

Tesis Doctoral

**Efectos antioxidantes del aceite de
oliva y de sus compuestos fenólicos**

Montserrat Fitó Colomer

2003



**Departament de Medicina de la Universitat
Autònoma de Barcelona
Programa de Doctorado en la Universitat
Autònoma de Barcelona**

Maria Isabel Covas Planells, Doctora en Ciencias Biológicas, Licenciada en Farmacia y Especialista en Bioquímica Clínica y Joan Carles Pedro-Botet Montoya, Catedrático de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Hacen constar,

Que la tesis Doctoral titulada **EFECTOS ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE OLIVA Y DE SUS COMPUESTOS FENÓLICOS**, presentada por Montserrat Fitó Colomer, dirigida por la Dra Maria Isabel Covas Planells siendo el tutor de la misma el Profesor Dr. Joan Carles Pedro-Botet Montoya, representa una gran aportación al tema y reúne los méritos suficientes para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste donde proceda, firmamos la presente en Barcelona, 21 de febrero de 2003.

Firma de la directora de tesis

Maria Isabel Covas Planells

Firma del tutor de tesis

Joan Carles Pedro-Botet Montoya

**Als meus pares,
amb tot el meu carinyo, afecte
i admiració**

Acrónimos

ADN, ácido desoxirribonucleico

AGMI, ácidos grasos monoinsaturados

AGPI, ácidos grasos poliinsaturados

AGS, ácidos grasos saturados

CF, compuestos fenólicos

CML, células musculares lisas

DC, dienos conjugados

EAC, equivalentes de ácido cafeico

EC, enfermedad coronaria

GSH-Px, glutathion peroxidasa

GSSG, glutathion oxidado

GSSG-Rd, glutathion reductasa

GSH-S-T, glutathion-S-transferasa

HDL, lipoproteínas de alta densidad

HPLC-DAD, cromatografía líquida de alta precisión-detector diode array

ICAM-1, molécula 1 de adhesión intercelular

ICAM-2, molécula 2 de adhesión intercelular

ICAM-3, molécula 3 de adhesión intercelular

IDL, lipoproteína de densidad intermedia

LDL, lipoproteínas de alta densidad

LDLox, lipoproteínas de alta densidad oxidadas

MCP-1, proteína-1 quimiotáctica para monocitos

NF-kB, factor nuclear kappa B

ON, óxido nítrico

QM, quilomicrones

SOD, superóxido dismutasa

TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

VLDL, lipoproteínas de baja densidad

VCAM-1, molécula 1 de adhesión vascular

Indice

▪ Objetivos	1
▪ Hipótesis de trabajo	3
▪ Introducción	5
1. Radicales libres generados en el organismo humano	5
1.1. <i>Equilibrio entre especies reactivas y mecanismo antioxidantes</i>	6
1.2. <i>Determinación del estado oxidativo/antioxidativo</i>	9
2. Efectos de las especies reactivas	11
2.1. <i>Oxidación proteica</i>	11
2.2. <i>Oxidación del Ácido Desoxirribonucleico</i>	11
2.3. <i>Peroxidación lipídica</i>	11
3. Metabolismo de la lipoproteínas	12
4. Hipótesis oxidativa de la Enfermedad Arteriosclerótica:	
Papel de la LDL oxidada	14
4.1. <i>Oxidación de las lipoproteínas de baja densidad</i>	14
4.2. <i>Activación de monocitos a macrófagos</i>	16
4.3. <i>Captación de LDL por macrófagos y células musculares lisas</i> <i>Formación de la estría grasa</i>	16
4.4. <i>Papel del endotelio vascular en la patogénesis de la enfermedad</i> <i>arteriosclerótica</i>	16
4.5. <i>Proliferación de las células musculares lisas</i>	17
4.6. <i>Regulación de la expresión genética como respuesta de la lesión</i> <i>arteriosclerótica</i>	18
5. Papel de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en la aterogénesis	18
6. Factores de riesgo de la Enfermedad Coronaria	19
7. Papel de la dieta en la salud	20
7.1. <i>Paradojas del Sur de Europa: Factores protectores de la Enfermedad</i> <i>Cardiovascular</i>	20

7.2. <i>Dieta tipo Mediterránea como factor protector de la Enfermedad</i>	
<i>Cardiovascular</i>	21
8. Aceite de oliva. Composición y tipos de aceite de oliva	23
8.1. <i>Composición del aceite de oliva</i>	24
8.2. <i>Tipos de aceites de oliva existentes en el mercado</i>	24
9. Mecanismos por los que el consumo de aceite de oliva es beneficioso para la salud	25
9.1. <i>Papel de los ácidos grasos en la dieta. Beneficio de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados respecto a una rica en ácidos grasos saturados y/o poliinsaturados</i>	25
9.2. <i>Antioxidantes presentes en el aceite de oliva</i>	27
9.2.1. <i>Compuestos fenólicos del aceite de oliva</i>	29
10. Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en humanos	30
11. Efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos del aceite de oliva	31
12. Otras actividades biológicas de los compuestos fenólicos del aceite de oliva	32

▪ **Método**

1. Proyecto de investigación en el que se enmarca esta memoria de tesis	33
2. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y sus compuestos fenólicos	34

▪ Resumen global de los resultados	39
---	----

▪ **Artículos cuyo compendio constituye esta Tesis Doctoral**

Publicación 1:

Fitó Montserrat, Covas María Isabel, Lamuela-Raventós Rosa M., Vila Joan, De la Torre-Boronat Carmen, Marrugat Jaume.

ACEITE DE OLIVA E INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

Medicina Clínica 2000; 115: 166-9.

Publicación 2:

Fitó Montserrat, Covas María Isabel, Lamuela-Raventós Rosa M., Vila Joan, Torrents Jaume, De la Torre-Boronat Carmen, Marrugat Jaume.

PROTECTIVE EFFECT OF OLIVE OIL AND ITS PHENOLIC COMPOUNDS
AGAINST LOW DENSITY LIPOPROTEIN OXIDATION.

Lipids 2000; 35 (6): 633-8.

Publicación 3:

Lamuela-Raventós Rosa M, Covas María Isabel, Fitó Montserrat, Marrugat Jaume, M. De la Torre-Boronat Carmen.

DETECTION OF DIETARY ANTIOXIDANT PHENOLIC COMPOUNDS IN
HUMAN LOW DENSITY LIPOPROTEINS

Clinical Chemistry 1999; 45 (10): 1870-2.

Publicación 4:

María-Isabel Covas, Fitó Montserrat, Lamuela-Raventós Rosa M., Sebastià Neus, De la Torre-Boronat Carmen, Marrugat Jaume.

VIRGIN OLIVE OIL PHENOLIC COMPOUNDS: BINDING TO HUMAN LDL AND
EFFECT ON LDL OXIDATION.

Int J Pharmacol Res 2000; XX (3/4): 49-54.

Publicación 5:

Fitó Montserrat, Gimeno Eva, Covas María Isabel, Miró Elisabet, López-Sabater Carmen, Farré Magí, De la Torre Rafael, Marrugat Jaume.

POSTPRANDIAL AND SHORT-TERM EFFECTS OF DIETARY VIRGIN OLIVE
OIL ON OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS.

Lipids 2002; 37: 245-251.

Publicación 6:

Marrugat Jaume, Covas Maria Isabel, Fitó Montserrat, Schroeder Helmut, Miró-Casas Elisabet, De la Torre Rafael, Farré-Albaladejo Magí.

ANTIOXIDANT EFFECT OF OLIVE OIL PHENOLIC CONTENT IN A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND CONTROLLED CLINICAL TRIAL.

Sometido para publicación.

▪ Discusión de los resultados	43
1. Influencia de los distintos componentes del aceite de oliva en la protección de la LDL a la oxidación	43
2. Efectos de los extractos fenólicos de aceite de oliva sobre la protección de la LDL a la oxidación	45
3. Detección de compuestos fenólicos en partículas de LDL humanas	46
3. Estudios in vitro sobre la capacidad de unión de los compuestos fenólicos del aceite de oliva a la LDL humana	47
5. Estudios de los efectos antioxidantes del aceite de oliva en humanos	49
5.1. <i>Efectos sobre el estrés oxidativo postprandial y a las 24 horas de la ingestión de aceite de oliva virgen</i>	49
5.1.1. Estrés oxidativo postprandial de la ingestión de aceite de oliva virgen.....	50
5.1.2. Efectos sobre el estrés oxidativo a las 24 horas de la ingestión de aceite de oliva virgen	52
5.2. <i>Efectos a corto plazo de la ingestión de aceite de oliva virgen sobre el estrés oxidativo</i>	52
5.3. Efectos a largo plazo de la ingestión de aceites de oliva con diferente contenido fenólico sobre la protección de la LDL a la oxidación.....	54
5.3.1. Antecedentes sobre el estudio de los efectos antioxidantes de un consumo agudo y mantenido de aceite de oliva en humanos.....	54
5.3.2. <i>Efectos del consumo de aceites de oliva con diferente contenido fenólico sobre la peroxidación lipídica</i>	60

5.3.3. <i>Efectos del consumo de aceites de oliva con diferente contenido fenólico sobre el perfil lipídico, lipoproteico y la glicemia</i>	61
5.3.4. <i>Características del estudio</i>	62
▪ Futuras líneas de investigación	63
▪ Conclusiones	65
▪ Referencias	67
▪ Anexos	91

1. Otras publicaciones:

Anexo 1.1:

Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Marrugat Jaume, Miró Elisabet, Farré Magí, De la Torre Rafael, Gimeno Eva, López-Sabater María-Carmen, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, De la Torre-Boronat Maria-Carme.

FACTEURS PROTECTEURS DE LA MALADIE CORONARIËNNE: EFFECT ANTIOXYDANT DE L'HUILE D'OLIVE (review).

Therapie 2001; 56: 607-611.

Anexo 1.2:

Fitó Montserrat, Weinbrenner Tanja, Covas Maria-Isabel.

OLIVE OIL ANTIOXIDANT ACTION: NEW FINDINGS.

En: Research Advances in Lipids (en prensa).

Anexo 1.3:

Elisabet, Farré Magí, Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, de la Torre Rafael.

TYROSOL BIOAVAILABILITY IN HUMANS AFTER VIRGIN OLIVE OIL INGESTION.

Clin Chem 2001; 47: 341-3.

Anexo 1.4:

Miró-Casas Elisabet, Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Farré-Albaladejo Magí, Marrugat Jaume, de la Torre Rafael.

TYROSOL AND HYDROXYTYROSOL ARE ABSORBED FROM MODERATE AND SUSTAINED DOSES OF VIRGIN OLIVE OIL IN HUMANS.

Eur J Clin Nutr 2002; 56: 1-5.

2. Protocolo del estudio sobre los efectos del consumo de aceite de oliva virgen en la fase postprandial y a corto plazo en humanos.....	93
3. Protocolo del ensayo clínico randomizado cruzado y a doble ciego, sobre los efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en humanos.....	95
4. Encuesta dietética realizada en los ensayos clínicos. Registro dietético.....	99
4. Encuesta de actividad física realizada en los ensayos clínicos. Cuestionario de actividad física de Minnesota.....	101



OBJETIVOS

▪ **Objetivos**

El objetivo de esta tesis es **determinar la capacidad protectora del aceite de oliva y de los compuestos fenólicos del aceite de oliva frente el estrés oxidativo.**

Para alcanzar este objetivo se plantearon diversos objetivos parciales:

1. Análisis de la capacidad protectora in vitro de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la oxidación de la LDL.

1.1. *Influencia de los distintos componentes del aceite de oliva en la protección de la LDL a la oxidación*

1.2. *Efectos de los extractos fenólicos de aceite de oliva sobre la protección de la LDL a la oxidación*

2. Análisis de la capacidad de unión a la LDL de los compuestos fenólicos en general y de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en particular

2.1. *Capacidad de los compuestos fenólicos de la dieta de unirse a las LDL humanas in vivo.*

2.2. *Estudios in vitro sobre la capacidad de unión de los compuestos fenólicos del aceite de oliva a la LDL humana.*

3. Evaluación del efecto de los compuestos fenólicos sobre la oxidación de la LDL en humanos

3.1. *Efectos sobre el estrés oxidativo postprandial de la ingestión aguda de aceite de oliva virgen*

3.2. *Efectos a corto plazo de la ingestión regular y moderada durante una semana de aceite de oliva virgen sobre el estrés oxidativo*

3.3. *Efectos a largo plazo de la ingestión de aceites de oliva con diferente contenido fenólico sobre la protección de la LDL a la oxidación.*



HIPÓTESIS DE TRABAJO

▪ **Hipótesis de trabajo**

1. El contenido total de compuestos fenólicos del aceite de oliva posee una capacidad protectora de la oxidación de la LDL. Dicha protección es independiente y diferencial respecto a los otros componentes del aceite de oliva.
2. Dado que los compuestos fenólicos del aceite de oliva son biodisponibles, podrían unirse a las partículas humanas de LDL.
3. La ingestión de aceite de oliva virgen podría ejercer un efecto protector frente al estrés oxidativo postprandial.
4. El consumo moderado y regular de aceite de oliva virgen, a dosis cercanas a las de un consumo habitual en nuestro medio, puede ejercer efectos beneficiosos sobre el balance oxidación/antioxidación.
5. Los efectos beneficiosos del consumo moderado y regular de aceite de oliva sobre la oxidación de la LDL estarían asociados al contenido fenólico del aceite de oliva.

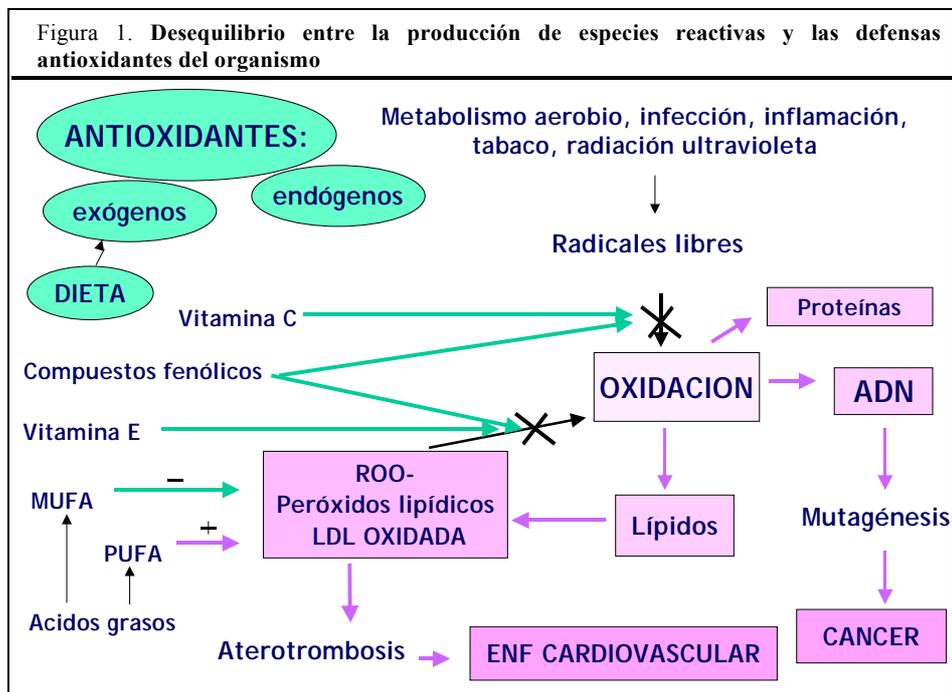


INTRODUCCIÓN

▪ Introducción

1. Radicales libres generados en el organismo humano

Un radical libre es una especie química definida que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable y fugaz con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena ^{1 2}. Una vez generados, los radicales libres aparean rápidamente el electrón desapareado uniéndose a otro radical libre o, cediendo o arrancando un electrón a una estructura molecular adyacente no radicalaria, con el fin de estabilizarse. La vida aeróbica precisa oxígeno para oxidar los nutrientes provenientes de la dieta y obtener así energía. La reducción parcial de la molécula de oxígeno puede generar especies reactivas de oxígeno como el hidróperóxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales libres, superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidróperóxilo (HO_2^{\cdot}) e hidroxilo ($\cdot OH$) ^{3 4}. Los óxidos de nitrógeno, óxido nítrico ($\cdot ON$) y dióxido nítrico (NO_2^{\cdot}), son asimismo radicales libres. El óxido nítrico tiene especial interés por ser sintetizado por las células endoteliales como factor vasodilatador. Cuando el óxido nítrico reacciona con el superóxido se produce el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), con un gran poder oxidante ⁴. La definición de radical libre también incluye los metales de transición cuando éstos tienen uno o más electrones desapareados ⁴. A concentraciones moderadas y dada su corta existencia, los radicales libres pueden desempeñar un importante papel como mediadores en la regulación de varios procesos fisiológicos ^{5 6}, como mediadores de los efectos del factor de crecimiento derivado de las plaquetas sobre las células musculares lisas ⁷, activadores de la adenilato ciclasa ⁸ o vasodilatador como en el caso del óxido nítrico (ON) ⁹. Pero a concentraciones elevadas, pueden dañar la mayoría de los constituyentes celulares y son notablemente peligrosos para los organismos vivos ⁶. Los radicales libres se sintetizan fisiológicamente en el organismo humano como parte del metabolismo energético, pero la producción se incrementa frente a diferentes agresiones como infecciones, ejercicio físico extremo, dietas desequilibradas, tóxicos alimentarios y contaminantes ambientales entre otros. Los radicales libres son capaces de dañar (de forma reversible o irreversiblemente) todo tipo de compuestos bioquímicos, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos libres, lípidos, carbohidratos y macromoléculas del tejido conectivo (figura 1) ¹⁰. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son especialmente sensibles, dentro del grupo de los lípidos, al ataque de los radicales libres ¹¹. Estos radicales libres pueden alterar la actividad celular, tanto a nivel de funciones de membrana, del metabolismo o de expresión génica ¹⁰.



1.1. Equilibrio entre especies reactivas y mecanismo antioxidantes

Los efectos dañinos de los radicales libres están controlados en el organismo humano mediante un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobulina, hemopexina, ácido úrico, bilirrubina, albúmina) y exógeno a través de la dieta [vitaminas E y C, carotenoides, selenio y dentro del grupo de compuestos fenólicos (CF), se encuentran los ácidos fenólicos, fenoles no carboxílicos y flavonoides] (figura 1) ⁴. Según su modo de actuación en el organismo los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios (tabla 1).

Muchos compuestos antioxidantes actúan por un único mecanismo, pero otros como por ejemplo los CF pueden tener acciones combinadas ^{13 14}. Los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilos, formándose un puente de hidrógeno entre dos grupos cercanos. El grado de actividad de los CF y de otros muchos antioxidantes, está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula ^{15 16}. Cabe destacar también que se ha descrito un sinergismo entre las distintas moléculas antioxidantes *in vitro* ¹⁷ e *in vivo* ¹⁸.

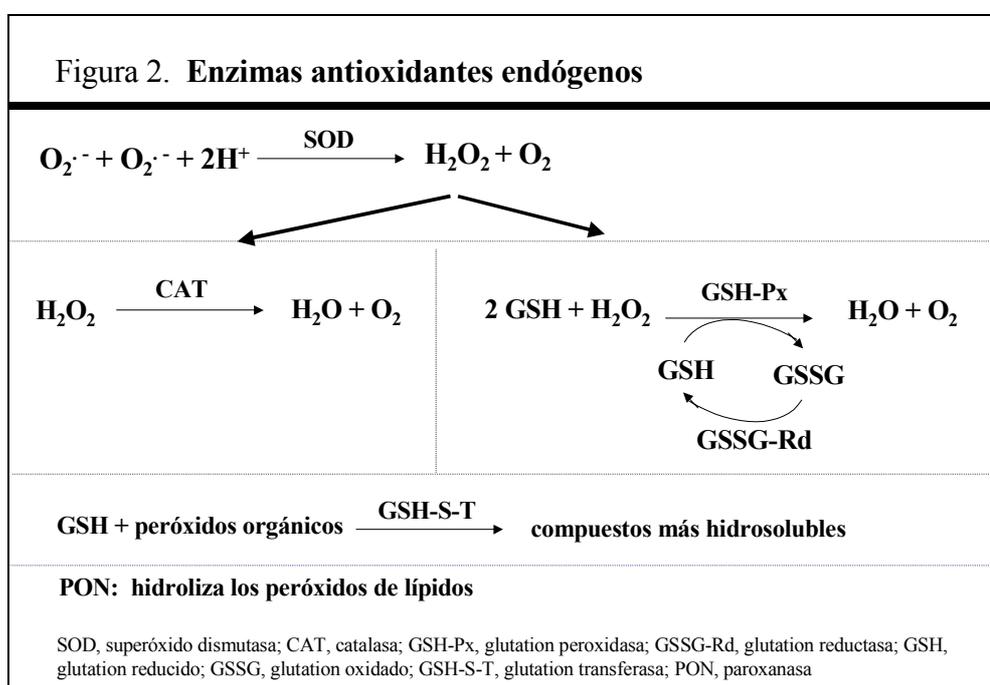
Tabla 1. Clasificación de los compuestos antioxidantes según su modo de actuación

Primarios:	<i>impiden la formación de radicales libres (quelantes de metales de transición)</i>
Secundarios:	<i>interrumpen la reacción de propagación por inactivación (como el alfa-tocoferol y el ácido ascórbico) o desplazan a las especies reactivas de oxígeno (como el ácido ascórbico, carotenoides, glutathion y la mayoría de enzimas antioxidantes)</i>
Terciarios:	<i>reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que se han estropeado</i>

Fuente: obtenida de las referencias ¹²

Entre los componentes del sistema antioxidante endógeno destacan las enzimas antioxidantes. En la figura 2 están representadas las distintas vías metabólicas de acción de estas enzimas antioxidantes. La paroxanasa es una enzima extracelular específica de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se encuentra asociada a la apolipoproteína-A1 ¹⁹; Esta enzima es capaz de hidrolizar los peróxidos lipídicos y destruir las moléculas proinflamatorias producidas por la inflamación de las lipoproteínas de alta densidad (LDL) ¹⁹. La concentración de la paroxanasa aumenta de forma masiva en las placas de ateroma, posiblemente en respuesta al aumento del estrés oxidativo ²⁰. Las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa (SOD) y glutathion peroxidasa (GSH-Px) están consideradas como una de las defensas antioxidantes endógenas más importantes del organismo frente a la producción de radicales libres ^{21 4}. En los mamíferos existen 3 isoenzimas de SOD, 2 intracelulares (CuZn-SOD citosólica y Mn-SOD mitocondrial) y una extracelular. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido (O_2^-) a H_2O_2 . El H_2O_2 es desactivado por la catalasa así como por la GSH-Px, que oxida el glutathion (GSH), formándose H_2O más O_2 . Asimismo la GSH-Px, cuya actividad es selenio dependiente, convierte los hidroperóxidos formados por los radicales libres en alcoholes no tóxicos ⁴. La isoenzima glutathion-S-transferasa (GSH-S-T) es selenio no dependiente, a diferencia de la GSH-Px, y participa en la biotransformación de muchos compuestos ²²; La GSH-S-T puede catalizar la conjugación del GSH con una gran variedad de peróxidos orgánicos (los lipoperóxidos inclusive) formándose compuestos más hidrosolubles ²². La glutathion reductasa (GSSG-Rd) tiene la función de regenerar el glutathion oxidado (GSSG). Las actividades de las enzimas antioxidantes dependen del equilibrio entre su consumo o inactivación, y su inducción. La inducción mantenida de enzimas antioxidantes representaría un factor protector frente a la generación de radicales libres ²³.

Así el incremento de actividad de CuZn-SOD y GSH-Px se considera uno de los efectos beneficiosos del preconditionamiento isquémico sobre el miocardio ²⁴. Por otra parte, se han descrito grados de actividad de SOD y GSH-Px bajos, en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo incluyendo la EC (enfermedad coronaria) ²⁵, diabetes mellitus ²⁶, neoplasias ²⁷, enfermedades glomerulares renales ²⁸ y enfermedades cerebrales asociadas al envejecimiento ²⁹. La actividad de estas enzimas está siendo investigada en la actualidad como posible marcador biológico de diversas patologías como la aterosclerosis ³⁰.



Los posibles efectos dañinos de las moléculas reactivas de oxígeno, nitrógeno, hierro y cobre, son controlados por la barrera antioxidante orgánica. No obstante el estrés oxidativo surge fruto del desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo ⁴ (figura 1). Los radicales libres se han asociado, a multitud de procesos clínicos (lesiones inflamatorias, lesiones por tóxicos y radiaciones, sobrecarga de hierro, enfermedades autoinmunes, deficiencias nutricionales, diabetes, aterosclerosis, enfisema pulmonar, artritis reumatoide, enfermedad de Parkinson, demencia senil, amiloidosis, envejecimiento y neoplasias) ^{10 31 32}.

1.2. Determinación del estado oxidativo/antioxidativo

Actualmente se dispone de una amplia gama de métodos de laboratorio para determinar el estado oxidativo/antioxidativo. Entre otros se han propuesto como biomarcadores del estrés oxidativo, la determinación de equivalentes de malondialdeído, concentración de compuestos antioxidantes, relación entre el glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG ratio), poder antioxidante según la reducción del ión férrico, actividad de los enzimas antioxidantes, marcadores de la oxidación proteica, del ácido desoxirribonucleico (DNA) y, por último, indicadores específicos de la peroxidación lipídica. En la tabla 2 se presentan algunos de los marcadores de estrés oxidativo más utilizados.

Tabla 2. **Marcadores de estrés oxidativo**

Determinación	Método de Laboratorio	
GSH-Px	enzimático (Plagia & Valentine)	Se usa el hidroperóxido de cumeno como oxidante. Se mide la disminución de la abs a 340nm (NADPH)
GSSG-Rd	enzimático	Se mide la disminución de la abs a 340nm (NADPH)
SOD	enzimático (McCord & Fridovich)	Se mide la inhibición de la reducción del INT
GSH/GSSG	HPLC	
Alfa-tocoferol	HPLC	
Beta-caroteno	HPLC	
Compuestos fenólicos	GC-MS/HPLC	

GSH-Px, glutatión peroxidasa; GSSG-Rd, glutatión reductasa; SOD, superóxido dismutasa; GSH, glutatión reduct; HPLC, cromatografía líquida de alta precisión; GC-MS, cromatografía de gases- espectrometría de masas; INT, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride

Fuente: obtenida de la referencia ⁴

Dentro de las técnicas disponibles para la determinación de la oxidación lipídica (tabla 3), existen unos métodos directos y indirectos ³³. Durante mucho tiempo la resistencia de la LDL a la oxidación mediante la monitorización de la formación de DC (dienos conjugados) espectrofotométricamente, ha sido el método más ampliamente aceptado a pesar de ser una medida indirecta de la peroxidación lipídica ³⁴. Se dispone además de técnicas de enzimo-inmunoensayo para la determinación de anticuerpos anti LDL oxidada. Por último cabe destacar como métodos analíticos directos de la

lipoperoxidación la determinación de F₂-isoprostanos (compuestos derivados de la lipoperoxidación del ácido araquidónico), lipoperóxidos e hidroperóxidos, aldehídos, oxisteroles (productos derivados de la oxidación del colesterol) y LDL oxidada mediante anticuerpos contra la apoproteína B oxidada.

Tabla 3. Marcadores de lipoperoxidación

Marcador de:	Método de Laboratorio	
LPO/aldehidos	GC-MS	Extracción, separación por CG, identificación por MS
LPO	GSH-Px	Adición de GSSG-Rd y NADPH para recuperar GSH, la disminución del NADPH es un marcador de LPO
Aldehidos	Fluorómetro	Aldehídos reaccionan con grupos amino, dando bases Schiff (-N=C=C=N-);430nm (luz emisión), 360nm (luz excitación)
Aldehidos	GC-MS, HPLC, anticuerpos	Uso de anticuerpos para determinar proteínas modificadas por productos de la lipoperoxidación
TBARS	Test TBA	Incubar TBA y suero a 100°C, leer aductos TBA-MDA a 532nm (espectrofotómetro) o 553nm (fluorómetro).
Dienos conjugados	Espectrofotómetro (UV)	Oxidación de AGI produce la formación de DC, que se puede detectar a 234nm.
Ac anti-LDL oxidada	EIA	ELISA: LDL oxidada con cobre ligada a la placa
LDL oxidada	EIA	ELISA: Ac anti epítomos de ApoB oxidados ligados ala placa
Pérdida de AGI	CG o HPLC (análisis de AG)	Util como marcador de lipoperoxidación inducida
Pentano, etano, isopreno	CG	Análisis de gases formados durante la lipoperoxidación (control riguroso)
Oxisteroles	GC-MS	Marcadores de aterogénesis y reguladores de la homeostasis del colesterol
F ₂ -isoprostanos	GC-MS, HPLC, EIA	Isómeros de prostaglandinas producidos en la peroxidación de ácido araquidónico (formación no enzimática)
RL inertes	Resonancia de spin electrónico	Creación de RL estables que ha permitido inferir y identificar factores de estabilidad radicalaria

LPO, lipoperóxidos; GC-MS, cromatografía de gases- espectrometría de masas; GSH-Px, glutation peroxidasa; GSSG-Rd, glutation reductasa; HPLC, cromatografía líquida de alta precisión; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; TBA, ácido tiobarbitúrico; MDA, malondialdehido; UV, ultravioleta; DC, dienos conjugados; Ac, anticuerpos; EIA, enzimoimmuno ensayo; CG, cromatografía de gases; AGI, ácidos grasos insaturados.
Fuente: obtenida de la referencia ⁴

2. Efectos de las especies reactivas

2.1. Oxidación proteica

La oxidación proteica se define como una modificación covalente en una proteína inducida por especies reactivas³⁵. Los cambios oxidativos en proteínas pueden comportar diversas consecuencias en su función, como la inhibición de la actividad enzimática, un incremento de la susceptibilidad a la agregación y proteólisis, un aumento o disminución de la captación celular y una alteración de la inmunogénesis³⁵. Los carbonilos proteicos son los marcadores de la modificación oxidativa proteica más ampliamente utilizados, aunque existen otros como la o-tirosina, cloro-, nitro- y di-tirosina³⁶. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, pueden oxidar los aminoácidos de proteínas formando los carbonilos proteicos³⁶, que han sido asociados con el envejecimiento y la severidad de algunas patologías³⁶.

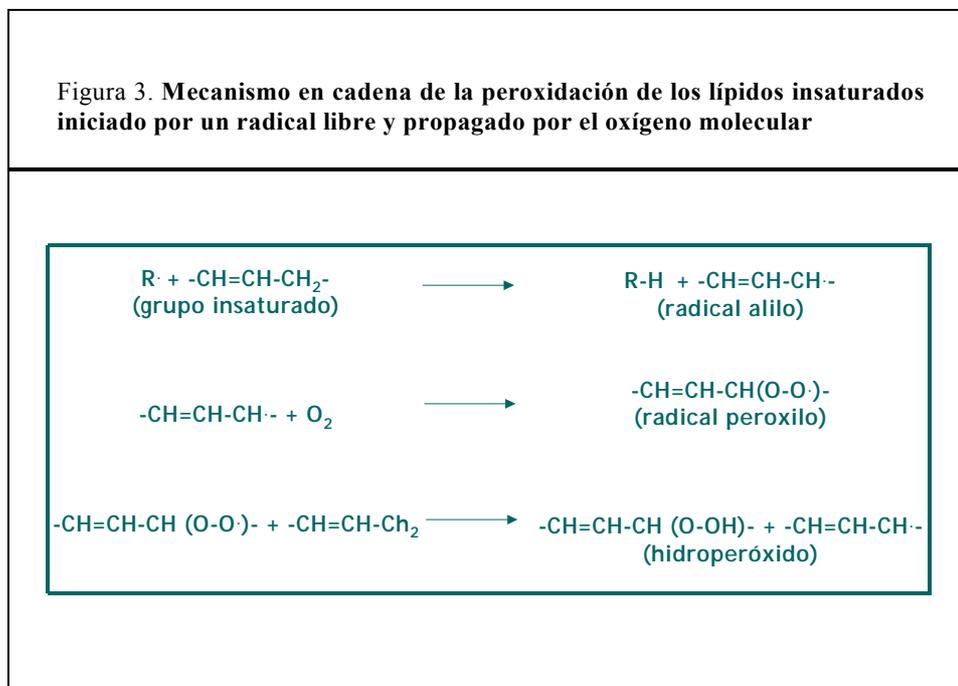
2.2. Oxidación del Acido Desoxirribonucleico

El ADN en las células vivas, sufre constantemente lesiones a nivel molecular seguidas de procesos fisiológicos de reparación³⁷. Los productos de las lesiones oxidativas del ADN, como nucleósidos y bases oxidados, tienen una naturaleza hidrofílica y suelen excretarse en orina sin sufrir cambios metabólicos³⁷. Cabe destacar que los productos de oxidación del ADN en orina representarían la proporción media de lesión en el organismo, mientras que el nivel de bases oxidadas en el ADN nuclear de una muestra sería la concentración específica de esa muestra³⁷. Los marcadores de lesión oxidativa de ADN en humanos son la determinación de nucleósidos y bases oxidados en orina (8-oxo-2'-deoxiguanosina, 8-oxoguanina, timina glicol, timidina glicol y 5-hidroximetiluracilo)³⁷, y la detección de modificaciones en ADN aislado de tejido o células^{38 39 40}.

2.3. Peroxidación lipídica

Los radicales libres inician y causan la peroxidación de los lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas), particularmente aquellos que componen las membranas celulares². La peroxidación lipídica es un proceso radicalario autocatalítico que transcurre en 3 etapas. La etapa de iniciación se desarrolla cuando los radicales libres captan un átomo de hidrógeno (H^+) de un carbono metileno de un AGPI, formándose un doble enlace alterno coplanar denominado DC⁴. Tras la pérdida del átomo de hidrógeno, el átomo de carbono queda con un electrón desapareado generándose un radical carbonilo (R·) que se estabiliza formando un DC (figura 3). En la etapa de propagación el DC

reacciona con el oxígeno dando lugar a un radical peróxilo (ROO·), el cual seguidamente capta otro H⁺ de otro AGPI, dando lugar a un lipoperóxido (ROOH) y a otro radical carbonilo, iniciándose una reacción en cadena autocatalítica (figura 3) ⁴. En la fase de terminación 2 radicales carbonilo reaccionan entre ellos formando un producto estable e inactivo (R-R) o cuando un radical peroxilo es estabilizado por un antioxidante. Un lipoperóxido es una especie químicamente bastante estable pero en presencia de metales divalentes como el Fe²⁺, puede generar un radical alcoxilo, que conlleva la formación de determinados productos terminales de oxidación de toxicidad diversa como el malondihaldeído, hidroxinonenal y hexanal ⁴¹.



Fuente: obtenida de la referencia ⁴²

La peroxidación lipídica tiene un papel trascendental en la fisiopatología de la arteriosclerosis, como más adelante se analiza en el apartado 4 (Hipótesis oxidativa de la Enfermedad Arteriosclerótica: Papel de la LDL oxidada).

3. Metabolismo de la lipoproteínas

En la tabla 4 se presenta la composición, función y vida media de las principales lipoproteínas.

Tabla 4. Composición, función y vida media de las principales lipoproteínas

	Quilomicrones	VLDL	LDL	HDL
<i>Tamaño (nm)</i>	75-600	30-80	21-22	7,5-10
<i>Densidad (Kg/L)</i>	<0.95	0,95-1,006	1,006-1,063	1,063-1,21
<i>Orígen</i>	intestino	hígado	plasma	intestino e hígado
<i>Eliminación</i>	hígado	hígado (transformación en LDL)	captación celular	hígado
<i>Función</i>	transporte de TG exógenos	transporte de TG endógenos	aporte de colesterol	transporte reverso de colesterol
<i>Vida media</i>	1 hora	1-3 horas	2,5-3,5 días	5-6 días
<i>Composición</i>	proteínas: 0,5-2% lípidos: 98-99,5% (triglicéridos: 84%)	proteínas: 7,7% lípidos: 90,1% (triglicéridos: 55%)	proteínas: 22,3% lípidos: 78,3% (colesterol: 44%)	proteínas: 51,9% lípidos: 48,6% (colesterol: 22%, fosfolípidos: 23%)
<i>Apoproteínas</i>	B-48, A-1, A-IV, C, E	C, E, B-100	B-100	A-I, A-II, C

Fuente: obtenida de las referencias ^{43 46}

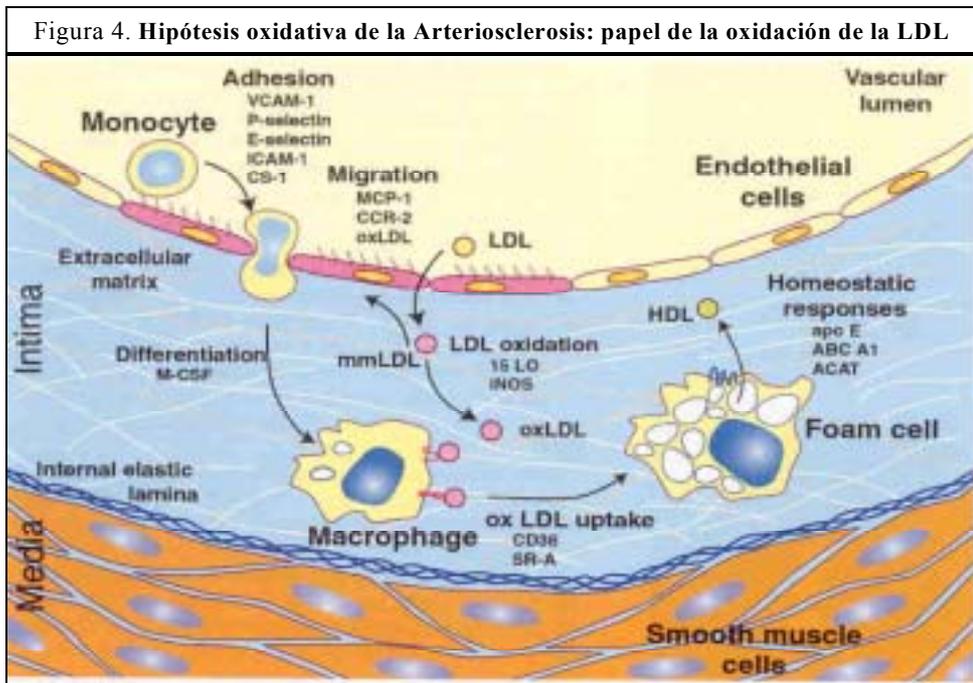
Los triglicéridos y el colesterol penetran en el plasma en forma de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos [quilomicrones (QM) y lipoproteínas de baja densidad (VLDL)], que suministran ácidos grasos a los tejidos para los requerimientos energético y almacenamiento. La grasa exógena de la dieta es transportada desde su lugar de absorción intestinal en forma de QM. Los triglicéridos endógenamente sintetizados son transportados desde el hígado en las VLDL. La lipoproteinlipasa, una enzima presente en la superficie de las células endoteliales, hidroliza triglicéridos y diglicéridos de los QM y las VLDL. Posteriormente los lípidos superficiales y algunas apolipoproteínas son transferidos a la HDL. El QM residual se fija a la superficie de los hepatocitos, penetra por un proceso regido por un receptor altamente específico y finalmente es degradado ⁴³. El hígado es el principal órgano responsable de la síntesis de colesterol y triglicéridos del organismo. El colesterol y los ácidos grasos que llegan al hígado, juntamente con el colesterol y triglicéridos sintetizados por este, se utilizan en la formación de VLDL. A medida que parte de los fosfolípidos de la VLDL plasmática son degradados por la lipoproteína lipasa y otras lipasas, la apolipoproteína B cambia de conformación y facilita que la partícula de VLDL pueda captar Apolipoproteína E ⁴³. La hidrólisis de sus triglicéridos y la transferencia de colesterol no esterificado y apolipoproteínas desde la VLDL a HDL, y de ésteres de colesterol desde la HDL a la VLDL, conduce a que la VLDL se transforme primero en IDL y posteriormente en LDL posiblemente a través de la lipasa hepática ⁴³; por otra parte las partículas de VLDL también pueden degradarse por el hígado ⁴⁴. La partícula de LDL

suministra colesterol a los tejidos a través de la endocitosis, regida por los receptores de LDL tanto en tejidos hepáticos como extrahepáticos. La HDL es segregada principalmente en el hígado como en el intestino, acumula colesterol de las membranas celulares y de otras lipoproteínas, y transfiere los ésteres de colesterol a la VLDL y IDL ⁴⁵. La lecitina colesterol acil transferasa insolubiliza el colesterol de la superficie de la HDL y facilita su migración a su interior de la partícula o la transferencia a otras lipoproteínas ⁴³.

4. Hipótesis oxidativa de la Enfermedad Arteriosclerótica: Papel de la LDL oxidada

Actualmente la hipótesis más aceptada considera la aterosclerosis como el resultado de una respuesta inflamatoria de la pared a diferentes formas de lesión adoptando dicho proceso un carácter crónico ^{47 48}.

4.1. Oxidación de las lipoproteínas de baja densidad



La acumulación de LDL en el espacio subendotelial parece ser uno de los primeros episodios asociados al desarrollo de lesiones ateroscleróticas. En zonas donde existe una disfunción endotelial que facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, las LDL penetran, interaccionan con

proteínas de matriz extracelular y sufren procesos de modificación. La modificación de las LDL de la que se tiene un mayor conocimiento es la oxidación ⁴⁹, en la que intervienen, en un primer momento, las células endoteliales y, posteriormente, las células musculares lisas (CML) y los macrófagos (figura 4). La oxidación de las LDL desempeña un papel clave en el proceso de acumulación de material lipídico en las placas ⁴⁹. Se ha demostrado la existencia de LDL oxidada (LDL_{ox}) en las placas ateroscleróticas humanas ¹¹. El primer paso en la oxidación de las LDL, es la generación de las LDL mínimamente modificadas, que presentan un grado de oxidación relativamente bajo, pero que activan el endotelio y poseen mayor capacidad que las LDL nativas de inducir la adhesión de monocitos ^{50 51 52}. Posteriormente se generan unas partículas de LDL con un mayor grado de oxidación y que poseen unas propiedades aterogénicas bien establecidas (tabla 5). La oxidación de las LDL puede estar potenciada por procesos patológicos subyacentes como la diabetes, ya que concentraciones elevadas de glucosa promueven la glicosilación y aceleran la oxidación ⁵³.

Tabla 5. Propiedades fisiopatológicas de la LDL oxidada

-
1. Inducen la expresión de la MCP-1 y de moléculas de adhesión como la VCAM-1 y la P-selectina en células endoteliales, lo que facilita la unión de monocitos circulantes al endotelio.
 2. Promueven la diferenciación de monocitos a macrófagos⁵⁴.
 3. Provocan apoptosis de las células endoteliales y alteran la producción por las células endoteliales de ON.
 4. Estimulan la proliferación de células musculares lisas.
 5. Modulan la activación en estas células de factores como el factor nuclear kappa B (NF-kB), punto clave en la activación de múltiples efectos ligados al proceso aterosclerótico.
 6. Promuevan la agregación plaquetar y la formación de trombos.
-

MCP-1, proteína-1 quimiotáctica para monocitos; VCAM-1, molécula 1 de adhesión vascular; ON, óxido nítrico; NF-kB, factor nuclear kappa B.

Fuentes: obtenida de las referencias ^{55 56 54 57 58 59 60 61 11}.

4.2. Activación de monocitos a macrófagos

Los monocitos circulantes, atraídos por las LDLox retenidas en la pared y la producción incrementada de la proteína-1 quimiotáctica para monocitos (MCP-1), se adhieren al endotelio y migran a la íntima⁵³. Posteriormente, el monocito atraviesa el endotelio a través de los espacios intercelulares. La activación en la íntima de los monocitos a macrófagos es estimulada por las LDL modificadas y diferentes moléculas producidas por los linfocitos T, las células endoteliales y las CML (figura 4).

4.3. Captación de LDL por macrófagos y células musculares lisas. Formación de la estría grasa

En condiciones fisiológicas cuando una célula necesita colesterol expresa unos receptores específicos para las lipoproteínas que lo transportan. Por otra parte la LDL está expuesta a diferentes tipos de agresiones moleculares que pueden alterar la apolipoproteína B-100, y evitar que pueda ser reconocida por los receptores normales de la LDL^{62 63}. No obstante algunas extirpes celulares como los macrófagos expresan unos receptores denominados “scavenger” que sí son capaces de interaccionar con la LDL modificadas e internalizarlas⁶⁴. Los receptores “scavenger” mejor caracterizados son los tipos I y II de la clase A, que han sido clonados en diferentes modelos animales y en humanos⁶⁵. En dichos receptores la región de unión a las LDLox posee una elevada carga positiva y cualquier modificación de las LDL que aumente su carga negativa (como la oxidación y la glicosilación) posibilita su captación por este tipo de receptores⁶⁶. Ninguno de estos receptores implicados en la captación de LDL modificada está regulado por la concentración intracelular de colesterol, por lo que se produce una acumulación de colesterol en los macrófagos masiva y descontrolada formándose las células espumosas⁶⁷. La posterior acumulación en la íntima de las células espumosas origina la formación de la denominada estría grasa⁶⁷. La estría grasa corresponde a la lesión tipo II en la clasificación aceptada por la American Heart Association, que categoriza las lesiones ateroscleróticas en VIII fases o estadios⁶⁸.

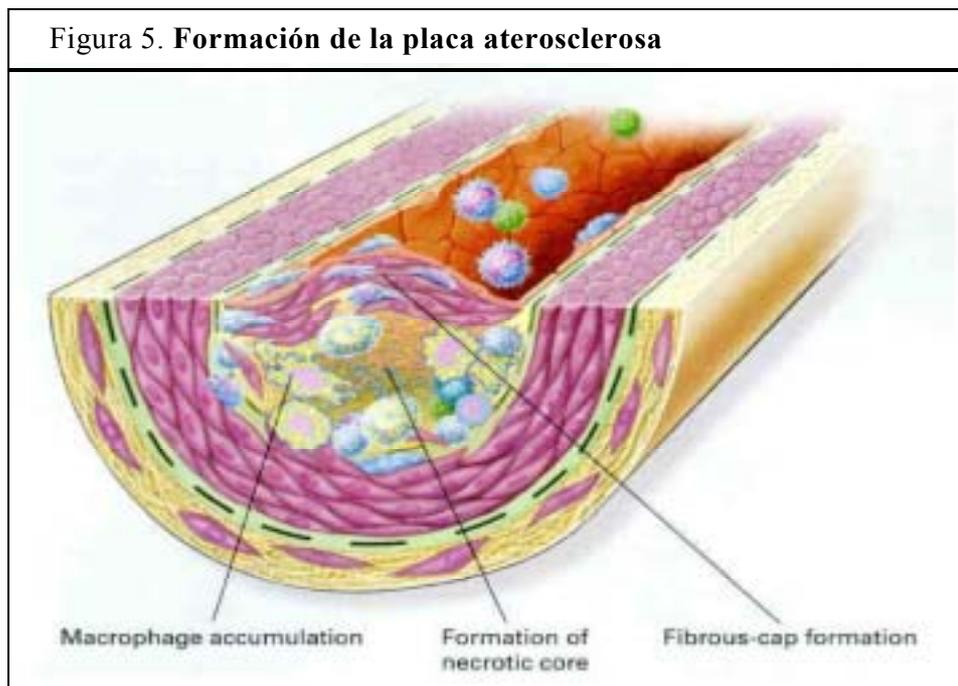
4.4. Papel del endotelio vascular en la patogénesis de la enfermedad arteriosclerótica

El endotelio integra diversas funciones reguladoras que contribuyen a mantener la homeostasis de la pared vascular. El NO liberado por el endotelio no sólo contribuye a mantener el tono arterial⁹, sino que también evita la proliferación de las CML, disminuye la adhesión de monocitos y la agregación de plaquetas, y preserva de la oxidación a las LDL⁶⁹. Por otra parte el endotelio posee propiedades

antitrombóticas ya que participa en la activación de la antitrombina III ⁷⁰. Los principales factores que pueden provocar una disfunción endotelial y con ello perturbar todas las propiedades antiaterogénicas del endotelio son la LDLox y el colesterol, aunque existen múltiples factores como toxinas bacterianas y sustancias inmunorreguladoras. Una disfunción endotelial puede producir una perturbación del balance entre los agentes vasoactivos o entre sus funciones pro y antitrombogénicas, con el consiguiente incremento de la adhesión de plaquetas. El endotelio expresa además proteínas de membrana que actúan como moléculas de adhesión para receptores específicos de monocitos y linfocitos T. Estas moléculas son selectinas como la E- y la P-selectina y proteínas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas como molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1) y las moléculas 1, 2 y 3 de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3) (figura 4) ⁷¹. El dominio extracelular de estas moléculas de adhesión puede fácilmente liberarse al torrente circulatorio; por ello, en la actualidad se evalúa la validez de los fragmentos solubles de estas moléculas como marcadores de evolución de las lesiones ateroscleróticas y procesos patológicos asociados ^{72 73}.

4.5. Proliferación de las células musculares lisas

Las células musculares lisas de la media activadas por citocinas y factores de crecimiento liberados en las lesiones, migran a la íntima atraídas por factores quimioatrayentes y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones ⁷⁴. Las CML son el componente celular mayoritario (incluso un 90%) de las lesiones ateroscleróticas iniciales ⁷⁵. Actualmente se especula sobre un posible papel protector de las CML atribuido mayoritariamente a la síntesis de proteínas de matriz extracelular, como el colágeno y proteoglicanos ⁷⁴. La destrucción de la matriz extracelular por enzimas producidas por macrófagos, originándose un gran núcleo lipídico envuelto por una cubierta fibrosa delgada, que contribuye a la inestabilización y rotura de la placa (figura 5) ^{76 74}.



4.6. Regulación de la expresión genética como respuesta de la lesión arteriosclerótica

El desarrollo de las lesiones comporta la activación tanto de las células endoteliales como de las CML y de los monocitos/macrófagos. En dicha activación intervienen múltiples factores de crecimiento, citocinas y las propias LDL modificadas, que a través de diferentes vías de transducción de señales activan factores de transcripción, como el factor nuclear kappa B (NF-kB) (cuya activación no requiere inducción de su expresión) o protooncogenes que regulan la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria/proliferativa de las lesiones ⁷⁴.

5. Papel de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en la aterogénesis

Se ha demostrado que lipoproteínas ricas en triglicéridos (partículas remanentes), derivadas de QM o VLDL, pueden atravesar el endotelio y ser captadas por macrófagos en la íntima arterial, induciendo la formación de células espumosas ^{77 78}. Una lipemia postprandial elevada desencadena procesos metabólicos que conducen a un perfil lipoproteico potencialmente trombogénico y aterogénico ^{79 80}; Trombogénico, por una activación del factor VII de la coagulación y un aumento del inhibidor-1 del activador del plasminógeno y, aterogénico debido a la producción de QM remanentes, VLDL con un alto contenido en ésteres de colesterol, una reducción de la HDL, un incremento de la lipoproteína(a) y la formación de LDL de menor diámetro y más densas o LDL

densas con un alto contenido en triglicéridos, lo que se ha asociado con una mayor susceptibilidad a la oxidación de la LDL ^{79 81 82}. Karpe y cols. ⁸² demostraron una relación entre las LDL ricas en triglicéridos con la severidad de la EC. Un metanálisis de varios estudios prospectivos ha demostrado que los niveles elevados de triglicéridos son un riesgo independiente de EC ¹¹. Así pues, junto con la hipercolesterolemia a expensas de LDL, los niveles elevados de las lipoproteínas ricas en triglicéridos pueden considerarse también proaterogénicos directa o indirectamente ^{83 81 79 11}.

6. Factores de riesgo de la Enfermedad Coronaria

La aterosclerosis y la cardiopatía coronaria se producen por la combinación de distintos factores de riesgo ⁸⁴. El éxito de cualquier medida preventiva depende en gran parte del conocimiento de los factores de riesgo y del impacto que la modificación de los mismos puede tener sobre la progresión de la enfermedad ⁸⁵. En la tabla 6 se presentan los principales factores de riesgo de la enfermedad coronaria. Concretamente en el caso de la enfermedad cardiovascular conocemos un buen número de factores de riesgo y, afortunadamente, muchos de ellos son modificables ⁸⁶ como los niveles plasmáticos de colesterol LDL elevados, niveles de HDL colesterol reducidos, tabaco y hipertensión arterial entre los factores de riesgo mayores ⁸⁷.

La colesterolemia está influida por determinantes genéticos y alimentarios, en especial la ingestión de grasas saturadas y en menor medida de colesterol ⁸⁸. La hipercolesterolemia se asocia no sólo con un mayor depósito de lípidos en las lesiones ateroscleróticas sino que valores elevados de LDL (>160 mg/dl) alteran diferentes funciones tanto de las células endoteliales como de las CML y de los monocitos ^{89 90 91 92}. Una mayor concentración de LDL en plasma implica la existencia de más sustrato para la actuación de los radicales libres. Por otra parte, la capacidad aterogénica del colesterol y de las partículas de LDL está ligada a su modificación y posterior formación de LDLox. Actualmente la prevención primaria de la EC dentro de la Salud Pública se fundamenta en introducir el concepto “cambios terapéuticos en el estilo de vida”, como son una ingestión reducida de grasas saturadas y colesterol, aumentar la actividad física y controlar el peso corporal ⁸⁷.

Tabla 6. Principales factores de riesgo de la Enfermedad Coronaria

Factores de riesgo modificables:

Factores mayores:

Tabaco, hipertensión arterial, colesterol LDL aumentado y colesterol HDL disminuido

Factores predisponentes:

Obesidad y sedentarismo

Factores condicionantes:

Resistencia a la insulina, hipertrofia ventricular izquierda, niveles elevados de fibrinógeno, Lp(a), homocisteína y microalbuminuria

Factores de riesgo no modificables:

Factores mayores:

Edad, sexo masculino, mujer postmenopáusica, diabetes mellitus, historia personal de enfermedad cardiovascular

Factore predisponentes:

Herencia

Lp(a), lipoproteína(a)

Fuente: obtenida de las referencias ⁸⁷

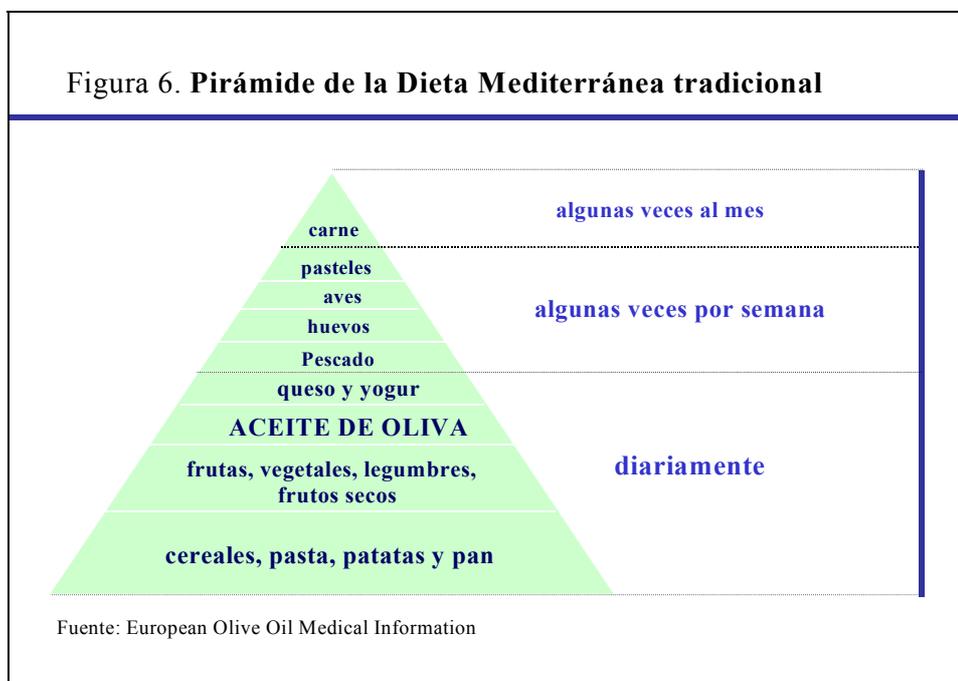
7. Papel de la dieta en la salud

7.1. Paradojas del Sur de Europa: Factores protectores de la Enfermedad Cardiovascular

La EC es en la actualidad el problema de salud más importante en la población adulta de los países desarrollados. Existe sin embargo una gran variabilidad en la incidencia y tasas de mortalidad de esta enfermedad, siendo el área mediterránea, la que presenta las tasas más bajas del mundo ⁹³. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado una relación entre el tipo de dieta y la EC ^{94 95 96}. En 1979, Keys y cols. aportaron evidencia ecológica de la asociación entre un menor riesgo de EC y la dieta Mediterránea tradicional, a pesar de una ingestión elevada de grasa monoinsaturada ⁹⁸. Varios estudios han relacionado la menor incidencia de enfermedad cardiaca coronaria en los países mediterráneos con la dieta de los mismos ^{99 100}. Desde entonces se han descrito varias paradojas en el área mediterránea, siendo la más conocida la paradoja Francesa, con un elevado consumo de grasa asociado a una baja tasa de mortalidad por EC ⁹⁹. Existe también un paradoja Albanesa en la que sorprende una expectativa de vida media alta en una población con unos ingresos económicos

muy bajos, siendo la tasa de mortalidad en la edad adulta (incluyendo la mortalidad por EC) similar a la tasa de mortalidad de los países ubicados en el área mediterránea ¹⁰¹. Una tercera paradoja se publicó en el año 1998, en ella se observó una alta prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares paralelamente a una incidencia de EC baja en Girona ^{93, 102}. Teniendo en cuenta las paradojas expuestas anteriormente, podríamos hablar globalmente de una paradoja del sur de Europa o paradoja Mediterránea. Es posible que la combinación de una serie de factores protectores (niveles elevados de HDL, dieta cardioprotectora, índice de masa corporal más reducido y niveles más altos de actividad física) sea responsable de las reducidas tasas de morbilidad y mortalidad cardiovascular observadas en la región mediterránea en general ⁸⁵. También es posible que nuestra población esté enriquecida en polimorfismos genéticos que aumenten la protección cardiovascular, o alternativamente que exista una frecuencia menor de polimorfismos que aumente la predisposición cardiovascular ⁸⁵. Entre los factores candidatos a explicar esta paradoja Mediterránea estarían los ligados al estilo de vida, como la dieta, la actividad física y factores ambientales como la cohesión social ¹⁰³.

7.2. Dieta tipo Mediterráneo como factor protector de la Enfermedad Cardiovascular



El término “dieta mediterránea” hace referencia a los patrones alimentarios propios de los países mediterráneos de hace 50 años ⁹⁸. Aunque existen distintas variantes de la dieta Mediterránea, se puede hablar de unos componentes comunes: 1) el principal aporte de grasas está constituido por el aceite de oliva; 2) consumo alto en vegetales, legumbres, cereales, frutos frescos y secos; 3) moderado consumo de pescado, carne de ave, leche y productos derivados de la leche; 4) bajo consumo de carne roja ^{104 105}. Finalmente, cabe destacar un consumo moderado diario de vino ¹⁰⁶. En la figura 6 está representada la pirámide de la dieta Mediterránea clásica.

Existen cada vez más evidencia científica de que la dieta Mediterránea clásica tiene un efecto protector sobre procesos asociados con la lesión oxidativa ^{105 107 108 109}, lo que se atribuye a su alto contenido en compuestos con propiedades biológicas antioxidantes y a elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI). Sin embargo, pocos estudios han analizado la dieta Mediterránea como una intervención de dieta propiamente. Cabe destacar que la eficacia de la dieta tipo Mediterráneo, tanto en la prevención secundaria de eventos ligados a EC ¹⁰⁷ como en protección frente a cáncer ¹⁰⁸, ha sido demostrada por De Lorgeril y cols. mediante un ensayo clínico controlado y randomizado, que aporta el más alto nivel de evidencia científica (Lyon Diet Heart Study). Existen también algunos estudios de cohorte que han analizado los beneficios de una dieta tipo Mediterráneo sobre la mortalidad global. En el Melbourne Study ¹¹⁰, con un diseño parecido a otro estudio previo realizado en Grecia ¹¹¹, se demostró la transferibilidad de los beneficios de una dieta Mediterránea en poblaciones Anglo-Celtas y Griego-Australianas. En el estudio de Oviedo ¹¹², el hábito de adquirir un patrón dietético tipo Mediterráneo se asoció a una menor mortalidad en individuos de edad inferior a 80 años. Un estudio de cohorte con 44.875 hombres demostró que un “patrón dietario prudente” con un alto consumo de vegetales, fruta, legumbres, cereales, pescado y carne de ave, se asociaba con un menor riesgo de muerte por EC ¹¹³. Distintas organizaciones nacionales e internacionales recomiendan la adopción de un patrón dietético similar a la dieta Mediterránea tradicional ^{87 114}. Los objetivos nutricionales recomendados son una ingestión de grasa total que varía entre el 35 y el 30% de las calorías totales en función de que se utilice o no habitualmente aceite de oliva ¹¹⁵. Se aconseja un aporte de ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos *trans* menor del 10% de la ingesta calórica ^{116 117}, un aporte de AGPI del 10% de la ingestión calórica total, mientras el restante 10-20% debería ser aportado por AGMI ^{87 114} o que el conjunto de AGPI y AGMI sume 30% ¹¹⁷. El consumo diario de colesterol total debe ser inferior a 300 mg y además se recomienda aumentar el consumo de carbohidratos complejos y fibra ^{117 116 114}.

8. Aceite de oliva. Composición y tipos de aceite de oliva

El aceite de oliva es un producto base de la dieta Mediterránea y cabe destacar un consumo

Tabla 7. Composición de la fracción insaponificable del aceite de oliva

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración / Porcentaje</i>
<i>Hidrocarburos totales</i>	300 - 700 mg/100g
escualeno	300 - 700 mg/100g
<i>Pigmentos</i>	
clorofilas	0 - 9,7 mg/kg
<i>Carotenoides</i>	0,5 - 10 mg/kg (en β -caroteno)
luteína	30 60%
β -caroteno	5 - 15%
<i>Tocoferoles</i>	70 - 300 mg/kg
α -tocoferol	>93%
β y γ -tocoferol	<10%
γ -tocoferol	<1,5%
<i>Esteroles</i>	80 - 240 mg/100g
β -sitosterol	75 - 95%
campesterol	2 - 4%
stigmasterol	1 - 2%
Δ 5-avenasterol	3 - 14%
Δ 7-avenasterol	<0,7%
<i>Compuestos fenólicos</i>	50 - 500 mg/kg (en ácido cafeico)
<i>Alcoholes triterpénicos</i>	100 - 300 mg/100g
<i>Compuestos aromáticos</i>	
Alcoholes	
Cetonas	
Ésteres	
Éteres	
derivados furánicos	

Fuente: obtenida de las referencias ^{122 123}

diario en las zonas mediterráneas ya que se usa como condimento (en crudo) y para cocinar. El aporte de AGMI que comporta el alto consumo de aceite de oliva en los países mediterráneos, supone que un 35% de la energía diaria provenga de la ingestión de grasas en nuestro medio ¹¹⁸.

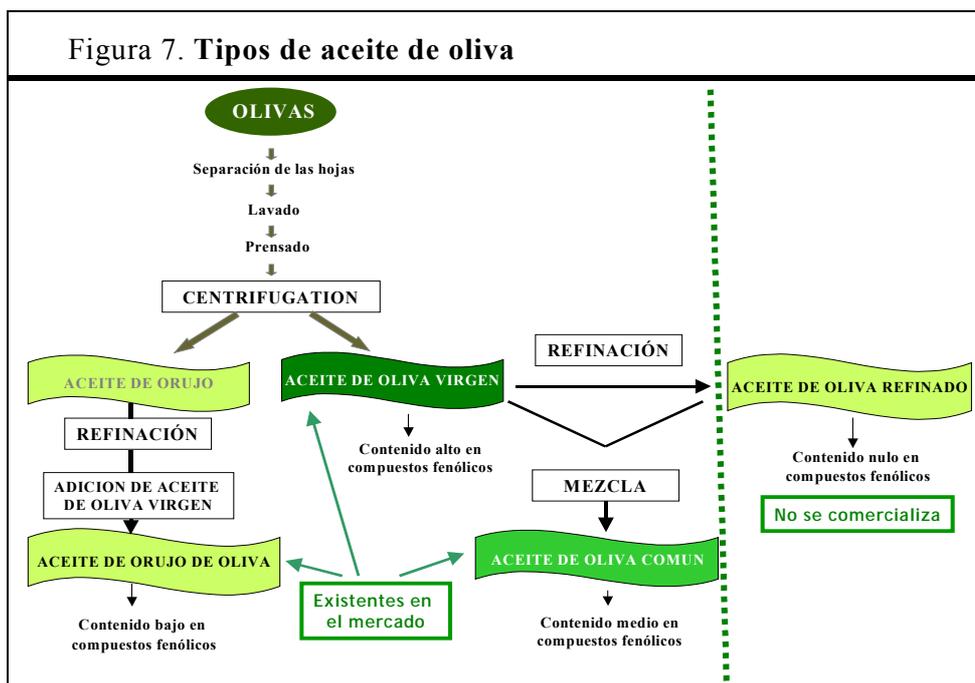
8.1. Composición del aceite de oliva

El aceite de oliva posee una composición de ácidos grasos muy característica y peculiar, con un contenido en ácido oleico (18:1n-9) del 56-84% y un contenido del 3-21% de ácido linoleico ¹¹⁹. En la fracción no saponificable del aceite de oliva (tabla 7), se encuentra el α -tocoferol (5, 7, 8-trimetiltocol), la forma más activa *in vivo* de la Vitamina E y la más abundante en la naturaleza ¹²⁰. Esta fracción no grasa del aceite de oliva virgen (aceite obtenido directamente del fruto del olivo por medios puramente físicos, como la presión y centrifugación) es rica en CF cuyas propiedades antioxidantes protegen al aceite de oliva de la autooxidación ¹²¹.

8.2. Tipos de aceites de oliva existentes en el mercado

En nuestro medio se consumen tres tipos de aceite de oliva (figura 7): el aceite de oliva virgen, común y el de orujo de oliva. El aceite de oliva virgen se obtiene directamente del fruto maduro por medios físicos (primer prensado o centrifugado) y es el único que se consume sin refinar. El aceite de oliva común (aceite de oliva UE 1991) es una mezcla de aceite de oliva virgen y aceite de oliva refinado, y su consumo es el más habitual. Por último el aceite de orujo de oliva se obtiene a partir de la pulpa y semilla tras la extracción del aceite de oliva virgen y debe pasar un proceso de refinado, posteriormente se le añade aceite de oliva virgen para que sea apto para su consumo ¹²⁴.

El aceite de oliva virgen posee un contenido de CF superior a 120 mg/Kg equivalentes de ácido cafeico (EAC), y el aceite de oliva común consta de un contenido de CF de entre 10 a 100 mg/Kg EAC; en cuanto al aceite de orujo de oliva, posee muy pocos CF. El precio del aceite de oliva vigente en el mercado varía proporcionalmente a su contenido en CF. Por ello es importante analizar la relación coste/beneficio de los distintos tipos de aceite de oliva ¹²⁵, para efectuar futuras recomendaciones sobre su consumo en la prevención primaria o secundaria de los procesos asociados al estrés oxidativo.



9. Mecanismos por los que el consumo de aceite de oliva es beneficioso para la salud

El consumo de aceite de oliva se ha relacionado con un perfil lipídico de menor riesgo de padecer EC^{126 127} y con un menor riesgo desarrollar varios tipos de neoplasias malignas^{109 127 128 129}. Varios autores confieren a la dieta rica en aceite de oliva un poder atenuante de los efectos agudos procoagulantes de comidas grasas (disminución de la activación del factor VII y reducción de la inducción de las plaquetas *ex vivo*)^{130 131}. Un número creciente de indicios apuntan al papel crucial que desempeña el aceite de oliva como integrante básico de la dieta Mediterránea, en sus efectos beneficios sobre la salud. Dichos efectos pueden atribuirse tanto a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados como a la presencia de compuestos antioxidantes en el aceite.

9.1. Papel de los ácidos grasos en la dieta. Beneficio de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados respecto a una rica en ácidos grasos saturados y poliinsaturados.

En una dieta occidental los AGS principales son el palmítico, esteárico, mirístico y laúrico^{132 133 134}¹³⁵. El AGPI más frecuente en la dieta es el ácido linoleico, mientras el ácido araquidónico y 6-ácido linolénico representan menos del 2% del total de ácidos grasos. El AGMI de mayor presencia en la dieta mediterránea es el ácido oleico, siendo la fuente de grasa mayoritaria en el aceite de oliva. En la mayoría de los ácidos grasos insaturados el doble enlace se encuentra en configuración *cis*, el

cambio de configuración *cis* a *trans* se produce en la hidrogenización generalmente durante procesos industriales ¹³⁶. El consumo de dichos isómeros *trans* conllevan una elevación del colesterol total y la lipoproteína (a) y una disminución del colesterol HDL ^{137 138}. Se ha analizado el impacto sobre la salud de una dieta rica en AGMI en comparación con otras dietas, quedando bien establecidos los efectos beneficiosos de una dieta rica en AGMI al reducir significativamente los niveles de LDL ^{139, 140} y en algunos estudios elevar el HDL colesterol levemente ^{141 142 143}. Mensink y cols. ¹⁴⁴ atribuyen un modesto efecto hipocolesterolémico a la ingestión de AGMI, cuando estos sustituyen una ingestión de carbohidratos manteniendo la misma relación equicalórica ¹⁴⁴. Hasta el momento los metanálisis realizados apuntan a que no existen diferencias significativas en los niveles de LDL o HDL colesterol entre una dieta enriquecida en AGMI o enriquecida en AGPI ^{145 144}. El consumo de aceite de oliva aumenta la ingestión de AGMI, sin elevación significativa de las AGS y asegura un consumo apropiado de AGPI esencial, mejorando el perfil lipídico asociado a riesgo cardiovascular ^{146 147 148}.

Uno de los factores clave en el desarrollo de la aterosclerosis es la oxidación de las LDL ¹⁴⁹. El tipo de ácido graso presente en los aceites consumidos se incorpora a la partícula lipoproteica ¹⁵⁰ influyendo en la susceptibilidad de la LDL a la oxidación. En estudios nutricionales utilizando modelos animales, se ha demostrado que la partículas de LDL ricas en ácido oleico son marcadamente más resistentes a modificaciones oxidativas ¹⁵¹. Asimismo existen diversos estudios en humanos en los que tras una suplementación dietética, las LDL ricas en ácido oleico mostraron mayor resistencia a la oxidación *ex vivo* que las enriquecidas en ácido linoleico ^{152 153 146 154 139}, aunque no en todos ¹⁵⁵. La falta de ajuste por el resto de componentes antioxidantes de la dieta podría explicar estas discrepancias. Por otra parte las LDL enriquecidas con ácido oleico y con un menor contenido en AGPI a través de una dieta suplementada con ácido oleico, presentan una mayor resistencia a convertirse en lipoproteínas proinflamatorias o LDL mínimamente modificadas ¹⁵⁶. Mata y cols. demostraron que tras una dieta enriquecida con AGMI, se apreció una reducción de la síntesis de CML en los cultivos celulares incubados con el suero humano ¹⁵⁴. Otros estudios con cultivos de células endoteliales mostraron que el ácido oleico inhibe la activación del endotelio (aunque en menor medida que AGPI), analizada a través la expresión de VCAM-1, NF-kB y niveles de ácido ribonucleico mensajero de VCAM-1 ¹⁵⁷. Carluccio y cols. sugieren que el ácido oleico puede contribuir en la prevención de la aterogénesis desplazando AGS de los fosfolípidos de la membrana celular y modulando la expresión genética de moléculas implicadas en la captación de

monocitos ¹⁵⁷. Existe evidencia científica de un efecto hipotensivo tras seguir una dieta enriquecida con AGMI ¹⁵⁸. Se precisan más estudios para conocer si estos resultados son fruto de un nutriente en particular o sería más exacto hablar de un efecto global de la dieta Mediterránea. Ferrara y cols. ¹⁵⁸ sugieren que una reducción del consumo de AGS junto con los CF presentes en el aceite de oliva virgen pueden explicar (a través de un incremento de los niveles de ON) la disminución de la presión arterial.

9.2. Antioxidantes presentes en el aceite de oliva

El efecto bioactivo del aceite de oliva beneficioso para la salud se atribuye como ya se ha indicado a su contenido en AGMI o a su carga antioxidante, tanto de vitamina E, carotenoides o CF.

Algunos estudios observacionales han demostrado la asociación entre el consumo de alimentos ricos en vitamina E y una reducción en la mortalidad cardiovascular ¹⁵⁹. También se ha descrito una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de vitamina E y un menor mortalidad de enfermedad cardiovascular ¹⁶⁰. En la tabla 8 están representados los diversos ensayos clínicos con vitaminas antioxidantes en la EC. En la actualidad, se considera que no hay evidencia científica suficiente para recomendar la suplementación con Vitamina E ^{161 162}. En prevención secundaria de EC, no existe un consenso sobre el beneficio de una terapia con vitamina E, existiendo resultados contradictorios por el momento ¹¹. Ensayos clínicos randomizados con suplementación con β -caroteno no han demostrado ningún efecto beneficioso en la prevención de EC o cáncer ^{163 164}. Estos resultados decepcionantes de los estudios de suplementación con vitaminas E y C pueden interpretarse en parte por un alejamiento de la forma de ingestión habitual en la vida cotidiana. El consumo de las mismas se produce en la vida real acompañado de otras sustancias, algunas de las cuales son potentes antioxidantes como los CF.

Por otra parte, las cantidades de vitamina E y carotenoides aportadas por un consumo razonable de aceite de oliva son inferiores a las ensayadas en estudios *in vitro* e *in vivo* como antioxidantes ^{165 166 161 163 164}. Por ello la presencia de otros constituyentes antioxidantes en el aceite de oliva como los CF, junto con el estudio de su biodisponibilidad en humanos, son de particular importancia en la investigación de los efectos beneficiosos del consumo de aceite

Tabla 8. Ensayos clínicos con suplementos antioxidantes en la Enfermedad Coronaria

Estudio	Diseño	Población	Tratamiento antioxidante	Resultados
Linxian ¹⁶⁷	Abierto, no placebo (5,3 años)	n=29584, H y M, 40-69 años	1, retinol + zinc; 2, riboflavina + niacina; 3, vC (120mg) + molibdeno; 4, BC (15mg) + vE (30mg) + selenio	No efectos sobre mortalidad CV, EC; BC (15mg) + vE (30mg) + selenio: ↓ mortalidad global (sobretudo por cáncer) (RR 0,91, 95% IC 0,84-0,99)
ATBC ¹⁶⁸ ATBC subgrupos ¹⁶⁹	DC, CP, 2x2, (6,1 años)	n=29134, H fumadores; 50-69 años; PP n=27272, PS n=1862	1, vE (50mg = 55 UI); 2, BC (20mg); 3, vE + BC	BC: tendencia a ↑ cáncer de pulmón (RR 1,02 95% IC 0,95-1,09), BC: ↑ mortalidad global (RR 1,08 95% IC 1,01-1,06); BC, vE: no efectos sobre PP IAM, o PS IAM.
CARET ¹⁶⁴	DC, CP (4 años)	n=18314, H y M fumadores o ex fumadores; exposición a asbesto (PP)	BC (30mg) + vA (25000UI retinol)	BC + vA: ↑ cáncer de pulmón (RR 1,28 95% IC 1,04-1,57, P=0,02), BC + vA: ↑ mortalidad global (RR 1,17 95% IC 1,03-1,33, P=0,02), BC + vA: tendencia a ↑ mortalidad CV (RR 1,26 95% IC 0,99-1,61)
Physician health ¹⁷⁰	DC, CP, 2x2 (12 años BC)	n=22071, H, PP	1, BC (50mg días alternos); 2, aspirina	BC: no efecto en acontecimiento CV mortales o no, ni sobre mortalidad global (RR 1,2, 0,93-1,11); Aspirina (se paró el estudio): ↓ IAM
CHAOS ¹⁷¹	DC, CP (1,4 años, rango: 3días-3años)	n=2002, H y M con EC, PS	vE 800 o 400 UI	vE: ↓ ↓ IAM no-fatal (RR 0,23, 95% IC 0,11-0,47, P<0,001), vE: tendencia: ↑ mortalidad CV (RR 1,18 95% IC 0,62-2,27, P=0,6)
GISSI-P ¹⁷²	Abierto, CP, 2x2 (3,5 años)	n=11234, H y M con IAM reciente (3 meses), PS	1, vE (300mg = 330UI); 2, aceite de pescado (1, 0g)	vE: no efectos IAM + mortalidad + ictus (RR 0,88 95% IC 0,75-1,04); aceite de pescado: ↓ IAM + mortalidad + ictus (RR 0,80 95% IC 0,68-0,95)
HOPE ¹⁷³ ¹⁷⁴	DC, CP, 2x2 (4,5 años)	N=9541, H y M alto riesgo (PP, PS)	1, vE (400UI); 2, ramipril	vE: no efectos IAM + mortalidad CV + ictus (RR 1,05 95% IC 0,95-1,16, P=0,33); Ramipril: ↓ IAM + mortalidad CV + ictus (RR 0,78 95% IC 0,70-0,86, P<0,001)
SPACE ¹⁷⁵	DC, CP (2 años)	n=196, hemodiálisis, PS	vE (800UI)	vE: ↓ ↓ IAM + ictus + EVP + angina inestable (RR 0,46 95% IC 0,27-0,78, P=0,014)
PPP ¹⁷⁶	Abierto, CP, 2x2 (3,6 años)	N=4495, con alto riesgo para enfermedad CV, PP	1, vE (300mg); 2, aspirina (100mg)	vE: no efectos (RR 1,07, 95% IC 0,74-1,56); aspirina: ↓ IAM + mortalidad CV + ictus (RR 0,77, 95% IC 0,62-0,95)
HATS ¹⁷⁷	DC, CP, 2x2 (3,5 años)	n=160, EC, PS	1, simvastatina-niacina; 2, antioxidantes (vE 800UI, vC 1000mg, BC 25mg, selenio 100µ)	Simvastatina-niacina: ↑ HDL2, ↓ progresión angiográfica (de 3,9 a 0,7%, P=0,004), ↓ eventos (de 24 a 3%, P=0,02); antioxidantes: ↓ HDL2, progresión angiográfica (de 3,9 a 1,8%, P=0,16), inhibe los efectos de simvastatina-niacina sobre eventos, progresión, HDL.
HPS ¹⁷⁸	DC, CP, 2x2 (5,5 años)	n=20356, H y M alto riesgo, PP, PS	1, simvastatina (40mg); 2, antioxidantes (vE 600mg, vC 250mg, BC 20mg)	Simvastatina: ↓ IAM + mortalidad CV + ictus (RR 0,72, P=0,0001). Antioxidantes: no efectos (RR 1,0)
WACS ¹⁷⁹	DC, CP, 2x2x2	n=8000, M con EC, PP, PS	1, vE (400mg); 2, BC (20mg/d); 3, vC (1g/d)	eventos cardiovasculares
WHS ¹⁷⁹	ECR	n=40000, M sanas, = o >45 años, PP	1, vE (600mg/d); 2, BC (50mg/d); 3, aspirina	cáncer eventos cardiovasculares
SU.VI.MAX Trial ¹⁸⁰	DC	n=12479, H y M sanos, 35-60 años	vE, vC, BC	eventos cardiovasculares, cáncer mortalidad CV y por cáncer

DC, doble ciego; CP, control placebo; ECR, ensayo clínico randomizado; H, hombres; M, mujeres; PP, prevención primaria; PS, prevención secundaria; EC, enfermedad coronaria; UI, unidades internacionales; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza; BC, beta-caroteno; vE, vitamina E; vA, vitamina A; vC, vitamina C; IAM, Infarto Agudo de Miocardio; CV, cardiovascular; EC, enfermedad coronaria; EVP, enfermedad vascular periférica; ↑: aumento; ↓, descenso.

Fuente: obtenida de las referencias ^{162 12 181}

de oliva, tanto por su participación directa como antioxidantes como por un posible sinergismo *in vivo* con otras sustancias antioxidantes.

9.2.1. *Compuestos fenólicos del aceite de oliva*

Los CF que encontramos en el aceite de oliva constituyen una fracción muy compleja formada por un número muy elevado de compuestos, algunos todavía por identificar. El aceite de oliva contiene fenoles simples, como hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico, *p*-cumárico, ácido ferúlico y vanilina. También contiene flavonoides como apigenina y luteolina, así como otros fenoles más complejos como aldehidos secoiridoides (ej. oleuropeína), verbacósidos y ligstrósidos, y el dialdehido del ácido elenoico ligado al tirosol y hidroxitirosol^{147 182}. Recientemente se ha descrito la presencia de lignanos en la fracción fenólica de algunos aceites de oliva¹⁸³, siendo el (+)-1-acetoxipinoresinol y (+)-pinoresinol los componentes mayoritarios¹⁸⁴. Los aceites de oliva ricos en CF presentan un grado de estabilidad mayor cuanto mayor sea la concentración de los CF, por otra parte, les confiere unas propiedades organolépticas con un gusto fuerte y afrutado que es indicador de alta calidad, aunque no forzosamente sean las características organolépticas preferidas entre los consumidores¹⁸⁵.

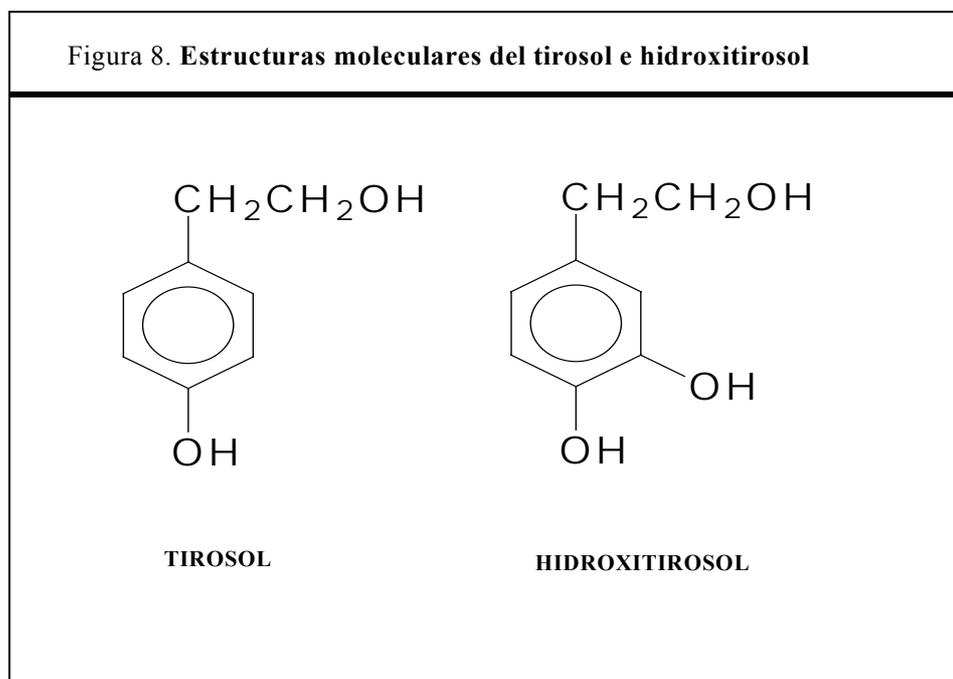
La concentración final de CF en aceites de oliva es fruto de la interacción de varios factores. Además de las condiciones climatológicas, las características de la tierra del cultivo y la variedad de la oliva, otros factores (sobre los que se puede incidir técnicamente) que pueden influir en la calidad del aceite son el estado de maduración de las olivas, el tipo de almacenamiento y la tecnología utilizada en su transporte y procesamiento^{185, 186 187}.

Los estudios del contenido de CF en el aceite de oliva mediterráneo^{124 186 121} han sido enfocados en referencia a la estabilidad o enranciamiento de los propios aceites. El consumo de compuestos fenólicos como los flavonoides se ha asociado a una reducción de la incidencia de EC en diversos estudios epidemiológicos prospectivos^{188 189}. Dicho efecto antioxidante y protector cardiovascular de los flavonoides fue confirmado y aceptado por la comunidad científica en el estudio Zutphen¹⁹⁰, realizado con una cohorte de 800 individuos, en el que se describió una correlación inversa entre la cantidad de flavonoides procedentes de la dieta (principalmente té y cebollas) y la incidencia de cardiopatía isquémica. Sin embargo pocos estudios han relacionado el contenido de antioxidantes presentes en el aceite de oliva y su efecto protector sobre la peroxidación lipídica como mecanismo de prevención frente a la aterosclerosis. Así pues los CF del aceite de oliva merecen ser analizados

detalladamente ya que son buenos candidatos para explicar una parte sustancial de los beneficios de la dieta mediterránea.

10. Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de aceite de oliva en humanos

La absorción de un compuesto tras la ingestión del mismo se considera requisito indispensable para establecer una relación causal, entre los CF presentes en los alimentos y sus efectos biológicos asociados con la prevención de enfermedades. Fenoles de origen vegetal como los flavonoides ¹⁸⁹ y las catequinas ¹⁹¹ han mostrado ser biodisponibles y poseer propiedades antioxidantes en estudios efectuados *in vitro* e *in vivo*. Ruiz-Gutierrez y cols. ¹⁹² detectaron e identificaron hidroxitirosol en plasma de ratas, a las que habían suplementado con tirosol. Varios estudios han demostrado la biodisponibilidad de los CF del aceite de oliva en humanos, después de una dieta suplementada, ¹⁹³ ¹⁹⁴. Dentro del marco del Estudio del Efecto Antioxidante del Aceite de Oliva, se demostró la biodisponibilidad del tirosol y del hidroxitirosol a partir de la ingestión de aceite de oliva en su forma natural ¹⁹⁵ ¹⁹⁶. Las concentraciones urinarias de tirosol e hidroxitirosol aumentaron, llegando a un pico a las 0-4 horas después de la administración de 50 ml de aceite de oliva virgen y recobraron sus valores basales a las 12 horas después de su ingestión ¹⁹⁷.



Ambos compuestos se excretan principalmente como conjugados ¹⁹⁷ y sus vidas medias de eliminación se han establecido en 7,7 y 8,6 horas, respectivamente. Una vez establecido que el tirosol y el hidroxitirosol de aceite de oliva virgen son biodisponibles en humanos, se definió su utilidad como marcadores de una dieta rica en tirosol y hidroxitirosol ^{198 199}.

En la figura 8 se representan las estructuras moleculares del tirosol e hidroxitirosol, dos CF característicos del aceite de oliva ²⁰⁰. Están presentes en su forma libre o conjugada como secoroides o agliconas. Se ha descrito que el tirosol y el hidroxitirosol en su forma libre junto con los derivados secoroides, representan el 30% del contenido total de CF del aceite de oliva virgen ²⁰⁰. El 50% de dicho contenido total de CF corresponde a otras formas conjugadas del tirosol y el hidroxitirosol como la oleuropeína y ligstrósidos agliconas ²⁰⁰.

11. Efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos del aceite de oliva

Entre los CF presentes en el aceite de oliva, tienen especial interés aquellos que poseen un grupo orto-difenólicos, principalmente la oleuropeína y el hidroxitirosol, por ser grandes inhibidores de la oxidación de la LDL *in vitro* ^{201 202 147}. La actividad antioxidante del hidroxitirosol, se debe tanto a un efecto quelante de iones de metales como a un efecto secuestrador de radicales libres ¹⁴⁷. La oleuropeína y el hidroxitirosol, secuestradores de radicales libres, han mostrado poseer una actividad antioxidante igual o superior a la de otros antioxidantes conocidos como la vitamina E, vitamina C y el hidroxitolueno butilado ¹⁴⁷. Recientemente se ha publicado que de entre los CF presentes en el aceite de oliva, los lignanos han mostrado ser potentes antioxidantes *in vitro* ^{200 183 203} y presentar la más alta correlación con la capacidad antioxidante, seguidos en orden decreciente por secoroide-1, hidroxitirosol, tirosol y secoroide-2 ¹⁸³. Por otro lado en estudios con animales, se ha atribuido a los lignanos la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica *in vivo* ²⁰⁴. Aunque en el pasado se había atribuido mayoritariamente a la fracción soluble de los CF extraíbles la capacidad antioxidante, Bravo y cols. ¹⁴ mostraron que polifenoles de aceite de oliva que no eran extraíbles con la metodología utilizada como proantocianidinas y taninas hidrosolubles de alto peso molecular, poseían una capacidad de aplacar radicales peróxido 15 a 30 veces superior a la de los fenoles simples. Se atribuyó a dichos compuestos no extraíbles, a pesar de ser menos absorbibles en el tubo digestivo humano, una acción antioxidante en el aparato digestivo protegiendo lípidos, proteínas y carbohidratos frente a agresiones oxidativas durante la digestión, preservando de este modo otros antioxidantes ¹⁴.

12. Otras actividades biológicas de los compuestos fenólicos del aceite de oliva

Se ha demostrado una mejora del perfil lipídico plasmático en ratas tras una dieta rica en CF y aunque no se conoce el mecanismo exacto, se han propuesto como posibles explicaciones, un incremento del transporte reverso de colesterol, una reducción de la absorción de colesterol y/o un aumento de la excreción de ácidos biliares ^{205 206 207}. En estudios *in vitro* el hidroxitirosol y la oleuropeína, han mostrado una capacidad de inhibir la agregación plaquetaria con una concentración inhibitoria 50% (del mismo orden de magnitud que la aspirina) ¹⁸⁵. Por otra parte, estos mismos CF pueden inhibir *in vitro* la producción de la molécula proinflamatoria leucotrieno B₄ por leucocitos activados ²⁰⁸. Después de una comida grasa se tiene constancia de que los antioxidantes provenientes de la dieta pueden inhibir la liberación de moléculas de adhesión inflamatorias, como VCAM-1 y ICAM-1 ²⁰⁹. Varios estudios han demostrado que la oleuropeína incrementa la producción de óxido nítrico e induce la expresión de óxido nítrico en macrófagos murinos activados con lipopolisacárido ^{201 208}. Se ha asociado la ingestión de alimentos ricos en precursores de lignanos con una protección frente a neoplasias de colon, próstata y mama ¹⁸⁴. Las similitudes existentes entre la estructura de los lignanos, estradiol y el tamoxifeno (antiestrógeno sintético) sugieren que los lignanos pueden ejercer su efecto anticarcinogénico parcialmente por sus efectos antiestrogénicos ²¹⁰. Se han propuesto otros mecanismos por los que los lignanos pueden inhibir la carcinogénesis como una acción antiviral ²¹¹ y actividad antioxidante ¹⁸³. Owen y cols. han postulado que los lignanos, presentes en la dieta, podrían intervenir en la prevención del cáncer reduciendo el estrés oxidativo ¹⁸⁴ o inhibiendo la actividad de la xantina oxidasa ²⁰⁰. La enterolactona, producida por la microflora intestinal a partir de precursores de lignanos presentes en la dieta, se ha relacionado con la protección frente a eventos coronarios agudos ²¹². Los CF del aceite de oliva neutralizan especies reactivas de oxígeno generadas por especímenes biológicos humanos, que podrían conducir a la formación de aductos de DNA exocíclico promutagénico ²¹³. Por ello, es de suma importancia no sólo conocer el contenido cuantitativo en CF del aceite de oliva sino también su perfil cualitativo, a la hora de estudiar y definir sus posibles propiedades biológicas.



MÉTODO

- **Método**

El Departamento de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Farmacia de Barcelona desarrolló una metodología para la detección de CF en LDL [extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta precisión-detector diode array (HPLC-DAD)]²¹⁴; Asimismo en dicho Departamento se determinaron los CF, α -tocoferol, β -caroteno y el perfil de ácidos grasos en la partícula de LDL, y con la realización del perfil plasmático de ácidos grasos²¹⁵.

La Unitat de Farmacología del Institut Municipal de Investigació Mèdica, desarrolló un método para determinar tirosol e hidroxitirosol en orina humana, como paso previo a los estudios *in vivo*^{195 196}.

Una vez establecido que el tirosol y el hidroxitirosol de aceite de oliva virgen son biodisponibles en humanos, se definió su utilidad como marcadores de una dieta rica en tirosol y hidroxitirosol¹⁹⁸

La determinación de lípidos y glucosa sérica, la resistencia de la LDL a la oxidación, los equivalentes de malondialdehído, la actividad de los enzimas antioxidantes^{216 215}, los anticuerpos anti LDL oxidada y los niveles de LDL oxidada^{199;199}, se realizaron en la Unidad de Lípidos y Epidemiología Cardiovascular.

1. Proyecto de investigación en el que se enmarca esta memoria de tesis

Dada la creciente importancia que se atribuye al papel del aceite de oliva en las propiedades beneficiosas para la salud de la alimentación Mediterránea, y con el fin de efectuar en el futuro recomendaciones nutricionales precisas a la población, se realizaron una serie de estudios sobre el efecto antioxidante del aceite de oliva. Estos estudios con sus correspondientes tareas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Metodología y plan de trabajo

<i>Tareas</i>	Descripción
<i>1ª tarea: Tipificación de aceites. Experimental laboratorio.</i>	Determinación del contenido de antioxidantes y ácidos grasos en diversas muestras de aceites de oliva consumidos en Catalunya
<i>2ª tarea: Ensayos in vitro. Experimental laboratorio.</i>	Establecer la influencia del aceite de oliva y de extractos de CF de aceite de oliva virgen sobre varios marcadores del estado oxidativo.
<i>3ª Tarea: Estudio de biodisponibilidad de CF y de los efectos de la ingestión a corto plazo de aceite de oliva virgen en voluntarios sanos (n=16)</i>	Determinación de CF y marcadores de estrés oxidativo en voluntarios sanos antes y después de la administración de aceite de oliva virgen
<i>4ª Tarea: Ensayo clínico randomizado en voluntarios sanos (n=30)</i>	Estudio de la influencia de la ingesta moderada y regular de aceites de oliva con diferente contenido en CF, sobre el estado oxidativo
<i>5ª Tarea: Ensayo clínico randomizado en pacientes con antecedentes de enfermedad cardiaca coronaria (n = 40)</i>	Estudio de la influencia de la ingesta moderada y regular de aceites de oliva con diferente contenido fenólico, sobre el estado oxidativo
<i>6ª tarea: Estudio poblacional (n=3500)</i>	Determinación del consumo de aceite de oliva y del nivel de oxidación de la LDL en una muestra representativa de la población estudiada.

2. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y sus compuestos fenólicos

Esta tesis está basada en los resultados del Proyecto correspondiente a las tareas 2, 3 y 4 del Proyecto.

2.1. TAREA 2: Estudio experimental

2.1.1. Análisis de la capacidad protectora in vitro de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la oxidación de la LDL.

2.1.1.1. Influencia de los distintos componentes del aceite de oliva en la protección de la LDL a la oxidación

Publicación 1: Fitó Montserrat, Covas María-Isabel, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, Vila Joan, De la Torre-Boronat Maria-Carme, Marrugat Jaume. ACEITE DE OLIVA E INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS. Medicina Clínica 2000.

Anexo 1.1.: Covas Maria-Isaabel, Fitó Montserrat, Marrugat Jaume, Miró Elisabet, Farré Magí, De la Torre Rafael, Gimeno Eva, López-Sabater María-Carmen, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, De la Torre-Boronat Maria-Carme. FACTEURS PROTECTEURS DE LA MALADIE CORONARIÈNNE: EFFECT ANTIOXYDANT DE L'HUILE D'OLIVE (review). Therapie 2001.

Anexo 1.2.: Fitó Montserrat, Weinbrenner Tanja, Covas Maria-Isabel. OLIVE OIL ANTIOXIDANT ACTION: NEW FINDINGS. En: Research Advances in Lipids (en prensa).

2.1.1.2. Efectos de los extractos fenólicos de aceite de oliva sobre la protección de la LDL a la oxidación

Publicación 2: Fitó Montserrat, Covas María-Isabel, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, Vila Joan, Torrents Jaume, De la Torre-Boronat Maria-Carme, Marrugat Jaume. PROTECTIVE EFFECT OF OLIVE OIL AND ITS PHENOLIC COMPOUNDS AGAINST LOW DENSITY LIPOPROTEIN OXIDATION. Lipids 2000.

Anexo 1.1. (ver en el apartado 2.1.1.1.)

Anexo 1.2. (ver en el apartado 2.1.1.1.)

2.1.2. Análisis de la capacidad de unión a la LDL de los compuestos fenólicos en general y de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en particular

2.1.2.1. Capacidad de los compuestos fenólicos de la dieta de unirse a las LDL humanas in vivo

Publicación 3: Lamuela-Raventós Rosa-Maria, Covas María-Isabel, Fitó Montserrat, Marrugat Jaume, De la Torre-Boronat Maria-Carme. DETECTION OF DIETARY ANTIOXIDANT PHENOLIC COMPOUNDS IN HUMAN LOW DENSITY LIPOPROTEINS. Clinical Chemistry 1999.

2.1.2.2. *Estudios in vitro sobre la capacidad de unión de los compuestos fenólicos del aceite de oliva a la LDL humana.*

Publicación 4: Maria-Isabel Covas, Fitó Montserrat, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, Sebatjà Neus, De la Torre-Boronat Maria-Carme, Marrugat Jaume. VIRGIN OLIVE OIL PHENOLIC COMPOUNDS: BINDING TO HUMAN LDL AND EFFECT ON LDL OXIDATION. Int J Pharmacol Res 2000.

Anexo 1.1. (ver en el apartado 2.1.1.1.)

Anexo 1.2. (ver en el apartado 2.1.1.1.)

2.2. TAREA 3: Ensayo de biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva y de efectos de la ingestión aguda y a corto plazo de aceite de oliva virgen en voluntarios sanos.

2.2.1. *Efectos postprandiales y a corto plazo de la ingestión de aceite de oliva virgen sobre el estrés oxidativo*

Publicación 5: Fitó Montserrat, Gimeno Eva, Covas María-Isabel, Miró Elisabet, López-Sabater María-Carmen, Farré Magí, De la Torre Rafael, Marrugat Jaume. POSTPRANDIAL AND SHORT-TERM EFFECTS OF DIETARY VIRGIN OLIVE OIL ON OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS. Lipids 2002.

Anexo 1.3.: Miró Elisabet, Farré Magí, Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, de la Torre Rafael. TYROSOL BIOAVAILABILITY IN HUMANS AFTER VIRGIN OLIVE OIL INGESTION. Clin Chem 2001.

Anexo 1.4.: Miró-Casas Elisabet, Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Farré-Albaladejo Magí, Marrugat Jaume, de la Torre Rafael. TYROSOL AND HYDROXYTYROSOL ARE ABSORBED FROM MODERATE AND SUSTAINED DOSES OF VIRGIN OLIVE OIL IN HUMANS. Eur J Clin Nutr 2002.

2.3. TAREA 4: Ensayo clínico randomizado en el que se analizó los efectos a largo plazo de la ingestión de aceite de oliva virgen

2.3.1. Efectos a largo plazo de la ingestión de aceites de oliva con diferente contenido fenólico sobre la protección de la LDL a la oxidación.

Publicación 6: Marrugat Jaume, Covas Maria Isabel, Fitó Montserrat, Schroeder Helmut, Miró-Casas Elisabet, De la Torre Rafael, Farré-Albaladejo Magí. ANTIOXIDANT EFFECT OF OLIVE OIL PHENOLIC CONTENT IN A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND CONTROLLED CLINICAL TRIAL. Sometido para publicación.



RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

▪ Resumen global de los Resultados

En primer lugar se estudió la capacidad protectora *in vitro* de los CF del aceite de oliva sobre la oxidación de la LDL. Para ello se testó previamente la influencia de los distintos componentes del aceite de oliva en la protección de la LDL a la oxidación; Los resultados obtenidos mostraron que todos los tipos de aceites testados (con similar perfil de ácidos grasos y contenido de vitamina E, pero con diferencias en su contenido fenólico) incrementaron la fase de latencia de los dienos conjugados en las LDL (resistencia de la LDL a la oxidación) en comparación con las LDL control. Sin embargo, se observó un incremento de la capacidad protectora de la oxidación de la LDL cuanto mayor era la concentración de CF en el aceite de oliva (Publicación 1 y Publicación 2). Asimismo observamos que diferencias en la naturaleza de las especies fenólicas presentes en el aceite de oliva (a igual concentración de fenoles totales) influenciaban la capacidad protectora de la LDL a la oxidación (Publicación 1) (Anexos 1.1 y 1.2).

Al analizar separadamente el efecto de los extractos fenólicos de aceite de oliva sobre la protección de la LDL a la oxidación observamos un incremento de la resistencia de la LDL a la oxidación, directamente relacionado con la concentración de CF del aceite de oliva incubados con las lipoproteínas (Publicación 2). Asimismo observamos que tras incubación de la LDL aislada con concentraciones crecientes de CF del aceite de oliva se alcanzaba una inhibición de la formación de peróxidos lipídicos en la LDL tras la oxidación con 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (productor de radicales peroxilo) (Publicación 2). Se testó entonces la capacidad protectora de la oxidación de la LDL aislada tras incubación de los CF con el plasma. Los resultados mostraron un incremento de la resistencia de la LDL a la oxidación directamente relacionado con la concentración de CF del aceite de oliva incubados con el plasma (Publicación 2, Anexos 1.1 y 1.2).

De los resultados del estudio anterior se desprendía que únicamente los compuestos antioxidantes ligados a las LDL podían ser responsables del retraso en la oxidación de la lipoproteína. Con el fin de dilucidar si los CF provenientes de la dieta podían unirse a las LDL *in vivo* se diseñó un método para detectar y cuantificar los CF en la LDL de individuos no-suplementados. Mediante la integración de una ultracentrifugación secuencial prolongada, para garantizar la pureza de la LDL, y un sistema de extracción en fase sólida y HPLC-DAD desarrollado en el Departamento de

Bromatología y Nutrición de la Facultad de Farmacia de Barcelona se demostró la presencia de fenoles individuales provenientes de la dieta, concretamente la rutina, quercetina-3-glucurónido y tres compuestos de tipo flavonoide, ligados a las LDL humanas (Publicación 3).

A fin de investigar la capacidad de los CF del aceite de oliva para unirse a las LDL se incubaron CF del aceite de oliva con plasma humano y se procedió a la determinación de CF en la partícula de LDL, en el Departamento de Bromatología i Nutrició de la Facultat de Farmàcia de Barcelona. Los resultados mostraron la capacidad del tirosol, un compuesto fenólico característico del aceite de oliva virgen, para unirse a las LDL. Los niveles de tirosol, que no estaba presente en la LDL control, y de otros CF, previamente presentes en la LDL control, incrementaron en relación directa con la concentración de los CF del aceite de oliva incubados con el plasma (Publicación 4). El incremento de la concentración de CF en la LDL estuvo directamente relacionado con un incremento en la fase de latencia de los dienos conjugados en las LDL (Publicación 4, Anexe 1.1 y Anexe 1.2).

Una vez testado los efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos del aceite de oliva *in vitro* y demostrada la incorporación de CF a la LDL *in vivo*, se diseñaron varios estudios en humanos. Primero se demostró la biodisponibilidad de los CF de aceite de oliva en humanos (Anexo 1.3). La Unitat de Farmacologia del Institut Municipal de Investigació Mèdica, desarrolló un método para determinar tirosol e hidroxitirosol en orina humana, como paso previo a los estudios *in vivo*. Se llevaron a cabo tres estudios con voluntarios sanos para investigar los efectos postprandiales de la administración de aceite de oliva y, los efectos a corto y largo plazo de un consumo de aceite de oliva regular y moderado. En los estudios anteriormente mencionados, se testó la posible utilización del tirosol y hidroxitirosol como marcadores de una ingesta rica en aceite de oliva (anexo 1.4).

Se observó que tras la ingesta de 50 ml de aceite de oliva virgen ocurría un estrés oxidativo postprandial, a las 4-6 horas de la ingestión del aceite, reflejado en un incremento de los peróxidos lipídicos en plasma y VLDL, y en un descenso de la actividad plasmática de las enzimas antioxidantes GSH-Px y GSSG-Rd. Sin embargo, no se observaron cambios en la resistencia a la oxidación de la LDL en esta fase postprandial. Los niveles de peróxidos lipídicos incrementaron en las lipoproteínas de baja densidad (VLDL) pero no en las LDL. Asimismo en la fase postprandial observamos un incremento de la concentración en plasma de ácido oleico, linoleico, palmítico y

esteárico, cuyos análisis fueron realizados en el Departamento de Bromatologia i Nutrició de la Facultat de Farmàcia de Barcelona. El incremento de ácido linoleico estuvo directamente relacionado con los niveles de peróxidos lipídicos e inversamente relacionado con los niveles de GSH-Px y GSSG-Rd (Publicación 5).

En el estudio de los efectos a corto plazo de la ingestión de aceite de oliva virgen sobre el estrés oxidativo se determinó un incremento de la resistencia de la LDL a la oxidación, de la actividad plasmática de GSSG-Rd y de la concentración de ácido oleico en plasma, tras una semana de consumo de aceite de oliva virgen (25 ml/día). El cociente linoleato/oleato estuvo en relación directa con los niveles de peróxidos lipídicos en plasma y en relación inversa con los niveles de la actividad plasmática de GSSG-Rd (Publicación 5).

Por último, se realizó un ensayo clínico a doble ciego, randomizado y controlado, con el fin de estudiar los efectos a largo plazo (3 semanas) de la ingestión de aceites de oliva con diferente contenido fenólico (aceite de oliva refinado= nulo, común= medio y virgen= alto contenido). La utilización del tirosol como marcador de la ingesta de aceite de oliva, reflejó el buen cumplimiento de la ingesta del aceite por parte de los participantes. Se demostró un descenso de los niveles de LDL oxidada en plasma y de resistencia de la LDL a la oxidación en relación directa con el contenido de CF presentes en el aceite de oliva consumido. El diseño del estudio permitió atribuir la mejora del perfil oxidativo/antioxidativo a los CF del aceite de oliva; El contenido en CF, era el carácter diferencial entre los tres aceites ya que la composición en α -tocoferol y β -caroteno era similar (trabajo sometido para su publicación).



DISCUSIÓN

▪ **Discusión de los resultados**

El aceite de oliva es la principal fuente de grasa en la alimentación de la población mediterránea. En nuestro país se estima que el 35% de la energía diaria proviene de la grasa, debido al alto consumo de AGMI del aceite de oliva ²¹⁷. Por ello consideramos que el aceite de oliva es un buen candidato para explicar parte de los beneficios asociados a la dieta Mediterránea. Al ser el aceite de oliva un alimento característico de la dieta Mediterránea, se diseñó un proyecto con el fin de estudiar los efectos de su consumo en nuestra población. Estos estudios comprendieron ensayos *in vitro* y ensayos en humanos, incluyendo estos últimos la determinación de CF en LDL de sujetos sanos no suplementados y el análisis de los efectos biológicos antioxidantes *in vivo* de los CF del aceite de oliva.

Nuestros estudios han demostrado la capacidad antioxidante del aceite de oliva, cuyo poder antioxidante está asociado a la concentración y naturaleza de los CF presentes en el aceite de oliva. Asimismo se constató la unión del tirosol, CF característico del aceite de oliva virgen, a la partícula de LDL. Por último, se demostraron los efectos antioxidantes de la ingestión de aceite de oliva con distinto contenido fenólico, en situación postprandial, a medio y a corto plazo, en humanos.

1. Influencia de los distintos componentes del aceite de oliva en la protección de la LDL a la oxidación

El primer estudio dentro del grupo de ensayos: “Estudios de la capacidad protectora *in vitro* de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la oxidación de la LDL” estuvo dirigido a discriminar la potencial capacidad antioxidante de los CF del aceite de oliva frente a la de los componentes más significativos del aceite de oliva: AGMI y vitamina E. Los AGM provenientes de la dieta han demostrado reducir los niveles de factores de riesgo de padecer EC ¹⁴⁸. Aunque los estudios prospectivos de larga duración sobre suplementación con vitamina E muestran resultados contradictorios, está aceptado por la comunidad internacional que la ingestión de alimentos ricos en vitamina E está asociada a un menor riesgo de EC ¹⁶². El papel protector frente al estrés oxidativo de los CF provenientes de la dieta, adquiere cada día mayor interés ^{147 183 184 189}. El consumo de compuestos fenólicos como los flavonoides se ha asociado a una reducción de la mortalidad cardiovascular en diversos estudios epidemiológicos observacionales ¹⁸⁹.

Aunque ambos tipos de aceites de oliva (con o sin compuestos fenólicos) retardaron la oxidación de la LDL, se observó un incremento de la actividad antioxidante a mayor concentración fenólica en el aceite de oliva. El aceite de oliva refinado, sin compuestos fenólicos detectables, prolongó la fase de latencia de la formación de dienos conjugados en un 52%. Esta protección frente a la oxidación de la LDL es atribuible a los compuestos no-fenólicos con capacidad antioxidante presentes en el aceite de oliva. Al añadir aceite refinado a la LDL aislada se alcanzó una concentración final de α -tocoferol de 4,38 mg/L. Frankel y cols.²¹⁸ observaron un retraso de la fase de latencia del 42% en la oxidación de LDL inducida por cobre, trabajando a una concentración de α -tocoferol similar a la utilizada en nuestro experimento. Sin embargo, el hecho de que el retraso en la fase de latencia tras la adición de aceite refinado fuera menor que el obtenido con los otros aceites de oliva con contenido fenólico, indica que los fenoles del aceite de oliva tienen un papel preponderante frente a la oxidación de la LDL *in vitro*. Otros autores también han atribuido a otros CF de la dieta como el resveratrol, lignanos y catequinas más poder antioxidante *in vitro* que la Vitamina E^{218 203 219}. Por el contrario Nigdikar et al han publicado que la vitamina E retrasa la lag time, 4-5 veces más que el contenido fenólico de un vino tinto²²⁰.

Las concentraciones de compuestos fenólicos, α -tocoferol y β -caroteno, de los aceites con contenido fenólico utilizados (aceite de oliva común y virgen) mostraron una asociación positiva con el retraso en la oxidación de la LDL. Por ello y a fin de obtener una estimación del efecto sobre la oxidación de la LDL atribuible a cada componente se realizaron análisis de regresión múltiple con dichas variables. Los compuestos fenólicos de los aceites de oliva común y virgen fueron los principales responsables del retraso en la oxidación de la LDL. Observamos una contribución menor aunque significativa del α -tocoferol al incremento de la fase de latencia en el experimento con aceite de oliva común. No se observaron asociaciones con las concentraciones de β -caroteno. Cabe mencionar que la concentración de β -caroteno presente en las soluciones de incubación fue menor que la utilizada habitualmente para inhibir la formación de dienos conjugados²²¹. Estos resultados indican que aunque todos los componentes antioxidantes del aceite de oliva pueden estar involucrados en la protección que ejerce el aceite sobre la oxidación de la LDL los compuestos fenólicos poseen la mayor capacidad antioxidante *in vitro*.

La distinta actividad antioxidante de los aceites con contenido fenólico, común y virgen, a idénticas concentraciones de fenoles totales, podría atribuirse a una diferencia en la naturaleza de los compuestos fenólicos. El examen de los perfiles cromatográficos de ambos aceites mostró

diferencias entre ambos. Por ello el grado de actividad antioxidante *in vitro* de los aceites de oliva depende de la cantidad pero también de la naturaleza de los CF ²²².

Se requieren posteriores estudios para identificar y cuantificar los distintos CF del aceite de oliva, su biodisponibilidad y sus efectos antioxidantes en humanos *in vivo*, a fin de determinar cual sería el mejor perfil antioxidante de CF en un aceite de oliva y poder así establecer recomendaciones dietéticas en torno a su consumo.

2. Efectos de los extractos fenólicos de aceite de oliva sobre la protección de la LDL a la oxidación

Una vez establecido el papel preponderante que, sobre la resistencia a la oxidación de la LDL *in vitro*, tenían los CF del aceite de oliva, se procedió a analizar separadamente diversos aspectos de su capacidad antioxidante. En una primera fase se analizaron los efectos protectores de los CF del aceite de oliva sobre la oxidación metal- y radical-dependiente de la LDL aislada. En una segunda fase se estudiaron los efectos protectores sobre la oxidación metal dependiente de la LDL tras incubación de los CF del aceite de oliva con el plasma.

Primero se confirmó que los extractos fenólicos del aceite de oliva virgen inhiben la oxidación de la LDL *in vitro* tanto metal-dependiente como radical-inducida de forma lineal a la concentración de fenoles incubada con la LDL aislada ²²³. Diversos autores habían demostrado previamente la capacidad antioxidante de CF aislados del aceite de oliva ^{224;225 226, 227 228}. En este estudio se comprobó la capacidad antioxidante *in vitro* del contenido total de CF del aceite de oliva virgen. Los resultados fueron concordantes con los obtenidos por Caruso y cols. ²²⁹.

En un segundo experimento se observó un incremento de la resistencia de la LDL a la oxidación, tras la adición de extractos fenólicos de aceite de oliva virgen al plasma y posterior aislamiento de la LDL ²²³; se detectó una relación exponencial entre el contenido de CF y el retraso del tiempo de latencia de formación de dienos conjugados. Comparando ambos experimentos, las concentraciones de CF necesarias para conseguir la inhibición del 50% (CI₅₀) y 100% (CI₁₀₀) del tiempo de latencia fueron superiores en el experimento de la adición de extractos fenólicos a plasma seguido por el aislamiento de LDL (CI₅₀=98,5 y CI₁₀₀=148 mg/Kg), que en el experimento de la adición de extractos fenólicos a LDL aislada (CI₅₀=0,12 mg/Kg y CI₁₀₀=0,24). Ello indica que sólo una pequeña fracción del contenido fenólico de la muestra podría unirse a la LDL. Algunos autores han descrito resultados similares en estudios con CF de vino tinto y flavonoides de té ^{230 219}. Kerry y

cols. establecieron que eran necesarios 70 mg/L de vino tinto para retrasar el tiempo de latencia un 60% ²³⁰. Por otra parte Ishikawa y cols. han descrito que 93 mg/L de epigallocatequina retrasaban un 50% el tiempo de latencia ²¹⁹. Este estudio sugiere que los CF, de naturaleza anfipática mayoritariamente, podrían incorporarse en la partícula de LDL.

La adición de extractos de aceite de oliva a LDL aislada sería representativo de la situación en plasma donde los CF pueden actuar, debido a su naturaleza anfipática, como inhibidores de la oxidación tanto en el medio acuoso como unidos a lipoproteínas. Ello implicaría una capacidad para inhibir la formación de LDL mínimamente modificadas en el torrente sanguíneo ¹⁴⁹. En este punto, es importante mencionar que la relevante protección conferida por las moléculas polares antioxidantes en la circulación sanguínea, ha sido descrita por algunos autores ²³¹. La preincubación de los CF del aceite de oliva con plasma y posterior aislamiento de la LDL, podría emular la situación en la íntima arterial donde la oxidación de las lipoproteínas tiene lugar en dominios aislados de la protección que pueden conferir los antioxidantes plasmáticos ¹⁴⁹.

3. Detección de compuestos fenólicos en partículas de LDL humanas

Los resultados obtenidos en el estudio anterior apuntaban la posibilidad de una unión de los CF del aceite de oliva a la partícula de LDL, dado que sólo los antioxidantes unidos a la lipoproteína podían ser responsables del retraso en su oxidación tras la incubación de CF del aceite de oliva con plasma y posterior aislamiento de la LDL. Durante el proceso de oxidación de la LDL en la capa íntima arterial, espacio desprovisto de la riqueza de antioxidantes existente en el plasma, la carga antioxidante endógena de la lipoproteína es crucial para su protección ²³². Nigdikar y cols. observaron un incremento de CF totales en LDL tras la ingestión de vino tinto (375mL) con el método Folin-Ciocalteu ²³³. Sin embargo, el método del reactivo Folin-Ciocalteu es poco específico y sensible a una gran cantidad de compuestos oxidables. La confirmación química analítica de la unión de CF a las LDL *in vivo*, una de las cuestiones consideradas clave por la comunidad internacional ²²⁰, no había sido establecida previamente y requería una metodología más precisa. Mediante el desarrollo de un método cromatográfico, con extracción en fase sólida y HPLC-DAD, se pudo demostrar la existencia de CF ligados a la partícula de LDL en individuos sanos no suplementados ²¹⁴. Los 3 picos mayoritarios presentes en LDL, aunque no fueron identificados, presentaron un tiempo de retención y un espectro compatible con el de los flavonoides. Entre los CF ligados a la LDL humana se identificaron la rutina y la quercetina-3-glucurónido por su tiempo de

retención y espectro. La capacidad de los CF para unirse a la partícula de LDL está ligada al coeficiente de partición de la molécula, ya que el plasma es un compartimiento acuoso y la partícula de LDL está rodeada de una cubierta anfipática. El CF presente en la LDL con una concentración menor fue la rutina, lo que podría ser un reflejo de su bajo coeficiente de partición^{234 235}. La escasa capacidad de la rutina para penetrar en membranas lipídicas, ha sido descrita en la literatura científica²³⁶.

Es importante destacar que la determinación de CF se realizó en LDL aislada de individuos no suplementados, lo que apunta a que una dieta habitual de nuestro medio, proporcionaría un aporte de CF antioxidantes a las lipoproteínas. Por otra parte, el hecho de que los CF se determinen en LDL después del aislamiento de la partícula mediante una ultracentrifugación secuencial (por flotación y por gradiente de densidad) sugiere una unión fuerte de los CF a la lipoproteína. Los resultados de este estudio aportan evidencia de que varios CF provenientes de la dieta pueden ligarse a partículas de LDL. La importancia de la capacidad de unión de los CF a la LDL radica en que esta unión implica una accesibilidad directa de los CF a los posibles radicales peróxido que se puedan formar en la lipoproteína. Por consiguiente, los CF vehiculizados mediante la partícula de LDL, podrían ejercer su función antioxidante en el espacio subendotelial, donde se produce mayoritariamente la oxidación de la lipoproteína²³².

4. Estudios *in vitro* sobre la capacidad de unión de los compuestos fenólicos del aceite de oliva a la LDL humana.

Una vez establecido que los CF provenientes de la dieta pueden incorporarse a las partículas de LDL, se procedió a investigar la capacidad de los CF específicos del aceite de oliva para unirse a la LDL. Tras la incubación de CF de aceite de oliva con plasma de voluntarios sanos y posterior aislamiento de la LDL, se observó un aumento de la concentración del contenido total de CF en la LDL directamente relacionado con la concentración de CF incubada con el plasma²³⁷.

El análisis cromatográfico mostró que la rutina y cuatro CF con tiempo de retención y espectro compatible con el de los flavonoides se encontraban ligados a la LDL control. Estos CF no se detectaron en los extractos del aceite de oliva incubados con el plasma, e incrementaron su concentración en LDL en relación directa con la concentración de CF del aceite de oliva incubados con el plasma. El tirosol, sin embargo, no estaba presente en la LDL control y asimismo se observó un incremento significativo de su concentración en la partícula de LDL en relación directa con la

concentración de CF del aceite de oliva incubados con el plasma. Estos resultados muestran la capacidad del tirosol, CF característico del aceite de oliva, de unirse a la LDL *in vitro* y la capacidad de los CF del aceite de oliva para proteger a otros CF previamente unidos a la partícula de LDL ²³⁷. En nuestros estudios anteriores observamos la capacidad del contenido total de CF del aceite de oliva de proteger la LDL frente a la oxidación inducida *in vitro*. Aquí aportamos evidencia de uno de los posibles mecanismos a través de los cuales podría alcanzarse esta protección. El hecho de que el tirosol estuviera presente en los extractos fenólicos del aceite de oliva incubados con el plasma y no en la LDL control, indica claramente que el origen de la unión del tirosol a la partícula de LDL son los extractos fenólicos del aceite. Respecto al incremento en la LDL de los compuestos tipo flavonoide previamente ligados a la lipoproteína, podemos descartar que fueran derivados (por modificaciones oxidativas o químicas) de los CF presentes en los extractos del aceite de oliva. La presencia de flavonoides en aceite de oliva virgen ha sido descrita en concentraciones muy reducidas (0.1mg/Kg de aceite de oliva virgen) ²²⁹, pero no fueron detectados en los extractos de aceite de oliva utilizados en este estudio. Por otra parte, a partir de estas concentraciones tan modestas hubiera sido muy difícil detectar una incorporación de flavonoides procedentes del aceite de oliva en la LDL. El incremento de los CF previamente existentes en LDL, se puede atribuir a su preservación debido a la protección conferida por los CF de aceite de oliva virgen incubados con el plasma, durante el aislamiento de la LDL y la posterior extracción de los CF.

El incremento de CF (específicos o en términos globales) en LDL después de incubar CF de aceite de oliva virgen con plasma, se asoció directamente con un incremento de la resistencia de la LDL a la oxidación. Una parte de este efecto puede atribuirse al incremento de los CF antioxidantes ligados a la LDL. La capacidad antioxidante de la rutina ha sido establecida en estudios *in vitro* después de su adición a lipoproteínas aisladas ^{238 239 234}. Asimismo, varios flavonoides procedentes de la dieta han mostrado poseer propiedades antioxidantes *in vitro* ^{234 240} y *in vivo* ^{189 219}. El consumo de flavonoides se ha asociado a una reducción de la incidencia de EC ^{188 190}. Aunque la capacidad antioxidante del tirosol parece menos potente que la de otros CF del aceite de oliva (como hidroxitirosol, la oleuropeína o ácido cafeico), el tirosol ha demostrado inhibir la generación de 5-lipoxigenasa en cultivos de leucocitos ²⁴¹ y proteger las células intestinales Caco-2 contra los efectos citotóxicos y citostáticos de la LDL oxidada ²⁴². Asimismo, Caruso y cols. demostraron la capacidad del tirosol de inhibir la generación de oxisteroles durante la fotooxidación de la partícula de LDL ²²⁹. Aunque no se ha constatado específicamente su unión químico-analítica a la LDL en este estudio,

otros CF presentes en el aceite de oliva con notables propiedades antioxidantes *in vitro* como el hidroxitirosol y la oleuropeína^{241 201 202 147}, también podrían unirse a la misma en cantidades no detectables por el método HPLC-DAD y contribuir a proteger a la partícula de LDL de la oxidación. La unión de los CF del aceite de oliva a la LDL en la protección frente la peroxidación lipídica en la LDL, puede estar relacionado con la preservación de otros antioxidantes que bloquean las reacciones en cadena de la lipoperoxidación como el α -tocoferol o los flavonoides previamente ligados a la lipoproteína o por efecto directo al estar unidos a la partícula²³⁷. La preservación de la vitamina E en la protección de la LDL frente a la oxidación, conferida por el hidroxitirosol está descrita en la literatura²⁰².

En este estudio se observó un incremento cualitativo y cuantitativo de CF unidos a LDL después de una preincubación de CF de aceite de oliva virgen con plasma. Se demostró la capacidad del tirosol de unirse a la LDL *in vitro*, pero se requería demostrar la biodisponibilidad de los CF del aceite de oliva virgen en humanos y estudiar los efectos antioxidante de los CF del aceite de oliva *in vivo*.

5. Estudios de los efectos antioxidantes del aceite de oliva en humanos

Previo al inicio de los estudios en humanos y dentro del marco del estudio: "Efectos antioxidantes del aceite de oliva" se realizó un estudio de biodisponibilidad de los CF del aceite de oliva. Se estableció la biodisponibilidad del tirosol y el hidroxitirosol, dos CF característicos del aceite de oliva virgen con propiedades antioxidantes²⁰⁰, a partir de la ingestión de aceite de oliva en su forma natural.

Estos trabajos han permitido utilizar la determinación de estos CF como marcadores de la ingesta de aceite de oliva en nuestros posteriores estudios^{198 199}.

Una vez comprobada la biodisponibilidad del tirosol e hidroxitirosol se procedió a efectuar diversos estudios en humanos. En primer lugar se examinaron los efectos postprandiales y a corto plazo el consumo de aceite de oliva virgen en voluntarios sanos. En segundo lugar se realizó un estudio para establecer el papel antioxidante de la ingesta de CF procedentes del aceite de oliva virgen en voluntarios sanos.

5.1. Efectos sobre el estrés oxidativo postprandial y a las 24 horas de la ingestión de aceite de oliva virgen

Se estudiaron los efectos de una ingesta aguda de 50 mL de aceite de oliva virgen sobre el balance oxidativo/antioxidativo, y sobre los niveles de ácidos grasos y triglicéridos plasmáticos, en 16

voluntarios sanos (Ver protocolo en Anexo 1).

5.1.1. Estrés oxidativo postprandial de la ingestión de aceite de oliva virgen

Tras la administración de 50 mL de aceite de oliva virgen, se observó un estrés oxidativo postprandial a las 4-6 horas de la ingestión, reflejado en un incremento de peróxidos lipídicos y un descenso de la actividad de los enzimas antioxidantes asociados al sistema glutatión. El hecho de que la GHS-Px convierta los hidroperóxidos formados por los radicales libres en alcoholes no tóxicos⁴, y la GSSG-Rd actúe regenerando el glutatión oxidado a su forma reducida²⁴³, podría explicar el descenso de la actividad de estos enzimas debido a su consumo; un patrón habitual, en un estado de estrés oxidativo, es observar una oxidación de lípidos incrementada junto con un descenso de las defensas antioxidantes^{244 245}.

El incremento de peróxidos lipídicos observado podría deberse a su generación durante la digestión^{244 245}, debido al pH y a la presencia de catalizadores (i.e. metales de transición) de la lipoperoxidación³⁸. Por otra parte el consumo de lípidos oxidados a través de dieta, está descrito como uno de los orígenes de lipoperóxidos^{246 247}. Los índices máximos permitidos por la Comunidad Europea, sobre la cantidad de peróxidos y productos secundarios carbonilos existentes en un aceite de oliva virgen, son de 20 miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de masa (meq. O₂/Kg) y de 0,2 (coeficiente de extinción K270), respectivamente. Aunque el índice de peróxidos y la K270 del aceite de oliva virgen administrado en este estudio se encontraban muy por debajo de los límites establecidos, no se puede descartar totalmente un posible aporte de lípidos oxidados a través del aceite ingerido, lo que podría contribuir al estrés oxidativo postprandial observado. La hiperglucemia es otra causa ampliamente conocida de generación de radicales libres en el organismo²⁴⁸. Aunque no se determinó la glicemia en la fase postprandial temprana, cuando se produce el pico de glicemia, se detectó un aumento moderado de la glucosa a las 2 horas de la ingesta del aceite de oliva. El incremento postprandial de glucosa e insulina se ha relacionado con el estrés oxidativo en pacientes diabéticos²⁴⁹, sin embargo la relevancia en la generación de radicales libres de los niveles de glucosa y insulina en individuos sanos está por dilucidar.

Nuestros resultados indican que las partículas de VLDL sufren una oxidación después de la administración de 50 mL de aceite de oliva virgen. El incremento del contenido en triglicéridos en las VLDL se ha relacionado con el estrés oxidativo en pacientes con Diabetes tipo II²⁵⁰. Por otra parte, las lipoproteínas remanentes postprandiales se han asociado con una disfunción endotelial²⁵¹. Después de una comida rica en aceite de oliva, las lipoproteínas ricas en triglicéridos reflejan la

composición en ácidos grasos del aceite de oliva, con un incremento de linoleil-oleil- y palmitoil-oleil-triglicéridos ¹⁵⁰. Estos datos, aportados por Abia y cols., coinciden con el aumento del ácido oleico y linoleico plasmático en la fase postprandial después de la ingesta de 50 mL de aceite de oliva virgen, observado en nuestro estudio. Está ampliamente aceptado que las lipoproteínas ricas en ácido oleico son más resistentes a la oxidación ^{152 153 146 154 139 252}. Por el contrario el ácido linoleico es uno de los ácidos grasos provenientes de la dieta más oxidable ²⁵³. En nuestro estudio, a pesar del incremento concomitante de ácido oleico junto con el ácido linoleico plasmático, el desequilibrio oxidativo/antioxidativo a las 4 horas de la administración del aceite de oliva estuvo directamente relacionado con los niveles elevados de ácido linoleico.

A pesar del estrés oxidativo postprandial reflejado en el ascenso de peróxidos lipídicos en plasma y en las VLDL, no se observaron cambios en la resistencia de la LDL a la oxidación. Estos resultados coinciden con el trabajo de Nicolaiew y cols., quienes no detectaron cambios de la resistencia de la LDL a la oxidación a las 6 horas, después de la ingesta de una dieta rica en aceite de oliva virgen ¹⁵. En nuestro estudio, aunque en las partículas VLDL aumentaron los equivalentes de malondihaldeído, indicando un incremento de su estado de oxidación, no se apreció un ascenso de su generación en las LDL ²¹⁵. En las partículas de LDL el contenido de ácido oleico, α -tocoferol y CF tendió a incrementar en la fase postprandial, aunque no alcanzó la significación estadística ²⁵⁴. Gimeno y cols. consideran que esta tendencia no llega a ser significativa, a causa de que el periodo de blanqueo previo al que fueron sometidos los participantes produjo una depleción de antioxidantes, que retrasó la recuperación de los niveles basales de los mismos ²⁵⁴. El hecho de que la LDL se mantuviera protegida frente a la oxidación a pesar de la existencia del estrés oxidativo postprandial ²¹⁵, podría atribuirse a un sinergismo entre los antioxidantes de la partícula de LDL ²⁵⁴. Se ha descrito un incremento de la susceptibilidad de la LDL a la oxidación ²⁵⁵ y niveles elevados de peróxidos lipídicos ²⁵⁶ después de una dieta rica en grasa. Otros estudios sin embargo, no han encontrado cambios en los marcadores de oxidación lipídica en individuos sanos después de una ingesta rica en grasas ²⁵⁷, grasa sometida a estrés térmico o grasa sin calentar ²⁴⁷. La lipemia postprandial está reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo de la arteriosclerosis y se ha asociado con un aumento de lipoproteínas ricas en triglicéridos y sus remanentes ^{258 80}, pudiendo dañar directamente el endotelio vascular a través de mecanismos oxidativos ²⁵⁹. El impacto de la ingesta de aceite de oliva sobre el estrés postprandial sigue pendiente de dilucidar.

Varios autores han publicado que el consumo de 100g de aceite de oliva no influye sobre la

resistencia de la LDL a la oxidación durante el periodo postprandial ²⁶⁰, ²⁶¹, ²⁶². Por otra parte el aceite de oliva es rico en ácido oleico, el cual ha demostrado aumentar la resistencia de la LDL a la oxidación ²⁶³. Cabe considerar también que los antioxidantes presentes en el aceite de oliva, podrían proteger a la partícula de LDL de la oxidación. En estudios con animales, se ha demostrado que la capacidad antioxidante del plasma aumenta 4h después de la administración de una dosis única de alpechín (aguas residuales que se obtienen después del prensado de la oliva) ²⁶⁴. Visioli y cols. han descrito un descenso en la excreción de F₂-isoprostanos en orina de 24 horas, asociado al contenido en CF de aceite de oliva administrado a humanos ²⁶⁵.

5.1.2. Efectos sobre el estrés oxidativo a las 24 horas de la ingestión de aceite de oliva virgen

Después del estrés oxidativo postprandial detectado, tanto los niveles plasmáticos de peróxidos lipídicos como la actividad de los enzimas antioxidantes recobraron la normalidad a las 24 horas de la ingestión de 50 mL de aceite de oliva virgen. Un día después de la ingesta del aceite de oliva virgen se apreció una mayor resistencia de la LDL a la oxidación, mientras que el ácido oleico plasmático y la razón AGMI/AGPI se elevaron. En este periodo, el aceite de oliva fue la única fuente dietética de antioxidantes y AGMI, por ello la mejora en la resistencia de la LDL a la oxidación puede atribuirse al consumo de aceite de oliva virgen (50mL) en este día; Se detectó un incremento de α -tocoferol en la partícula de LDL a las 24 horas de la administración del aceite de oliva y se observó asimismo un incremento, aunque no significativo, de CF y AGMI en esta lipoproteína. ²⁵⁴.

Cabe mencionar que la principal limitación de este estudio fue no poseer un grupo control, que realizara una ingesta aguda de otro tipo de grasa. Se requieren más estudios para dilucidar si el consumo de aceite de oliva virgen conlleva una mayor protección que dietas ricas en otras grasas frente un estrés oxidativo postprandial, y si el distinto contenido en CF de los aceites de oliva pueden influir en el estrés posprandial posterior a su ingesta.

5.2. Efectos a corto plazo de la ingestión de aceite de oliva virgen sobre el estrés oxidativo

Después de una administración de 25 mL/día de aceite de oliva virgen durante una semana, se observó un incremento del ácido oleico sin cambios en el contenido total de ácidos grasos tanto en plasma ²¹⁵ como en la partícula de LDL ²⁵⁴. Ello confirma el buen cumplimiento de los voluntarios en la toma diaria de aceite de oliva.

A pesar de que la administración diaria de aceite de oliva virgen fue sólo durante una semana, los efectos beneficiosos sobre la resistencia de la LDL a la oxidación son parecidos a los descritos en estudios anteriores en humanos, con dietas enriquecidas con AGMI y con periodos de intervención más largos (3-4 semanas)^{253 139 154 266}. Ello puede deberse a que los voluntarios antes de empezar el periodo de intervención, efectuaron un periodo de blanqueo de aceite de oliva y alimentos ricos en antioxidantes (4 días) con una dieta libre en aceite de oliva y antioxidantes. Por ello, junto con el aceite de oliva, otros compuestos antioxidantes provenientes de la dieta podrían influir en el aumento de la resistencia de la LDL a la oxidación y de la actividad de los enzimas antioxidantes. Después del consumo regular y moderado de aceite de oliva virgen durante una semana, el descenso del cociente linoleico/oleico en plasma se relacionó con un mejor equilibrio oxidativo/antioxidativo, reflejado en una disminución plasmática de lipoperóxidos y un incremento de la actividad plasmática de GSSG-Rd²¹⁵. La mayor resistencia de la LDL a la oxidación observada se puede atribuir en parte a la sustitución de ácido linoleico, ácido graso altamente oxidizable²⁵³, en la lipoproteína por ácido oleico. Sin embargo, estudios recientes con liposomas enriquecidos con ácido oleico sugieren un mecanismo protector propio del ácido oleico sobre la oxidación de la LDL²⁶⁷. El incremento de la actividad plasmática de la GSSG-Rd indicó su preservación ante una situación oxidativa/antioxidativa favorable. Aunque se dispone de poca información de la respuesta *in vivo* de los enzimas antioxidantes, frente a un consumo notable de grasa, se ha establecido un aumento de la actividad de la GSH-Px y glutatión transferasa después de la suplementación con aceite de oliva en conejos²⁶⁸. Por otra parte se observó un aumento del contenido de α -tocoferol, CF y ácido oleico en LDL, indicativo de un estado de defensa ante una posible agresión oxidativa²⁵⁴.

Visioli y cols. han descrito un estado oxidativo/antioxidativo favorable a los 4 días de la administración de alpechín a ratas²⁶⁹, por otra parte han descrito un descenso de 8-isoprostaglandinas F₂ a los 2 y 4 días de la administración de alpechín a ratas²⁷⁰. Como ya se ha mencionado anteriormente, nuestros resultados concuerdan con los de otros autores^{253 139 154 266}

Así los efectos beneficiosos de la ingestión de aceite de oliva virgen podrían estar ligados a un consumo moderado y continuado de una dosis razonable para el consumidor, pudiendo entonces considerarse al aceite de oliva virgen como un alimento natural funcional.

Del mismo modo que se ha indicado en el apartado anterior cabe destacar, como limitación del estudio, la falta del grupo control.

5.3. Efectos a largo plazo de la ingestión de aceites de oliva con diferente contenido fenólico sobre la protección de la LDL a la oxidación

Se diseñó un ensayo clínico randomizado, cruzado y a doble ciego, con 30 voluntarios sanos, con el fin de investigar los efectos antioxidantes del consumo de 25 mL de aceite de oliva crudo y identificar el papel de los CF. Se realizaron tres periodos de intervención (3 semanas) con tres tipos de aceite (con un contenido en CF nulo, medio y alto, de 0, 68 y 150 mg/Kg EAC), precedidos por un periodo de blanqueo (2 semanas) en el cual se administró un aceite de oliva sin CF (aceite de oliva refinado). Los tres aceites administrados procedían de la misma variedad de oliva y cosecha, lo que confería la máxima homogeneidad posible a los aceites en cuanto a composición en ácidos grasos y antioxidantes, excepto en su contenido en CF. El estudio se llevó a cabo en una comunidad religiosa a fin de conseguir el máximo control sobre la dieta y la máxima homogeneidad en los estilos de vida de los participantes. Durante todo el estudio los voluntarios no consumieron alimentos con un alto contenido en CF. Por otra parte se confirmó que la dieta y el ejercicio físico (controlados mediante cuestionarios) no variaron a lo largo de la realización del estudio. El cumplimiento de los voluntarios se verificó mediante la determinación de los niveles de tirosol en orina (CF presente en el aceite de oliva no refinado), parámetro que demostró ser un buen reflejo del consumo de alimentos ricos en tirosol. Mediante el registro de la dieta diaria y la determinación urinaria de tirosol, se confirmó que los tres periodos de blanqueo previos a cada intervención fueron efectivos y comparables entre ellos.

5.3.1. Antecedentes sobre el estudio de los efectos antioxidantes de un consumo agudo y mantenido de aceite de oliva en humanos

A pesar de que el beneficio del consumo de aceite de oliva sobre el perfil lipídico^{271 272 273} y la resistencia de la LDL a la oxidación inducida *in vitro* están ampliamente aceptados^{224 225 226, 227, 228 203}, los efectos beneficiosos *in vivo* de sus CF están todavía cuestionados. Estudios en modelos animales han mostrado un aumento de la resistencia de la LDL a la oxidación a largo plazo aunque acompañado de un aumento de los niveles plasmáticos de malondihaldeido, después del consumo de aceite de oliva durante 6 semanas²⁷⁴. Varios estudios en humanos no han encontrado cambios en los marcadores de estrés oxidativo utilizados, después del consumo durante 3-4 semanas de aceite de oliva con distinto contenido fenólico^{260, 261, 275}. Por otra parte Ramirez-Tortosa y cols.²⁷⁶ han demostrado un ascenso de la resistencia de la LDL a la oxidación y un descenso de la captación por

parte de macrófagos de LDL oxidada, asociado al contenido en CF del aceite de oliva, después de la administración de aceite de oliva virgen y refinado durante 3 meses. Recientemente en un estudio con 171 casos y 171 controles, se ha encontrado una reducción estadísticamente significativa del riesgo de infarto agudo de miocardio no fatal del 82%, entre los que consumían aceite de oliva valorado por cuestionarios (aproximadamente 60mL/día) ²⁷⁷.

En la tabla 10 y 11 se han representado los diferentes estudios de intervención en humanos sobre los efectos postprandiales de una ingesta aguda de aceite de oliva y los efectos de un consumo mantenido (a corto o a largo plazo) de aceite de oliva, respectivamente. Los distintos resultados se pueden atribuir a las características de los participantes (por ejemplo pacientes versus voluntarios), recomendaciones dietéticas durante el estudio, marcadores de oxidación utilizados, duración de los periodos de intervención y diferencias en el contenido de CF. Algunos de estos estudios carecen de un grupo control, y en otros se comparó el valor de los marcadores oxidativos correspondiente al final de los períodos de intervención, sin ponderarlos respecto al valor basal previo a la intervención; por tanto al no haberse analizado la homogeneidad de los valores basales previos a cada periodo de intervención, la seguridad de que los periodos de blanqueo han sido efectivos no existe.

Tabla 10. Estudios en humanos sobre el efecto antioxidante postprandial del consumo de aceite de oliva

Ref	Intervención	n	Dosis de CF	Diseño	Marcador de oxidación	Resultados ^a	Dirección del efecto de la intervención ^b
Nicolaiew y cols. ²⁶¹	Aceite de girasol enriquecido en ácido oleico vs aceite de oliva virgen	10	16 mg/d + 12 mg ^c en el último día	3 sem cruzado, extracción sanguínea a las 6h el último día	Incremento comparado con el t = 0 - tiempo de latencia ante la oxidación de la LDL (min) - velocidad max de ox de la LDL (μmol/min/g pt LDL) - dienos conjugados formados (μmol/ g pt LDL)	(alto vs bajo) ^d 4 vs 3 -1 vs -1 -30 vs -24	0/- (6h) 0 (6h) 0/+ (6h)
Visioli y cols. ²⁶⁵	Aceite de oliva con distintas cantidades de extractos fenólicos	6	- 24 mg - 49 mg - 73 mg -98 mg	4 dosis únicas, recolección de orina de 24 h	Excreción urinaria de 8-isoprostaglandinas F _{2α} - 24 mg - 49 mg ↓ - 73 mg -98 mg	(pg/mg creat) 273 228 ↑ 180 184	↓ + (dosis-dependiente)
Vissers y cols. ²⁷⁸	Aceite de oliva bajo en fenoles vs aceite de oliva con extractos ricos en fenoles polares y no polares	12	0 vs 100 mg	3 dosis únicas, extracciones de sangre a las 0, ½ y 2 h	Incremento comparado con el t = 0 - tiempo de latencia ante la oxidación de la LDL (min) - velocidad max de ox de la LDL (μmol/min/g pt LDL)	(alto vs bajo) ^e 4 vs 7 (½ h) 4 vs 8 (2 h) -1 vs -1 (½ h) 0 vs -2 (2 h)	0/- (½ h) 0/- (2h) 0 (½ h) 0 (2h)
Gimeno y cols. ¹⁴³	Aceite de oliva virgen	16	11 mg	una dosis única después de un blanqueo de 4 días, extracciones a las 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h	Resultado comparado con el de t = 0 - tiempo de latencia ante la oxidación de la LDL (min) - dienos conjugados formados (μmol/ g pt LDL) - velocidad max de ox de la LDL (μmol/min/g pt LDL) - relación MUFA/PUFA plasmática	(0h vs extracciones post.) 142 vs 149 (24h) 612 vs 759 (4h) 6,4 vs 4,8 (24h) 0,50 vs 0,58, 0,65, 0,7, 0,6,	0/+ (2, 4, 6, 8h) + (24h) 0/- (2, 4h) 0/+ (2, 4, 6, 8h) + (24h) + (2, 4, 6, 8, 24h)
Fitó y cols. ²¹⁵					- relación MUFA/PUFA en LDL - vitamina E en LDL - CF en LDL - glutation reductasa - glutation peroxidasa	0,58 (2, 4, 6, 8, 24h) 0,41 vs 0,47 5,9 vs 5,8 4,8 vs 7,0 50,1 vs 48,6, 49,4, 45,5, 51,9 (2, 4, 6, 24h) 905 vs 865, 836,842, 930 (2, 4, 6h)	0/+ (6h) 0/- (6h) 0/+ (8h) 0/- (2, 4, 6, 8h) 0/+ (24h) - (2, 4, 6h) 0/+ (24h)

^a Resultados expresados comparando dosis alta de CF versus baja para las referencias 1 y 3. Para la referencia 2 se expresa la reducción dosis-dependiente de isoprostanos en orina, a medida que aumenta el hidroxitirosol ingerido (tanto en su forma libre como formando parte de la aglicona de oleuropeína). Para las referencias 4 y 5 resultados expresados comparando los valores basales (después de 4 días de blanqueo) versus niveles a las 2, 4, 6, 8 y 24h post-administración.

^b 0 = no efecto, + = efecto protector, - = efecto negativo, 0/+ = efecto con tendencia a ser protector no significativo, 0/- = efecto con tendencia a ser negativo no significativo.

^c La ingesta de aceite de oliva y CF ha sido estimada apartir del contenido de MUFA en la dieta y en el aceite, asumiendo que todo el contenido de MUFA en la dieta proviene del aceite de oliva. Esta estimación sería la cantidad máxima de aceite de oliva consumido por día.

^d Se ha restado el tiempo de latencia de las 0h a el de las 6h.

^e Se ha expresado el incremento medio de las dosis de 100mg de extractos ricos en fenoles polares y no polares vs aceite de oliva bajo en fenoles

CF = compuestos fenólicos, creat = creatinina; ox = oxidación, pt = protein, ref = referencia, vs = versus.

Tabla 11. Estudios en humanos sobre el efecto antioxidante de un consumo sostenido de aceite de oliva

Ref	Intervención	n	Dosis de CF	Diseño	Marcador de oxidación	Resultados ^a	Dirección del efecto de la intervención ^b
Nicolaiew y cols. ¹⁵	Aceite de girasol enriquecido en ácido oleico vs aceite de oliva virgen versus	10	0 vs 16 mg/d ^c	3 sem cruzado	- tiempo de latencia ante la oxidación de la LDL (min) - velocidad max de ox de la LDL (μmol/min/g pt LDL) - dienos conjugados formados (μmol/ g pt LDL)	64 vs 59 11 vs 11 485 vs 483	0/- 0 0
Ramírez-Tortosa y cols. ²⁷⁹	Aceite de oliva refinado vs aceite de oliva virgen	24	3 vs 33 mg/d Vit E: 8 vs 12 mg/d	3 meses cruzado	- velocidad de formación de TBARS (nmol TBARS/mg pt LDL/μmol Cu ²⁺ /L) - captación de LDL oxidada por macrófagos (% de captación de LDL por U937 macrófagos)	15 vs 12 46 vs 35	+ +
Bonanome y cols. ²⁸⁰	liva refinado vs aceite de oliva virgen	14	tirosol + hidroxitirosol: 0 vs 0,4 mg/d	1 mes cruzado	-tiempo de latencia ante la oxidación de la LDL (min) -velocidad de peroxidación (nmol O ₂ captado/min)	47 vs 40 15 vs 13	0/- 0/+
Vissers y cols. ²⁸¹	Aceite de oliva virgen pobre en CF vs aceite de oliva virgen rico en CF	46	3 vs 21 mg/d	3 sem cruzado	- tiempo de latencia ante la oxidación de la LDL (min) - en LDL - en HDL - velocidad max de ox de la LDL (μmol/min/g pt LDL) - en LDL - en HDL - malondialdeido (μmol/L) - hidroperóxidos lipídicos (μmol/L) - carbonilos proteicos (nmol/mg pt) - capacidad plasmática reductora del férrico (nmol/L)	110 vs 109 69 vs 70 12 vs 12 4,6 vs 4,4 0,7 vs 0,7 0,4 vs 0,4 0,2 vs 0,2 1,1 vs 1,1	0 0 0 0 0 0 0 0
Gimeno y cols. ¹⁴³ Fitó y cols. ²¹⁵	Aceite de oliva virgen	16	4,6 mg/d	1 sem	Resultado comparado con el de t = 0 - tiempo de latencia ante la oxidación de la LDL (min) - dienos conjugados formados (μmol/ g pt LDL) - velocidad max de ox de la LDL (μmol/min/g pt LDL) - relació MUFA/PUFA plasmática - relació MUFA/PUFA en LDL - vitamina E en LDL - CF en LDL - glutation reductasa - glutation peroxidasa	(0h vs extracciones post.) 142 vs 163 612 vs 573 6,41 vs 5,3 0,50 vs 0,61 0,41 vs 0,48 5,88 vs 6,90 4,8 vs 8,0 50,1 vs 56,8 905 vs 974	+ 0/+ + + + + + + 0/+
Marrugat y cols. ¹⁹⁹	Aceite de oliva refinado vs aceite de oliva común y virgen	30	0 vs 1,2mg/d y 2,7mg/d	3 sem cruzado	Resultados pre y post-intervención (R, C, V) - tiempo de latencia ante la oxidación de la LDL (min) - niveles de LDL oxidada (U/L) - anticuerpos anti LDL oxidada (U/L)	R 116 vs 118 36,7 vs 30,3 252 vs 304 C 116 vs 120 38,3 vs 33,7 275 vs 324 V 112 vs 120 42,8 vs 28,3 412 vs 293	(asociado al contenido de CF) → + + 0

^a Resultados expresados comparando dosis baja de CF versus alta para las referencias 1, 2, 3 y 4. Para la referencia referencias 5 y 6 resultados expresados comparando los valores basales (después de 4 días de blanqueo) versus niveles después de una semana de tratamiento. En la referencia 7 los resultados estan expresados comparando los valores basales de cada intervención con los valores post-intervención.

^b 0 = no efecto, + = efecto protector, - = efecto negativo, 0/+ = efecto con tendencia a ser protector no significativo, 0/- = efecto con tendencia a ser negativo no significativo.

^c La ingesta de aceite de oliva y CF ha sido estimada apartir del contenido de MUFA en la dieta y en el aceite, asumiendo que todo el contenido de MUFA en la dieta proviene del aceite de oliva. Esta estimación es entonces la cantidad máxima de aceite de oliva consumido por día. AG, ácidos grasos; CF = compuestos fenólicos, ox = oxidación, pt = protein, ref = referencia, vs = versus, R = aceite de oliva refinado, C = aceite de oliva común, V = aceite de oliva virgen.

5.3.2. Efectos del consumo de aceites de oliva con diferente contenido fenólico sobre la *peroxidación lipídica*

Se observó un incremento de la resistencia de la LDL a la oxidación junto un decremento de los niveles de LDL oxidada, asociado al contenido en CF del aceite de oliva administrado. El mayor porcentaje de cambio en las variables indicadoras de peroxidación lipídica (tiempo de resistencia de la LDL a la oxidación y niveles plasmáticos de LDL oxidada) se detectó en el período de consumo de aceite de oliva virgen, posteriormente en la intervención con aceite de oliva común y por último con el aceite refinado, secuencia paralela al contenido decreciente de CF en los tres aceites de oliva. Debido al diseño del estudio, podemos atribuir estos efectos al contenido de CF del aceite de oliva, carácter diferencial entre los 3 aceites ya que el contenido en alfa-tocoferol, beta-caroteno y ácidos grasos era similar entre los 3 tipos de aceite utilizados.

Los marcadores utilizados en este estudio estaban dirigidos a examinar el grado de oxidación y/o la resistencia de oxidación de la LDL; cabe mencionar que se desconoce todavía la significación clínica de cambios en variables indicadoras del estado oxidativo. Se conoce que la LDLox es una partícula inmunogénica²⁸²; se han descrito niveles inferiores de anticuerpos anti LDLox en sujetos sanos que en pacientes con EC^{283 284} y asimismo se ha establecido una asociación positiva entre el grado de arteriosclerosis carotídea medida por Eco-Doppler y los niveles séricos de anticuerpos anti LDLox²⁸⁵. Por el contrario, se ha publicado en sujetos sanos un asociación inversa entre el título de anticuerpos anti LDLox y los niveles de LDLox²⁸⁶ y entre el título de anticuerpos con el grosor de la pared arterial²⁸⁷. La gran variedad interindividual y la gran diversidad de métodos existentes para detectar anticuerpos anti LDLox, podría contribuir a la ausencia de consenso sobre su significado clínico. En este estudio no observamos cambios en los niveles de anticuerpos anti LDLox asociado al consumo de aceite de oliva. La gran variedad interindividual de los niveles de LDLox (rango de 0.7 a 200 U/L) podría contribuir a la dificultad de observar cambios en este marcador.

Aún no se conoce con exactitud de qué modo y donde se oxida la LDL in vivo²⁸⁸ pero, dado que existe evidencia de que la peroxidación lipídica ocurre mayoritariamente en la íntima y dada la dificultad que esto implica para determinar la oxidación de la LDL in vivo⁴¹, se considera que medir la resistencia de la LDL circulante a la oxidación proporciona una información valiosa³⁴ aunque tiene una aplicabilidad en la práctica clínica limitada. Se ha observado en diversos estudios una menor resistencia de la LDL a la oxidación inducida por

cobre en pacientes con EC, que en voluntarios sanos ^{289 284 290}. Respecto la medición directa de la LDLox, se han descrito diferencias significativas en los niveles de LDLox entre pacientes sanos y pacientes con EC, siendo superior en estos últimos ^{291 292}. Varios autores han publicado la correlación entre los niveles de LDLox y la gravedad del síndrome coronario agudo ^{293 294}, sugiriendo una posible aplicación clínica de los niveles de LDLox como herramienta predictora de la severidad del síndrome coronario agudo. Aunque los datos siguen una misma tendencia, los distintos títulos encontrados entre los distintos estudios pueden ser fruto, además de la variación interindividual y técnica inherente a todo determinación de laboratorio, de los diferentes anticuerpo monoclonales utilizados. Algunos estudios han analizado la LDLox a través de un ELISA con dos anticuerpos contra determinantes antigénicos de la molécula apolipoproteína B oxidada, siendo uno de ellos el anticuerpo monoclonal murino específico mAb-4E6 ^{293 199}. Dicha determinación de LDLox puede incluir también a la VLDL oxidada que posee también apolipoproteína B, aunque en menor cantidad ⁴³. Ehara y col. ²⁹⁴ utilizan anticuerpos monoclonales AbDLH3, que reconocen moléculas de fosfatidilcolina oxidada y son específicos contra LDL oxidada. Aun utilizando distintos anticuerpos monoclonales, los diversos estudios muestran unos resultados que destacan que la determinación de LDLox puede ser un marcador fiable de peroxidación lipídica *in vivo* y del desarrollo de la EC.

5.3.3. Efectos del consumo de aceites de oliva con diferente contenido fenólico sobre el perfil lipídico, lipoproteico y la glicemia

Se detectó un incremento del colesterol HDL después de la administración del aceite de oliva virgen, y una disminución de los triglicéridos plasmáticos después de la ingesta del aceite de oliva común. Se ha descrito un aumento del colesterol HDL y una disminución de triglicéridos y LDL-colesterol después del consumo de plantas ricas en flavonoides, en humanos ²⁹⁵. El mecanismo fisiológico de los efectos hipolipemiantes del consumo de alimentos ricos en CF, está aún pendiente de ser dilucidado ^{296 297}. Se ha propuesto una mejora del transporte reverso de colesterol, una reducción de la absorción intestinal de colesterol y un incremento de la excreción de ácido biliar, han sido propuestos como base fisiológica de la acción hipolipemiente de la ingesta de alimentos ricos en CF ^{205 206 207}.

5.3.4. Características del estudio

La mejora del estado oxidativo/antioxidativo apreciado, aunque estadísticamente significativo, es de discreta magnitud ¹⁹⁹. Posiblemente se hubieran detectado mayores diferencias en los marcadores de estrés oxidativo utilizados si la dosis de aceite diaria y/o el contenido en CF del aceite de oliva virgen hubiesen sido superiores, si en lugar de consumir aceite refinado durante los periodos de blanqueo se hubiese utilizado mantequilla, margarina o aceites vegetales y, si los voluntarios hubiesen sido personas con alguna patología o no consumidores habituales de una dieta Mediterránea. Cabe destacar que uno de los objetivos del estudio era analizar los efectos antioxidantes de los CF de una dosis de aceite de oliva en crudo (25 mL) razonable para cualquier población con el fin de poder recomendar su uso a otros países con poca tradición de incluir aceite de oliva en su dieta. La administración de aceite de oliva refinado durante los periodos de blanqueo, aunque también puede tener un efecto antioxidante por su contenido en AGMI y antioxidantes como la vitamina E, aseguró la homogenización del perfil lipídico plasmático y de la composición lipídica de las lipoproteínas. Este hecho permite atribuir a los CF presentes en el aceite de oliva, única característica diferencial entre los tres aceites, las diferencias analizadas con los marcadores del estrés oxidativo utilizados. La velocidad de oxidación de la LDL y la cantidad máxima de dienos formados durante la oxidación de la LDL, variables relacionadas con la composición de ácidos grasos en las lipoproteínas, no mostraron diferencias entre los tres períodos de intervención; en cambio el tiempo de latencia de la LDL a oxidarse, relacionado directamente con la carga antioxidante endógena de la partícula, sí presentó significación estadística. Por otra parte es de esperar que la recomendación del consumo de aceite de oliva a una población industrializada no mediterránea, repercutiría en unos mayores beneficios para la salud dado su más habitual consumo de grasas saturadas o polinsaturadas.

Por último cabe destacar que los efectos beneficiosos *in vivo* de los CF del aceite de oliva virgen están todavía pendientes de ser demostrados en estudios observacionales de cohorte o en ensayos clínicos aleatorizados, en poblaciones con distintos hábitos dietéticos. Demostrar que tanto poblaciones con un consumo habitual de grasas saturadas o polinsaturadas como los consumidores de una dieta Mediterránea estándar, pueden beneficiarse de los efectos saludables del consumo de aceite de oliva virgen, es importante para las recomendaciones dietéticas en Salud Pública.



FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- **Futuras líneas de investigación**

Una vez demostrados los efectos antioxidantes de los CF del aceite de oliva, tanto en experimentos *in vitro* como en estudios *in vivo* en humanos, queda por confirmar los resultados obtenidos en este estudio, en poblaciones con un estilo de vida menos regular. También sigue pendiente de especificar, el posible sinergismo entre distintos compuestos antioxidantes procedentes de la dieta en el organismo humano. Otra cuestión sería dilucidar si el efecto del consumo de aceite de oliva difiere en poblaciones con distintos estilos de vida (por ejemplo poblaciones del Norte y Centro de Europa), implicando un beneficio más o menos aparente según los hábitos alimenticios previos a la introducción del aceite de oliva en la dieta cotidiana. Por último, sería de interés determinar si los efectos beneficiosos de un consumo regular de aceite de oliva se manifiestan de forma más relevantes en personas con distintos tipos de patología, como por ejemplo la Enfermedad Cardiovascular.



CONCLUSIONES

▪ Conclusiones

1. Aunque varios componentes del aceite de oliva poseen capacidad antioxidante, su capacidad global de retardar la oxidación de la LDL *in vitro* está asociada de forma significativa tanto a su concentración total de compuestos fenólicos, como a la naturaleza de los mismos.
2. El contenido total de compuestos fenólicos de un aceite de oliva virgen posee capacidad protectora frente a la oxidación, tanto metal- como radical-dependiente, de la partícula de LDL aislada.
3. El contenido total de compuestos fenólicos de un aceite de oliva virgen posee capacidad protectora de la oxidación, metal-dependiente, de la partícula de LDL aislada tras incubación de un extracto de CF del aceite de oliva con el plasma.
4. Los compuestos fenólicos provenientes de la dieta pueden incorporarse a las partículas de LDL *in vivo*, formando parte de su carga antioxidante endógena.
5. El tirosol, compuesto fenólico característico del aceite de oliva virgen, puede incorporarse a LDL tras la incubación de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen con el plasma.
6. Tras la administración de una sola dosis de 50 mL de aceite de oliva virgen a voluntarios sanos, se produce un estrés oxidativo postprandial, sin cambios en la resistencia de la LDL a la oxidación en las primeras 24 horas.
7. Tras la administración de una sola dosis de 50 mL de aceite de oliva virgen a voluntarios sanos se observa una mayor resistencia de la partícula de LDL a la oxidación 24 horas después de su ingesta.
8. El consumo regular de dosis moderadas de aceite de oliva puede proporcionar protección sobre la oxidación de la LDL en relación directa con el contenido fenólico presente en el aceite de oliva.



REFERENCIAS

▪ Referencias

1. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-24.
2. Ballester M. [Anti-oxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach]. *Med Clin (Barc)* 1996;107:509-15.
3. Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:241-48.
4. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-28.
5. Packer, L. and Wirts, K. Signalling messenger and trigger molecules from free radical reactions, and their control by antioxidants in: *Signalling Mechanisms from transcription factors to oxidative stress*. Packer, L. and Wirts, K. Gutteridge JMC, 157-164. 1995. Berlin, Springer-Verlag.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
6. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
7. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995;270:296-99.
8. Tan CM, Xenoyannis S, Feldman RD. Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. *Circ Res* 1995;77:710-17.
9. Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N Engl J Med* 1979;300:1142-47.
10. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL *et al*. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-45.
11. Violi F, Micheletta F, Iluliano L. Antioxidants and atherosclerosis. *Eur Heart J Suppl* 2002;4:B17-B21.
12. Antioxidants, lipid peroxidation and cardiovascular diseases, In: Kumpulainen JT, Salonen JT, editors. *Natural antioxidants and anticarcinogenesis nutrition, health and disease*, The Royal Society of Chemistry ed. 1999. p. 3-8.
13. Ramón JR, Alonso MB, Rubio S, Ramón BM, Plaza Celemin L, Mostaza JM *et al*. Antioxidantes de la dieta y enfermedad coronaria. *Clin Cardiolvasc* 1996;14:29-38.
14. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56:317-33.

15. Nicolaiew N, Lemort N, Adorni L, Berra B, Montorfano G, Rapelli S *et al.* Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Ann Nutr Metab* 1998;42:251-60.
16. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933-56.
17. Filipe P, Lanca V, Silva JN, Morliere P, Santos R, Fernandes A. Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 2001;221:79-87.
18. Fuhrman B, Volkova N, Rosenblat M, Aviram M. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxid Redox Signal* 2000;2:491-506.
19. Navarro-Lopez F. [Genes and coronary heart disease]. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:413-31.
20. Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med* 1999;31:217-24.
21. Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A *et al.* Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl B:B2-11.
22. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. Age-Related Modifications of Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Glutathione-Related Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clin Chem* 1992;38:66-70.
23. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995;61:1-31.
24. Beard T, Carrie D, Boyer MJ, Boudjemaa B, Ferrieres J, Delay M *et al.* [Production of oxygen free radicals in myocardial infarction treated by thrombolysis. Analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1994;87:1289-96.
25. Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2000;101:2264-70.
26. Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;53:33-39.
27. Toh Y, Kuninaka S, Mori M, Oshiro T, Ikeda Y, Nakashima H *et al.* Reduced expression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with invasiveness in esophageal carcinoma. *Oncology* 2000;59:223-28.
28. Turi S, Nemeth I, Torkos A, Saghy L, Varga I, Matkovic B *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases. *Free Radic Biol Med* 1997;22:161-68.

29. De la Torre MR, Casado A, Lopez-Fernandez ME, Carrascosa D, Casado MC, Venarucci D *et al.* Human aging brain disorders: role of antioxidant enzymes. *Neurochem Res* 1996;21:885-88.
30. Yegin A, Yegin H, Aliciguzel Y, Deger N, Semiz E. Erythrocyte selenium-glutathione peroxidase activity is lower in patients with coronary atherosclerosis. *Jpn Heart J* 1997;38:793-98.
31. Mercuri F, Quagliaro L, Ceriello A. Oxidative stress evaluation in diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2000;2:589-600.
32. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L *et al.* Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001;44:834-38.
33. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996;42:498-506.
34. Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res* 2000;47:410-18.
35. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000;32:307-26.
36. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 2000;33 Suppl:S99-108.
37. Loft S, Poulsen HE. Estimation of oxidative DNA damage in man from urinary excretion of repair products. *Acta Biochim Pol* 1998;45:133-44.
38. Natella F, Ghiselli A, Guidi A, Ursini F, Scaccini C. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1036-44.
39. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1286-92.
40. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996;74:297-312.
41. Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996;42:498-506.
42. Ballester M. [Anti-oxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach]. *Med Clin (Barc)* 1996;107:509-15.

43. Lipoproteínas plasmáticas, Bioquímica Clínica. Semiología i diagnòstic: interpretació de les dades bioquímiques, Editorial Barcanova,S.A. ed. 1993. p. 123-65.
44. Lipids, Lipoproteins and apolipoproteins, In: Aschwood B, editor. Fundaments of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Company ed. 2001. p. 462-93.
45. Bernard Henry J. Lípidos y Dislipoproteinemia, Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio, 9ª edición ed. Filadelfia: Saunders Company; 1993. p. 199.
46. Calmarza P. Separación de Lipoproteínas. Cont Lab Clin; 2000. p. 15-22.
47. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). N Engl J Med 1992;326:242-50.
48. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). N Engl J Med 1992;326:310-18.
49. Steinberg D. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. Circulation 1997;95:1062-71.
50. Parhami F, Fang ZT, Fogelman AM, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. J Clin Invest 1993;92:471-78.
51. Colome C, Martinez-Gonzalez J, Vidal F, de Castellarnau C, Badimon L. Small oxidative changes in atherogenic LDL concentrations irreversibly regulate adhesiveness of human endothelial cells: effect of the lazaroid U74500A. Atherosclerosis 2000;149:295-302.
52. Kaplan M, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. Clin Chem Lab Med 1999;37:777-87.
53. Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. J Clin Invest 1994;94:771-78.
54. Kaplan M, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. Clin Chem Lab Med 1999;37:777-87.
55. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW *et al.* Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. J Clin Invest 1991;88:2039-46.

56. Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD *et al.* Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res* 1997;80:810-18.
57. Sata M, Walsh K. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998;102:1682-89.
58. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995;270:319-24.
59. Aviram M. Antiatherogenicity of antioxidants against LDL oxidation, In: Kumpulainen JT, Salonen JT, editors. Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease. The Royal Society of Chemistry; 1999. p. 9-19.
60. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R *et al.* Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996;97:1715-22.
61. Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1572-79.
62. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1979;76:333-37.
63. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1984;81:3883-87.
64. Brown MS, Goldstein JL. Scavenger cell receptor shared. *Nature* 1985;316:680-81.
65. Freeman MW. Macrophage scavenger receptors. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:143-48.
66. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A *et al.* Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1994;91:9441-45.
67. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-61.
68. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr. *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355-74.
69. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-18.

70. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991;71:481-539.
71. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-601.
72. Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K, Ueno T, Maki S, Noda T *et al.* Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* 1995;92:1693-96.
73. Frijns CJ, Kappelle LJ, Van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 1997;28:2214-18.
74. Martinez-Gonzalez J, Llorente-Cortes V, Badimon L. [Cellular and molecular biology of atherosclerotic lesions]. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:218-31.
75. Wissler RW, Vesselinovitch D, Komatsu A. The contribution of studies of atherosclerotic lesions in young people to future research. *Ann N Y Acad Sci* 1990;598:418-34.
76. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G *et al.* Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995;92:1565-69.
77. Havel RJ. Remnant lipoproteins as therapeutic targets. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:615-20.
78. Kosaka S, Takahashi S, Masamura K, Kanehara H, Sakai J, Tohda G *et al.* Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor: interferon-gamma inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages. *Circulation* 2001;103:1142-47.
79. Cohn JS. Postprandial lipemia: emerging evidence for atherogenicity of remnant lipoproteins. *Can J Cardiol* 1998;14 Suppl B:18B-27B.
80. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliari L, Piconi L, Bais B *et al.* Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 2002;106:1211-18.
81. Roche HM, Gibney MJ. The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:317-24.
82. Karpe F, Hamsten A. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:123-29.
83. Zilversmit DB. Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem* 1995;41:153-58.

84. Kannel WB. High-density lipoproteins: epidemiologic profile and risks of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1983;52:9B-12B.
85. Ordovas JM. [Cholesterol and tobacco: classics that withstand the passing of time]. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:1143-45.
86. Lopez MJ, Ordovas JM, Perez JF. [Interaction between genes and diet as a determinant of the plasma levels of cholesterol]. *Med Clin (Barc)* 1998;111:546-51.
87. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
88. Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr* 1965;17:281-95.
89. Pritchard KA, Jr., Wong PY, Stemerman MB. Atherogenic concentrations of low-density lipoprotein enhance endothelial cell generation of epoxyeicosatrienoic acid products. *Am J Pathol* 1990;136:1383-91.
90. Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1998;252:378-84.
91. Pritchard KA, Jr., Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P *et al.* Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995;77:510-18.
92. Smalley DM, Lin JH, Curtis ML, Kobari Y, Stemerman MB, Pritchard KA, Jr. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:585-90.
93. Perez G, Pena A, Sala J, Roset P, Masia R, Marrugat de la Iglesia J. Acute myocardial infarction case fatality, incidence and mortality rates in a population registry in Gerona, Spain, 1990-1992. *Int J Epidemiol* 1998;27:599-604.
94. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996;334:1156-62.
95. Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arterioscler Thromb* 1993;13:590-600.
96. Gaziano JM, Manson JE, Branch LG, Colditz GA, Willett WC, Buring JE. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. *Ann Epidemiol* 1995;5:255-60.

97. Mariotti S, Capocaccia R, Farchi G, Menotti A, Verdecchia A, Keys A. Differences in the incidence rate of coronary heart disease between north and south European cohorts of the Seven Countries Study as partially explained by risk factors. *Eur Heart J* 1982;3:481-87.
98. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R *et al.* The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986;124:903-15.
99. Ducimetie're P, Richard JL, Cambien F, Rakotovao R, Claude JR. Coronary heart disease in middle-aged Frenchmen. Comparisons between Paris Prospective Study, Seven Countries Study, and Pooling Project. *Lancet* 1980;1:1346-50.
100. Perez G, Marrugat J, Sala J. Myocardial infarction in Girona, Spain: attack rate, mortality rate and 28-day case fatality in 1988. Regicor Study Group. *J Clin Epidemiol* 1993;46:1173-79.
101. Gjonca A, Bobak M. Albanian paradox, another example of protective effect of Mediterranean lifestyle? *Lancet* 1997;350:1815-17.
102. Masia R, Pena A, Marrugat J, Sala J, Vila J, Pavesi M *et al.* High prevalence of cardiovascular risk factors in Gerona, Spain, a province with low myocardial infarction incidence. REGICOR Investigators. *J Epidemiol Community Health* 1998;52:707-15.
103. Marrugat J, Masia R, Elosua R, Covas M. Factores de protección cardiovascular: ¿Pueden explicarse por las diferencias de mortalidad y morbilidad entre la población mediterránea y la anglosajona? *Cardiovasc Risk Fac* 1999;8:28-38.
104. Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev* 1997;55:383-89.
105. Renaud S, de Lorgeril M, Delaye J, Guidollet J, Jacquard F, Mamelie N *et al.* Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1360S-7S.
106. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-26.
107. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelie N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. Final report of the Lyon Diet Heart Study Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999;99:779-85.
108. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Boucher P, Mamelie N. Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Arch Intern Med* 1998;158:1181-87.

109. Trichopoulou A, Katsouyanni K, Stuver S, Tzala L, Gnardellis C, Rimm E *et al.* Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:110-16.
110. Kouris-Blazos A, Gnardellis C, Wahlqvist ML, Trichopoulos D, Lukito W, Trichopoulou A. Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *British Journal of Nutrition* 1999;82:57-61.
111. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E *et al.* Diet and overall survival in elderly people. *Br Med J* 1995;311:1457-60.
112. Lasheras C, Fernandez S, Patterson AM. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am J Clin Nutr* 2000;71:987-92.
113. Hu FB, Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Spiegelman D, Willett WC. Prospective study of major dietary patterns and risk of coronary heart disease in men. *Am J Clin Nutr* 2000;72:912-21.
114. Prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares, Control de la colesterolemia en España, Edición de la Secretaría General Técnica del Ministerio de Sanidad y Consumo ed. 2000. p. 17-43.
115. Aranceta J, Serra-Majem L. Dietary guidelines for the Spanish population. *Public Health Nutr* 2001;4:1403-08.
116. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on coronary prevention. *Eur Heart J* 1998;19:1434-503.
117. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ *et al.* AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke* 2000;31:2751-66.
118. Serra-Majem L, Ribas L, Tresserras R, Ngo J, Salleras L. How could changes in diet explain changes in coronary heart disease mortality in Spain? The Spanish paradox. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1351S-9S.
119. Tiscornia E, Forina M, Evangelisti F. Composizione chimica dell'oliid'oliva e sue variacion indotte dal processo di rettificazione. *La Rivista Italiana delle Sostanze Gras* 1982;59:519-56.
120. Diplock AT. Vitamin E. Fat soluble vitamins. *Pennsylvania* 1985;154-224.
121. Papadopoulos G, Boskou D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *JAOCS* 1991;68:669-71.

122. Karleskind A. Manel des corps gras, Sources and monographies des principaux corps gras. Paris: Technique and Documentación Lavoisier; 1992.
123. Mataix FJ, Martinez Victoria E. Bases para el futuro, El aceite de oliva. Sevilla, España: Centro de Información y Documentación Agraria; 1988.
124. Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. Their extraccion, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J Agric Food Chem* 1992;40:1571-76.
125. Roche HM. Olive oil, high-oleic acid sunflower oil and CHD. *Br J Nutr* 2001;85:3-4.
126. Trevisan M, Krogh V, Freudenheim J, Blake A, Muti P, Panico S *et al.* Consumption of olive oil, butter, and vegetable oils and coronary heart disease risk factors. The Research Group ATS-RF2 of the Italian National Research Council. *JAMA* 1990;263:688-92.
127. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalder B *et al.* Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* 2000;1:107-12.
128. Trichopoulou A. Olive oil and breast cancer. *Cancer Causes Control* 1995;6:475-76.
129. Lipworth L, Martinez ME, Angell J, Hsieh CC, Trichopoulos D. Olive oil and human cancer: an assessment of the evidence. *Prev Med* 1997;26:181-90.
130. Kelly CM, Smith RD, Williams CM. Dietary monounsaturated fatty acids and haemostasis. *Proc Nutr Soc* 2001;60:161-70.
131. Larsen LF, Jespersen J, Marckmann P. Are olive oil diets antithrombotic? Diets enriched with olive, rapeseed, or sunflower oil affect postprandial factor VII differently. *Am J Clin Nutr* 1999;70:976-82.
132. Denke MA, Grundy SM. Comparison of effects of lauric acid and palmitic acid on plasma lipids and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1992;56:895-98.
133. Derr J, Kris-Etherton PM, Pearson TA, Seligson FH. The role of fatty acid saturation on plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: II. The plasma total and low-density lipoprotein cholesterol response of individual fatty acids. *Metabolism* 1993;42:130-34.
134. Temme EH, Mensink RP, Hornstra G. Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *Am J Clin Nutr* 1996;63:897-903.
135. Zock PL, de Vries JH, Katan MB. Impact of myristic acid versus palmitic acid on serum lipid and lipoprotein levels in healthy women and men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:567-75.
136. Leningher AL. Lípidos, lipoproteínas y membranas, Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función molecular, Ediciones Omega,S.A. ed. 1983. p. 285-314.

137. Judd JT, Clevidence BA, Muesing RA, Wittes J, Sunkin ME, Podczasy JJ. Dietary trans fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1994;59:861-68.
138. Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1368S-73S.
139. Berry EM, Eisenberg S, Friedlander Y, Harats D, Kaufmann NA, Norman Y *et al.* Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins--the Jerusalem Nutrition Study. II. Monounsaturated fatty acids vs carbohydrates. *Am J Clin Nutr* 1992;56:394-403.
140. Roche HM, Zampelas A, Knapper JM, Webb D, Brooks C, Jackson KG *et al.* Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism. *Am J Clin Nutr* 1998;68:552-60.
141. Morgan SA, O'Dea K, Sinclair AJ. A low-fat diet supplemented with monounsaturated fat results in less HDL-C lowering than a very-low-fat diet. *J Am Diet Assoc* 1997;97:151-56.
142. Perez-Jimenez F, Espino A, Lopez-Segura F, Blanco J, Ruiz-Gutierrez V, Prada JL *et al.* Lipoprotein concentrations in normolipidemic males consuming oleic acid- rich diets from two different sources: olive oil and oleic acid-rich sunflower oil. *Am J Clin Nutr* 1995;62:769-75.
143. Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, Covas M, Farre M *et al.* Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:114-20.
144. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 1992;12:911-19.
145. Gardner CD, Kraemer HC. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1917-27.
146. Mata P, Alonso R, Lopez-Farre A, Ordovas JM, Lahoz C, Garces C *et al.* Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1347-55.
147. Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev* 1998;56:142-47.
148. Kris-Etherton PM. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 1999;100:1253-58.
149. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994;344:793-95.

150. Abia R, Perona JS, Pacheco YM, Montero E, Muriana FJ, Ruiz-Gutierrez V. Postprandial triacylglycerols from dietary virgin olive oil are selectively cleared in humans. *J Nutr* 1999;129:2184-91.
151. Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1990;87:3894-98.
152. Abbey M, Belling GB, Noakes M, Hirata F, Nestel PJ. Oxidation of low-density lipoproteins: intraindividual variability and the effect of dietary linoleate supplementation. *Am J Clin Nutr* 1993;57:391-98.
153. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 1993;91:668-76.
154. Mata P, Varela O, Alonso R, Lahoz C, de Oya M, Badimon L. Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2088-95.
155. Carmena R, Ascaso JF, Camejo G, Varela G, Hurt-Camejo E, Ordovas JM *et al.* Effect of olive and sunflower oils on low density lipoprotein level, composition, size, oxidation and interaction with arterial proteoglycans. *Atherosclerosis* 1996;125:243-55.
156. Tsimikas S, Philis-Tsimikas A, Alexopoulos S, Sigari F, Lee C, Reaven PD. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:122-30.
157. Carluccio MA, Massaro M, Bonfrate C, Siculella L, Maffia M, Nicolardi G *et al.* Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:220-28.
158. Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L, Guida L, Dello RA, Marotta T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med* 2000;160:837-42.
159. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993;328:1450-56.
160. Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991;53:326S-34S.
161. Rimm EB, Stampfer MJ. Antioxidants for vascular disease. *Med Clin North Am* 2000;84:239-49.

162. Price JF, Fowkes FG. Antioxidants vitamins in the prevention of cardiovascular disease. The epidemiological evidence. *Eur Heart J* 1997;18:719-27.
163. Tavani A, La Vecchia C. Beta-carotene and risk of coronary heart disease. A review of observational and intervention studies. *Biomed Pharmacother* 1999;53:409-16.
164. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A *et al.* Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1150-55.
165. Carroll YL, Corridan BM, Morrissey PA. Lipoprotein carotenoid profiles and the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in healthy elderly volunteers. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:500-07.
166. Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 2000;28:141-64.
167. Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ *et al.* Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease- specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1483-92.
168. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:1029-35.
169. Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, Huttunen JK, Albanes D, Taylor PR *et al.* Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997;349:1715-20.
170. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR *et al.* Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1145-49.
171. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347:781-86.
172. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999;354:447-55.
173. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:154-60.
174. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients.

- The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:145-53.
175. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafer U, Iaina A *et al.* Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000;356:1213-18.
 176. de Gaetano G. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet* 2001;357:89-95.
 177. Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS *et al.* Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med* 2001;345:1583-92.
 178. Collins R, Peto R, Armitage J. The MRC/BHF Heart Protection Study: preliminary results. *Int J Clin Pract* 2002;56:53-56.
 179. Manson JE, Gaziano JM, Spelsberg A, Ridker PM, Cook NR, Buring JE *et al.* A secondary prevention trial of antioxidant vitamins and cardiovascular disease in women. Rationale, design, and methods. The WACS Research Group. *Ann Epidemiol* 1995;5:261-69.
 180. Vazquez MC, Galan P, Preziosi P, Ribas L, Serra LL, Hercberg S. [The SUVIMAX (France) study: the role of antioxidants in the prevention of cancer and cardiovascular disorders]. *Rev Esp Salud Publica* 1998;72:173-83.
 181. Kritharides L, Stocker R. The use of antioxidant supplements in coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2002;164:211-19.
 182. Brenes M, Garcia A, Garcia P, Rios JJ, Garrido A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J Agric Food Chem* 1999;47:3535-40.
 183. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer* 2000;36:1235-47.
 184. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clin Chem* 2000;46:976-88.
 185. Galli C, Visioli F. Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids* 1999;34 Suppl:S23-S26.
 186. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *JAOCS* 1981;58:966-68.
 187. Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventos, R., De la Torre-Boronat, M. C., and Lopez-Sabater, M. C. The effects of arvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -Tocopherol and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry* .

2002.

Ref Type: In Press

188. Hollman PC, Katan MB. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl* 1998;20:237-48.
189. Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 1997;51:305-10.
190. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
191. Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, Yoshida H, Ayaori M, Nishiwaki M *et al.* Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr* 1997;66:261-66.
192. Ruiz-Gutierrez V, Juan ME, Cert A, Planas JM. Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC. *Anal Chem* 2000;72:4458-61.
193. Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr* 2002;132:409-17.
194. Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G *et al.* Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett* 2000;468:159-60.
195. Miro CE, Farre AM, Covas Planells MI, Fito CM, Lamuela Raventos RM, de la Torre FR. Tyrosol bioavailability in humans after ingestion of virgin olive oil. *Clin Chem* 2001;47:341-43.
196. Miro-Casas E, Farre AM, Covas MI, Rodriguez JO, Menoyo CE, Lamuela Raventos RM *et al.* Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem* 2001;294:63-72.
197. Miro-Casas E, Farre AM, Covas MI, Rodriguez JO, Menoyo CE, Lamuela Raventos RM *et al.* Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem* 2001;294:63-72.
198. Miró-Casas, E., Covas, M. I., Fito, M., Farré-Albadalejo, M., Marrugat, J., and De la Torre, R. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* . 2002. Ref Type: In Press
199. Marrugat, J., Covas, M. I., Fito, M., Miro-Casas, E., Schroder, H., Farré-Albadalejo, M., and De la Torre, R. Antioxidant effect of olive oil phenolic content in a randomized double-blind controlled clinical trial. 2002. Ref Type: Bill/Resolution

200. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalter B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 2000;38:647-59.
201. Visioli F, Galli C. Free radical-scavenging actions of olive oil phenolics. *Lipids* 1999;34 Suppl:S315.
202. Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995;117:25-32.
203. Kang MH, Naito M, Sakai K, Uchida K, Osawa T. Mode of action of sesame lignans in protecting low-density lipoprotein against oxidative damage in vitro. *Life Sci* 2000;66:161-71.
204. Kang MH, Naito M, Tsujihara N, Osawa T. Sesamol inhibits lipid peroxidation in rat liver and kidney. *J Nutr* 1998;128:1018-22.
205. Yugarani T, Tan BK, Teh M, Das NP. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids* 1992;27:181-86.
206. Nalini D, Kapoor R. Effect of plant fruits--Indian gall nut, bedda nut and gooseberry--on hypercholesterolemic rats. *Plant Foods Hum Nutr* 1999;53:343-49.
207. Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1986;32:613-22.
208. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Servili M, Montedoro GF, Galli C. A phenolic antioxidant extracted from olive oil inhibits platelet aggregation and arachidonic acid metabolism in vitro. *World Rev Nutr Diet* 1994;75:169-72.
209. Giugliano D, Nappo F, Coppola L. Pizza and vegetables don't stick to the endothelium. *Circulation* 2001;104:E34-E35.
210. Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T *et al.* Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;44:147-53.
211. Schroder HC, Merz H, Steffen R, Muller WE, Sarin PS, Trumm S *et al.* Differential in vitro anti-HIV activity of natural lignans. *Z.Naturforsch [C]* 1990;45:1215-21.
212. Vanharanta M, Voutilainen S, Lakka TA, van der LM, Adlercreutz H, Salonen JT. Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study. *Lancet* 1999;354:2112-15.
213. Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999;20:2209-18.

214. Lamuela-Raventos RM, Covas MI, Fito M, Marrugat J, de La Torre-Boronat MC. Detection of dietary antioxidant phenolic compounds in human LDL. *Clin Chem* 1999;45:1870-72.
215. Fito M, Gimeno E, Covas MI, Miro E, Lopez-Sabater MC, Farre M *et al.* Postprandial and short-term effects of dietary virgin olive oil on oxidant/antioxidant status. *Lipids* 2002;37:245-51.
216. Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, Torrents L, de la TC *et al.* Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids* 2000;35:633-38.
217. Moreiras-Varela O. The Mediterranean diet in Spain. *Eur J Clin Nutr* 1989;43 Suppl 2:83-87.
218. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol [letter]. *Lancet* 1993;341:1103-04.
219. Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, Yoshida H, Ayaori M, Nishiwaki M *et al.* Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low- density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr* 1997;66:261-66.
220. Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low- density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* 1998;68:258-65.
221. Jialal I, Norkus EP, Cristol L, Grundy SM. beta-Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1991;1086:134-38.
222. Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, de la TC, Marrugat J. [Olive oil and inhibition of low density lipoprotein oxidation. Role of phenolic compounds]. *Med Clin (Barc)* 2000;115:166-69.
223. Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, Torrents L, de la TC *et al.* Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids* 2000;35:633-38.
224. Visioli F, Galli C. Free radical-scavenging actions of olive oil phenolics. *Lipids* 1999;34 Suppl:S315.
225. Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995;117:25-32.
226. Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev* 1998;56:142-47.
227. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer* 2000;36:1235-47.

228. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalter B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 2000;38:647-59.
229. Caruso D, Berra B, Giavarini F, Cortesi N, Fedeli E, Galli G. Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1999;9:102-07.
230. Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1997;135:93-102.
231. Nyssonen K, Porkkala-Sarataho E, Kaikkonen J, Salonen JT. Ascorbate and urate are the strongest determinants of plasma antioxidative capacity and serum lipid resistance to oxidation in Finnish men. *Atherosclerosis* 1997;130:223-33.
232. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994;344:793-95.
233. Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* 1998;68:258-65.
234. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J* 1998;330:1173-78.
235. Liao K, Yin M. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. *J Agric Food Chem* 2000;48:2266-70.
236. Saija A, Scalse M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free radical biology & medicine* 1995;19:481-86.
237. Covas MI, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Sebastia N, Torre-Boronat C, Marrugat J. Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation. *Int J Clin Pharmacol Res* 2000;20:49-54.
238. Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1210-18.
239. Aherne SA, O'Brien NM. Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutr Cancer* 1999;34:160-66.
240. Viana M, Barbas C, Bonet B, Bonet MV, Castro M, Fraile MV *et al.* In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation. *Atherosclerosis* 1996;123:83-91.

241. de la PR, Ruiz G, V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol* 1999;57:445-49.
242. Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M *et al.* Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J Nutr* 1999;129:1269-77.
243. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D *et al.* Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995;252:38-53.
244. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:99-105.
245. Efe H, Deger O, Kirci D, Karahan SC, Orem A, Calapoglu M. Decreased neutrophil antioxidative enzyme activities and increased lipid peroxidation in hyperlipoproteinemic human subjects. *Clin Chim Acta* 1999;279:155-65.
246. Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Kim KY, Feingold KR. Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1900-05.
247. Sutherland WH, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1340-47.
248. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000;49:27-29.
249. Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Pieri C, Marra M, Tonutti L *et al.* Meal-induced oxidative stress and low-density lipoprotein oxidation in diabetes: the possible role of hyperglycemia. *Metabolism* 1999;48:1503-08.
250. Evans M, Anderson RA, Graham J, Ellis GR, Morris K, Davies S *et al.* Ciprofibrate therapy improves endothelial function and reduces postprandial lipemia and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2000;101:1773-79.
251. Doi H, Kugiyama K, Oka H, Sugiyama S, Ogata N, Koide SI *et al.* Remnant lipoproteins induce proatherothrombogenic molecules in endothelial cells through a redox-sensitive mechanism. *Circulation* 2000;102:670-76.
252. Mabile L, Salvayre R, Bonnafe MJ, Negre-Salvayre A. Oxidizability and subsequent cytotoxicity of chylomicrons to monocytic U937 and endothelial cells are dependent on dietary fatty acid composition. *Free Radic Biol Med* 1995;19:599-607.
253. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Almazan F, Mattson FH *et al.* Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am J Clin Nutr* 1991;54:701-06.

254. Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, Covas M, Farre M *et al.* Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:114-20.
255. Lechleitner M, Hoppichler F, Foger B, Patsch JR. Low-density lipoproteins of the postprandial state induce cellular cholesteryl ester accumulation in macrophages. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1799-807.
256. Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bon GB, Sevanian A. Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. *Free radical biology & medicine* 1998;25:250-52.
257. Diwadkar VA, Anderson JW, Bridges SR, Gowri MS, Oelgten PR. Postprandial low-density lipoproteins in type 2 diabetes are oxidized more extensively than fasting diabetes and control samples. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:178-84.
258. Cohn JS. Postprandial lipemia: emerging evidence for atherogenicity of remnant lipoproteins. *Can J Cardiol* 1998;14 Suppl B:18B-27B.
259. Sattar N, Petrie JR, Jaap AJ. The atherogenic lipoprotein phenotype and vascular endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 1998;138:229-35.
260. Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E *et al.* Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000;10:111-20.
261. Nicolaiew N, Lemort N, Adorni L, Berra B, Montorfano G, Rapelli S *et al.* Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Ann Nutr Metab* 1998;42:251-60.
262. Nielsen NS, Marckmann P, Hoy C. Effect of meal fat quality on oxidation resistance of postprandial VLDL and LDL particles and plasma triacylglycerol level. *British Journal of Nutrition* 2000;84:855-63.
263. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 1993;91:668-76.
264. Visioli F, Caruso D, Plasmati E, Patelli R, Mulinacci N, Romani A *et al.* Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res* 2001;34:301-05.
265. Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:797-99.

266. Reaven PD, Grasse BJ, Tribble DL. Effects of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with alpha-tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in humans. *Arterioscler Thromb* 1994;14:557-66.
267. Lee C, Barnett J, Reaven PD. Liposomes enriched in oleic acid are less susceptible to oxidation and have less proinflammatory activity when exposed to oxidizing conditions. *J Lipid Res* 1998;39:1239-47.
268. De La Cruz JP, Quintero L, Villalobos MA, Sanchez dIC. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim Biophys Acta* 2000;1485:36-44.
269. Visioli F, Caruso D, Plasmati E, Patelli R, Mulinacci N, Romani A *et al.* Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res* 2001;34:301-05.
270. Visioli F, Galli C, Plasmati E, Viappiani S, Hernandez A, Colombo C *et al.* Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation* 2000;102:2169-71.
271. Trevisan M, Krogh V, Freudenheim J, Blake A, Muti P, Panico S *et al.* Consumption of olive oil, butter, and vegetable oils and coronary heart disease risk factors. The Research Group ATS-RF2 of the Italian National Research Council. *JAMA* 1990;263:688-92.
272. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 1992;12:911-19.
273. Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1368S-73S.
274. Wiseman SA, Mathot JN, de Fouw NJ, Tijburg LB. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 1996;120:15-23.
275. Vissers MN, Zock PL, Wiseman SA, Meyboom S, Katan MB. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:334-41.
276. Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, Lopez-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A *et al.* Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr* 1999;129:2177-83.
277. Fernandez-Jarne E, Martinez-Losa E, Prado-Santamaria M, Brugarolas-Brufau C, Serrano-Martinez M, Martinez-Gonzalez M. Risk of first non-fatal myocardial infarction negatively associated with olive oil consumption: a case-control study in Spain. *Int J Epidemiol* 2002;31:474-80.

278. Vissers MN, Zock PL, Leenen R, Roodenburg AJ, van Putte KP, Katan MB. Effect of consumption of phenols from olives and extra virgin olive oil on LDL oxidizability in healthy humans. *Free Radic Res* 2001;35:619-29.
279. Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, Lopez-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A *et al.* Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr* 1999;129:2177-83.
280. Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E *et al.* Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000;10:111-20.
281. Vissers MN, Zock PL, Wiseman SA, Meyboom S, Katan MB. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:334-41.
282. Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1572-79.
283. Lehtimaki T, Lehtinen S, Solakivi T, Nikkila M, Jaakkola O, Jokela H *et al.* Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:23-27.
284. Bakalova R, Zhelev Z, Goudev A, Ribarov S, Nachev C. Serum level of IgG autoantibodies against oxidized low density lipoproteins and lag-phase of serum oxidation in coronary heart disease- -inverse correlation. *Gen Physiol Biophys* 1999;18:87-97.
285. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R *et al.* Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992;339:883-87.
286. Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H *et al.* Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2000;148:171-77.
287. Fukumoto M, Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, Okuno Y, Nishizawa Y. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:703-07.
288. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1815-26.
289. Yesilbursa D, Serdar Z, Dirican M, Serdar A, Gullulu S, Cordan J. Susceptibility of apolipoprotein B-containing lipoproteins to oxidation and antioxidant status in acute coronary syndromes. *Clin Cardiol* 2000;23:655-58.

290. Haidari M, Javadi E, Kadkhodae M, Sanati A. Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease. *Clin Chem* 2001;47:1234-40.
291. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J *et al.* Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2243-47.
292. Tsimikas S, Witztum JL. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation* 2001;103:1930-32.
293. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998;98:1487-94.
294. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M *et al.* Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;103:1955-60.
295. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, Mostafavi S, Vakili R. Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. *Drugs Exp Clin Res* 2000;26:89-93.
296. Kurowska EM, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piche LA *et al.* HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1095-100.
297. Ebrahim SS, Movahedian Atar AM, Yektaian A. Antihyperlipidemic effect of hydroalcoholic extract, and polyphenolic fraction from *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Pharm Acta Helv* 1998;73:167-70.



ANEXOS

- **Anexos**

Anexo 1: Otras publicaciones

Anexo 1.1: Covas Maria-Isaabel, Fitó Montserrat, Marrugat Jaume, Miró Elisabet, Farré Magí, De la Torre Rafael, Gimeno Eva, López-Sabater María-Carmen, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, De la Torre-Boronat Maria-Carme. FACTEURS PROTECTEURS DE LA MALADIE CORONARIÈNNE: EFFECT ANTIOXYDANT DE L'HUILE D'OLIVE (review). Therapie 2001.

Anexo 1.2: Fitó Montserrat, Weinbrenner Tanja, Covas Maria-Isabel. OLIVE OIL ANTIOXIDANT ACTION: NEW FINDINGS. En: Research Advances in Lipids (en prensa).

Anexo 1.3: Miró Elisabet, Farré Magí, Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, de la Torre Rafael. TYROSOL BIOAVAILABILITY IN HUMANS AFTER VIRGIN OLIVE OIL INGESTION. Clin Chem 2001.

Anexo 1.4: Miró-Casas Elisabet, Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Farré-Albaladejo Magí, Marrugat Jaume, de la Torre Rafael. TYROSOL AND HYDROXYTYROSOL ARE ABSORBED FROM MODERATE AND SUSTAINED DOSES OF VIRGIN OLIVE OIL IN HUMANS. Eur J Clin Nutr 2002.

Publicación 1:

Fitó Montserrat, Covas María Isabel, Lamuela-Raventós Rosa M., Vila Joan, De la Torre-Boronat Carmen, Marrugat Jaume.

ACEITE DE OLIVA E INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

Medicina Clínica 2000; 115: 166-9.

Publicación 2:

Fitó Montserrat, Covas María Isabel, Lamuela-Raventós Rosa M., Vila Joan, Torrents Jaume, De la Torre-Boronat Carmen, Marrugat Jaume.

PROTECTIVE EFFECT OF OLIVE OIL AND ITS PHENOLIC COMPOUNDS
AGAINST LOW DENSITY LIPOPROTEIN OXIDATION.

Lipids 2000; 35 (6): 633-8.

Publicación 3:

Lamuela-Raventós Rosa M, Covas María Isabel, Fitó Montserrat, Marrugat Jaume, M. De la Torre-Boronat Carmen.

DETECTION OF DIETARY ANTIOXIDANT PHENOLIC COMPOUNDS IN HUMAN LOW DENSITY LIPOPROTEINS

Clinical Chemistry 1999; 45 (10): 1870-2.

Publicación 4:

María-Isabel Covas, Fitó Montserrat, Lamuela-Raventós Rosa M., Sebastià Neus, De la Torre-Boronat Carmen, Marrugat Jaume.

VIRGIN OLIVE OIL PHENOLIC COMPOUNDS: BINDING TO HUMAN LDL AND EFFECT ON LDL OXIDATION.

Int J Pharmacol Res 2000; XX (3/4): 49-54.

Publicación 5:

Fitó Montserrat, Gimeno Eva, Covas María Isabel, Miró Elisabet, López-Sabater Carmen, Farré Magí, De la Torre Rafael, Marrugat Jaume.

POSTPRANDIAL AND SHORT-TERM EFFECTS OF DIETARY VIRGIN OLIVE OIL ON OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS.

Lipids 2002; 37: 245-251.

Publicación 6:

Marrugat Jaume, Covas Maria Isabel, Fitó Montserrat, Schroeder Helmut, Miró-Casas Elisabet, De la Torre Rafael, Farré-Albaladejo Magí.

ANTIOXIDANT EFFECT OF OLIVE OIL PHENOLIC CONTENT IN A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND CONTROLLED CLINICAL TRIAL.

Sometido para publicación.

Anexo 1.1:

Covas Maria-Isaabel, Fitó Montserrat, Marrugat Jaume, Miró Elisabet, Farré Magí, De la Torre Rafael, Gimeno Eva, López-Sabater María-Carmen, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, De la Torre-Boronat Maria-Carme.

FACTEURS PROTECTEURS DE LA MALADIE CORONARIÈNNE: EFFECT ANTIOXYDANT DE L'HUILE D'OLIVE (review).

Therapie 2001; 56: 607-611.

Anexo 1.2:

Fitó Montserrat, Weinbrenner Tanja, Covas Maria-Isabel.

OLIVE OIL ANTIOXIDANT ACTION: NEW FINDINGS.

En: Research Advances in Lipids (en prensa).

Anexo 1.3:

Miró Elisabet, Farré Magí, Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Lamuela-Raventós Rosa-Maria, de la Torre Rafael.

TYROSOL BIOAVAILABILITY IN HUMANS AFTER VIRGIN OLIVE OIL
INGESTION.

Clin Chem 2001; 47: 341-3.

Anexo 1.4:

Miró-Casas Elisabet, Covas Maria-Isabel, Fitó Montserrat, Farré-Albaladejo Magí, Marrugat Jaume, de la Torre Rafael.

TYROSOL AND HYDROXYTYROSOL ARE ABSORBED FROM MODERATE AND SUSTAINED DOSES OF VIRGIN OLIVE OIL IN HUMANS.

Eur J Clin Nutr 2002; 56: 1-5.

Anexo 2. Protocolo del estudio sobre los efectos del consumo de aceite de oliva virgen en la fase postprandial y a corto plazo en humanos

- Primer día: extracción venosa basal en ayuno y recogida de la primera micción de la mañana.
- A continuación un período de 4 días de blanqueo con una dieta baja en CF y recolección de la primera micción de la mañana. El quinto día se recogió también orina de 24 horas
- El sexto día se recogió la primera micción de la mañana y seguidamente la orina de 24 horas. Se realizó una extracción venosa basal post blanqueo en ayuno y acto seguido los participantes ingirieron 50 ml de aceite de oliva virgen en crudo (opcionalmente con pan, azúcar o sal). Posteriormente se realizaron extracciones a las 2, 4, 6, 8 y 24 horas (junto con la recogida de la primera micción de la mañana). La dieta de ese día fue baja en CF.
- A continuación se procedió con un período de 6 días, se realizó una ingesta diaria de 25 ml de aceite de oliva virgen en crudo y se siguió una dieta Mediterránea estándar. El último día de este período se recogió orina de 24 horas.
- El último día del estudio se realizó un extracción venosa en ayuno y se recogió la primera micción de la mañana.

Anexo 3. Protocolo del ensayo clínico randomizado cruzado y a doble ciego, sobre los efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en humanos

- 1^{er} día:
- Recogida de la primera orina de la mañana
 - Extracción venosa basal en ayuno, antes del desayuno
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena (durante todo el estudio)
- Del 1^{er} al 14^o día:
- Realizar unas encuestas: demográficas, estilo de vida, actividad física y costumbres nutricionales.
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena
- 15^o día:
- Recogida de la primera orina de la mañana
 - Extracción venosa basal en ayuno, antes del desayuno
 - Dieta A, B o C (aceite refinado para cocinar y 20 ml/día de aceite de oliva virgen, comercial o refinado para tomar en crudo).
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena
- Del 15^o al 35^o día:
- Dieta A, B o C (aceite refinado para cocinar y 20 ml/día de aceite de oliva virgen, comercial o refinado para tomar en crudo).
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena
- 36^o día:
- Recogida de la primera orina de la mañana
 - Extracción venosa basal en ayuno, antes del desayuno.
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena

- Del 36° al 49° día:
- Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena
- 50° día:
- Recogida de la primera orina de la mañana
 - Extracción venosa basal en ayuno, antes del desayuno.
 - Dieta A, B o C (aceite refinado para cocinar y 20 ml/día de aceite de oliva virgen, comercial o refinado para tomar en crudo).
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena
- Del 50° al 70° día:
- Dieta A, B o C (aceite refinado para cocinar y 20 ml/día de aceite de oliva virgen, comercial o refinado para tomar en crudo).
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena
- 71° día:
- Recogida de la primera orina de la mañana
 - Extracción venosa basal en ayuno, antes del desayuno.
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena
- Del 71° al 84° día:
- Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena
- 85° día:
- Recogida de la primera orina de la mañana
 - Extracción venosa basal en ayuno, antes del desayuno.
 - Dieta A, B o C (aceite refinado para cocinar y 20 ml/día de aceite de oliva virgen, comercial o refinado para tomar en crudo).
 - Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena

Del 85° al 105° día:

- Dieta A, B o C (aceite refinado para cocinar y 20 ml/día de aceite de oliva virgen, comercial o refinado para tomar en crudo).
- Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena

106° día:

- Recogida de la primera orina de la mañana
- Extracción venosa basal en ayuno, antes del desayuno.
- Registro de la dieta: recoger información de la dieta de la comida y cena

Anexo 4. Encuesta dietética realizada en los ensayos clínicos. Registro dietético

Nombre:..... **Apellidos:**.....

Código:.....

Día De La Semana:..... **Fecha:** ___/___/___/

Alimentos/Bebidas	Modo de preparación	Cantidad (medida casera)
Desayuno Hora:		
Media Mañana Hora:		
Comida Hora:		
Merienda Hora:		
Cena Hora:		
Entre comidas		

Anexo 5. Encuesta de actividad física realizada en los ensayos clínicos. Cuestionario de actividad física de Minnesota

Instrucciones para su administración

Instrucciones para los entrevistadores que utilicen la adaptación española del Cuestionario de Actividad Física durante el Tiempo Libre de Minnesota (CAFTLM).

I. Técnica de la entrevista

La técnica de la entrevista es muy importante, el objetivo es facilitar el recuerdo de las actividades físicas realizadas el último año para reducir el sesgo de memoria que pueda existir. También hay que evitar que la encuesta se haga pesada o irritante, tanto para el participante como para el entrevistador.

Para muchas personas es difícil recordar qué actividades físicas realizaron durante el último año, sobre todo cuando se trata de actividades cotidianas como caminar. Algunos participantes tienden a desanimarse y ni tan sólo intentan hacer una estimación. Otros se toman el trabajo muy seriamente y lo intentan de forma excesivamente meticulosa, alargando la entrevista innecesariamente.

Como entrevistador, es conveniente establecer una buena comunicación durante **la presentación**. Es necesario remarcar la importancia de la información que pedimos, poniendo énfasis en algunas palabras clave. **Las instrucciones** deben expresarse de forma clara y precisa.

El entrevistador tiene que tomar la iniciativa, y establecer, y mantener el ritmo de la entrevista. Conviene evitar conversaciones ajenas al objetivo del cuestionario. Aunque un participante no tenga prisa, si está utilizando un tiempo excesivo intentando recordar algo con mucho detalle, el entrevistador debería interrumpirlo diciendo: "Recuerde que estamos interesados en una estimación media, no en el tiempo exacto" o "En general ¿a usted que le parece?".

Es conveniente verificar cualquier afirmación que parezca exagerada:

Ejemplo 1: Un participante afirma que nada 1 hora cada semana en su centro deportivo. Conviene asegurarse de que esta hora, no incluye el tiempo empleado en cambiarse de ropa y en las relaciones sociales. De hecho, el tiempo que está realmente nadando podría ser de unos 20 minutos.

Si un participante afirma que realiza una actividad más de 8 veces al mes, conviene traducirlo a semanas (más de 2 veces a la semana) y verificarlo.

Ejemplo 2: Un participante afirma que juega a fútbol 16 veces cada mes. El entrevistador tendría que confirmarlo: "¿De promedio juega al fútbol 4 veces cada semana?".

Ejemplo 3: Si un participante dice que practica alguna actividad durante los meses de verano, no se ha de sobrentender cuáles son estos meses. Conviene preguntar: "¿A qué meses se refiere usted?".

Se sabe que la gente acostumbra a sobreestimar el tiempo invertido en una actividad física determinada. Si un participante dice "2 o 3 horas", apunte 2. Si el intervalo que refiere es amplio "5 a 10 veces", pida que sea más preciso.

Si una actividad siempre se realiza al aire libre, pregunte si la frecuencia es igual en invierno que en verano.

La media de tiempo invertida en la entrevista debe ser de 10 a 20 minutos. El objetivo es obtener estimadores tan precisos como sea posible y, a la vez establecer un ritmo rápido que mantenga el interés. Cuanta más experiencia tenga el entrevistador, más fácil será el dominio de estas técnicas. Como entrenamiento para desarrollar el estilo y conocer la dinámica de la entrevista es muy útil, escuchar cintas de sus propias entrevistas. Planifique entrevistar y grabar al menos cinco personas (cualquier miembro del equipo investigador puede ser adecuado como práctica). Evalúe su estilo y decida qué situaciones podrían haber sido manejadas de forma distinta: quizás era necesaria más información, no se verificó alguna respuesta cuestionable, o quizás hacía falta un ritmo más rápido, etc.

I-a. Ejemplo de presentación.

Como presentación se podría explicar de manera sencilla, rápida y comprensible el objetivo del estudio que se está realizando. Esta presentación puede servir de motivación al participante.

Posteriormente se remarca que la información que nos dé es muy importante y se le pide su atención y colaboración.

Ejemplo: "Todavía quedan algunas cuestiones sin aclarar sobre la relación que existe entre la actividad física y las enfermedades coronarias. Por eso realizamos este estudio que tiene como objetivo ... (explicar brevemente el objetivo del estudio). Es muy importante que recojamos datos sobre la actividad física que usted realiza y por eso le hacemos estas preguntas. Le pedimos que cuando nos conteste sea lo más preciso y sincero posible".

I-b Ejemplo de instrucciones

"En esta hoja le presentamos una lista de actividades físicas. Tiene que señalar con una cruz aquellas que ha realizado durante el último año, aunque sólo sea una vez. Posteriormente iremos examinándolas una por una, para valorar cuántas veces las ha practicado, y cuánto tiempo de media cada vez".

Una vez señaladas las actividades practicadas (suponga que ha señalado pasear, bailar, y nadar en el mar): "Para facilitar el recuerdo vamos a comenzar por la semana pasada, ¿cuántos días ha paseado esta última semana?...¿Cuánto tiempo de media cada día?...¿Cuántos días ha bailado esta última semana?...¿Cuánto tiempo de media cada día?...¿Cuántos días ha nadado en el mar esta última semana?...¿Cuánto tiempo de media cada día?..." Habrá actividades que estarán señaladas pero que no se habrán realizado durante la última semana, en estos casos tranquilice al participante, por ejemplo: "No se preocupe ya la examinaremos más adelante, ahora estamos anotando las actividades realizadas esta última semana."

Una vez rellenado el impreso de las actividades de la última semana, interrogamos sobre las realizadas en el último mes siguiendo la misma dinámica, haremos lo mismo con el último trimestre y finalmente con las actividades realizadas durante el último año.

Este procedimiento puede parecer un poco confuso pero una vez iniciada la rutina, será muy fácil y casi con un gesto se obtendrán las respuestas. (Es muy importante una actitud positiva del entrevistador).

II.-Actividades

Cada actividad tiene una definición, el entrevistador debería estar muy familiarizado con cada una de ellas. No hace falta definir las actividades excepto si el participante tiene alguna pregunta al respecto. Algunas actividades requerirán preguntas especiales o comentarios aclaratorios.

Si un participante ha señalado ejercicio en casa o en un gimnasio o club deportivo, preguntad cuales son las actividades específicas que realiza y anotarlo en la correspondiente actividad.

Las siguientes actividades tienen alguna restricción (mire las definiciones). Si se señala alguna de estas actividades, asegurarse de que las restricciones se cumplen:

Andar de casa al trabajo y/o del trabajo a casa

Excursiones con mochila

Andar campo a través

Trotar

Correr

Navegación

Natación

Ciclismo

II-a. Tiempo estandarizado para algunas actividades

Para asegurar la uniformidad de la información recogida consideraremos que:

un mes tiene 4 semanas,

un año tiene 48 semanas,

cada año tiene 240 días laborables,

un mes tiene 22 días laborables,

un año tiene 100 días de fin de semana.

Se ha establecido un tiempo estandarizado para las siguientes actividades:

-subir escaleras, cada piso = 1/2 minuto,

-una vuelta de esquí acuático = 5 minutos,

-una partida de billar = 10 minutos,

-un set de tenis individual = 20 minutos,

-un set de tenis dobles = 15 minutos,

-golf 9 hoyos = 90 minutos.

Para estas actividades la forma de preguntar cambiará: por ejemplo, no se pregunta cuántos minutos ha subido escaleras, sino cuántos pisos y se convertirá a minutos (1/2 minuto por piso); igualmente con los hoyos de golf, etc.

II-b Definiciones y comentarios de las actividades

Andar

El tiempo empleado en andar durante las horas de trabajo no se pregunta exceptuando el caso de interrupciones largas como la comida.

01 **Pasear:** Ya que esta actividad es la más seleccionada, pregunte explícitamente a cada participante si pasea.

- 02 **Andar de casa al trabajo y/o del trabajo a casa y/o durante el periodo de descanso del trabajo:** Andar hasta el autobús, hasta el trabajo o desde el aparcamiento, etc., pueden ser incluidos en esta categoría si se anda de forma continua durante más de 10 minutos. Esta actividad se puede repetir por la tarde.
- 03 **Andar (llevando el carrito de la compra).** Incluye solamente el andar arrastrando el carrito de la compra lleno.
- 04 **Andar (llevando bolsas de la compra).** Se incluye el tiempo empleado andando cargado con bolsas de compras realizadas. Puede ser desde la tienda a casa o al coche y también del coche a casa.
- 05 **Subir escaleras.** Se entiende como la utilización voluntaria de las escaleras cuando el ascensor o la escalera mecánica están disponibles, se puede incluir el horario laboral. Pregunte específicamente por el número de pisos que se suelen subir habitualmente. No se cuentan las bajadas. Cuente 1/2 minuto por piso.
- 06 **Andar campo a través.** Andar de forma continua por terreno plano u ondulado, sin mochila, durante, al menos, dos horas. Interrogue sobre el tiempo dedicado a esta actividad, la frecuencia y la duración de los periodos de descanso y las paradas para comer. Finalmente haga una estimación del tiempo total dedicado a andar en cada ocasión.
- 07 **Excursiones con mochila.** Marchas cargando una mochila de unos 9 Kg o más. Si la actividad no reúne estos criterios, anote el tiempo como si se tratara de la actividad anterior (06). Descuento las paradas para descansar y comer.
- 08 **Escalar montañas.** Recorridos en los cuales el objetivo es llegar a alcanzar una cima, para lo cual hay que invertir diversas horas o días. No se hace ninguna distinción entre la escalada de rocas o de lomas. Pida al participante que separe el tiempo real de escalada de las paradas para descansar, dormir, comer, etc. Incluya el tiempo total invertido en la subida y en la bajada.
- 09 **Ir en bicicleta al trabajo o a pasear.** En este apartado se incluye la utilización de la bicicleta para ir a trabajar y por placer. No se hace distinción en relación con el tipo de bicicleta. Pregunte el tiempo realmente invertido en pedalear. Los individuos que se dedican a carreras de mediana ó larga distancia, se tendrían que informar en el epígrafe de otras actividades con el título de ciclismo.
- 10 **Bailar.** Incluye todo tipo de baile. Pregunte el tiempo invertido en cada sesión.

- 11 **Aerobic o ballet.** Se incluye el tiempo invertido en clases de aerobio o de ballet.
- 12 **Jugar con los niños (corriendo, saltando,...).** Pregunte el tiempo invertido jugando o cuidando niños y que exija cierto nivel de esfuerzo: correr, saltar, etc...

Ejercicios de mantenimiento general.

Todos los ejercicios de puesta a punto, ejercicios específicos para aumentar la fuerza, la flexibilidad, realizados en casa o en un gimnasio, se tendrían que informar en el epígrafe 'Hacer ejercicio en casa' o en un 'Hacer ejercicio en un gimnasio'.

Por otro lado, si un participante realiza sobre todo actividades como el trotar, correr, levantar pesos, no informe de éstas como 'Hacer ejercicio en casa o en un gimnasio', sino como actividades específicas: si un participante acude al gimnasio con el único propósito de jugar una partida de squash, u otros juegos listados en la sección encabezada como "Deportes", anote estas actividades como el juego específico más que como actividades en el gimnasio.

- 13 **Hacer ejercicio en casa.** Pregunte qué tipo de ejercicio se ha realizado. No hay que incluir actividades listadas en otros apartados. Pregunte el tiempo realmente dedicado a hacer ejercicio.
- 14 **Hacer ejercicio en un gimnasio.** Pregunte qué tipo de ejercicios se han realizado. Distinga entre asistencia a clases de mantenimiento físico general y la practica de un juego concreto (por ejemplo balonvolea) o una actividad física específica (por ejemplo nadar). Descuento el tiempo invertido en los vestuarios, la sauna, etc.
- 15 **Caminar deprisa.** Marcha a paso vivo que obliga a respirar más deprisa de lo habitual al andar. Puede definirse para el participante como "la forma de andar cuando uno tiene mucha prisa".
- 16 **Trotar ("Jogging").** Pregunte el tiempo invertido trotando, entendiendo por trotar la carrera continua durante menos de 10 minutos, o la que se realiza con pasos cortos (la mayoría de participantes que realizan esta actividad tendrán una buena estimación del tiempo).
- 17-18 **Correr 8-11 km/h o 12-16 km/h.** Pregunte por el tiempo invertido corriendo. Correr se define como la carrera continua durante 10 minutos o más, utilizando los pasos más largos posibles. Una actividad continua más corta o con pasos cortos se tiene que informar bajo el epígrafe de trotar. Si no puede precisar la velocidad se incluye en el apartado 17 (correr 8-11 km/hora).
- 19 **Levantar pesas.** Anote el tiempo que se está en la sala de musculación o de pesas.

Actividades acuáticas

- 20 **Esquí acuático.** Pregunte el número total de vueltas. Multiplique este número de vueltas por 5 para obtener el total de minutos de la actividad.
- 21 **Surf.**
- 22 **Navegar a vela.** Hay que anotar en este apartado, sólo aquellos individuos que navegan en carreras de competición. Apunte el número de horas en cada sesión que el participante de competición o entrenamiento.
- 23 **Ir en canoa o remar por distracción.** Anote las horas en cada ocasión. Asegúrese de que el participante distingue bien entre navegar como acompañante y remar personalmente.
- 24 **Ir en canoa o remar en competición.** Pregunte el número de meses de entrenamiento, el número de sesiones cada mes y la media de tiempo de cada sesión.
- 25 **Hacer un viaje en canoa, "Rafting".** Debe incluir el tiempo invertido remando. También hay que incluir las actividades asociadas como llevar la barca, preparar el campamento, y su mantenimiento, en los apartados apropiados.
- 26 **Nadar (más de 150 metros en la piscina).** Distinguir entre el tiempo invertido tomando el sol al lado de la piscina (bebiendo cerveza, etc.), y el tiempo invertido en la recuperación, del tiempo invertido realmente nadando. ¿Era la piscina suficientemente larga?. Los gimnasios suelen tener piscinas de 15 a 25 metros de largo. Se debe verificar este punto.
- 27 **Nadar en el mar.** No se debe incluir el tiempo invertido sentados en la playa o jugando a pelota. Pregunte al participante si nadó en aguas profundas y cuánto tiempo estuvo nadando en una zona donde el agua le cubría. No se debe incluir el tiempo invertido nadando con gafas y mascarilla con un tubo.
- 28 **Bucear.** Nadar bajo el agua respirando oxígeno procedente de unas botellas de oxígeno ligadas a la espalda, o de una mascarilla con tubo. Anote el tiempo real invertido nadando bajo el agua.

Actividades de invierno

- 29 **Esquiar.** Tiempo realmente invertido en los descensos. Puede servir de ayuda pedir al participante que estime el número de bajadas en cada ocasión y el tiempo aproximado invertido en cada una de ellas.

- 30 **Esquí de fondo o de montaña.** Anote la media de tiempo de cada travesía o excursión, sin contar las paradas para comer o descansar.
- 31 **Patinar sobre ruedas o hielo.** Anote el tiempo invertido en la pista, restando los períodos de descanso y actividad social.

Deportes

- 32 **Montar a caballo.**
- 33 **Jugar a los bolos.** Pregunte al participante cuantos juegos o líneas realiza de promedio cada vez que va a la bolera. Multiplique el número de juegos por 10 y el resultado es el tiempo invertido por ocasión en minutos.
- 34 **Balonvolea.** Anote el tiempo invertido en la pista.
- 35 **Tenis de mesa.** Pregunte el tiempo invertido jugando.
- 36 **Tenis individual.** Pregunte el número de sets y multiplíquelo por 20 minutos. El resultado es el tiempo de juego en minutos.
- 37 **Tenis dobles.** Pregunte el número de sets y multiplíquelo por 15 minutos. El resultado será el tiempo de juego en minutos.
- 38 **Badminton.** Anote el tiempo en la pista.
- 39 **Baloncesto sin jugar partido.** Anote el tiempo en la pista.
- 40 **Baloncesto jugando un partido.** Anote igualmente el tiempo en la pista.
- 41 **Arbitrar un partido de baloncesto.** Anote el tiempo en la pista.
- 42 **Squash.** Anote igualmente el tiempo en la pista.
- 43 **Fútbol.** Anote el tiempo total jugado.
- 44 **Golf (Llevando el carrito de los palos).** Igual que la anterior.
- 45 **Golf (Llevando los palos en la bolsa).** Igual que la anterior.
- 46 **Balonmano.** Anote el tiempo en el campo o pista.
- 47 **Petanca.**
- 48 **Artes marciales.** No incluir el tiempo en los vestuarios o el empleado en actividades sociales
- 49 **Motociclismo.** Incluimos en este apartado la utilización deportiva de la motocicleta para: competiciones de velocidad en circuito, competiciones de subida, pruebas de resistencia y regularidad, y competiciones sobre terreno accidentado en la doble modalidad de velocidad (motocros) y de habilidad (trial). Anote el tiempo dedicado.

- 50 **Ciclismo de carretera o de montaña.** Se incluye en este apartado la práctica de ciclismo de mediana o larga distancia, se puede incluir aquel cuya duración por sesión sea superior a 60 minutos. Anote el tiempo que se está sobre la bicicleta.

Actividades en el jardín

- 51 **Cortar el césped con máquina.** Esta categoría incluye las cortadoras de césped que tienen motorizadas las hojas de cortar, así como las que tienen motorizadas tanto las hojas como las ruedas. Anote el tiempo dedicado a cortar césped descontando el tiempo de descanso.
- 52 **Cortar el césped manualmente.** Anote el tiempo descontando los períodos de descanso.
- 53 **Limpiar y cultivar el jardín.** Incluye todas las actividades necesarias para mantener un jardín que ya está plantado. Pueden ser realizadas varias veces durante las épocas del año en que suelen efectuarse. Pida al participante que haga la estimación del tiempo invertido, ajustando de acuerdo con los períodos de descanso.
- 54 **Cavar, labrar el jardín y/o el huerto.** Actividades necesarias para preparar el jardín y/o el huerto para plantar. Se realizan generalmente sólo durante la primavera.
- 55 **Quitar nieve con pala.** Suelen realizarla individuos procedentes de zonas montañosas durante el invierno.

Reparaciones caseras (bricolaje).

Este apartado incluye un número limitado de actividades específicas destinadas a cubrir el amplio abanico de actividades que los participantes suelen referir. Explique a cada participante que debido a las limitaciones de espacio no se ha podido hacer una lista de todas las posibles actividades que se pueden realizar en una casa. En la definición de las actividades que daremos a continuación, se encuentra una larga lista de diversas actividades de reparaciones caseras añadidas al encabezamiento general de cada una de ellas. Podemos preguntar al participante si ha realizado algún tipo de reparación casera, cual ha sido e incluirla en el apartado correspondiente.

Un día de trabajo equivale a 8 horas.

- 56 **Trabajos de carpintería dentro del taller.** Podemos incluir bajo este código: fabricar muebles u objetos similares utilizando una herramienta de mano o mecánica, o reparar ventanas o contraventanas, o realizar reparaciones menores dentro de casa. Anote el tiempo invertido en hacer el trabajo o trabajos.

- 57 **Trabajos de carpintería (exterior).** Podemos incluir bajo este código: construir porches, garajes, vallas y poner baldosas en paredes o patios. Anote la suma de tiempo utilizado para acabar el trabajo o trabajos.
- 58 **Pintar o empapelar dentro de casa.** Podemos incluir bajo este código: encerar el suelo, colocar baldosas, instalar o reparar tuberías, instalar o reparar líneas eléctricas. Anote el tiempo invertido en hacer el trabajo o trabajos.
- 59 **Pintar fuera de casa.** Se pueden incluir bajo este código: pintar fuera de casa, trabajos que requieran escaleras de mano, cambiar contraventanas y tejas, y limpiar cristales, hacer cemento, colocar bloques de cemento y cavar fosas para los cimientos.
- 60 **Limpiar la casa.** Se incluyen en esta actividad las actividades de limpieza de la casa que requieran un esfuerzo físico vigoroso.
- 61 **Mover muebles.**

Caza y pesca

- 62 **Tiro con pistola.**
- 63 **Tiro con arco.**
- 64 **Pescar en la orilla del mar o del río.** Anote el tiempo dedicado a pescar.
- 65 **Pescar con botas altas dentro del río.** Anote el tiempo invertido pescando.
- 66 **Caza menor.** Pregunte el tiempo que ha caminado campo a través.
- 67 **Caza mayor.** Pregunte sobre los días dedicados y el tiempo medio que se ha caminado cada día

Lista de Actividades Físicas

(Marque con una cruz la casilla correspondiente a las actividades físicas que haya realizado durante el último año)

Andar - Bailar - Subir escaleras

- 1 Pasear
- 2 Andar de casa al trabajo y del trabajo a casa o durante el periodo de descanso del trabajo
- 3 Andar (llevando carrito de la compra)
- 4 Andar (llevando bolsas de la compra)
- 5 Subir escaleras
- 6 Andar campo a través
- 7 Excursiones con mochila
- 8 Escalar montañas
- 9 Ir en bicicleta al trabajo
- 10 Bailar
- 11 Aeróbic o ballet
- 12 Jugar con los niños (corriendo, saltando,..)

Ejercicios de mantenimiento general

- 13 Hacer ejercicio en casa
- 14 Hacer ejercicio en un gimnasio
- 15 Caminar deprisa
- 16 Trotar ("Jogging")
- 17 Correr 8-11 km/h
- 18 Correr 12-16 km/h
- 19 Levantar pesas

Actividades acuáticas

- 20 Esquí acuático
- 21 Surf
- 22 Navegar a vela
- 23 Ir en canoa o remar (por distracción)
- 24 Ir en canoa o remar (en competición)
- 25 Hacer un viaje en canoa
- 26 Nadar (más de 150 metros en piscina)
- 27 Nadar en el mar
- 28 Bucear

Deportes de invierno

- 29 Esquiar
- 30 Esquí de fondo
- 31 Patinar (ruedas o hielo)

Otras actividades

- 32 Montar a caballo
- 33 Jugar a los bolos

- 34 Balonvolea
- 35 Tenis de mesa
- 36 Tenis individual
- 37 Tenis dobles
- 38 Bádminton
- 39 Baloncesto (sin jugar partido)
- 40 Baloncesto (jugando un partido)
- 41 Baloncesto (actuando de árbitro)
- 42 Squash
- 43 Fútbol
- 44 Golf (llevando el carrito)
- 45 Golf (andando y llevando los palos)
- 46 Balonmano
- 47 Petanca
- 48 Artes marciales
- 49 Motociclismo
- 50 Ciclismo de carretera o montaña

Actividades en el jardín

- 51 Cortar el césped con máquina
- 52 Cortar el césped manualmente
- 53 Limpiar y arreglar el jardín
- 54 Cavar el huerto
- 55 Quitar nieve con pala

Trabajos y actividades caseras

- 56 Trabajos de carpintería dentro de casa
- 57 Trabajos de carpintería (exterior)
- 58 Pintar dentro de casa
- 59 Pintar fuera de casa
- 60 Limpiar la casa
- 61 Mover muebles

Caza y pesca

- 62 Tiro con pistola
- 63 Tiro con arco
- 64 Pescar en la orilla del mar
- 65 Pescar con botas altas dentro del río
- 66 Caza menor
- 67 Caza mayor (ciervos, osos...)

Otras (Especificar)

- 68
- 69
- 70

Listado de Actividades Físicas con su Código de Intensidad

ACTIVIDAD FISICA	METS
1 Pasear	3.5
2 Andar de casa al trabajo y del trabajo a casa o durante el periodo de descanso en el trabajo	4.0
3 Andar (llevando el carrito de la compra)	3.5
4 Andar (llevando bolsas de la compra)	5.5
5 Subir escaleras	8.0
6 Andar campo a través (excursiones)	6.0
7 Excursiones con mochila	7.0
8 Escalar montañas	8.0
9 Ir en bicicleta al trabajo o pasear	4.0
10 Bailar	4.5
11 Aeróbic o ballet	6.0
12 Jugar con los niños (corriendo, saltando,...)	4.5
13 Hacer ejercicio en casa	4.5
14 Hacer ejercicio en un gimnasio	6.0
15 Caminar deprisa	4.5
16 Trotar ("Jogging")	6.0
17 Correr 8-11 km/h	10.0
18 Correr 12-16 km/h	15.0
19 Levantar pesas	6.0
20 Esquí acuático	6.0
21 Surf	6.0
22 Navegar a vela	3.0
23 Ir en canoa o remar (por distracción)	3.5
24 Ir en canoa o remar (en competición)	12.0
25 Hacer un viaje en canoa	4.0
26 Nadar (más de 150 metros en piscina)	6.0
27 Nadar en el mar	6.0
28 Bucear	5.0
29 Esquiar	7.0
30 Esquí de fondo	8.0
31 Patinar (ruedas o hielo)	7.0
32 Montar a caballo	5.0
33 Jugar a los bolos	3.0
34 Balonvolea	4.0
35 Tenis de mesa	4.0
36 Tenis individual	8.0
37 Tenis dobles	6.0
38 Bádminton	7.0
39 Baloncesto (sin jugar partido)	6.0
40 Baloncesto (jugando un partido)	8.0
41 Baloncesto (actuando de árbitro)	7.0
42 Squash	12.0
43 Fútbol	10.0
44 Golf (llevando el carrito)	3.5
45 Golf (andando y llevando los palos)	5.5

46	Balonmano	10.0
47	Petanca	3.0
48	Artes marciales	10.0
49	Motociclismo	4.0
50	Ciclismo de carretera o montaña	9.0
51	Cortar el césped con máquina	4.5
52	Cortar el césped manualmente	6.0
53	Limpiar y arreglar el jardín	4.5
54	Cavar el huerto	5.0
55	Quitar nieve con pala	6.0
56	Trabajos de carpintería dentro del taller	3.0
57	Trabajos de carpintería (exterior).	6.0
58	Pintar dentro de casa (incluye empapelar)	4.5
59	Pintar fuera de casa	5.0
60	Limpiar la casa	3.5
61	Mover muebles	6.0
62	Tiro con pistola	2.5
63	Tiro con arco	3.5
64	Pescar en la orilla del mar	3.5
65	Pescar con botas altas dentro del río	6.0
66	Caza menor	5.0
67	Caza mayor	6.0