,85
Semana 9	8 370,7 (2 599,5)	8 475,0 (2 455,1)	
Lípidos (%)			
Semana 0	34,5 (6,2)	36,2 (6,7)	0,09
Semana 9	36,6 (6,4)	36,1 (5,7)	
Proteínas (%)			
Semana 0	17,34 (3,54)	17,27 (3,2)	0,74
Semana 9	17,59 (4,73)	17,3 (3,5)	
Carbohidratos (%)			
Semana 0	48,1 (7,2)	46,5 (8,2)	0,11
Semana 9	45,8 (8,4)	46,6 (7,1)	
^a Análisis de varianza de medidas repetidas con dos factores			

Cuadro 3. Cambios medios absolutos y relativos en los parámetros de lípidos y apolipoproteína en las semanas 6 y 9

	<i>Semana 6</i>	<i>Semana 9</i>
--	-----------------	-----------------

	Placebo (n=61) <i>Media (d.e.)</i>	<i>L. reuteri</i> (n=66) <i>Media (d.e.)</i>	P	Placebo (n=61) <i>Media (d.e.)</i>	<i>L. reuteri</i> (n=66) <i>Media (d.e.)</i>	P
TC						
Línea de base	5,89 (0,59)	6,36 (0,79)		5,89 (0,59)	6,36 (0,79)	
AbsΔ (mmol/l)	0,21 (0,70)	-0,36 (0,62)	<0,001 ^a	0,16 (0,67)	-0,42 (0,63)	<0,001 ^a
RelΔ (%)	3,82 (12,47)	-5,31 (10,04)	<0,001 ^b	2,76 (11,76)	-6,38 (10,28)	<0,001 ^a
LDL-C						
Línea de base	4,14 (0,49)	4,53 (0,65)		4,14 (0,49)	4,53 (0,65)	
AbsΔ (mmol/l)	0,14 (0,54)	-0,37 (0,51)	<0,001 ^a	0,21 (0,63)	-0,30 (0,57)	<0,001 ^a
RelΔ (%)	3,61 (12,74)	-7,95 (11,46)	<0,001 ^a	5,30 (15,57)	-6,33 (13,15)	0,001 ^a
HDL-C						
Línea de base	1,24 (0,30)	1,33 (0,46)		1,24 (0,30)	1,33 (0,46)	
AbsΔ (mmol/l)	0,03 (0,29)	-0,03 (0,33)	0,350 ^b	0,01 (0,29)	0,00 (0,24)	0,753 ^b
RelΔ (%)	3,81 (27,23)	0,44 (23,53)	0,367 ^b	2,55 (27,15)	1,42 (19,63)	0,583 ^b
HDL-no C						
Línea de base	4,64 (0,55)	5,03 (0,65)		4,64 (0,55)	5,03 (0,65)	
AbsΔ (mmol/l)	0,18 (0,57)	-0,33 (0,63)	<0,001 ^a	0,15 (0,63)	-0,42 (0,64)	<0,001 ^a
RelΔ (%)	4,16 (12,36)	-6,25 (12,41)	<0,001 ^a	3,43 (14,07)	-7,87 (12,87)	<0,001 ^a
TG						
Línea de base	1,50 (0,73)	1,50 (0,79)		1,50 (0,73)	1,50 (0,79)	
AbsΔ (mmol/l)	0,06 (0,69)	0,19 (0,89)	0,579 ^b	0,13 (1,04)	-0,02 (0,71)	0,635 ^b
RelΔ (%)	15,95 (51,61)	24,00 (68,71)	0,710 ^b	19,67 (73,81)	7,01 (42,65)	0,498 ^b
apoB-100						
Línea de base	1,20 (0,14)	1,28 (0,17)		1,20 (0,14)	1,28 (0,17)	
AbsΔ (mmol/l)	0,01 (0,14)	-0,13 (0,16)	<0,001 ^a	-0,03 (0,15)	-0,14 (0,18)	0,001 ^a
RelΔ (%)	0,96 (11,70)	-9,38 (11,68)	<0,001 ^a	-1,87 (12,63)	-10,28 (13,46)	0,002 ^a
apoA-1						
Línea de base	1,61 (0,27)	1,66 (0,38)		1,61 (0,27)	1,66 (0,38)	
AbsΔ (mmol/l)	0,04 (0,31)	0,02 (0,26)	0,499 ^a	0,02 (0,29)	0,00 (0,22)	0,870 ^b
RelΔ (%)	4,48 (21,65)	3,12 (17,02)	0,534 ^b	2,39 (20,12)	1,63 (16,09)	0,979 ^b

Abreviaciones: AbsΔ, cambio absoluto; apoA-1, apolipoproteínaA-1; apoB-100, apolipoproteínaB-100; HDL-C, colesterol HDL; LDL-C, LDL-colesterol; No-HDL-C, colesterol no-HDL; RelΔ, cambio relativo; TC, Colesterol total; TG, Triacilglicerol. ^a Análisis de covarianza. ^b Prueba Wilcoxon de Mann-Whitney.

Perfil de lípido sérico

El suero se evaluó en la línea de base, semana 3, semana 6 y final para obtener los valores de LDL-C, TC- HDL-C, HDL-C, HDL-no C, TG, apoB-100 y apoA-1. Los cambios absolutos y relativos medios de los valores de TC, LDL-C, HDL-C, HDL-no C, TG, apoB-100 y apoA-1 entre la

línea de base y la semana 3 no fueron estadísticamente significativos ($P>0,05$) (datos no mostrados). Los cambios absolutos y relativos medios de los valores de TC, LDL-C, HDL-C, HDL-no C, TG, apoB-100 y apoA-1 entre la línea de base y la semana 6 y el final de la prueba están resumidos en el Cuadro 3. El valor sérico del LDL-C en la semana 6 y al final cambiaron en comparación con la línea de base en $-0,37$ ($0,51$) y $-0,30$ ($0,57$) mmol/l lo cual constituyó un cambio medio significativo en relación con el placebo de $-11,56\%$ ($P<0,001$) y $-11,64\%$ ($P=0,001$), respectivamente. El TC sérico en la semana 6 y al final cambiaron en comparación con la línea de base en $-0,36$ ($0,62$) y $-0,42$ ($0,63$) mmol/l, lo cual constituyó un cambio medio significativo en relación con el placebo de $-9,13\%$ ($P=0,001$) y $-9,14\%$ ($P<0,001$), respectivamente. El HDL-no C sérico en la semana 6 y al final cambió con respecto a la línea de base en $-0,33$ ($0,63$) y $-0,42$ ($0,64$) mmol/l, lo cual constituyó un cambio medio significativo en relación con el placebo de $-10,41\%$ ($P<0,001$) y $-11,30\%$ ($P<0,001$), respectivamente. El apoB-100 sérico en la semana 6 y al final cambió con respecto a la línea de base en $-0,13$ ($0,16$) y $-0,14$ ($0,18$) mmol/l, lo cual constituyó un cambio medio significativo en relación con el placebo de $-10,34\%$ ($P<0,001$) y $-8,41\%$ ($P=0,002$), respectivamente. Los valores séricos de TG y HDL-C no cambiaron durante el curso del estudio.

Índices de lípidos y apolipoproteína y parámetros de riesgo cardiovascular

El cambio medio absoluto y relativo en el fibrinógeno, el índice LDL-C / HDL-C y el índice apoB-100 / apoA-1, así como la media geométrica y el rango intercuartil de hs-CRP están resumidos en el Cuadro 4. El índice LDL-C / HDL-C cambió al final con respecto a la línea de base en $-0,22$ ($0,88$), lo cual constituyó un cambio medio significativo en relación con el placebo de $-13,39\%$ ($P=0,006$). El índice apoB-100 / apoA-1 al final cambió con respecto a la línea de base en $-0,09$ ($0,20$), lo cual constituyó un cambio medio significativo en relación con el placebo de $-9,00\%$ ($P=0,026$). El fibrinógeno plásmico al final cambió con respecto a la línea de base en $-0,09$ ($0,96$) g/l, lo cual constituyó un cambio medio significativo en relación con el placebo de $-14,25\%$ ($P=0,004$). Finalmente, hubo un efecto significativo de la suplementación con *L. reuteri* NCIMB 30242 en el hs-CRP sérico ($P=0,005$), pues la media geométrica cambió en $-0,13$ mg/l entre la línea de base y el final y en $-1,05$ mg/l entre la línea de base y el final en relación con el placebo. Entre los sujetos con categorías de riesgo relativo hs-CRP promedio ($1-3$ mg/l) o alto (43 mg/l) en la línea de base, $27,1\%$ de los sujetos que recibieron *L. reuteri* NCIMB 30242 redujeron sus categorías de riesgo en uno o más grupos de riesgo en comparación con $1,7\%$ de sujetos que recibieron placebo (datos no mostrados).

Perfil plásmico de ácido biliar y fitosterol

En el Cuadro 5 se resumen las concentraciones medias de ácidos biliares conjugados y desconjugados en la línea de base y al final de estudio. Hubo un efecto significativo de la suplementación con *L. reuteri* NCIMB 30242 en los ácidos biliares plásmicos desconjugados durante el curso del estudio ($P=0,025$), puesto que los ácidos biliares desconjugados totales se incrementaron en $0,80$ $\mu\text{mol/l}$ en relación con la línea de base y en $1,00$ $\mu\text{mol/l}$ con relación a la línea de base en lo que respecta al placebo. Tal como lo muestra la Figura 1, se observó una asociación significativa en sujetos que tomaron *L. reuteri* NCIMB 30242 ($r=-0,369$, $P=0,003$), mientras que no se observó asociación en sujetos que tomaron placebo ($r=-$

0,086, $P=0,516$). Los coeficientes de regresión de los grupos con *L. reuteri* NCIMB 30242 y placebo fueron significativamente diferentes ($P=0,012$).

Cuadro 4. Cambios en los índices de lípidos y apolipoproteína y parámetros de riesgo cardiovascular			
	Placebo (n = 61)	<i>L. reuteri</i> (n= 66)	P
	Media (d.e.)	Media (d.e.)	
<i>LDL-C / HDL-C</i>			
Línea de base	3,51 (0,92)	3,77 (1,21)	
AbsΔ	0,21 (1,16)	-0,22 (0,88)	0,005 ^a
RelΔ (%)	8,91 (33,37)	-4,48 (21,24)	0,006 ^a
<i>apo-100/apoA-1</i>			
Línea de base	0,77 (0,18)	0,81 (0,22)	
AbsΔ	-0,02 (0,19)	-0,09 (0,20)	0,034 ^a
RelΔ (%)	-0,74 (22,82)	-9,74 (17,75)	0,026 ^b
Fibrinógeno			
Línea de base	2,50 (0,66)	2,63 (0,87)	
AbsΔ (g/l)	0,48 (0,87)	-0,09 (0,96)	0,004 ^a
RelΔ (%)	17,19 (35,67)	2,95 (26,71)	0,004 ^a
<i>hs-CRP (mg/l)</i> ^c			
Semana 0	1,63 (0,90–3,25)	2,00 (0,80–4,43)	0,005 ^d
Semana 9	2,55 (1,50–5,40)	1,87 (0,75–5,10)	

Abreviaciones: AbsΔ, cambio absoluto; apoA-1, apolipoproteínaA-1; apoB-100, apolipoproteínaB-100; HDL-C, colesterol HDL; LDL-C, colesterol LDL; RelΔ, cambio relativo. ^a Prueba Wilcoxon de Mann–Whitney. ^b Análisis de covarianza. ^c Media geométrica (rango intercuartil). ^d Análisis de varianza de medidas repetidas de dos factores.

En el Cuadro 6 se resumen las concentraciones medias de sitosterol, campesterol y estigmasterol en la línea de base y al final de estudio, tanto en términos absolutos como con relación a concentraciones de TC. Hubo un efecto significativo de la suplementación con *L. reuteri* NCIMB 30242 en las concentraciones absolutas de campesterol ($P=0,025$), sitosterol ($P=0,031$), estigmasterol ($P=0,042$) y fitosteroles totales ($P=0,027$) séricos durante el curso del estudio, puesto que el campesterol, sitosterol, estigmasterol y fitosteroles totales se redujeron en 41,5%, 34,2%, 40,7% y 38,9%, respectivamente, entre la línea de base y el final del estudio en relación con el placebo.

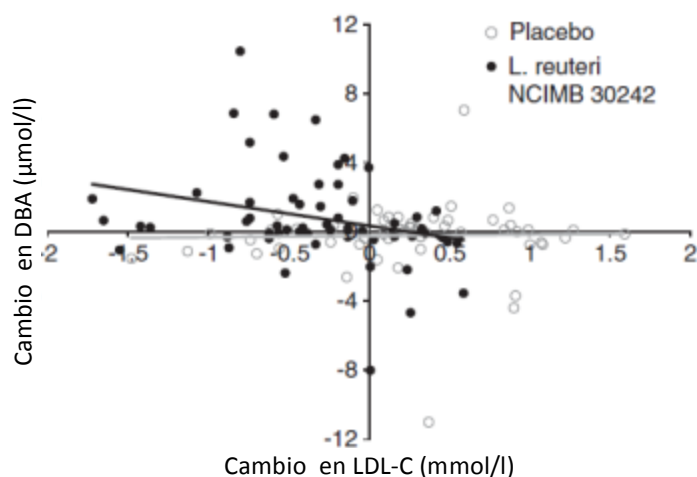


Figura 1. Cambios individuales en ácidos biliares desconjugados plásmicos (DBA, por sus siglas en inglés) y cambios asociados en LDL-C sérico durante el período de intervención. Se observó una asociación significativa en los sujetos que tomaron *L. reuteri* NCIMB 30242 ($r=0,369$, $P=0,003$), mientras que no se observó asociación en sujetos que tomaban placebo ($r=0,086$, $P=0,516$). Los coeficientes de regresión de los grupos con *L. reuteri* NCIMB 30242 y placebo fue significativamente diferente ($P=0,012$).

DISCUSIÓN

Aun cuando anteriormente hemos demostrado que el *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado reduce el LDL-C en adultos hipercolesterolémicos, cuando se administra en una formulación de yogur¹⁸, se desconocía si se verían efectos similares utilizando un formato de suplemento en cápsula, si se hubiera observado una mayor eficacia durante un período de intervención más largo o si el *L. reuteri* NCIMB 30242 podría resultar en un incremento de la circulación de ácidos biliares desconjugados o en la reducción de la absorción de esteroides que no son de colesterol. Por consiguiente, el presente estudio se emprendió con el fin de evaluar la eficacia en la reducción del colesterol de las cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 en adultos hipercolesterolémicos durante 9 semanas, e investigar su mecanismo de acción. Los resultados muestran que los sujetos que consumieron las cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 lograron reducciones significativas en las cifras de LDL-C de 11,64%, TC de 9,14%, HDL-no C de 11,30%, apoB-100 de 8,41%, LDL-C/HDL-C de 13,39% y apoB-100/apoA-1 de 10,34% en relación al placebo al final del estudio.

Un reciente metaanálisis realizado por Guo *et al.*³⁰, que incluyó 13 estudios clínicos sobre probióticos que reducen los lípidos, demuestra un cambio neto medio de LDL-C de 0,12 mmol/l (~3%). El tamaño de la muestra de los estudios incluidos en el metaanálisis va desde 14 a 78 y ninguno de los estudios incluidos investigó la especie *L. reuteri* o la cepa NCIMB 30242 de *L. reuteri*. Es más, ninguna prueba clínica anterior ha informado sobre una reducción significativa de LDL-C por causa de una formulación de suplemento de probiótico, a menos que se la haya provisto como simbiótico²⁶. Anteriormente se había postulado que algunas pruebas clínicas con probióticos que reducen lípidos carecen de una selección apropiada de la cepa, método de administración o diseño clínico³¹. Para este estudio se aplicó un enfoque sistemático, incluyendo la identificación de una cepa, *L. reuteri* NCIMB 30242, con las características fenotípicas adecuadas, incluyendo una expresión natural de BSH elevada, asegurando la seguridad de la cepa a través de la caracterización fenotípica y genotípica³² y la optimización de los parámetros de producción de la cepa.

Cuadro 6. Concentraciones de fitosteroles en la línea de base y al final			
	<i>Placebo (n = 61)</i>	<i>L. reuteri (n= 66)</i>	<i>p^a</i>
	<i>Media (d.e.)</i>	<i>Media (d.e.)</i>	
<i>Campesterol (ng/ml)</i>			
Semana 0	2840,8 (1471,0)	3064,2 (1860,9)	0,025
Semana 9	3438,3 (2041,2)	2805,0 (1649,8)	
<i>Sitosterol (ng/ml)</i>			
Semana 0	1368,9 (682,1)	1520,1 (891,1)	0,031
Semana 9	1636,8 (945,3)	1428,9 (868,5)	
<i>Estigmasterol (ng/ml)</i>			
Semana 0	68,3 (51,3)	68,4 (49,4)	0,042
Semana 9	81,2 (78,7)	62,0 (54,2)	
<i>PS Total (ng/ml)</i>			
Semana 0	4278,0 (2156,1)	4652,7 (2756,9)	0,027
Semana 9	5156,4 (3008,7)	4295,9 (2524,6)	
<i>Índice Campesterol / TC (ng/μg)</i>			
Semana 0	1,261 (0,672)	1,262 (0,811)	0,237
Semana 9	1,477 (0,854)	1,227 (0,735)	
<i>Índice Sitosterol / TC (ng/μg)</i>			
Semana 0	0,606 (0,303)	0,626 (0,384)	0,287
Semana 9	0,702 (0,397)	0,624 (0,381)	
<i>Índice Estigmasterol / TC (ng/μg)</i>			
Semana 0	0,030 (0,024)	0,028 (0,022)	0,255
Semana 9	0,035 (0,033)	0,028 (0,026)	
<i>Índice PS Total / TC (ng/μg)</i>			
Semana 0	1,897 (0,978)	1,916 (1,198)	0,235
Semana 9	2,214 (1,259)	1,879 (1,119)	
Abreviaciones: PS, fitosterol; TC, colesterol total. ^a Análisis de varianza de medidas repetidas de dos factores sobre valores transformados logarítmicamente.			

Durante el período de intervención, los sujetos que consumieron las cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 activado por BSH mostraron un incremento en los ácidos biliares desconjugados plásmicos en comparación con el placebo, que se afirma es el resultado de la actividad incrementada de BSH y la desconjugación de la sal biliar intraluminal. En una base sujeto a sujeto, se confirmó que la reducción del LDL-C durante el curso del estudio estuvo significativamente correlacionada con los ácidos biliares desconjugados plásmicos en los sujetos que consumieron las cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 activado por BSH. Es

más, las concentraciones absolutas de fitosteroles de plásmicos, o sea los marcadores suplentes de la absorción de colesterol^{33,34}, fueron significativamente reducidas en sujetos que consumieron las cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 activado por BSH, indicando un transporte interno total reducido de esteroides no-colesterol y sugiriendo una reducción en la absorción de colesterol nutricional y biliar³⁵. Tal como lo discute Jakulj *et al.*³⁶, la concentración de fitosterol se puede presentar tanto en valores absolutos como en índices ajustados a TC. Generalmente se alienta a esta última presentación para efectos de eliminar la influencia de las altas concentraciones de lipoproteínas, como ocurre en individuos con hipercolesterolemia familiar³⁷. En contraste, los valores absolutos de los fitosteroles han tenido sus defensores en instancias en las que están involucrados cambios inducidos por la estatina en los marcadores de colesterol³⁸.

Anteriormente se ha demostrado que las ratas libres de gérmenes tienden a acumular más colesterol que sus contrapartes criadas de forma convencional y, a falta de la microbiota intestinal, los ácidos biliares de la bilis y la absorción de colesterol se incrementan en 300% y 25% respectivamente^{7,8,11}. Estudios de seguimiento confirmaron que los animales libres de gérmenes tienen ácidos biliares conjugados elevados a lo largo del intestino, sin desconjugación, y excreción fecal fuertemente reducida⁹. Se ha hipotetizado que los incrementos en los ácidos biliares desconjugados pueden resultar en una reducida activación del receptor farnesoide X, catabolismo incrementado de colesterol, reducida inhibición del receptor X del hígado (LXR, por sus siglas en inglés) y sobrerregulación de los transportadores (ABC)G5/G8 de casetes de unión de trifosfato de adenosina. Estos transportadores efluyen colesterol desde los hepatocitos y enterocitos¹⁸ y están estimulados en presencia de ácidos biliares desconjugados. Para apoyar esto, se ha demostrado que la alimentación oral con *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 a ratones resultó en una reducción significativa de LDL-C y TG, excreción fecal de ácido biliar incrementada, síntesis incrementada de ácido biliar hepático y expresión incrementada de 7 alfa hidroxilasa (CYP7A1), la enzima clave en el catabolismo del colesterol y la síntesis de ácidos biliares³⁹. Dichos cambios en la homeostasis de lípidos y expresión génica son consistentes con lo que se conoce con respecto a la acción de los ácidos biliares sobre el receptor farnesoide X y LXR, incluyendo los hallazgos de que la activación del receptor farnesoide X por parte de los ácidos biliares causa la inducción del pequeño acompañante heterodímero e inhibición por retroalimentación de la síntesis de ácidos biliares al reducir la expresión de 7 alfa hidroxilasa (CYP7A1)^{40,41}. En cambio, la inhibición reducida de LXR por parte del pequeño socio heterodímero resulta en una biosíntesis reducida de triglicéridos y colesterol⁴² y en la estimulación de la exportación de colesterol desde las células a través de la expresión de los transportadores ABCG5/G8⁴³. Es más, se ha demostrado que la sobreexpresión de ABCG5 y ABCG8 en ratones transgénicos limita la absorción de esteroides y promueve la excreción de esteroides neutros⁴⁴; además, que los ácidos biliares desconjugados preferentemente incrementan la actividad ATPasa de los transportadores ABCG5/G8 encontrados en las membranas apicales de los enterocitos y hepatocitos, limitando la acumulación de colesterol mediante su transporte al lumen intestinal y la bilis⁴⁵.

Los resultados presentes indican que la actividad intraluminal BSH, incrementada en respuesta a la suplementación con *L. reuteri* NCIMB 30242 lleva a un incremento en los ácidos biliares desconjugados, una reducción en la absorción de esteroides no-colesterol y el colesterol sérico, que es consistente con mucho de estas hipótesis. Sin embargo, se debería considerar la posibilidad de que los cambios observados en la absorción del esteroide pueden ser el resultado de la inhibición del transportador C1 tipo 1 de Niemann-Pick o una combinación de los mecanismos reductores de colesterol. Yoon *et al.*⁴⁶ informó que el

Lactobacillus activado por BSH en las células Caco-2 resultó en la sobrerregulación del LXR junto con la expresión elevada de los transportadores AGCG5/G8 y el eflujo incrementado de colesterol, con efectos notables sobre la expresión C1 tipo 1 de Niemann-Pick. En contraste, un estudio realizado por Huang y Zheng⁴⁷ mostró que la cepa de probiótico *L. acidophilus* ATCC 4365 redujo la expresión C1 tipo 1 de Niemann-Pick e inhibió la captación de colesterol micelar en células Caco-2, un efecto al menos parcialmente mediado por LXR.

El fibrinógeno plásmico se redujo significativamente en 14,25% en relación con el placebo, en respuesta a la suplementación con *L. reuteri* NCIMB 30242 durante el período de intervención. Naruszewicz *et al.*⁴⁸ había demostrado previamente que la administración de una bebida de escaramujo que contenía *L. plantarum* 229V redujo las concentraciones plásmicas de IL-6 y fibrinógeno en fumadores. El fibrinógeno es la principal proteína de coagulación en la sangre en masa, contribuye a la viscosidad de la sangre⁴⁹, es una proteína inflamatoria de fase aguda y se ha asociado independientemente con resultados de enfermedad cardiovascular⁵⁰. Los resultados presentes también muestran una reducción significativa en hs-CRP, en respuesta a la suplementación con *L. reuteri* NCIMB 30242, tanto con respecto a los valores de la media geométrica como en la reducción de las categorías de riesgos relativos de los sujetos. Esto contrasta con un estudio reciente realizado por Leber *et al.*⁵¹, que muestra que el *Lactobacillus casei* Shirota incrementó significativamente el hs-CRP en pacientes con síndrome metabólico. El hs-CRP elevado está independientemente asociado con un riesgo incrementado de CAD⁵², diabetes mellitus⁵³, hipertensión⁵⁴, accidente cerebrovascular⁵⁵ y mortalidad⁵⁶, y está cercanamente asociado con fibrinógeno elevado. El fibrinógeno, así como el hs-CRP, está regulado por el IL-6 en los hepatocitos^{57,58}. Es más, se ha informado que los agentes farmacológicos que se prescriben actualmente para tratar CAD, tales como las estatinas⁵⁹, la aspirina⁵⁵ y los β -bloqueadores⁶⁰, reducen el hs-CRP, lo que sugiere que la inflamación reducida contribuye a los efectos beneficiosos de estas medicaciones.

En resumen, este estudio demuestra que las cápsulas de *L. reuteri* NCIMB 30242 reducen significativamente el LDL-C en 11,64% durante 9 semanas. Es más, hubo reducciones significativas en los criterios de valoración secundarios de los lípidos en las semanas 6 y 9, incluyendo LDL-C, TC, apoB-100 y HDL-no C. Las reducciones significativas en los criterios de valoración considerados como factores de riesgo cardiovascular, incluyendo el fibrinógeno y hs-CRP, se vieron al final de la semana 9. Los ácidos biliares desconjugados plásmicos incrementados y los esteroides, campesterol, sitosterol y estigmasterol no-colesterol plásmicos reducidos sugieren un efecto en la absorción de estos conjugados y un mecanismo de acción novedoso para la reducción del colesterol. Estos resultados muestran que el *L. reuteri* NCIMB 30242 se puede utilizar para reducir el LDL-C sérico, probablemente por sus efectos en la absorción del colesterol, e indican su potencial como una terapia adyuvante para el tratamiento de la hipercolesterolemia.

CONFLICTO DE INTERESES

MLJ y SP reconocen un conflicto de intereses en vista de que son cofundadores y accionistas de Micropharma. CJM es empleado y accionista de Micropharma.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a J Lahovský, V Vostinaková, M Svobodová y K Beber por su contribución al estudio. También agradecemos a todos los voluntarios que participaron en el estudio. Este trabajo tuvo el apoyo de Micropharma Limited. MLJ, SP y CJM diseñaron el estudio y prepararon el manuscrito. JL, VV y MS condujeron la investigación. KB y CJM realizaron el análisis estadístico. Todos los autores han leído y aprobado el manuscrito final.

REFERENCIAS

- 1 Muldoon MF, Manuck SB, Matthews KA. Concentraciones para reducción del colesterol y mortalidad - análisis cuantitativo de pruebas de prevención primaria. *BMJ* 1990; **301**: 309-314.
- 2 Ridker PM. Evaluación de los factores novedosos de riesgo cardiovascular: ¿podemos predecir mejor los ataques al corazón? *Ana Med Intern* 1999; **130**: 933-937
- 3 Panel de Expertos NCEP. Tercer informe del panel de expertos del Programa Nacional para la Educación sobre Colesterol (NCEP, por sus siglas en inglés) sobre la detección, evaluación y tratamiento de un alto nivel de colesterol en la sangre en adultos (Panel de Tratamiento para Adultos III), informe final. *Circulación* 2002; **106**: 3143-3421.
- 4 Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer Jr HB, Clark LT, Hunninghake DB *et al*. Implicaciones de pruebas clínicas recientes en los lineamientos del Panel para Tratamiento de Adultos III del Programa Nacional para Educación sobre el Colesterol. *Circulación* 2004; **110**: 227-239.
- 5 Smith Jr. SC, Allen J, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Fonarow GC *et al*. Lineamientos AHA/ACC para la prevención secundaria para pacientes con enfermedad coronaria y otras vasculares arterioescleróticas: actualización 2006: avalados por el Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre. *Circulación* 2006; **113**: 2363-2372.
- 6 Grupo de trabajo FAO/OMS. Informe del grupo de trabajo conjunto FAO/OMS. Lineamientos para la Evaluación de los Probióticos en los Alimentos" 2002, Londres, Ontario, Canadá.
- 7 Kellogg TF, Wostmann BS. Respuesta de ratas libres de gérmenes al colesterol nutricional. *Ava Med Exp Biol* 1969; **3**: 293.
- 8 Wostmann BS, Wiech NL, Kung E. Catabolismo y eliminación del colesterol en ratas libres de gérmenes. *R Inv Lipid* 1966; **7**: 77-82.
- 9 Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Análisis metagenómico funcional y comparativo de la actividad de la hidrolasa de sal biliar en la microbioma intestinal humana. *Proce Acad Naci Cie EE.UU.* 2008; **105**: 13580-13585.
- 10 Kellogg TF, Wostmann BS. Esteroides neutros y ácidos biliares fecales de ratas libres de gérmenes. *R Inv Lipid* 1969; **10**: 495-503.
- 11 Wostmann BS. Ácidos biliares intestinales y absorción de colesterol en la rata libre de gérmenes. *R Nutr* 1973; **103**: 982-990.
- 12 Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A *et al*. Probióticos reductores de colesterol como bioterapéuticos potenciales para enfermedades metabólicas. *Inv. Diabetes Exp* 2012; **2012**: 902917.
- 13 Lepercq P, Relano P, Cayuela C, Juste C. La cepa DN-173 010 de bifidobacterium animalis hidroliza las sales biliares en el tracto gastrointestinal de los cerdos. *R Escan Gastroenterol* 2004; **39**: 1266-1271.
- 14 De Smet I, De Boever P, Verstraete W. Reducción de colesterol en cerdos mediante la actividad mejorada de la hidrolasa de sal biliar bacteriana. *R Br Nutr* 1998; **79**: 185-194.
- 15 Agerbaek M, Gerdes LU, Richelsen B. Efecto hipocolesterolemico de un nuevo producto de leche fermentada en hombres sanos de mediana edad. *R Eur Nutr Clin* 1995; **49**: 346-352.
- 16 Agerholm-Larsen L, Raben A, Haulrik N, Hansen AS, Manders M, Astrup A *et al*. Efecto de la ingesta durante 8 semanas de productos lácteos probióticos sobre los factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares. *R Eur Nutr Clin* 2000; **54**: 288-297.
- 17 Bertolami MC, Faludi AA, Batlouni M. Evaluación de los efectos de un nuevo producto de leche fermentada (Gaió) sobre la hipercolesterolemia primaria. *R Eur Nutr Clin* 1999; **53**: 97-101.
- 18 Jones ML, Martoni CJ, Parent M, Prakash S. Eficacia en la reducción del colesterol de una formulación de yogur del *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado activado por hidrolasa de sal biliar en adultos hipercolesterolemicos. *R Br Nutr* 2012; **107**: 1505-1513.
- 19 Schaafsma G, Meuling WJ, van Dokkum W, Bouley C. Efectos de un producto lácteo, fermentado por *Lactobacillus acidophilus*, con fructo-oligosacáridos añadidos, en los lípidos sanguíneos de voluntarios humanos masculinos. *R Eur Nutr Clin* 1998; **52**: 436-440.
- 20 Richelsen B, Kristensen K, Pedersen SB. Efecto a largo plazo (6 meses) de un nuevo producto lácteo fermentado sobre el nivel de lipoproteínas plásmicas - estudio controlado con placebo y doble ciego. *R Eur Nutr Clin* 1996; **50**: 811-815.
- 21 Lin SY, Ayres JW, Winkler Jr. W, Sandine WE. Efectos del lactobacillus en el colesterol: resultados *in vitro* e *in vivo*. *R Cie Láctea* 1989; **72**: 2885-2899.
- 22 Lewis SJ, Burmeister S. Estudio doble ciego controlado con placebo de los efectos del *Lactobacillus acidophilus* en los lípidos plásmicos. *R Eur Nutr Clin* 2005; **59**: 776-780.
- 23 Greany KA, Bonorden MJ, Hamilton-Reeves JM, McMullen MH, Wangen KE, Phipps WR *et al*. Las cápsulas de probióticos no reducen los lípidos plásmicos en mujeres y hombres jóvenes. *R Eur Nutr Clin* 2008; **62**: 232-237.
- 24 de Roos NM, Schouten G, Katan MB. El yogur enriquecido con *Lactobacillus acidophilus* no reduce los lípidos sanguíneos en hombres y mujeres saludables con niveles de colesterol sérico normal a límite alto. *R Eur Nutr Clin* 1999; **53**: 277-280.
- 25 Andersson H, Bosaeus I, Ellegård L, Grahn E, Tidehag P, Hallmans G *et al*. Efectos de la leche baja en grasas y la leche fermentada baja en grasas sobre la absorción y excreción de colesterol en sujetos con ileostomía. *R Eur Nutr Clin* 1995; **49**: 274-281.

- 26 Ooi LG, Ahmad R, Yuen KH, Liong MT. El lactobacillus acidophilus CHO-220 y la inulina redujeron el colesterol total plásmico y el colesterol de lipoproteína de baja densidad mediante la alteración de los transportadores de lípidos. *R Cie Láctea* 2010; **93**: 5048–5058.
- 27 Jones ML, Martoni CJ, Tamber S, Parent M, Prakash S. Evaluación de la seguridad y tolerancia del *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación en yogur: Estudio con distribución aleatoria, controlado con placebo, doble ciego. *Toxicol Quím Alimentos* 2012; **50**: 2216–2223.
- 28 Jones ML, Martoni CJ, Pietro ED, Simon RR, Prakash S. Evaluación de la seguridad y tolerancia clínica de una cápsula de suplemento de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242. *Regul Farmacol Toxicol* 2012; **63**: 313–320.
- 29 Scherer M, Gnewuch C, Schmitz G, Liebisch G. Cuantificación rápida de ácidos biliares y sus compuestos en suero mediante cromatografía líquida – espectrometría de masas en tándem. *R Cromatogr B Tecnol Analit Cie Biomed Vida* 2009; **877**: 3920–3925.
- 30 Guo Z, Liu XM, Zhang QX, Shen Z, Tian FW, Zhang H *et al*. Influencia del consumo de probióticos en el perfil de lípidos plásmicos: metaanálisis de pruebas con distribución aleatoria y controladas. *Metab Nutr Enf Cardiovasc* 2011; **21**: 844–850.
- 31 Pereira DI, Gibson GR. Efectos del consumo de probióticos y prebióticos en los niveles de lípidos séricos en seres humanos. *Rev Crit Biol Mol Bioquím* 2002; **37**: 259–281.
- 32 Branton WB, Jones ML, Tomaro-Duchesneau C, Martoni CJ, Prakash S. Caracterización *in vitro* y seguridad de la cepa probiótica *Lactobacillus reuteri cardiovascularis* NCIMB 30242. *R Int Probiótico Prebiótico* 2011; **6**: 1–12.
- 33 Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. Los fitosteroles y los precursores de colesterol en suero reflejan la absorción y síntesis del colesterol en voluntarios de una población masculina seleccionada aleatoriamente. *R Am Epidemiol* 1990; **131**: 20–31.
- 34 Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ. El rol de los esteroides no-colesterol séricos como marcadores suplentes de la síntesis y absorción absoluta de colesterol. *Metab Nutr Enf Cardiovasc* 2011; **21**: 765–769.
- 35 Sudhop T, Lütjohann D, Kodal A, Igel M, Tribble DL, Shah S *et al*. Inhibición de la absorción intestinal del colesterol mediante ezetimiba en seres humanos. *Circulación* 2002; **106**: 1943–1948.
- 36 Jakulj L, Vissers MN, Groen AK, Hutten BA, Lütjohann D, Veltri EP *et al*. Absorción de colesterol en la línea de base y respuesta a la terapia con ezetimiba / simvastatin: análisis *post-hoc* de la prueba ENHANCE. *R Inv Lipid* 2010; **51**: 755–762.
- 37 Miettinen TA, Gylling H. Síntesis y marcadores de absorción del colesterol en el suero y las lipoproteínas durante un tratamiento con una fuerte dosis de estatina. *R Eur Invest Clín* 2003; **33**: 976–982.
- 38 Chan YM, Varady KA, Lin Y, Trautwein E, Mensink RP, Plat J *et al*. Concentraciones plásmicas de fitosteroles: fisiología y relación con enfermedad coronaria. *Rev Nutr* 2006; **64**: 385–402.
- 39 Jeun J, Kim S, Cho SY, Jun HJ, Park HJ, Seo JG *et al*. Efectos hipocolesterolemicos del *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 por excreción incrementada de ácido biliar en ratones C57BL/6. *Nutrición* 2010; **26**: 321–330.
- 40 Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Focalización en la señalización del ácido biliar para las enfermedades metabólicas. *Rev Nac Descub Medi* 2008; **7**: 678–693.
- 41 Chiang JY. Ácidos biliares: regulación de la síntesis. *R Inv Lipid* 2009; **50**: 1955–1966.
- 42 Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA *et al*. Los ácidos biliares reducen los niveles de triglicéridos mediante una vía que involucra a FXR, SHP y SREBP-1c. *R Invest Clín* 2004; **113**: 1408–1418.
- 43 Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Equipo del gen receptor X del hígado: nuevos actores potenciales en arterioesclerosis. *Med Nac* 2002; **8**: 1243–1248.
- 44 Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC *et al*. La sobreexpresión de ABCG5 y ABCG8 promueve la secreción biliar del colesterol y reduce la absorción fraccionaria del colesterol nutricional. *R Invest Clín* 2002; **110**: 671–680.
- 45 Johnson BJ, Lee JY, Pickert A, Urbatsch IL. Los ácidos biliares estimulan la hidrólisis de ATP en el transportador purificado de colesterol ABCG5/G8. *Bioquímica* 2010; **49**: 3403–3411.
- 46 Yoon HS, Ju JH, Kim H, Lee J, Park HJ, Ji Y *et al*. El *Lactobacillus rhamnosus* BFE 5264 y el *Lactobacillus plantarum* NR74 promueven la excreción de colesterol a través de la sobrerregulación de ABCG5/8 en células caco-2. *Probióticos y Proteínas Antimicrobianas* 2011; **3**: 194–203.
- 47 Huang Y, Zheng Y. El probiótico *Lactobacillus acidophilus* reduce la absorción de colesterol a través de la subregulación de C1-como 1 de Niemann-Pick en células Caco-2. *R Br Nutr* 2010; **103**: 473–478.
- 48 Naruszewicz M, Johansson ML, Zapolska-Downar D, Bukowska H. Efecto del *Lactobacillus plantarum* 299v en los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en fumadores. *R Am Nutr Clín* 2002; **76**: 1249–1255.
- 49 Maple-Brown LJ, Cunningham J, Nandi N, Hodge A, O’Dea K. Fibrinógeno y factores asociados de riesgo en una población de alto riesgo: indígenas australianos urbanos. Estudio DRUID. *Diabetol Cardiovasc* 2010; **9**: 69.
- 50 Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, Kostis JB *et al*. Nivel de fibrinógeno plásmico y riesgo de enfermedades cardiovasculares mayores y mortalidad no vascular: metaanálisis de un participante individual. *JAMA* 2005; **294**: 1799–1809.
- 51 Leber B, Tripolt NJ, Blattl D, Eder M, Wascher TC, Pieber TR *et al*. La influencia de la suplementación con probióticos en la permeabilidad intestinal en pacientes con síndrome metabólico: estudio piloto abierto y aleatorizado. *R Eur Nutr Clín* 2012; publicación en línea anterior a la impresión, 8 de agosto de 2012; doi:10.1038/ejcn.2012.103.
- 52 Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A *et al*. Proteína C-reactiva y otros marcadores circulantes de inflamación en la predicción de enfermedad coronaria. *R Med N Ingl* 2004; **350**: 1387–1397.
- 53 Dehghan A, Kardys I, de Maat MP, Uitterlinden AG, Sijbrands EJ, Bootsma AH *et al*. Variación genética, niveles de proteína C-reactiva e incidencia de diabetes. *Diabetes* 2007; **56**: 872–878.
- 54 Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. Proteína C-reactiva y riesgo de desarrollar hipertensión. *JAMA* 2003; **290**: 2945–2951.
- 55 Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflamación, aspirina y el riesgo de enfermedad cardiovascular en hombres aparentemente sanos. *R Med N Ingl* 1997; **336**: 973–979.

-
- ⁵⁶ Hindorff LA, Rice KM, Lange LA, Diehr P, Halder I, Walston J *et al*. Variantes comunes en el gen CRP en relación con la longevidad y la mortalidad por causas específicas en adultos mayores. Estudio de Salud Cardiovascular. *Arteriosclerosis* 2008; **197**: 922–930.
- ⁵⁷ Erlinger TP, Platz EA, Rifai N, Helzlsouer KJ. Proteína C-reactiva y riesgo de cáncer colorectal incidental. *JAMA* 2004; **291**: 585–590.
- ⁵⁸ Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Biosíntesis regulada de novo de fibrinógeno en células epiteliales extrahepáticas en respuesta a inflamación. *Tromb Hemost* 2004; **92**: 234–243.
- ⁵⁹ Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, Lindeman J, de Maat MM, Szalai AJ *et al*. Evidencia sobre la actividad antiinflamatoria de las estatinas y los activadores PPARalfa en ratones transgénicos con proteína humana C-reactiva *in vivo* y en hepatocitos humanos cultivados *in vitro*. *Sangre* 2004; **103**: 4188–4194.
- ⁶⁰ Jenkins NP, Keevil BG, Hutchinson IV, Brooks NH. Los betabloqueadores están asociados con concentraciones más bajas de proteína C-reactiva en pacientes con enfermedad coronaria. *R Am Med* 2002; **112**: 269–274.

El documento en el sitio web de la Revista Europea de Nutrición Clínica tiene adjunta información suplementaria (<http://www.nature.com/ejcn>)