

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Ensayo clínico para evaluar la eficacia de un nutraceutico frente
a placebo en la reducción del riesgo cardiovascular en sujetos
sanos

Autor:

D. Juan Pablo Martínez Rodríguez

Directores/as:

Dr. D. F. Javier López Román

Dr. D. Julián Castillo Sánchez

Murcia, septiembre de 2024

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

Ensayo clínico para evaluar la eficacia de un nutraceutico frente
a placebo en la reducción del riesgo cardiovascular en sujetos
sanos

Autor:

D. Juan Pablo Martínez Rodríguez

Directores/as:

Dr. D. F. Javier López Román

Dr. D. Julián Castillo Sánchez

Murcia, septiembre de 2024

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. F. Javier López Román y el Dr. D. Julián Castillo Sánchez como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Ensayo clínico para evaluar la eficacia de un nutraceutico frente a placebo en la reducción del riesgo cardiovascular en sujetos sanos” realizada por D. Juan Pablo Martínez Rodríguez en el Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011 de 28 de enero, en Murcia a 23 de septiembre de 2024.



F. Javier López Román



Julián Castillo Sánchez

RESUMEN

Se evaluó la eficacia de un complemento alimenticio basado en una combinación de extractos de pomelo, naranja amarga y hojas de olivo administrados durante 8 semanas (n = 51) frente a placebo (n = 45) sobre la reducción del riesgo cardiovascular en voluntarios sanos, en un ensayo controlado, unicéntrico, aleatorizado, doble ciego. Las variables del estudio incluyeron vasodilatación dependiente de endotelio (VDE); presión arterial (PA); perfil lipídico; estado trombótico; biomarcadores de estrés oxidativo; biomarcadores relacionados con la inflamación; variables antropométricas; calidad de vida; y actividad física. Se analizó el conjunto de datos por protocolo. En el grupo del producto activo, hubo diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo a las 8 semanas en comparación con la línea de base en VDE, PA sistólica y diastólica, colesterol total, LDL-C, LDL-oxidasa, proporción de glutatión oxidado/reducido, proteína carbonilo e IL-6. También se encontraron diferencias significativas entre los grupos para estas variables. No se encontraron cambios significativos en las variables antropométricas y la calidad de vida en ninguno de los grupos de estudio. Además, no se registraron cambios en el nivel de actividad física. El tratamiento con el producto activo fue bien tolerado. Todos estos hallazgos, tomados en conjunto, respaldan un efecto beneficioso de la suplementación con una mezcla de extractos de pomelo, naranja amarga y hojas de olivo sobre los mecanismos subyacentes que pueden interactuar entre sí para aumentar el riesgo cardiovascular en personas sanas.

PALABRAS CLAVE

patología cardiovascular; bioquímica vegetal; ciencias de la nutrición; riesgo cardiovascular; función endotelial; naranja amarga; pomelo; flavonoides cítricos; olivo; polifenoles; secoiridoides.

ABSTRACT

A single-center, randomized, double-blind controlled trial was conducted to assess the efficacy of a food supplement based on a combination of grapefruit, bitter orange, and olive extracts administered for eight weeks (n = 51) versus placebo (n = 45) on reduction of cardiovascular risk in healthy volunteers. Study variables included flow-mediated vasodilation (FMD), blood pressure (BP), lipid profile, thrombotic status, oxidative stress biomarkers, inflammation-related biomarkers, anthropometric variables, quality of life, and physical activity. The per-protocol data set was analyzed. In the active product group, there were statistically significant within-group differences at eight weeks as compared with baseline in FMD, systolic and diastolic BP, total cholesterol, LDL-C, LDL-oxidase, oxidized/reduced glutathione ratio, protein carbonyl, and IL-6. Significant between-group differences in these variables were also found. Significant changes in anthropometric variables and quality of life were not observed in the study groups. Changes in the level of physical activity were not recorded. Treatment with the active product was well tolerated. All these findings, taken together, support a beneficial effect of supplementation with a mixture of grapefruit, bitter orange fruits, and olive leaf extracts on underlying mechanisms that may interact each other to decrease the cardiovascular risk in healthy people.

KEY WORDS

cardiovascular pathology; plant biochemistry; nutritional sciences; cardiovascular risk; endothelial function; bitter orange; grapefruit; citrus flavonoids; olive; polyphenols; secoiridoids.

AGRADECIMIENTOS

En realidad, no creo que se me dé muy bien este “apartado” de agradecimientos, hay mucho que abarcar y quiero ser muy breve, algo imposible del todo, pero voy a intentarlo.

Dr. D. Julián Castillo Sánchez, tengo que empezar contigo. Pues contigo empezó este largo camino, y además, simplemente, si no fuera por ti, no habría nada que escribir. Cada día es una clase magistral, gracias infinitas por todo.

Quisiera agradecer al Dr. D. F. Javier López Román todo el fantástico trabajo realizado, por él y su brillante equipo. Y agradecer la inmensa oportunidad de dejarme ser parte de este proyecto, he podido ver desde dentro cómo trabaja este grupo y soy un privilegiado por ello.

Gracias a toda la familia de Nutrafur S.L. (Ahora llamada iff Murcia Natural Ingredients). Son ya muchos años juntos, aprendiendo al lado de fantásticos profesionales, este trabajo tiene trocitos de todos y cada uno de vosotros. Descuidad, todavía nos quedan muchas más aventuras por vivir.

Agradecer también a la Universidad Católica San Antonio, la institución encargada prácticamente de toda mi formación académica. Y felicitarles con entusiasmo pues a mi parecer, con los años se han convertido en un necesario referente universitario de la unión entre empresa y facultad.

Gracias a mi familia, a todos ellos, pero de manera especial a mis padres, Juan y Juani. Todo lo que soy, la manera de ver el mundo, mi educación, todo está de ligado a vosotros, como un árbol a sus fuertes raíces.

Y por último, gracias a mi querida Cristina, mi pared maestra, mi equilibrio, incansable sufridora en silencio de todo mi ser. Hace no mucho dejamos de ser un número par y, todo esto que pasa mientras intentamos hacer apresurados planes de futuro, no sería posible sin vosotros. Gracias eternas.

“Cuando hagas algo noble y bonito y nadie se dé cuenta, no estés triste. El amanecer es un espectáculo hermoso y sin embargo la mayor parte de la audiencia duerme todavía”

John Lennon 1940-1980

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	7
I - INTRODUCCIÓN.....	32
1.1. La Enfermedad Cardiovascular	32
1.1.1. Importancia en la salud publica.....	32
1.1.2. Resumen de la complejidad fisiológica del cuadro ECV	34
1.1.3. Sistemas, mecanismos y biomarcadores relevantes involucrados en la ECV	35
1.1.4. Interés de los compuestos bioactivos en el tratamiento de la ECV	50
1.2. Caracterización de Citroventm y sus compuestos bioactivos	53
1.2.1. Extracto de pomelo y naranja amarga: Flavonoides cítricos y Flavanonas glicosiladas	53
1.2.2. Polifenoles de hojas de olivo: Oleouperina, secoiridoides e hidroxitirosol	61
II - JUSTIFICACIÓN	67
2.1. Premisas de estudio	67
2.2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	68
2.3. HIPOTESIS DEL ESTUDIO.....	69
III - OBJETIVOS.....	73
3.1. Objetivos principales	73
3.2. Objetivos secundarios	73
IV - MATERIAL Y MÉTODO	77
4.1. Diseño del estudio	77
4.2. Población del estudio	77
4.2.1. Criterios de inclusión.....	77

4.2.2.	Criterios de exclusión	78
4.2.3.	Reclutamiento	79
4.2.4.	Aleatorización.....	80
4.2.5.	Cegamiento	80
4.2.6.	Criterios de retirada y abandono	80
4.2.7.	Pérdidas pre-randomización	81
4.2.8.	Producto administrado.....	81
4.3.	Variables	88
4.3.1.	Variables de riesgo cardiovascular: función endotelial	89
4.3.2.	Variables de riesgo cardiovascular: Niveles séricos de homocisteína.	92
4.3.3.	Variables de Metabolismo Lipídico	92
4.3.4.	Variables de tensión arterial	92
4.3.5.	Variables del estado trombótico: niveles séricos del factor de Von Willebrand.....	93
4.3.6.	Variables del estado antioxidante	93
4.3.7.	Variables de inflamación.....	94
4.3.8.	Variables antropométricas	95
4.3.9.	Variables de estilo de vida	95
4.3.10.	Variables de seguridad.....	97
4.4.	Desarrollo del estudio	97
4.4.1.	Fase de Reclutamiento.....	97
4.4.2.	Fase de Selección	98
4.4.3.	Fase Experimental	98
4.5.	Comité de Ética	99
4.5.1.	Comité de ética independiente.....	99
4.5.2.	Confidencialidad	99
4.5.3.	Hoja de información y consentimiento informado de los sujetos	100

ÍNDICE GENERAL	15
4.6. Análisis estadístico	100
4.6.1. Estudio descriptivo de las variables.	101
4.6.2. Estudio comparativo entre grupos en estado basal.	101
4.6.3. Evolución de las variables.	101
V - RESULTADOS	105
5.1. Diagrama de flujo	105
5.2. Riesgo cardiovascular	106
5.2.1. Vasodilatación dependiente de endotelio.	106
5.2.2. Homocisteína sérica	107
5.3. Presión arterial	109
5.3.1. Presión arterial sistólica.	109
5.3.2. Presión arterial diastólica	110
5.4. Perfil lipídico	112
5.4.1. Colesterol total.	112
5.4.2. Colesterol LDL.	113
5.4.3. Colesterol HDL	115
5.4.4. Triglicéridos	116
5.4.5. Colesterol LDL oxidada.	118
5.5. Estatus trombótico	120
5.5.1. Factor de Von Willebrand	120
5.6. Estatus antioxidante	121
5.6.1. Glutación oxidado (GSSG)	121
5.6.2. Glutación reducido (GSH)	123
5.6.3. Cociente GSH / GSSG	124
5.6.4. Grupos carbonilo	126
5.7. Estatus inflamatorio	127
5.7.1. Proteína C reactiva	127

5.7.2.	Interleucina 6	129
5.7.3.	Factor de necrosis tumoral alfa	130
5.8.	Antropometría.....	132
5.8.1.	Peso	132
5.8.2.	Índice de masa corporal	133
5.8.3.	Masa grasa.....	135
5.9.	Calidad de vida.....	136
5.9.1.	Salud física	136
5.9.2.	Salud mental	138
5.9.3.	Puntuación global	139
5.10.	Actividad física.....	141
5.10.1.	Nivel de actividad física.....	141
5.11.	Seguridad.....	142
5.12.	Tabla general de resultados	143
VI -	DISCUSIÓN.....	149
6.1.	Disfunción endotelial.....	149
6.1.1.	Comparación de mejora en función endotelial respecto a otros nutraceuticos.....	150
6.1.2.	Mejora en la función endotelial debida a los flavonoides cítricos.....	151
6.1.3.	Mejora en la función endotelial debida a la apigenina y luteolina	154
6.2.	Perfil lipídico	156
6.2.1.	Importancia del perfil lipídico en la enfermedad cardiovascular	156
6.2.2.	Mejora del perfil lipídico: LDL-oxidada	157
6.2.3.	Mejora del perfil lipídico: Lipoproteínas, colesterol y triglicéridos.....	160
6.3.	Presión arterial.....	160
6.4.	Estatus trombótico.....	168
6.5.	Estatus antioxidante.....	170

ÍNDICE GENERAL	17
6.6. Estatus antiinflamatorio	174
6.7. Antropometría. Calidad de vida. Actividad física	181
6.8. Seguridad.....	182
6.9. Limitaciones y futuras direcciones	182
VII - CONCLUSIONES	185
7.1. Conclusiones principales.....	185
7.2. Conclusiones secundarias.....	185
VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	189
8.1 VALORACIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	189
8.2 PRESENTE Y FUTURO DEL PRODUCTO.....	191
IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	205
X - ANEXOS	237

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABC, Health, Aging, and Body Composition study (estudio de salud, envejecimiento y composición corporal)

AKT ó Akt, proteína quinasa B

AMP, Adenosine Mnophosphate (adenosina monofosfato)

AMPK 5', proteína quinasa activada por AMP

anti-HSP, antibodies against Heat-Shock Proteins (anticuerpos contra las proteínas de choque térmico)

anti-PC, antibodies against Phosphorylcholine (anticuerpos contra la fosforilcolina)

AT, angiotensina

BAEC, Bovine Aortic Endothelial Cells (células endoteliales aórticas bovinas)

BP, Blood Pressure (presión arterial)

CE, célula endotelial

CK, Creatine Kinase (creatina quinasa)

COX, ciclooxigenasa

CRP, C-Reactive Protein (proteína reactiva C)

CTNS, Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (Centro Tecnológico de Nutrición y Salud)

CVD, Cardiovascular Disease (enfermedad cardiovascular)

DE, endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (relajación dependiente del endotelio por acetilcolina)

DM2, diabetes mellitus tipo 2

EAC, enfermedad arterial coronaria

ECA, enzima convertidora de angiotensina (angiotensin-converting enzyme)

ECV, Enfermedad Cardiovascular

EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor (factor hiperpolarizante derivado del endotelio)

EFSA, European Food and Safety Authority (Autoridad Europea de seguridad alimentaria)

EHGNA, Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico

ERK, quinasa regulada extracelular

eNOS, endothelial Nitric Oxide Synthase (óxido nítrico sintetasa endotelial)

ICC, Insuficiencia Cardíaca Congestiva (congestive heart failure)

IECA, inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (angiotensin-converting enzyme inhibition)

iNOS, Inducible Nitric Oxide Synthase (óxido nítrico sintasa inducible)

FMD, Flow-mediated vasodilation (Vasodilatación Dependiente del Endotelio)

FvW, Factor de von Willebrand

GPIIb, Glyco-Protein Iba (glicoproteína plaquetaria Iba)

GSH, glutatión reducido (como tiol reducido)

GSSG, glutatión reducido (como disulfuro oxidado)

HDL-c, High-Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)

HIV, Human Immunodeficiency Viruses (Virus de la inmunodeficiencia humana)

HPLC, High-performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia)

hs-CRP, high sensitivity C-Reactive Protein (proteína reactiva C de alta sensibilidad)

IHME, Institute for Health Metrics and Evaluation (Instituto de métricas y evaluación de la salud)

IL, interleucina

IP3, trifosfato de inositol

IMC, Índice de Masa Corporal

KC, calcium-activated potassium channel (factor hiperpolarizante derivado del endotelio)

LDL-c, Low-Density Lipoprotein (Lipoproteína de baja densidad)

L-NAME, N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (N-omega-nitro-L-arginina metil éster)

MACE, Major Adverse Cardiovascular Events (Eventos cardiovasculares adversos mayores)

MDA, Malondialdehyde (Malondialdehído)

METC, Cadena de transporte de electrones mitocondrial

MMP, metaloproteinasas de matriz

NADPH, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)

NO, nitric oxide (óxido nítrico)

NOS, óxido nítrico sintasas desacopladas

NOX2, NADPH oxidasa

OMS, Organización Mundial de la Salud

ox-HDL, oxydized HDL (HDL oxidada)

ox-LDL, oxydized LDL (LDL oxidada)

PA, presión arterial

PAS, presión arterial sistólica

PAD, presión arterial distólica

PCR, Proteína C Reactiva

PDE, fosfodiesterasa

PE, phenylephrine (fenilefrina)

PGI2, Prostacycline (Prostaciclina)

RNS, especies reactivas del nitrógeno

ROS, Reactive Oxygen Species (especies reactivas del oxígeno)

RyR, receptores de rianodina

SHR, spontaneously hypertensive rats (ratas espontáneamente hipertensas)

STABILITY, Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy (Estabilización de la placa aterosclerótica mediante el inicio del tratamiento con darapladib)

SOD, superóxido dismutasa

Src, sarcoma virus-associated kinase receptor (receptor quinasa del sarcoma asociado a virus)

TAG, Triacylglycerols (Triacilgliceroles ó triglicéridos)

TBARS, Thiobarbituric Acid Reactive Substances (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)

T-cell, linfocitos-T, ó células-T

TNF, Tumor Necrosis Factor (factor de necrosis tumoral)

VCAM, molécula de adhesión vascular

VDE, Vasodilatación Dependiente del Endotelio

VSME, Células del músculo liso vascular

VOCC, Voltage-Operated Calcium Channels (Canales de calcio operados por voltage)

VWF, Von Willebrand factor (Factor de von Willebrand)

WHO, World Health Organization

XO, xantina oxidasa

ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infografía de la Federación Mundial del Corazón (World Heart Federation) utilizando datos de la OMS (WHO: Organización Mundial de la Salud) y el Instituto para la Evaluación y Métricas de Salud (IHME: Institute for Health Metrics and Evaluation). Disponible en: https://world-heart-federation.org/resource/cardiovascular-disease-infographic/	33
Figura 2. Ilustración esquemática de una placa de ateroma con ruptura como complicación. Se muestran las causas potenciales de inflamación y reacciones inmunes. Imagen de Gunilla Elam en [14] por Johan Frostegård bajo la licencia Creative Commons CC BY 2.0.....	35
Figura 3. Ilustración esquemática de los factores de riesgo y manifestaciones sistémicas de la disfunción endotelial. MACE: Eventos cardiovasculares adversos mayores (major adverse cardiovascular events). Adaptado de [17] por Corban et al.	36
Figura 4. Biomarcadores tradicionales y noveles, y enfoques terapéuticos para evaluar la disfunción endotelial. Imagen de Diana Jhoseline Medina-Leyte et al. en [14] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	37
Figura 5. La génesis de la vasodilatación dependiente de endotelio, en respuesta a diferentes cambios de tensión. * cambios a muy corto plazo; ** cambios que se producen en períodos ligeramente más largos (minutos); *** cambios que se producen durante un tiempo más largo (muchos minutos u horas). NO: óxido nítrico; eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial; Prostaciclina PGI ₂ ; EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio; K _c : Canal de potasio activado por calcio; FMD: vasodilatación dependiente de endotelio. Adaptado de [23] por An L. Moens et al.	38

Figura 6. El óxido nítrico (NO) regula el metabolismo cardiovascular y se ve comprometido en presencia de factores de riesgo cardiovascular. Por Shifa Jebari-Benslaiman et al. de [43] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	39
Figura 7. Mecanismo arteriosclerótico con depósito de colesterol LDL. Adaptado de [36] por David P. Hajjar et al.	40
Figura 8. Efecto del flujo y los patrones de la tensión cortante en las bifurcaciones arteriales sobre el desarrollo de la placa aterosclerótica. Por Shifa Jebari-Benslaiman et al. adaptado de [43] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	42
Figura 9. (A) Una representación esquemática de un hilo del factor von Willebrand; y (B) un dímero del factor von Willebrand. Por Sergey Okhota et al. de [43] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	43
Figura 10. Activación inducida por la velocidad de cizallamiento del factor von Willebrand en el sitio del estrechamiento aterosclerótico de un vaso sanguíneo. Por Sergey Okhota et al. de [43] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	44
Figura 11. Aumento del estrés oxidativo como vía final común de los efectos de los factores de riesgo cardiovascular y sus efectos sobre la permeabilidad endotelial en las células endoteliales. Por Santa Mundi et al. adaptado de [46].	45
Figura 12. Procesos que regulan la reserva intracelular de glutatión. Por Deyamira Matuz-Mares et al. de [48] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	46
Figura 13. Esquema de los factores de riesgo y patofisiología de la ECV, y mecanismos y efectos cardioprotectivos de algunos compuestos bioactivos contenidos en plantas. Por Javad Sharifi-Rad et al. en [81] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	51
Figura 14. Papel de la apigenina en enfermedades cardio-metabólicas. Por Yajie Xu et al. de [93] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	55
Figura 15. Mecanismos moleculares de las funciones cardioprotectivas de la apigenina. Por Shilu Deepa Thomas et al. en [95] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	56
Figura 16. Mecanismos anti-ateroscleróticos de la luteolina. Adaptado de [99] por Yuanyuan Luo et al. bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	58
Figura 17. Acciones cardiovasculares y dianas moleculares de naringina y naringenina. Por Reza Heidary Moghaddam et al. adaptado de [115].	60

ÍNDICE DE FIGURAS	25
Figura 18. Diseño de estudio	77
Figura 19. Apariencia del Blíster con capsulas utilizadas en el estudio.....	82
Figura 20. Aspecto del extracto en investigación usado en el ensayo.	82
Figura 21. Diagrama de fabricación de los 5 ingredientes del extracto investigado.	84
Figura 22. Cromatograma de Citroven TM a longitud de onda de 280 nm.....	85
Figura 23. Cromatograma del extracto en investigación las longitudes de onda: 280, 340 y 370 nm analizado según [116].	86
Figura 24. Foto del ECO-DOPLER Sonosite micro Maxx HFL38.....	89
Figura 25. Técnica de evaluación de la función endotelial [140].	91
Figura 26. Diagrama de flujo de la población de estudio.....	105
Figura 27. Vasodilatación dependiente de endotelio (%) en función del producto de ingesta. Significación estadística: * p < 0.05	107
Figura 28. Homocisteína (μmol/L) en función del producto de ingesta.	108
Figura 29. Presión Arterial Sistólica (mm Hg) en función del producto de ingesta.	110
Figura 30. Presión Arterial Diastólica (mm Hg) en función del producto de ingesta.	111
Figura 31. Niveles de colesterol total (mg/dL) en función del producto de ingesta.	113
Figura 32. Niveles de colesterol LDL (mg/dL) en función del producto de ingesta.	114
Figura 33. Niveles de colesterol HDL (mg/dL) en función del producto de ingesta.	116
Figura 34. Niveles de triglicéridos (mg/dL) en función del producto de ingesta.	117
Figura 35. Niveles de colesterol LDL oxidada (pg/mL) en función del producto de ingesta.	119
Figura 36. Factor de Von Willebrand (%) en función del producto de ingesta. ...	121
Figura 37. Glutación oxidado (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.	122

Figura 38. Glutación reducido (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.	124
Figura 39. Glutación reducido entre el glutación oxidado (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.	125
Figura 40. Niveles de los grupos carbonilos (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.	127
Figura 41. Niveles de la proteína C reactiva (mg/L) en función del producto de ingesta.	128
Figura 42. Niveles de Interleucina 6 reactiva (pg/mL) en función del producto de ingesta.	130
Figura 43. Niveles del factor de necrosis tumoral alfa (pg/mL) en función del producto de ingesta.	131
Figura 44. Peso corporal (kg) en función del producto de ingesta.....	133
Figura 45. Índice de masa corporal (kg/m ²) en función del producto de ingesta.	134
Figura 46. Masa grasa (kg) en función del producto de ingesta.....	136
Figura 47. Nivel de salud física (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.	137
Figura 48. Nivel de salud mental (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.	139
Figura 49. Nivel de calidad de vida (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.	140
Figura 50. Nivel de actividad física (MET-minutos/semana) en función del producto de ingesta.	142

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización y estructura molecular del flavonoide cítrico apigenina en Citroven TM	53
Tabla 2. Caracterización y estructura molecular de la flavona glicosilada cítrica luteolina en Citroven TM	57
Tabla 3. Caracterización molecular de las flavanonas cítricas naringina y neohesperidina en Citroven TM	59
Tabla 4. Contenido de los componentes principales del extracto de olivo utilizado en Citroven TM . Se muestra la estructura molecular de la oleuropeína y el hidroxitirosol.	61
Tabla 5. Efectos y mecanismos implicados en la protección cardiovascular de la oleuropeína y el hidroxitirosol. Por Stefania Bulotta et al. adaptado de [126] bajo la licencia Creative Commons CC BY 4.0.	62
Tabla 6. Tiempos de retención (Rt) de los principales activos y estándares de referencia	85
Tabla 7. Procedimientos y mediciones en las visitas.....	98
Tabla 8. Vasodilatación dependiente de endotelio (%) en función del producto de ingesta.	106
Tabla 9. Homocisteína sérica (μmol/L) en función del producto de ingesta.	107
Tabla 10. Presión Arterial Sistólica (mm Hg) en función del producto de ingesta.	109
Tabla 11. Presión Arterial Diastólica (mm Hg) en función del producto de ingesta.	110
Tabla 12. Niveles de colesterol total (mg/dL) en función del producto de ingesta.	112
Tabla 13. Niveles de colesterol LDL (mg/dL) en función del producto de ingesta.	113
Tabla 14. Niveles de colesterol HDL (mg/dL) en función del producto de ingesta.	115

Tabla 15. Niveles de triglicéridos (mg/dL) en función del producto de ingesta. .	116
Tabla 16. Niveles de colesterol LDL oxidado (pg/mL) en función del producto de ingesta.	118
Tabla 17. Factor de Von Willebrand (%) en función del producto de ingesta.	120
Tabla 18. Glutación oxidado (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.	121
Tabla 19. Glutación reducido (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.	123
Tabla 20. Glutación reducido entre el glutación oxidado (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.	124
Tabla 21. Niveles de los grupos carbonilos (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.	126
Tabla 22. Niveles de la proteína C reactiva (mg/L) en función del producto de ingesta.	127
Tabla 23. Niveles de Interleucina 6 reactiva (pg/mL) en función del producto de ingesta.	129
Tabla 24. Niveles del factor de necrosis tumoral alfa (pg/mL) en función del producto de ingesta.	130
Tabla 25. Peso corporal (kg) en función del producto de ingesta.	132
Tabla 26. Índice de masa corporal (kg/m ²) en función del producto de ingesta. .	133
Tabla 27. Masa grasa (kg) en función del producto de ingesta.	135
Tabla 28. Nivel de salud física (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.	136
Tabla 29. Nivel de salud mental (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.	138
Tabla 30. Nivel de calidad de vida (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.	139
Tabla 31. Nivel de actividad física (MET-minutos/semana) en función del producto de ingesta.	141
Tabla 32. Tabla general de resultados.	143

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Hoja de información al paciente.....	237
ANEXO 2. Especificaciones del producto investigado.....	240
ANEXO 3. Estudio de la toxicidad oral agua en ratas.	242
ANEXO 4. Comité de ética de la UCAM.	248
ANEXO 5. Estudios previos del grupo	250

I – INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

1.1. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

1.1.1. Importancia en la salud pública

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la principal causa de muerte, con 17,9 millones de muertes en 2019, siendo la enfermedad coronaria y la enfermedad cerebrovascular responsables del 50% y 35% de las muertes de enfermedad cardiovascular [1]. Si restringimos la estadística a los 54 principales países miembros de Europa, solo en 2018 la cifra asciende a 4,4 millones de muertes, 7,1 millones de años de trabajo perdidos y 61,6 billones de euros estimados de pérdida en productividad [2]. La Federación Mundial del Corazón (World Heart Federation) ha nombrado la enfermedad cardiovascular como el “asesino mundial número 1” y muestra gráficamente los datos recogidos por la OMS: Organización Mundial de la Salud (WHO: World Health Organization) para este año pasado 2023 (Figura 1).

A la hora de evaluar el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, se ha determinado recientemente que los clásicos factores de riesgo [3]— el género, tabaquismo, diabetes, colesterol no-HDL, presión arterial sistólica e índice de masa corporal (IMC) — presentan una diferenciación generalmente pequeña en la asociación con el riesgo de ECV, si comparamos estos parámetros entre Europa central, del norte y del sur y Reino Unido [4]. También influyen factores socioeconómicos [5] e incluso se están implementando nuevas tecnologías como la inteligencia artificial y el “*Deep learning*” para mejorar la predicción del curso de la ECV y su asociación con estos factores de riesgo [6].

La cardiología preventiva evalúa el nivel base del riesgo de ECV para determinar de qué forma actuar sobre cambios en el estilo de vida, así como tomar la decisión de si iniciar o no un tratamiento farmacológico y con qué intensidad [7]. Destacar aquí que casi todos los factores de riesgo son altamente influenciados por factores que si son modificables por los mismos sujetos [8]: adicciones (tabaco y alcohol), dieta, sedentarismo y actividad física [9] (ambas influyen en el colesterol

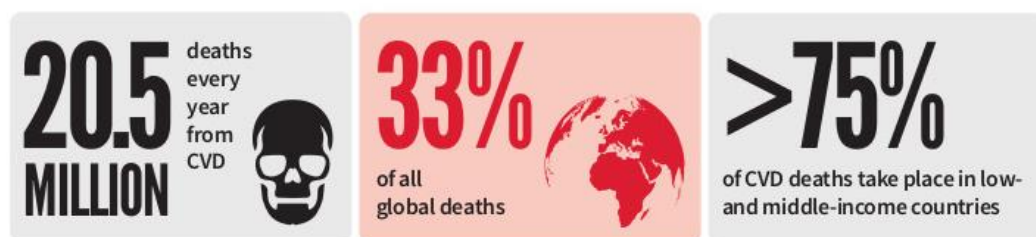
no-HDL, presión arterial, IMC, y diabetes tipo II – no innata), de ahí la importancia



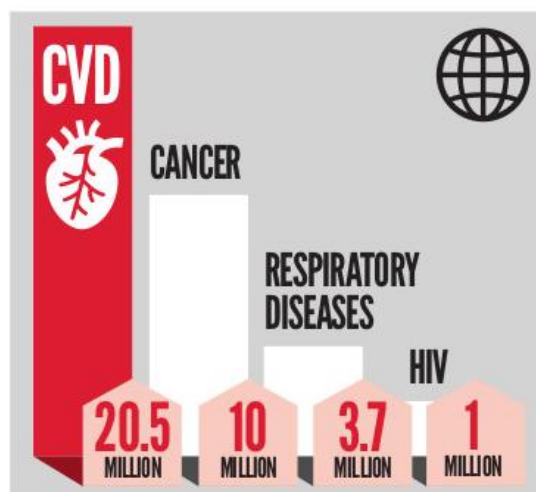
CARDIOVASCULAR DISEASE

THE WORLD'S NUMBER 1 KILLER

Cardiovascular diseases are a group of disorders of the heart and blood vessels, commonly referred to as **heart disease** and **stroke**.



GLOBAL CAUSES OF DEATH



RISK FACTORS FOR CVD



Sources: World Health Organization;
IHME, Global Burden of Disease

info@worldheart.org
www.worldheart.org

f worldheartfederation
worldheartfed
worldheartfederation

Figura 1. Infografía de la Federación Mundial del Corazón (World Heart Federation) utilizando datos de la OMS (WHO: Organización Mundial de la Salud) y el Instituto para la Evaluación y Métricas de Salud (IHME: Institute for Health Metrics and Evaluation). Disponible en: <https://world-heart-federation.org/resource/cardiovascular-disease-infographic/>

de actuar desde la salud pública y la prevención.

Aunque el enfoque preventivo actual es principalmente en cambios en el estilo de vida, estos cambios no son siempre efectivos o fáciles de incorporar, y por eso es interesante encontrar soluciones que faciliten la mejora de este cuadro, anticipándose al uso de fármacos que generalmente se utilizan en estadios más avanzados.

1.1.2. Resumen de la complejidad fisiológica del cuadro ECV

La arteriosclerosis es la enfermedad inflamatoria de las arterias asociada con las alteraciones metabólicas y lipídicas, denotada como la principal culpable en la enfermedad cardiovascular, cuya mortalidad se atribuye a dos condiciones mayores: la enfermedad isquémica del corazón (por la constricción de las arterias que nutren el musculo del corazón) y el accidente cerebrovascular (principalmente provocado por un trombo) [10].

Si bien la causa principal de muerte es la formación de un trombo que proviene de la placa de ateroma formada en las paredes de las arterias, el proceso patológico que lleva a esta situación es más complejo [11]. Se asocia que las elevadas concentraciones de colesterol de baja densidad (LDL-c) altera la permeabilidad celular y progresivamente afecta las paredes de las arterias [12]. Este sustrato promueve una respuesta inflamatoria en la cual los monocitos circulantes se adhieren a las células endoteliales que en respuesta expresan adhesión a moléculas y selectinas, incrementando la migración de monocitos al espacio subendotelial. Es entonces cuando los monocitos se convierten en macrófagos espumosos ricos en esteres de colesterol y ácidos grasos libres, que se infiltran en las paredes arteriales causando una lesión patológica por un incremento de la capa intima, induciendo la conversión del cumulo de lípidos en un núcleo necrótico: conocida como placa arteriosclerótica o placa de ateroma. Esta placa que contiene los macrófagos espumosos tiende a fisurarse o romperse, liberando un trombo en circulación sistémica que puede provocar una trombosis letal [13]. Se muestra la lesión arteriosclerótica y las potenciales causas de inflamación y reacciones inmunes abajo [14] (Figura 2).

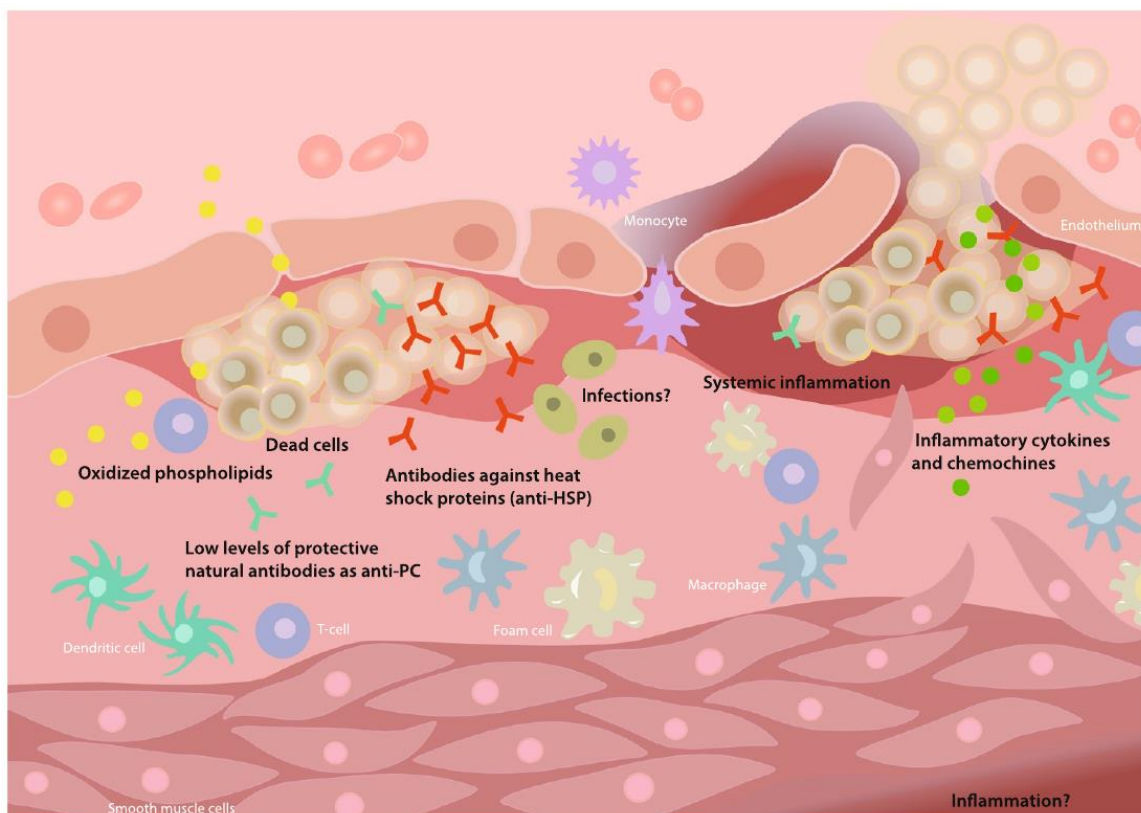


Figura 2. Ilustración esquemática de una placa de ateroma con ruptura como complicación. Se muestran las causas potenciales de inflamación y reacciones inmunes. Imagen de Gunilla Elam en [14] por Johan Frostegård bajo la licencia [Creative Commons CC BY 2.0](https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/).

1.1.3. Sistemas, mecanismos y biomarcadores relevantes involucrados en la ECV

1.1.3.1. Salud y disfunción endotelial

La disfunción endotelial se considera una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular [15]. El endotelio tiene funciones antitrombóticas, controla la actividad de las células musculares lisas de la capa media y modula el tránsito de macromoléculas. Es por ello por lo que la disfunción endotelial, que consiste en un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial y que por tanto predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular [16], parece ser un marcador que integra

el riesgo vascular de los pacientes arterioscleróticos [15,16]. Por ello para la formación de la placa no solo es importante la presencia de lípidos y su oxidación, sino que en última instancia, es el endotelio quien va a determinar la acumulación, estabilidad y reciclaje de la placa de ateroma cuando se forme [17]. En la siguiente figura mostramos los principales factores que afectan a la disfunción endotelial y sus desencadenantes (Figura 3).

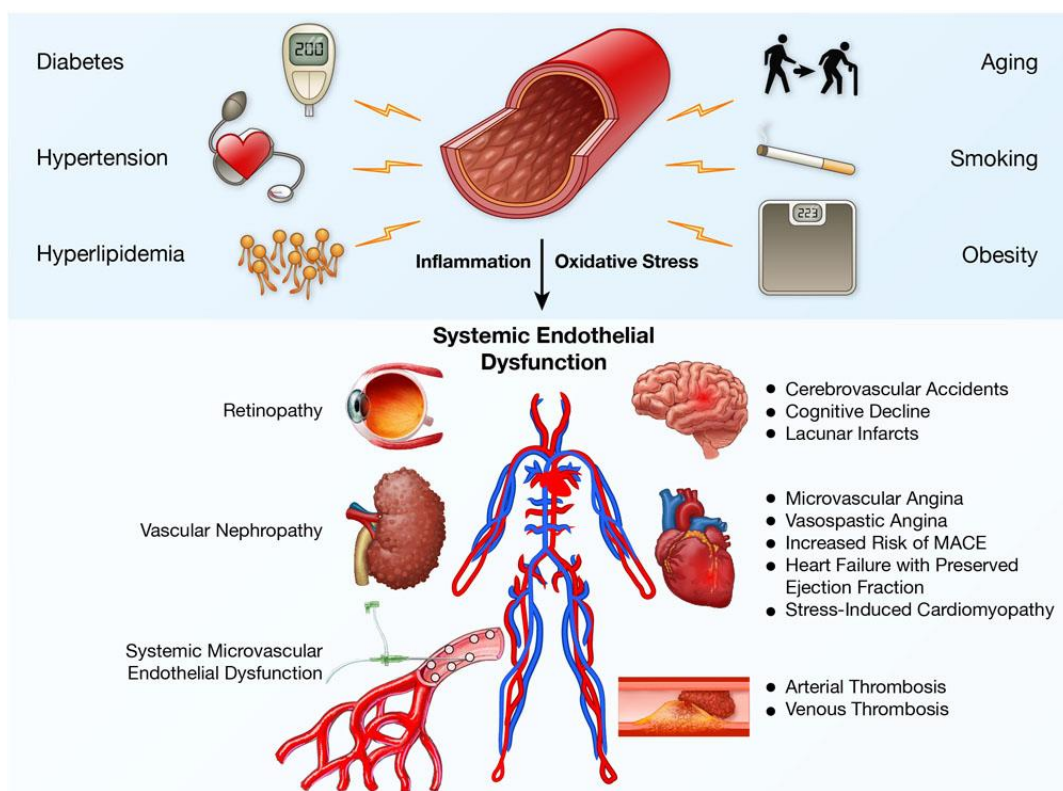


Figura 3. Ilustración esquemática de los factores de riesgo y manifestaciones sistémicas de la disfunción endotelial. MACE: Eventos cardiovasculares adversos mayores (major adverse cardiovascular events). Adaptado de [17] por Corban et al.

1.1.3.2. Evaluación de la función endotelial

En las últimas décadas, la medicina ha avanzado en el uso de biomarcadores para la evaluación de la ECV, utilizándose además de los biomarcadores

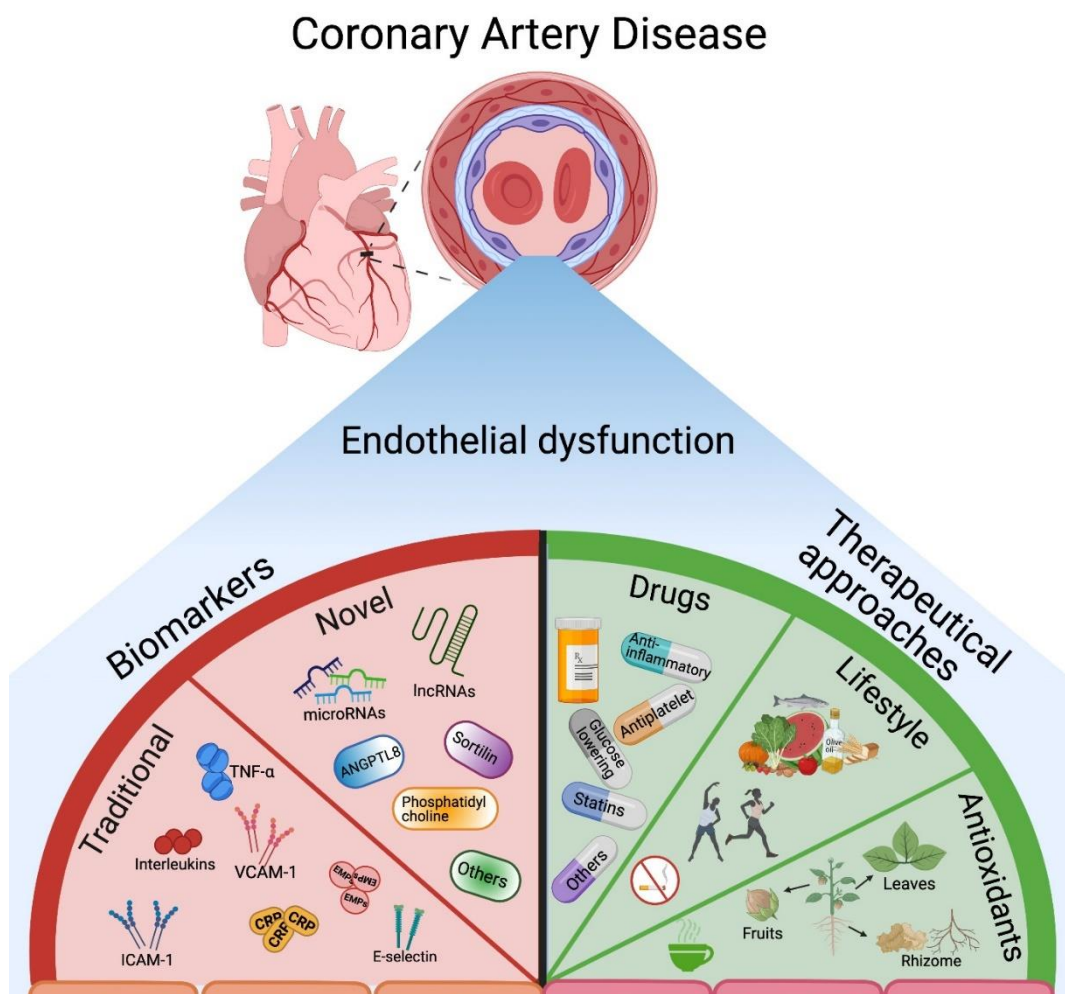


Figura 4. Biomarcadores tradicionales y novedales, y enfoques terapéuticos para evaluar la disfunción endotelial. Imagen de Diana Jhoseline Medina-Leyte et al. en [14] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](#).

tradicionales, otros biomarcadores novedales que sirven de utilidad para evaluar el estado de la enfermedad (ver Figura 4) [18]. También podemos ver en la figura, como además del enfoque en el estilo de vida y el tratamiento farmacológico, se están empezando a considerar el uso de plantas y compuestos bioactivos (en este caso, alegando sobre todo su capacidad antioxidante).

1.1.3.2.1. Vasodilatación dependiente del endotelio

La vasodilatación dependiente del endotelio (VDE) medida por el flujo se designa como un proceso dependiente del endotelio que refleja la relajación de una arteria conductora cuando se expone a un mayor flujo [19]. Esta variable está disminuida en pacientes con aterosclerosis y con factores de riesgo coronario [20], y mejora con la terapia de reducción del riesgo [21]. Por tanto, la medición de la VDE puede ser un buen instrumento de pronóstico en cardiología preventiva, es útil para predecir eventos cardiovasculares postoperatorios a corto plazo en una población de alto riesgo y para evaluar el riesgo cardiovascular a largo plazo en una población de menor riesgo [22], y es una excelente herramienta experimental para detectar cambios en la función endotelial tras nuevas intervenciones terapéuticas [23]. En la Figura 5 se muestra un esquema de la génesis de la vasodilatación dependiente del endotelio.

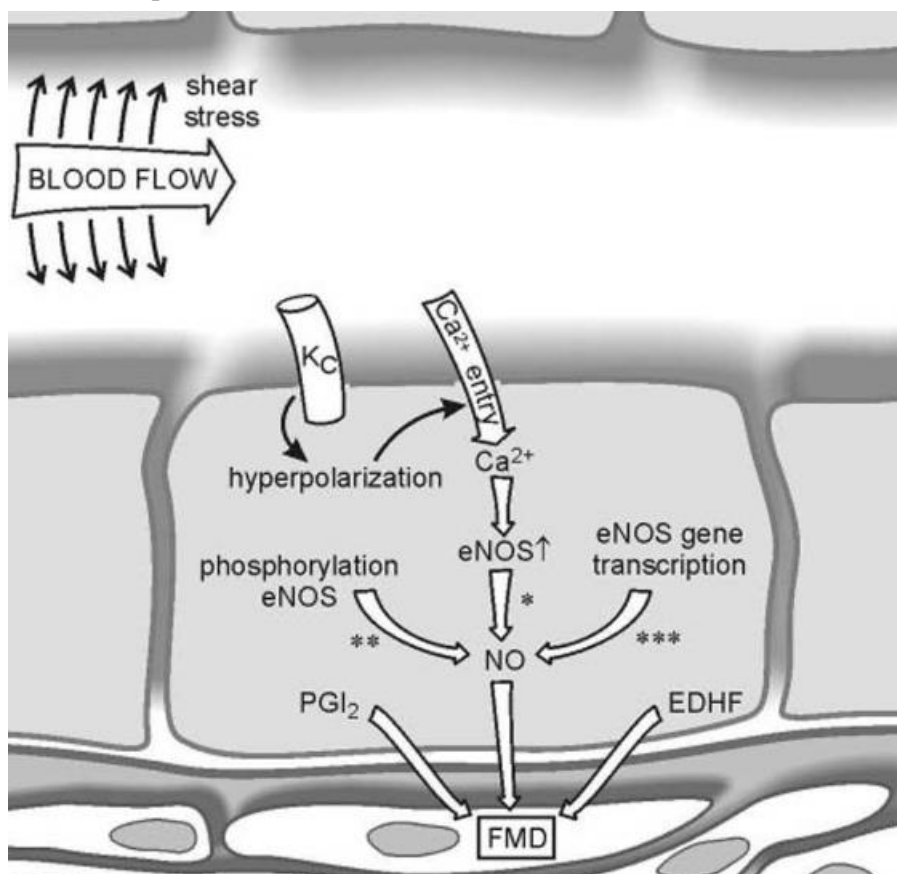


Figura 5. La génesis de la vasodilatación dependiente de endotelio, en respuesta a diferentes cambios de tensión. * cambios a muy corto plazo; ** cambios que se producen en períodos ligeramente más largos (minutos); *** cambios que se producen durante un tiempo más largo (muchos minutos u horas). NO: óxido nítrico; eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial; Prostaciclina PGI₂; EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio; Kc: Canal de potasio activado por calcio; FMD: vasodilatación dependiente de endotelio. Adaptado de [23] por An L. Moens et al.

Se ha demostrado que la dilatación mediada por el flujo depende predominantemente del óxido nítrico derivado del endotelio [24,25]. La membrana de la célula endotelial contiene canales iónicos especializados, como los canales de potasio activados por calcio, que se abren en respuesta al esfuerzo cortante [26–28]. La función de apertura del canal de potasio es hiperpolarizar la célula endotelial, aumentando la fuerza impulsora para la entrada de calcio. El calcio activa la NO sintasa endotelial (eNOS) y la generación posterior de NO parece explicar la dilatación mediada por el flujo [24,29].

1.1.3.3. Factores de riesgo aterosclerótico y permeabilidad endotelial

El deterioro de la función endotelial es ampliamente reconocido como el primer correlato clínico de la aterosclerosis y el primer paso en su inicio [30]. De hecho, se sabe que los factores de riesgo ateroscleróticos promueven la disfunción endotelial en la fase más temprana del proceso que afectan la estructura y función del glucocálix y la producción de NO (Figura 6), además de promover los cambios críticos subyacentes que conducen al ateroma [31]. Es importante destacar que todas estas condiciones afectan la transferencia de colesterol a través del endotelio, teniendo como denominador común un aumento del estrés oxidativo [32].

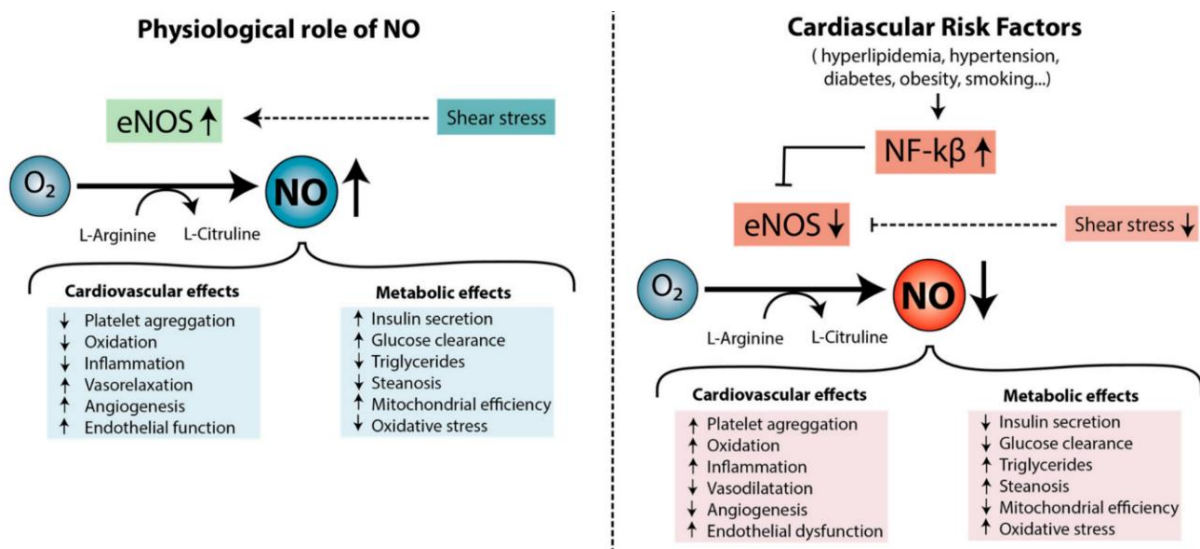


Figura 6. El óxido nítrico (NO) regula el metabolismo cardiovascular y se ve comprometido en presencia de factores de riesgo cardiovascular. Por Shifa Jebari-Benslaiman et al. de [43] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1.1.3.3.1. Dislipemias, oxidación lipídica y trombosis

Los tipos de dislipidemia más comunes asociados con un mayor riesgo cardiovascular son aquellos caracterizados por niveles elevados de colesterol LDL [33]. Los niveles elevados de LDL generan un aumento destacado de las lipoproteínas que, junto con los cambios en la permeabilidad endotelial aórtica, son los dos principales determinantes del flujo de LDL hacia la pared arterial y su depósito en la capa íntima [34,35].

En la siguiente figura (Figura 7) se describe el transporte de LDL hacia y desde la íntima arterial [36]. Además, la LDL oxidada (ox-LDL) también promueve la activación endotelial con la liberación de mediadores solubles y unidos a la membrana que alimentan aún más la respuesta inflamatoria [37].

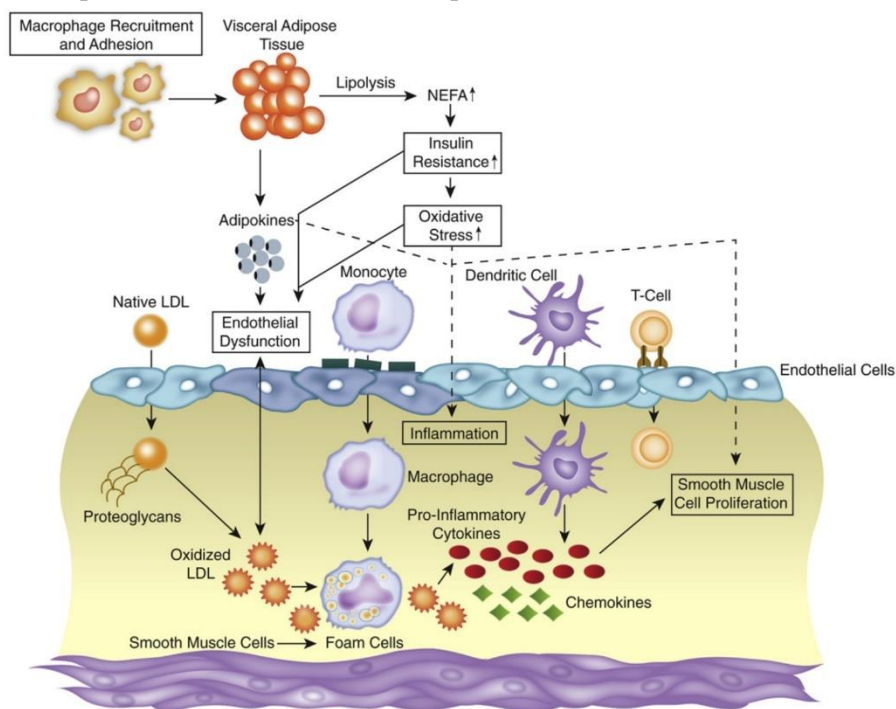


Figura 7. Mecanismo arteriosclerótico con depósito de colesterol LDL. Adaptado de [36] por David P. Hajjar et al.

La aterosclerosis comienza con la retención y la incorporación de LDL oxidada en células espumosas en crecimiento, el desencadenamiento de una cascada proinflamatoria y la posterior proliferación de células de músculo liso a medida que avanza la placa. Las células dendríticas y las células T son atraídas hacia la luz mediante moléculas de adhesión y se incorporan al ateroma. El aumento resultante del estrés oxidativo, combinado con la acción de las adipocinas,

exacerba el entorno vascular prooxidante y proinflamatorio, empeora la disfunción endotelial y la proliferación de células del músculo liso y acelera el proceso aterosclerótico.

1.1.3.3.2. Hipertensión:

La hipertensión arterial es el factor de riesgo más prevalente asociado con una mayor morbilidad y mortalidad cardiovascular [38,39]. La hipertensión acelera el desarrollo, la progresión y las complicaciones de la aterosclerosis, a través de mecanismos que involucran disfunción endotelial, estrés oxidativo vascular, inflamación y remodelación [40,41]. La hipertensión se caracteriza principalmente por cambios morfológicos en el endotelio arterial y por hipertrofia de la capa de músculo liso en la túnica media [42]. El flujo laminar alterado o flujo turbulento reduce la tensión cortante en la pared vascular y promueve la disfunción endotelial y la infiltración de LDL, que constituye el primer paso en la formación de la placa de ateroma [43] (véase Figura 8).

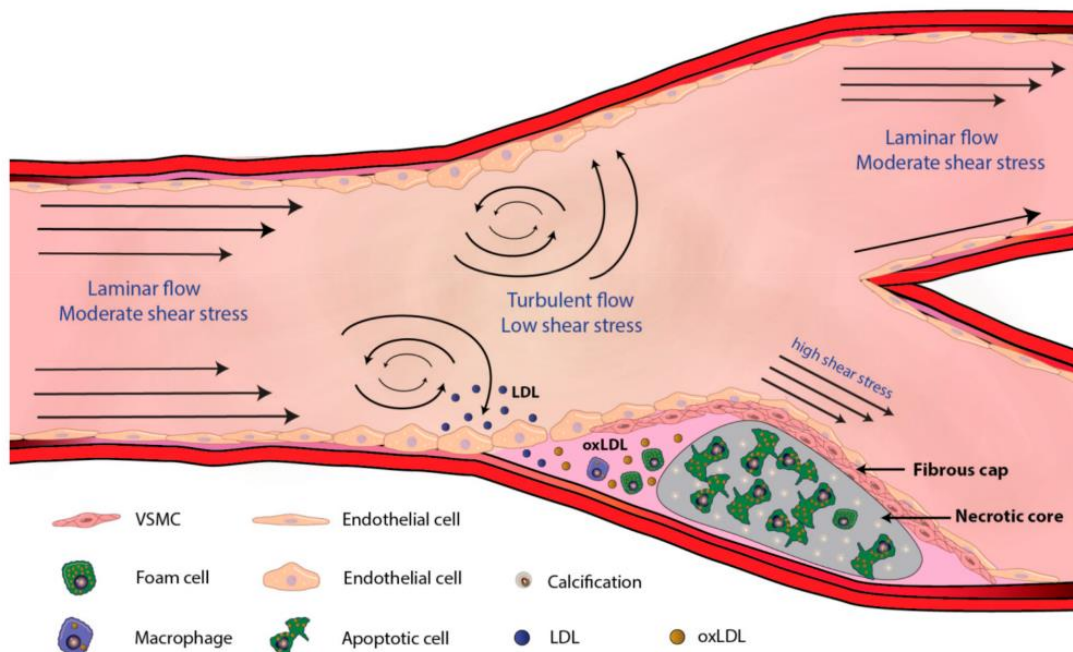
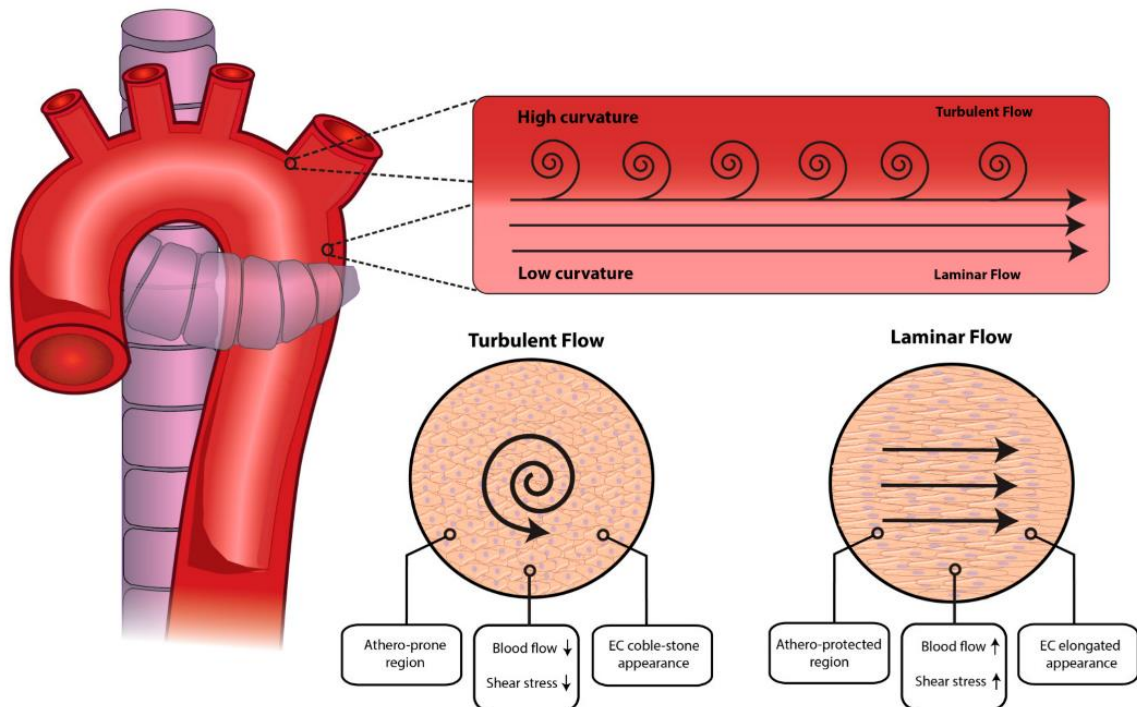


Figura 8. Efecto del flujo y los patrones de la tensión cortante en las bifurcaciones arteriales sobre el desarrollo de la placa aterosclerótica. Por Shifa Jebari-Benslaiman et al. adaptado de [43] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1.1.3.3.3. Factor de von Willebrand

El factor von Willebrand (VWF) es una glicoproteína plasmática multimérica de gran tamaño (Figura 9) que desempeña un papel importante en la hemostasia primaria. Se sintetiza en el endotelio vascular y los megacariocitos, luego se almacena en los cuerpos de endotelios de Weibel-Palade y los gránulos de plaquetas o se libera a la circulación. Tras el daño de la pared vascular, el VWF plasmático se une al colágeno en la matriz subendotelial expuesta y la glicoproteína plaquetaria Iba (GPIIb) desencadena la agregación plaquetaria y la formación de trombos (Figura 10) [44].

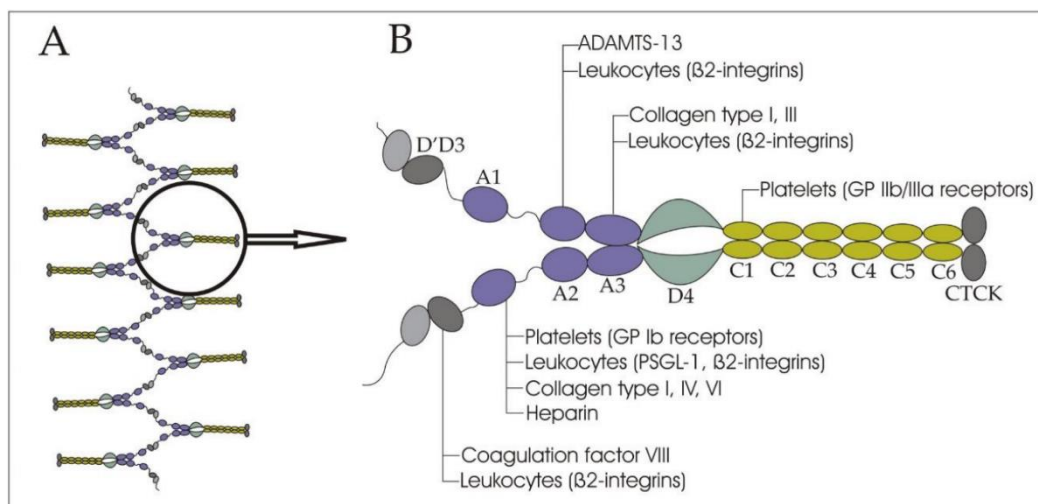


Figura 9. (A) Una representación esquemática de un hilo del factor von Willebrand; y (B) un dímero del factor von Willebrand. Por Sergey Okhota et al. de [43] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Se ha visto que los niveles de VWF están significativamente elevados en pacientes con ataque isquémico transitorio o accidente cerebrovascular isquémico atribuido a aterosclerosis de grandes arterias, en comparación con los otros subtipos de accidente cerebrovascular. El VWF sirve como un marcador útil de aterosclerosis y, posteriormente, un marcador de riesgo de accidente cerebrovascular [45].

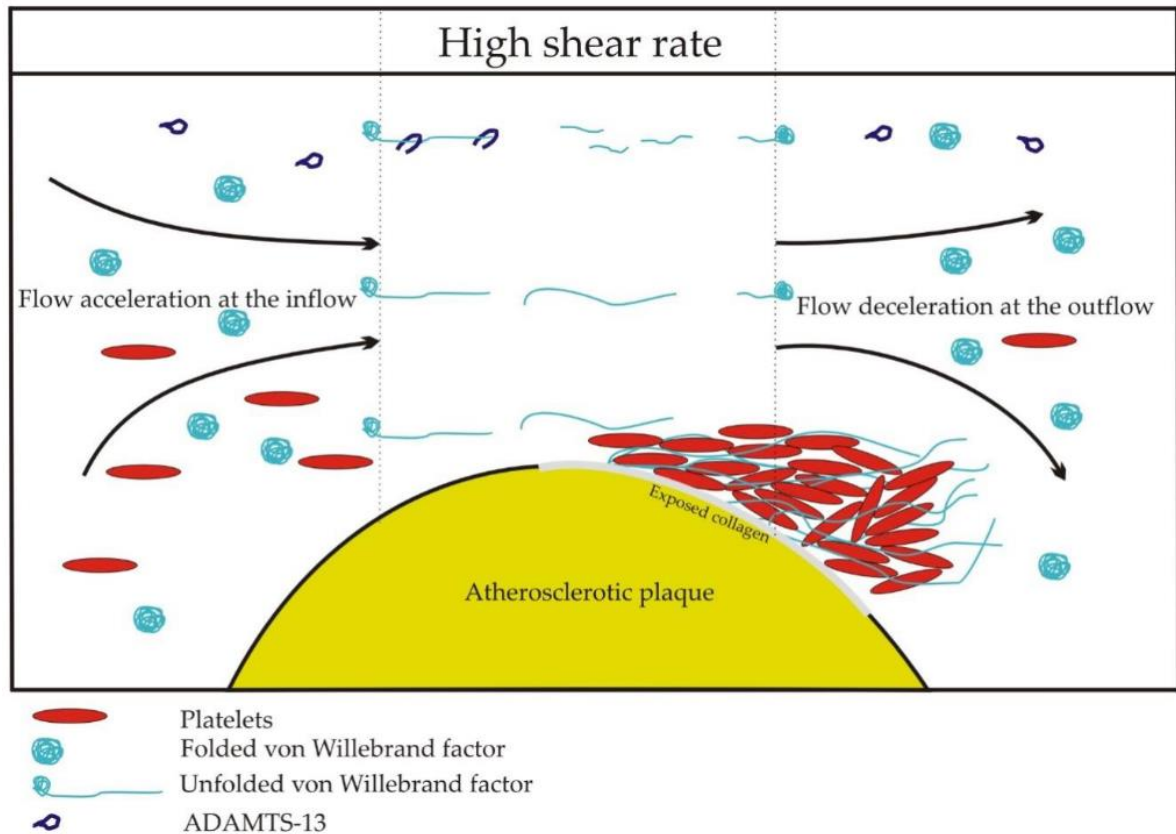


Figura 10. Activación inducida por la velocidad de cizallamiento del factor von Willebrand en el sitio del estrechamiento aterosclerótico de un vaso sanguíneo. Por Sergey Okhota et al. de [43] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1.1.3.4. Estrés oxidativo y permeabilidad endotelial

El aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS: Reactive Oxygen Species) y el equilibrio redox desregulado, también conocido como "estrés oxidativo", contribuyen a muchos de los eventos moleculares que subyacen a la aterogénesis y, en consecuencia, a la pérdida de la función de barrera endotelial [46]. A pesar de las diferencias existentes en la señalización ascendente entre los diversos factores de riesgo proaterogénicos, la mayoría de ellos comparten la capacidad de activar la NADPH oxidasa y aumentar la producción de ROS (Figura 11). El estrés oxidativo también afecta la abundancia y función de las moléculas de unión, lo que sugiere un papel desestabilizador de la señalización mediada por ROS y el estrés oxidativo en la integridad vascular [47].

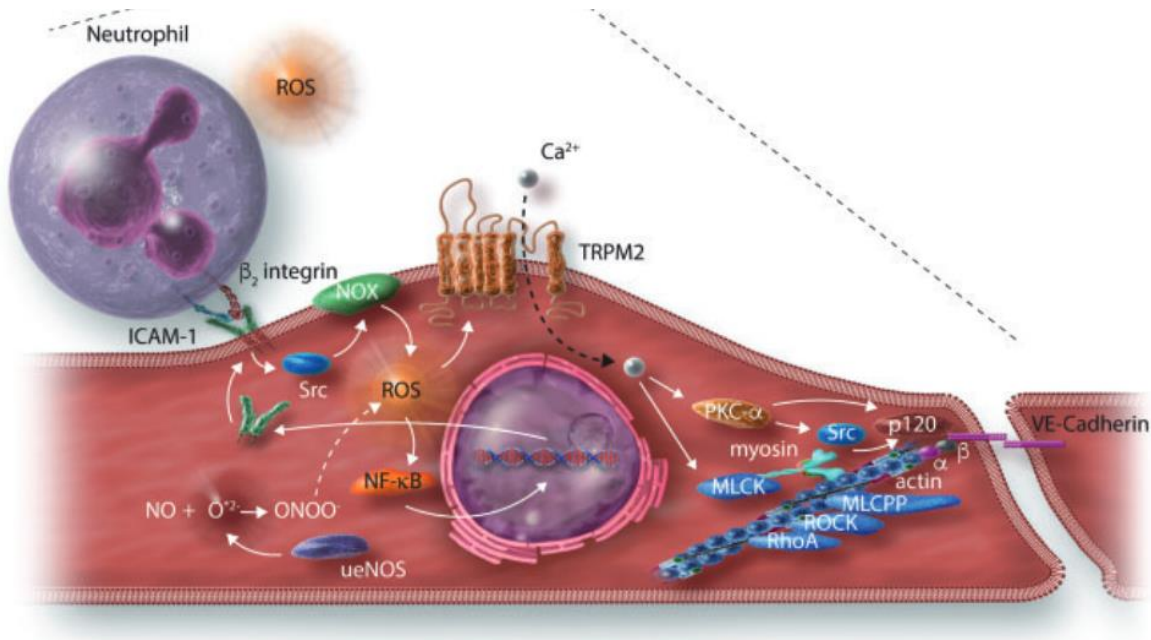


Figura 11. Aumento del estrés oxidativo como vía final común de los efectos de los factores de riesgo cardiovascular y sus efectos sobre la permeabilidad endotelial en las células endoteliales. Por Santa Mundi et al. adaptado de [46].

1.1.3.5. Estatus oxidativo y prevención de la oxidación lipídica

1.1.3.5.1. Glutación oxidado, reducido y su ratio

Una molécula que participa activamente en contrarrestar el efecto oxidante de las ROS es el glutatión reducido (GSH), un tripéptido que está presente en todos los tejidos y que puede ser sintetizado endógenamente y cuya regeneración de sus reservas (Figura 11) es muy importante para poder responder al aumento de agentes oxidantes [48].

En las células, el GSH realiza una variedad de funciones que contribuyen a mantener la homeostasis celular [49]; sin embargo, lo más importante es su actividad antioxidante intracelular, donde el glutatión es el antioxidante celular más abundante [49–51]. Puede estar presente en forma de tiol reducido (GSH), así como de disulfuro oxidado (GSSG); aunque en condiciones normales casi el 99% del glutatión celular se encuentra en forma de tiol reducido [52,53].

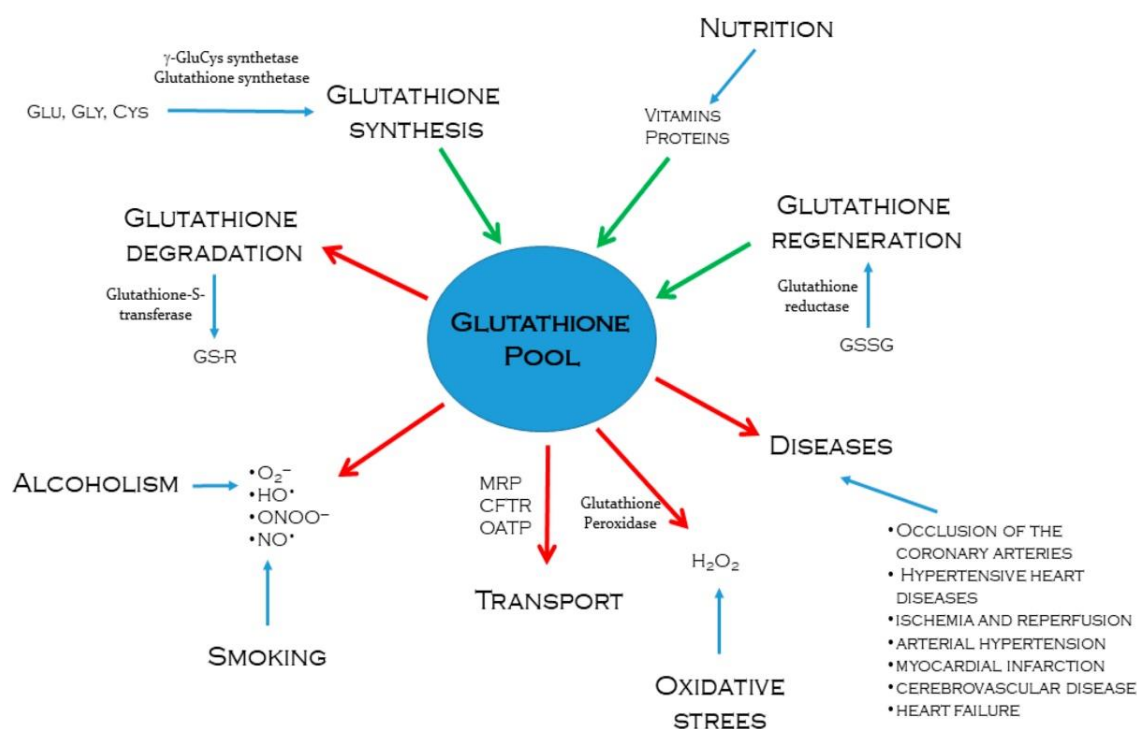


Figura 12. Procesos que regulan la reserva intracelular de glutatión. Por Deyamira Matuz-Mares et al. de [48] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

En el caso de patologías cardiovasculares, el estado de estrés oxidativo conlleva un deterioro de las condiciones del paciente asociado a la generación de ROS y especies reactivas del nitrógeno (RNS). El anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$), el óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) y otras especies de radicales no libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HClO$) y el peroxinitrito ($ONOO^-$), se encuentran todos dentro de estas especies reactivas [54]. En especial, la NADPH oxidasa (NOX), la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa (COX), la xantina oxidasa (XO), las óxido nítrico sintasas desacopladas (NOS), el citocromo P450 y la respiración mitocondrial son las causas enzimáticas más comunes de ROS en la ECV [55]. Los cambios en la concentración de GSH o el estado de oxidación se han relacionado con el desarrollo y la progresión de la ECV [56].

Por otro lado, hay intervenciones nutricionales que han mostrado capacidad de influenciar el GHS. Se vio que una dieta enriquecida con cisteína y glicina, los precursores del glutatión, pudo restablecer completamente la síntesis celular de glutatión y la concentración de GSH, lo que potencialmente reduce los niveles de estrés oxidativo y, por lo tanto, puede prevenir los daños asociados con el estrés

oxidativo y el envejecimiento [57]. Según las condiciones nutricionales, los niveles de aminoácidos pueden variar, siendo la cisteína, el glutamato y la glicina los más importantes para la síntesis del glutatión; sin embargo, dado que incluso en condiciones nutricionales normales, la cisteína es el aminoácido presente en menor concentración, su disponibilidad suele ser el factor limitante en la síntesis de GSH [58].

El contenido intracelular de glutatión reducido se regula según su consumo y síntesis; disminuye cuando se usa en reacciones de conjugación con xenobióticos a través de la vía de la glutatión S-transferasa o formando GSSG debido a su reactividad con radicales libres y ROS [59]. Los conjugados de glutatión son exportados y excretados hacia la bilis, provocando una pérdida irreversible del residuo cisteína del glutatión, paso limitante para su síntesis; por tanto, esta vía de desintoxicación consume glutatión intracelular de forma irreversible [53]. Sin embargo, GSSG puede reducirse para regenerar glutatión mediante la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH; aunque la recuperación del contenido de glutatión se debe principalmente a la síntesis de novo [59].

1.1.3.6. *Respuesta inflamatoria: Proteínas de fase aguda: Proteína reactiva C*

La Proteína C Reactiva (PCR) es un mediador inflamatorio sistémico y un importante reactivo de fase aguda producido principalmente por hepatocitos después de la estimulación con citocinas como IL-1, IL-6 y TNF- α [60]. La PCR regula a la baja la transcripción del óxido nítrico endotelial sintasa (eNOS) en la CE, lo que resulta en una disminución de la liberación de NO [61].

Consistentemente, varios ensayos clínicos han informado que los niveles de PCR están asociados con disfunción endotelial y diferentes etapas de la EAC [60,62]. Los niveles plasmáticos más altos de hsCRP se asociaron con disfunción endotelial coronaria, lo que sugiere que es un marcador independiente de vasorreactividad coronaria anormal en pacientes con enfermedad coronaria no obstructiva [63]. Recientemente, se encontró que los niveles altos de hs-CRP se correlacionan positivamente con IL-6 y colesterol LDL y aumentan el riesgo de enfermedad coronaria y la mortalidad [64].

1.1.3.7. *Respuesta inflamatoria: Citoquinas e Interleucinas*

Las citoquinas incluyen muchas proteínas pleiotrópicas que han sido ampliamente implicadas en el proceso de inflamación y aterosclerosis. Las citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-18 son mediadores inflamatorios esenciales, agravan la respuesta inflamatoria e inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y leucocitos (E-selectina y P-selectina), que empeoran la disfunción endotelial. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). El TNF- α juega un papel importante en la disfunción e inflamación endotelial [65]. El TNF- α activa las células endoteliales para que expresen y liberen diversas citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión necesarias para el reclutamiento y la migración de monocitos a la íntima del vaso [66]. En estudios clínicos, se encontró que el aumento de los niveles circulantes de TNF- α estaba asociado con la disfunción endotelial en pacientes hipertensos [67]; con espesor de aterosclerosis carotídea en pacientes con aterosclerosis temprana [68] y con riesgo de EAC [69,70]. Además, se descubrió que el aumento de los niveles plasmáticos de TNF- α activa los monocitos y desencadena directamente la formación de células espumosas [71].

1.1.3.7.1. Interleucina 6 (IL-6)

La interleucina-6 es una citocina importante implicada en muchos procesos inmunológicos diferentes, como el principal regulador de las proteínas de respuesta de fase aguda, y desempeña un papel crucial en la EAC [72,73]. Aunque existen pocos estudios sobre la IL-6 como biomarcador en la enfermedad coronaria, parece tener un papel potencial como biomarcador en la inestabilidad de la placa coronaria y se ha asociado con resultados clínicos en pacientes con enfermedad coronaria. En individuos con cardiopatía isquémica, los niveles plasmáticos de IL-6 se asociaron con la presencia de fibroateroma de capa fina observado con tomografía de coherencia óptica, y los niveles de IL-6 mostraron mayor sensibilidad y especificidad que hs-CRP para la predicción de la inestabilidad de la placa [74]. Además, en un subanálisis del ensayo STABILITY (estabilización de la placa aterosclerótica mediante el inicio de la terapia con darapladib), los niveles plasmáticos de IL-6 en pacientes con enfermedad coronaria estable se asociaron con varios resultados de salud, incluida la mortalidad cardiovascular y por todas las causas, la mortalidad miocárdica infarto e insuficiencia cardíaca [75]. Se requieren estudios futuros para explorar y validar más a fondo el valor de los niveles de IL-6 como biomarcador de disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular.

1.1.4. Interés de los compuestos bioactivos en el tratamiento de la ECV

El tratamiento convencional médico incluye un control de hábitos incluyendo nutrición, actividad física y hábitos tóxicos como el tabaquismo, además de tratamientos farmacológicos que actúan en diferentes estadios de la ECV [76]. En comparación con los tratamientos farmacológicos, los compuestos bioactivos presentan algunas potenciales ventajas [77,78]:

1-Amplio espectro de acción: Los compuestos bioactivos a menudo tienen múltiples actividades biológicas y pueden dirigirse a diversas vías involucradas en la salud cardiovascular. Por ejemplo, pueden tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antihipertensivas, antiplaquetarias o reductoras de lípidos. Esta multifuncionalidad puede proporcionar beneficios cardiovasculares más amplios.

2-Menores efectos secundarios: En ocasiones, los fármacos tienen efectos secundarios no deseados, desde molestias leves hasta complicaciones graves. Los compuestos bioactivos tienden a tener menores efectos adversos, al menos dentro del rango de dosis habitualmente efectivo.

3-Menor riesgo de interacciones medicamentosas: Los fármacos utilizados para tratar enfermedades cardiovasculares pueden interactuar con otros medicamentos, lo que potencialmente conduce a complicaciones. Dado que los compuestos bioactivos a menudo se consumen como parte de la dieta regular o como suplementos dietéticos, generalmente tienen un menor riesgo de interactuar con otros medicamentos.

4-Costo-efectividad: Los compuestos bioactivos a menudo se pueden obtener a un costo más bajo en comparación con los medicamentos farmacéuticos, especialmente cuando se obtienen de alimentos integrales o suplementos dietéticos comunes. Aunque en España y Europa los fármacos son generalmente baratos y a veces cofinanciados por el gobierno (en caso de que su coste sea elevado), en otros países como Estados Unidos, el coste de algunos medicamentos (especialmente los destinados a enfermedades complicadas) es privativo, haciéndolos inaccesibles o siendo su financiación un problema para clases sociales con menor poder adquisitivo.

5-Refuerzo psicológico de un estilo de vida saludable: Desde un enfoque holístico para la salud, el uso de nutraceúticos y complementos alimenticios enfatiza la importancia de los hábitos saludables. A diferencia de un tratamiento

farmacológico que se inicia para “curar una enfermedad”, la idea de iniciar el consumo de nutraceuticos para mejorar el estado de salud general, refuerza la actitud de que debemos cuidarnos y puede incluso facilitar cambios favorables en el estilo de vida.

6-Mayor aceptación por el consumidor: Los compuestos bioactivos suelen derivarse de fuentes naturales como frutas, verduras, hierbas y especias. Este origen natural a menudo los hace más aceptables para las personas que buscan alternativas a los fármacos sintéticos. Si bien este punto no responde a una lógica científica o desde el punto de vista de la salud, si es de interés para incentivar la investigación y el desarrollo de nuevos productos y complementos alimenticios en las empresas agroalimentarias y universidades. Hablamos ahora de un factor científico-social que repercute en destinar fondos y esfuerzos de organizaciones, instituciones y empresas para impulsar proyectos que pueden mejorar la salud pública.

No obstante, la motivación del producto a estudio de esta tesis no pretende sustituir a los fármacos, sino actuar en las fases precedentes, cuando aún no hay manifestación de la enfermedad, a modo de prevención y refuerzo de la salud

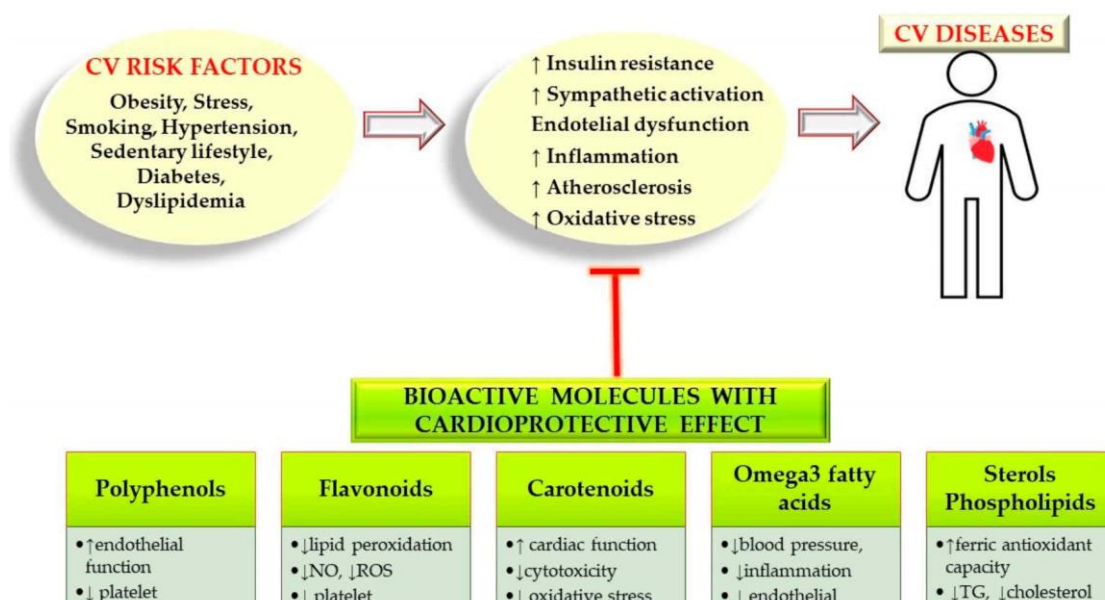


Figura 13. Esquema de los factores de riesgo y patofisiología de la ECV, y mecanismos y efectos cardioprotectores de algunos compuestos bioactivos contenidos en plantas. Por Javad Sharifi-Rad et al. en [81] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

general [79,80]. Con una visión más general, varios autores han hablado sobre el potencial de los compuestos activos para la ECV [81] (Figura 13).

Ahora pasamos a caracterizar el producto a estudio, su composición y la acción de sus compuestos bioactivos para entender cuál puede ser su beneficio en la ECV.

1.2. CARACTERIZACIÓN DE CITROVEN™ Y SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS

1.2.1. Extracto de pomelo y naranja amarga: Flavonoides cítricos y Flavanonas glicosiladas

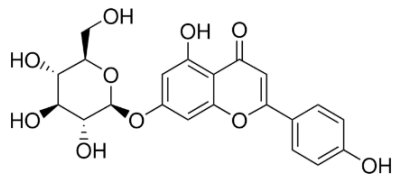
Los flavonoides son una familia de compuestos químicos ampliamente presente en plantas donde desempeñan un papel biológico, y cuyo papel beneficioso sobre el metabolismo y sistema vascular ha sido ampliamente estudiado [82–91].

En este apartado nos centraremos en aquellas subfamilias de flavonoides y compuestos químicos mayoritariamente presentes en el producto estudiado (Citroven™).

1.2.1.1. Flavonoides cítricos de alta pureza: Apigenina y Luteolina

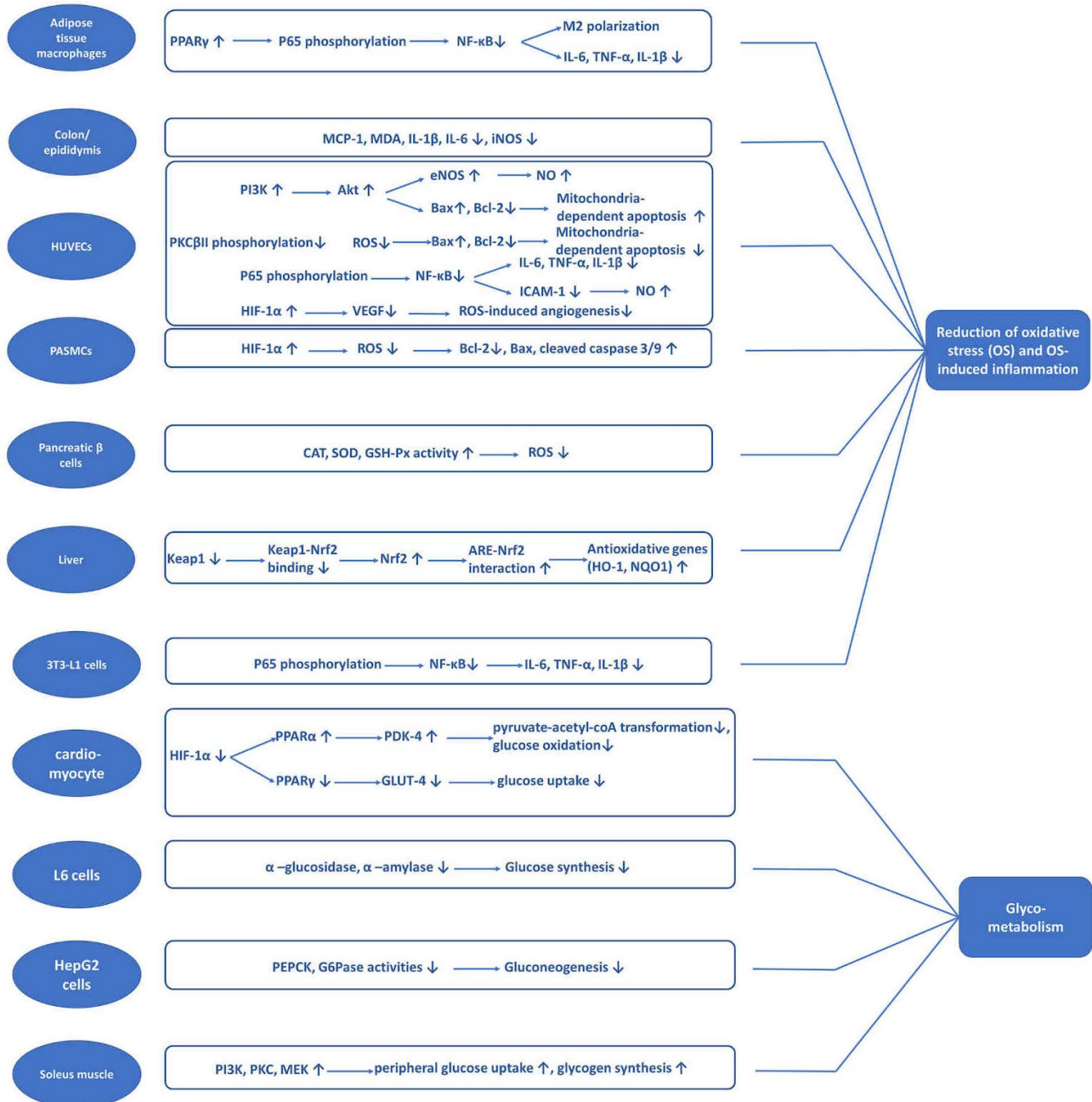
La apigenina presente en Citroven™ proviene principalmente de un extracto hidroetanólico de frutos inmaduros de pomelo (*Citrus paradisi*) sometido a varias etapas de extracción y modificación estructural (ver materiales y métodos para más detalles) que posteriormente es estandarizado para controlar la pureza de este principal compuesto bioactivo (caracterizada en la Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización y estructura molecular del flavonoide cítrico apigenina en Citroven™.

<i>Planta/Parte utilizada/Nombre botánico/Compuesto</i>	<i>Estructura molecular</i>
Pomelo, frutos inmaduros, <i>Citrus paradisi</i>	n/a
Apigenina CAS No. 520-36-5	

CAS No: Número de identificación para compuestos químicos según el Chemical Abstracts Service (CAS).

Aunque el potencial terapéutico de los flavonoides es más amplio [92], abajo se resumen los efectos beneficiosos de la apigenina sobre los cuatro sistemas principalmente involucrados en la enfermedad cardiovascular por rutas de señalización [93] (Figura 14).



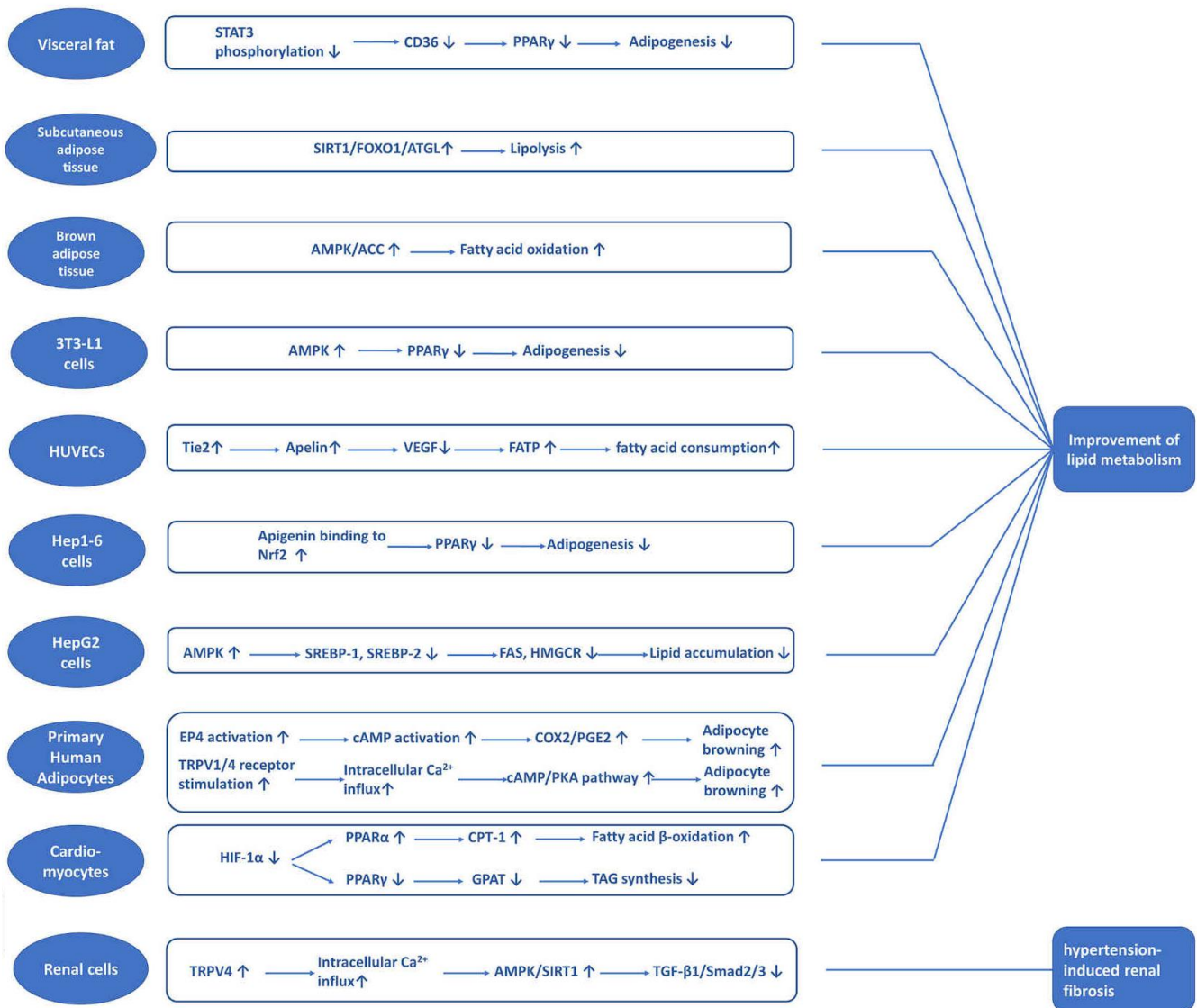


Figura 14. Papel de la apigenina en enfermedades cardio-metabólicas. Por Yajie Xu et al. de [93] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

A diferencia de las formas C-glicosiladas presentes de forma natural en frutas y verduras (vitexina e isovitexina), la apigenina en su forma más pura tiene un mayor efecto antiinflamatorio [94]. La apigenina utilizada en este estudio se encuentra en su forma no glicosilada y por ello se ha seleccionado como principal ingrediente antiinflamatorio. Podemos ver un resumen de sus acciones en la Figura 15 [95].

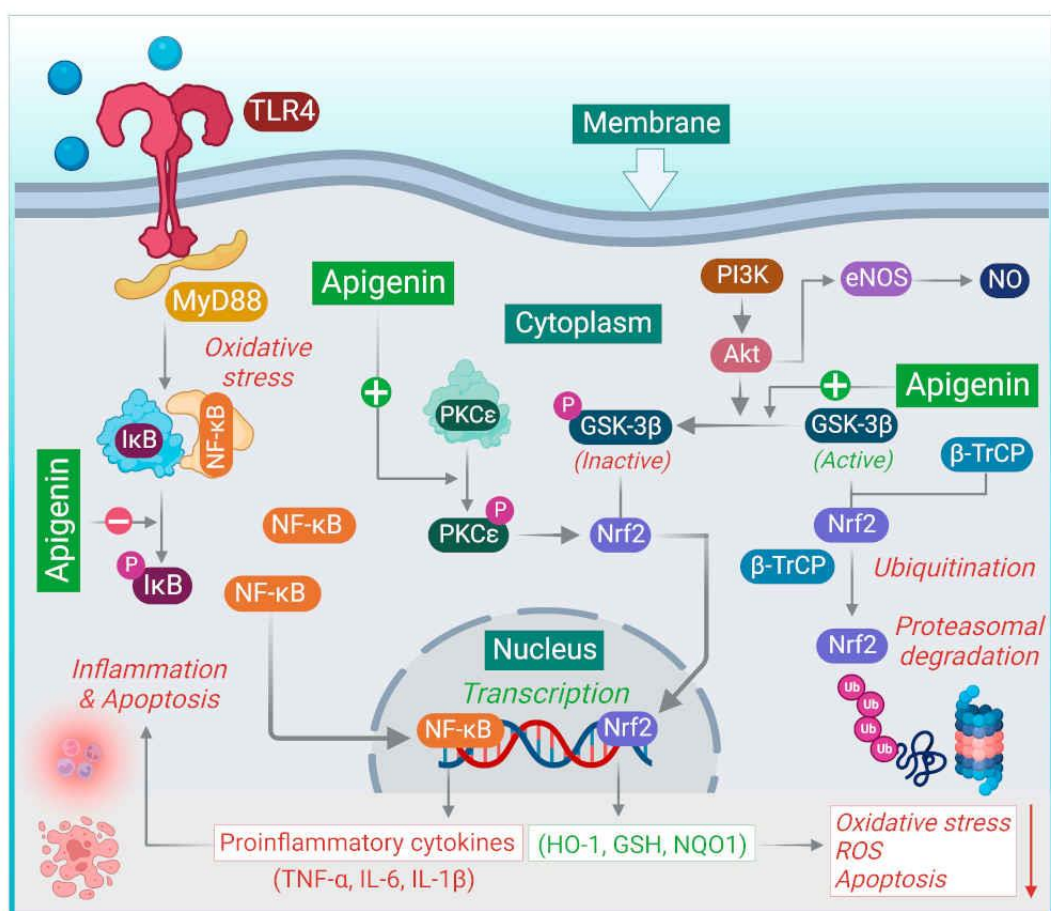
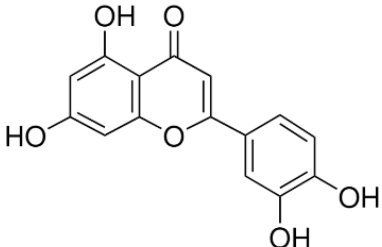


Figura 15. Mecanismos moleculares de las funciones cardioprotectivas de la apigenina. Por Shilu Deepa Thomas et al. en [95] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

El otro flavonoide cítrico de alta pureza presente en CitrovenTM es la luteolina (caracterizada en la Tabla 2), que proviene de un extracto hidrolizado de naranja amarga (*Citrus aurantium*) rica en flavonas y sometido a varias etapas de transformación.

Tabla 2. Caracterización y estructura molecular de la flavona glicosilada cítrica luteolina en CitrovenTM.

<i>Planta/Parte utilizada/Nombre botánico/Compuesto</i>	<i>Estructura molecular</i>
Naranja amarga, frutos, <i>Citrus aurantium</i>	n/a
Luteolina CAS No. 491-70-3	

CAS No: Número de identificación para compuestos químicos según el Chemical Abstracts Service (CAS).

La luteolina es uno de los cuatro glucósidos de flavonol más frecuentemente encontrados en plantas (junto con la quercetina, el kaempferol, la quercetina y la apigenina) y tiene actividad antiinflamatoria y antioxidante [96]. Algunos autores han indicado que una ingesta dietética elevada de luteolina se relaciona con un menor riesgo de infarto agudo de miocardio [97,98] y que ejerce efectos protectores en la ECV, aunque los estudios relevantes sobre este tema se han centrado principalmente en modelos *in vitro* e *in vivo* [99].

Como antioxidante la luteolina es capaz de bloquear el estrés oxidativo a través de la hemoxygenasa-1 (HO-1), una proteína de membrana integral ubicada en el retículo endoplásmico liso que promueve la citoprotección contra el estrés oxidativo [100]. Otro de los mecanismos antioxidantes descritos es a través de la regulación de las isoenzimas ON y ON sintasas para prevenir lesiones causadas por radicales libres, previniendo que el óxido nítrico interactúe con radicales superóxido [101].

Entre los efectos anti-ateroscleróticos de la luteolina se describen efectos antiinflamatorios y de inhibición de la proliferación y migración celular [102,103] (Figura 16).

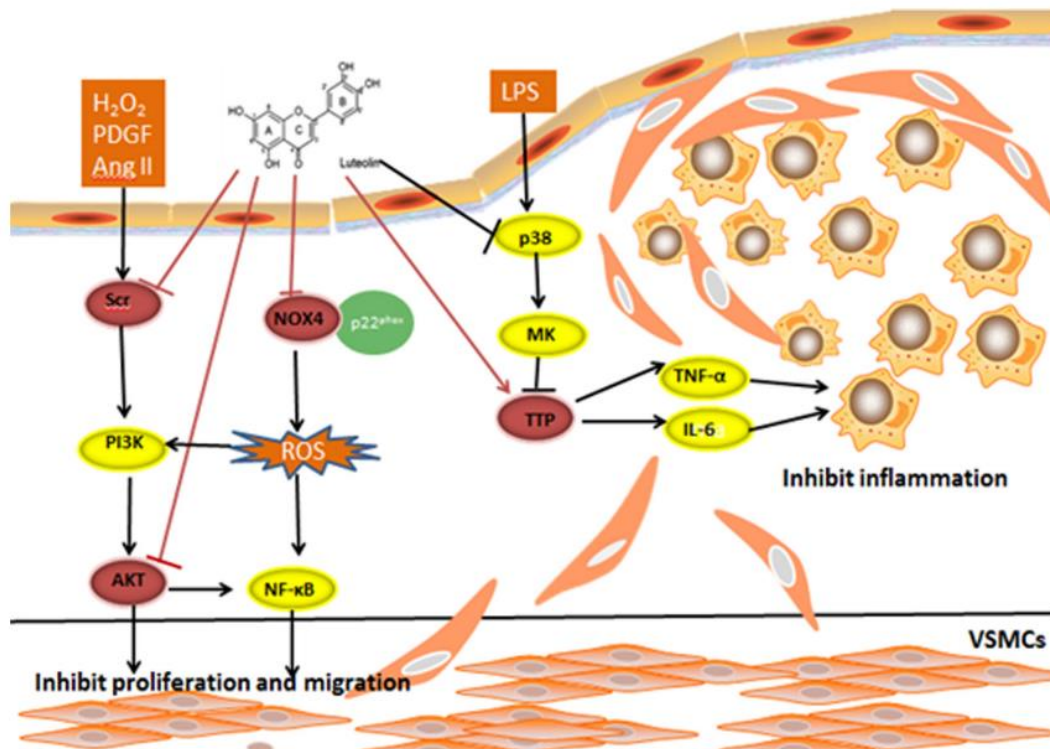


Figura 16. Mecanismos anti-ateroscleróticos de la luteolina. Adaptado de [99] por Yuanyuan Luo et al. bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Según se puede ver, estos son los principales mecanismos anti-ateroscleróticos que se han descrito para la luteolina:

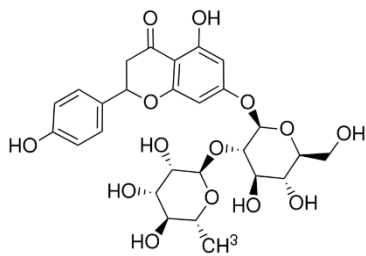
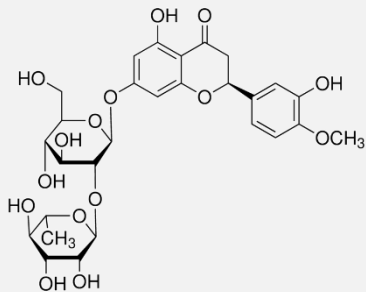
1. Efecto inhibitor sobre la tasa de proliferación y migración de células del músculo liso vascular (VSMCs) inducida por angiotensina II (Ang II).
2. Suprime la regulación positiva de la proteína quinasa B (AKT) para inhibir la proliferación y migración de VSMCs por una disminución de la expresión de las p-AKT (308) y p-AKT (473).
3. Bloquea la fosforilación de la SRC provocada por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por competición en la unión de ATP.
4. Regula la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios, ya que afecta a la estabilidad del ARNm del TNF-α y la IL-6, inhibiendo la fosforilación de la p38 y MK2 (gracias a una incrementada expresión de tristetraprolina (TTP)).

5. Disminuye la producción de especies radicales de oxígeno (ROS) a través del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y disminuye la expresión de la proteína NADP oxidasa 4 (NOX4) y la subunidad p22phox, además de atenuar el estrés oxidativo por la vía NOX4/ROS-NF- κ B.

1.2.1.2. Flavanonas glicosiladas: Naringina y Neohesperidina

El pomelo (*Citrus paradisi*) contiene ciertas cantidades de flavonoides principalmente naringina (naringenina-7-O-neohesperidósido) y narirutina (naringenina-7-O-rutinósido) [104]. Por su parte, la naranja amarga (*Citrus aurantium*) contiene importantes cantidades de neohesperidina [105–107], una flavanona similar a la hesperidina de la naranja dulce y del limón; y contiene también naringina [108–112] (caracterización de todas en la Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización molecular de las flavanonas cítricas naringina y neohesperidina en Citroven TM.

<i>Planta/Parte utilizada/Nombre botánico/Compuesto</i>	<i>Estructura molecular</i>
Pomelo, frutos inmaduros, <i>Citrus paradisi</i> + Naranja amarga, frutos, <i>Citrus aurantium</i>	n/a
Naringina CAS No. 10236-47-2	
Neohesperidina CAS No. 13241-33-3	

CAS No: Número de identificación para compuestos químicos según el Chemical Abstracts Service (CAS).

El producto empleado en este estudio, contiene un extracto rico en estas flavanonas glicosiladas obtenido a partir de dos extractos hidroetanólicos diferentes frutos inmaduros de pomelo y naranja amarga (ratio 1:1).

La naringenina y la naringina son flavonoides con propiedades ventajosas para el sistema cardiovascular que se han investigado en estudios *in vitro* e *in vivo* [113,114] y que se resume gráficamente en la figura 17 [115]. Por tanto, pensamos es un ingrediente activo de interés en la prevención del riesgo cardiovascular.

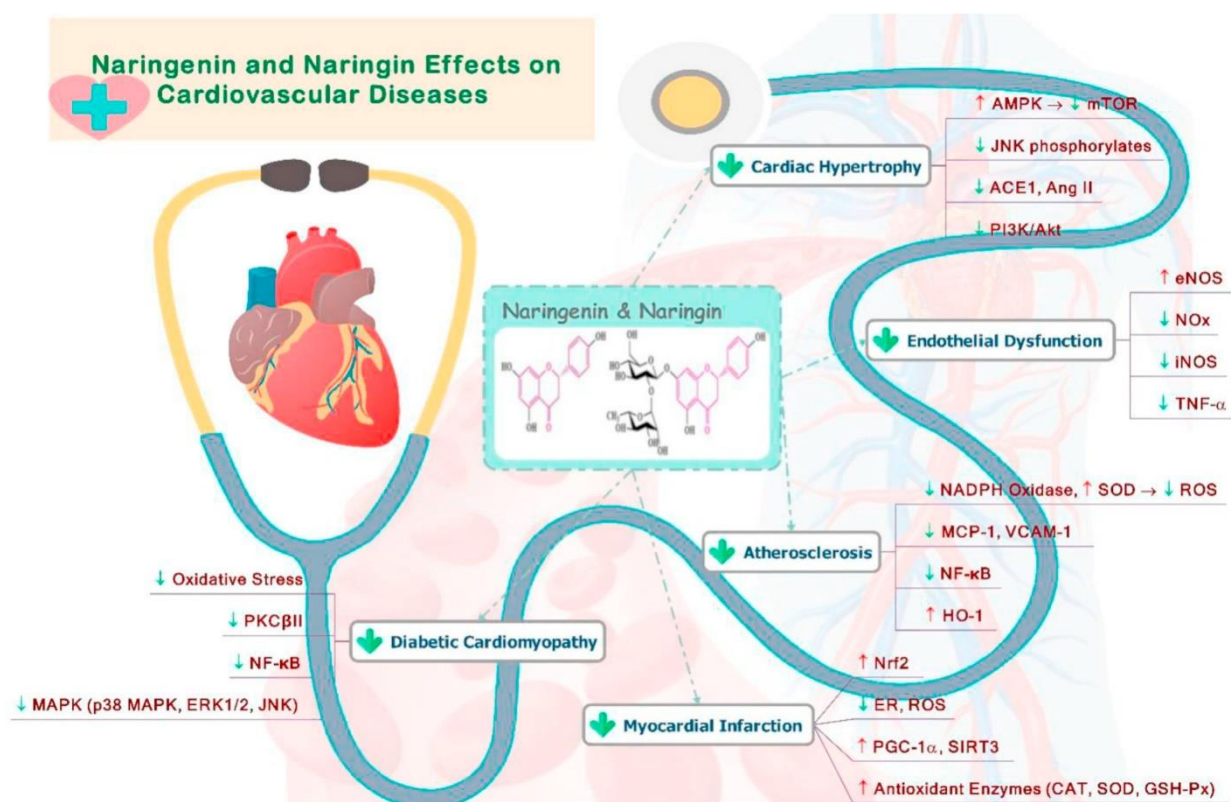
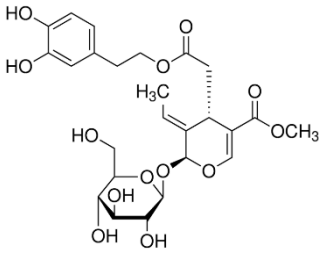
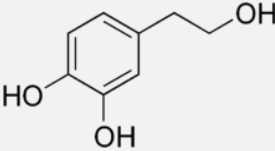


Figura 17. Acciones cardiovasculares y dianas moleculares de naringina y naringenina. Por Reza Heidary Moghaddam et al. adaptado de [115].

1.2.2. Polifenoles de hojas de olivo: Oleouperina, secoiridoides e hidroxitirosol

Se ha demostrado que el compuesto amargo oleuropeína, el componente principal de la familia secoiridoide del olivo (*Olea europaea* L.), es un potente antioxidante dotado de propiedades antiinflamatorias [116]. Su estructura química (ver Tabla 4) se especificó como la de un éster heterosídico de ácido elenólico y dihidroxifeniletanol [117].

Tabla 4. Contenido de los componentes principales del extracto de olivo utilizado en CitrovénTM. Se muestra la estructura molecular de la oleuropeína y el hidroxitirosol.

<i>Planta/Parte utilizada/Nombre botánico/Compuesto</i>	<i>Imagen del principal activo</i>
Olivo, hoja, <i>olea europea</i> <i>Oleuropeína</i> CAS# 32619-42-4	
<i>Hidroxitirosol</i> CAS# 10597-60-1	

CAS No: Número de identificación para compuestos químicos según el Chemical Abstracts Service (CAS).

Hace varias décadas se descubrió la actividad antiviral y bactericida del elenolato de calcio (obtenido por hidrólisis de la oleuropeína) [118,119] y posteriormente que la oleuropeína también tenía actividad antimicrobiana contra virus, retrovirus, bacterias, levaduras, hongos, mohos y otros parásitos [118,120–122]. Varios informes han descrito los efectos protectores de la oleuropeína [123] y el hidroxitirosol [124] contra la aterosclerosis [125], y en modelos experimentales preclínicos efectos sobre la protección cardiovascular (Tabla 5) [126].

Tabla 5. Efectos y mecanismos implicados en la protección cardiovascular de la oleuropeína y el hidroxitirosol. Por Stefania Bulotta et al. adaptado de [126] bajo la licencia [Creative Commons CC BY 4.0](#).

Protección	Efecto	Mecanismo	Referencias
Enfermedad vascular	Antioxidante	↓ Oxidación de LDL	[127,128]
		↓ Peroxidación lipídica	[129]
	↓ Activación endotelial	↓ VCAM-1	[130]
	↓ Adhesión de monocitos		
	↓ Agregación plaquetaria	n.d.	[131]
		↓ Actividad de COX-2	[132]
		↓ Tromboxano A2	
		↑ NO	
Enfermedad cardíaca	↓ Proliferación de VSME	↓ Fosforilación de ERK 1/2	[133]
	↓ Oclusión coronaria (*)	↓ Actividad de CK	[134]
		↓ GSSG	
	↓ Cardiotoxicidad (**)	↑ Fosforilación de AMPK	[135,136]
		↓ Expresión de iNOS	
		↑ Actividad de METC	
	Isquemia	Hipolipidemia	[137]
		↓ Actividad de SOD	
	Infarto de miocardio	↑ Fosforilación de Akt	[138]
		↑ Fosforilación de eNOS	
		↑ Fosforilación de FOXO3a	

(*) lesión miocárdica inducida por isquemia; (**) toxicidad inducida por doxorubicina; n.d.: no determinado. Abreviaturas: AMPK 5' proteína quinasa activada por AMP; CK Creatina quinasa; COX ciclooxigenasa; eNOS óxido nítrico sintasa endotelial; ERK quinasa regulada extracelular; GSSG glutatión oxidado; iNOS óxido nítrico sintasa inducible; LDL lipoproteínas de baja densidad; MMP metaloproteinasas de matriz; METC Cadena de transporte de electrones mitocondrial; ON óxido nítrico; PDE fosfodiesterasa; SOD superóxido dismutasa; VCAM molécula de adhesión vascular; VSME Células del músculo liso vascular.

II – JUSTIFICACIÓN

II - JUSTIFICACIÓN

El papel de la dieta es crucial en el desarrollo y la prevención de las enfermedades cardiovasculares, y debemos ser conscientes que los suplementos nutricionales deben ser considerados como “alimentos” y, en consecuencia, como herramientas de una actuación preventiva que, por eficaz que pudiera ser, no sea evaluada inicialmente en situaciones patológicas en las que se pueda hablar de una intervención terapéutica directa.

2.1. PREMISAS DE ESTUDIO

A la hora de planificar y desarrollar este estudio de intervención se establecieron dos premisas básicas:

- La prevención del riesgo cardiovascular, incluido dentro de ese amplio concepto que representa el síndrome metabólico, necesita un abordaje multifactorial, no podemos hablar de una única diana fisiológica/metabólica: obesidad, diabetes, hipertensión, dislipemias, aterotrombosis y vasculopatías entre otras.
- En el ensayo de intervención, conceptualmente, no puede llevarse a cabo con voluntarios que sufran patologías definidas, voluntarios que sean obesos, que padezcan diabetes, dislipemias, vasculopatías, etc. En definitiva, debe tratarse de sujetos sanos.
- En consecuencia, y con independencia de la definición de la variable principal y las secundarias, se decidió establecer el estudio sobre cuatro conceptos clave, cuya evolución durante la ingesta de un suplemento nutricional, podría ser evaluada mediante biomarcadores generales y específicos, así como mediante técnicas no invasivas:
 - Evaluar la incidencia sobre la función endotelial
 - Evaluar la incidencia en el perfil lipídico.
 - Evaluar la incidencia de biomarcadores inflamatorios
 - Evaluar la incidencia sobre el estado trombótico.

A nuestro juicio, si queremos realmente hablar de prevención, la evaluación de la evolución de estos factores en sujetos sanos es totalmente necesaria y, sobre todo, en el caso de la función endotelial. No olvidemos que, en la actualidad, la disfunción endotelial se considera una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular, principalmente considerando supone un desequilibrio en la biodisponibilidad de principios activos de origen endotelial y por tanto predispone a la inflamación, vasoconstricción y aumento de la permeabilidad vascular, siendo un marcador, que puede ser medido de forma no invasiva y que integra gran parte de la información sobre el riesgo vascular.

Resulta evidente que, a pesar de que en nuestra vida diaria podamos cumplir con recomendaciones nutricionales correctas, la ingesta a través de la dieta de flavonoides en general, y de otros compuestos polifenólicos relacionados, es realmente modesta. Este hecho es aún más significativo en el caso de los flavonoides cítricos y de los polifenoles del olivo, dado que las principales fuentes de estos compuestos, las pieles de los cítricos (albedo) y las hojas del olivo no se utilizan como ingredientes en nuestra dieta. En consecuencia, el uso de suplementos nutricionales se torna recomendable y casi necesario, tanto para permitir el acceso a la ingesta de estos compuestos activos, como para que dicha ingesta sea en la dosis adecuada para proporcionar una PREVENCIÓN FRENTE AL RIESGO CARDIOVASCULAR, realmente eficaz.

Nuestro grupo ya había trabajado desde principios de los años 2000, colaborando con diversos grupos de investigación, en estos aspectos relacionados con la salud y el riesgo cardiovascular, así como los efectos deletéreos del estrés oxidativo a nivel general, incluidos estudio in vitro y preclínicos (ver Anexo 5 (“Estudios previos del grupo”).

Todo este conjunto de investigaciones ha constituido la base del diseño de este estudio clínico de intervención, tanto a nivel de variables y parámetros a evaluar, como a nivel de diseño del suplemento nutricional/nutracéutico (CitrovenTM) empleado en el mismo.

2.2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La idea básica de este proyecto de validación clínica y desarrollo de productos final es superar los tres problemas que, a nuestro juicio son más

evidentes en la prevención de las patologías cardiovasculares: que los productos farmacéuticos están dirigidos obviamente y en realidad a dianas muy específicas, que no siempre consiguen un efecto beneficioso global y que presentan, en muchas ocasiones indeseables efectos secundarios; que la propia dieta, a pesar de ser un elemento clave en este aspecto, siendo correcta y bien regulada en cantidad y calidad, carece de la ingesta de aquellos compuestos que consideramos más efectivos en este ámbito, ya que su presencia se da en partes físicas de los alimentos que no se ingieren habitualmente; y finalmente, que los denominados alimentos funcionales simples adolecen de las necesarias concentraciones basales de ingredientes activos como para considerarlos verdaderamente eficaces en el objetivo que aquí consideramos.

2.3. HIPOTESIS DEL ESTUDIO

La combinación de la actividad biológica individual de ingredientes bioactivos puede ejercer efectos sinérgicos, complementarios y/o adicionales cuya actividad biológica conjunta es capaz de revertir/modular las alteraciones de distintas funcionalidades fisiológicas o factores de riesgo que describen, en su conjunto, una situación de alteración de la homeostasis (menopausia, estrés, síndrome metabólico, etc...).

La investigación, diseño de producto, evaluación clínica transversal de un suplemento nutricional, conteniendo dosis adecuadas de ingredientes activos, y enfocado a la multifactorialidad de las patologías cardiovasculares, podría constituir la mejor y más adecuada herramienta para su tratamiento.

III – OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS PRINCIPALES

- Determinar la eficacia del nutracéutico frente a placebo en la disminución del riesgo cardiovascular a lo largo del periodo de tratamiento.
- Evaluar el efecto que tiene sobre la función endotelial específica, de los sujetos estudio, la toma continuada del producto en investigación, valorándola frente al efecto causado por el placebo:
 - Evaluar la evolución en el perfil lipídico de los sujetos ensayo tras la toma continuada del producto en investigación, comparándola con el efecto del placebo.
 - Evaluar la evolución de la tensión arterial de los sujetos ensayo tras la toma continuada del producto en investigación, comparándola con el efecto del placebo.
 - Evaluar la incidencia sobre el estatus trombótico de los sujetos ensayo que han ingerido el producto en investigación frente al placebo.
 - Evaluar la evolución del estado antioxidante de los sujetos ensayo tras la toma continuada del producto en investigación, comparándola con el efecto del placebo.
 - Evaluar la incidencia sobre los biomarcadores inflamatorios de los sujetos ensayo que han ingerido el producto en investigación frente al placebo.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Evaluar la evolución en la antropometría de los sujetos a ensayo que han ingerido el producto en investigación frente al placebo.
- Evaluar como el producto experimental afecta a la calidad de vida frente al placebo.
- Evaluar la seguridad del producto en investigación frente a placebo en sujetos sanos y los posibles efectos adversos derivados de la ingesta diaria.

IV - MATERIAL Y MÉTODOS



IV -MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trató de un ensayo clínico aleatorizado, controlado, doble ciego, con dos ramas paralelas a estudio en función del producto consumido (experimental o placebo) estratificadas por sexo, y unicéntrico, diseñado con el objetivo de evaluar el efecto del producto en investigación sobre la reducción del riesgo cardiovascular (Figura 18).

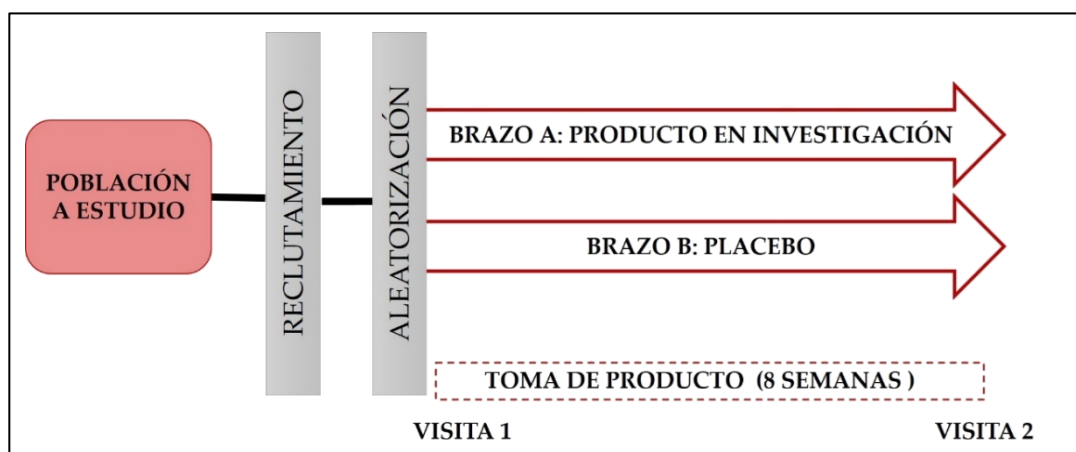


Figura 18. Diseño de estudio

4.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Los sujetos seleccionados fueron sujetos sanos de ambos sexos, con edades entre 40 y 75 años. Para poder participar en el estudio fue necesario que cumplieran los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

4.2.1. Criterios de inclusión

Con el fin de ser incluidos los pacientes tendrán que cumplir cada uno de los siguientes criterios:

- Sujetos de ambos sexos (hombres o mujeres) entre 40 y 75 años de edad, de raza caucásica.

- Presentar niveles, en ayuno, de LDL-colesterol sérico iguales o superiores a 110mg/dL.
- Presentar valores, en ayuno, de colesterol sérico total iguales o superiores a 180mg/dL.
- Las mujeres deben encontrarse en periodo menopáusico.
- Presentar índice de masa corporal entre 18,5 y 34,9 Kg/m².
- El número de plaquetas en sangre debe ser superior a 170 x10⁹/L.
- Hematocrito superior a 40% para los hombres o superior a 35% para las mujeres.
- Hemoglobina superior a 120 g/L para los hombres o a 110 g/L para las mujeres.
- Voluntarios capaces de comprender el estudio clínico y dispuesto a otorgar el consentimiento informado por escrito y para cumplir los procedimientos y requisitos del estudio.

4.2.2. Criterios de exclusión

Fue motivo de exclusión del ensayo clínico la presencia, de al menos uno, de los siguientes criterios:

- Disfunción de tiroides, infecciones, o con cualquier tipo de enfermedad crónica (por ejemplo, autoinmunes, inflamatorias).
- Sujetos que hayan padecido algún evento isquémico-vascular durante los últimos meses.
- Sujetos en tratamiento con medicamentos y/o nutracéutico para hipertensión, diabetes o hiperlipemia (por ejemplo, Estatinas).
- Sujetos en tratamiento con fármacos que por su estrecho margen terapéutico requieran una monitorización de sus niveles plasmáticos (digoxina, acenocumarol, warfarina, etc...).
- Sujetos en tratamiento que afecte al peso corporal o apetito.

- Antecedentes de hipersensibilidad alérgica o mala tolerancia a cualquier componente de los productos en estudio.
- Sujetos que estén realizando o pretendan realizar cualquier tipo de régimen alimenticio, hipocalórico o no, durante la realización del estudio.
- Sujetos que hayan donado un mínimo de 0.5L de sangre en el último mes
- Sujetos vegetarianos.
- Sujetos, que en hayan ingerido, en los últimos tres meses, suplementos de omega 3 y/o 6, (por ejemplo, aceite de pescado, aceite de onagra, aceite de krill, o aceite de algas).
- Sujetos en tratamiento con niacina o fibratos.
- Sujetos con abuso de alcohol, o bien con un consumo excesivo de alcohol (>3 copas de vino o cerveza/día).
- Sujetos sometidos a cirugía mayor en los últimos 3 meses.
- Sujetos fumadores o no, pero en cualquier caso que no modifiquen sus hábitos nicotínicos durante su participación en el estudio.
- Participación en otro ensayo clínico en los tres meses anteriores al estudio.
- Falta de voluntad o la incapacidad de cumplir con los procedimientos de ensayos clínicos.
- Sujetos cuya condición no les hace elegibles para el estudio conforme criterio del investigador.

4.2.3. Reclutamiento

La captación de individuos se realizó mediante la difusión de información a través de charlas en diversos centros de la mujer, centros de ancianos, asociaciones de vecinos y propagación a través de medios de comunicación. A través de estos se

informa a la población sobre finalidad del estudio de investigación y los criterios de inclusión y exclusión.

4.2.4. Aleatorización

Se llevó a cabo con un generador informático de números aleatorios (Epidat v.4.1) por un investigador ajeno a la investigación. A cada sujeto que participó en el estudio se le asignó un código que le hizo pertenecer a uno de los dos grupos de estudio.

Tanto los investigadores como el propio participante desconocieron el grupo al que pertenecieron. Para ello se preparó una hoja de aleatorización marcada como A o B, con la que se determinaba a cada una de ellas un producto experimental o un producto placebo. Esta distribución aleatoria quedó firmada y fechada en la hoja de aleatorización, y solamente fue al finalizar el estudio donde se comunicó cuál era el producto objeto de estudio y cuál el placebo.

4.2.5. Cegamiento

Se trata de un ensayo clínico doble ciego, con la finalidad de que el equipo investigador y los sujetos objeto a estudio no pudiesen saber al grupo que pertenecían. Para ello se seleccionó un placebo de idénticas características organolépticas, y del mismo aspecto que el producto en investigación, aunque sin actividad. Ambos fabricados por el promotor.

Puesto que los productos fueron idénticos y la asignación al grupo de seguimiento también fue ciega, no fue necesario ningún otro tipo de mecanismo de enmascaramiento. Los envases del producto del estudio fueron marcados con una etiqueta que los identificó como pertenecientes al grupo A o al grupo B y el código de cada voluntario.

4.2.6. Criterios de retirada y abandono

El estudio ha tenido en todo momento un carácter voluntario de la participación, donde los sujetos han podido abandonar el mismo sin que fuese necesario especificar las razones para hacerlo y sin sufrir ninguna desventaja personal, como se recoge en la “hoja de información al sujeto participante” (Anexo

1: “Hoja de información al paciente”). Así mismo el investigador pudo retirar a un sujeto del estudio si consideraba que este ya no podía cumplir con la totalidad de los requisitos del mismo o si alguno de los procedimientos se considera nocivo para el sujeto. Algunos de los acontecimientos a tener en cuenta son: presencia de acontecimientos adversos, violaciones del protocolo, decisión facultativa, renuncia del individuo a continuar en el estudio, pérdida del seguimiento. En el momento en el que se produjo un abandono, quedó debidamente recogido en su cuaderno de recogida de datos (CRD). Los sujetos que han tenido que abandonar el estudio se quedan reflejados en el diagrama de flujo de los resultados.

4.2.7. Pérdidas pre-randomización

Se consideraron pérdidas pre-randomización aquellas que ocurrieron en los sujetos antes del comienzo del consumo del producto, pero que previamente fueron seleccionadas para llevar a cabo el ensayo. Estas pérdidas pueden ser por decisión del investigador o por el abandono del sujeto de forma voluntaria.

También han quedado registradas convenientemente en el correspondiente CRD y detalladas en el diagrama de flujo.

4.2.8. Producto administrado

4.2.8.1. Caracterización del producto y placebo

Las características del producto a estudio fueron las siguientes:

Forma farmacéutica y presentación: cápsulas, tanto el producto en investigación como el placebo.

Contenido: Las cápsulas del producto en investigación contenían una combinación de extractos botánicos (comúnmente denominado con el anglicismo “blend”) denominada Citroven[™]. Las cápsulas del placebo estaban compuestas por maltodextrina y excipientes en *q.s.p.* (*quantum satis per*, hasta completar el volumen de la capsula) con misma apariencia de su contenido (polvo amarillento, Figura 19), además de capsula utilizada de color blanco opaco para ocultar el contenido interior, albergadas en un blíster (Figura 20). Estos blísteres estaban loteados (numeración única que vincula al producto con el proceso de su

fabricación) de forma distinta para el producto estudiado y el placebo, de forma que pudiesen identificarse durante el ensayo manteniendo el cegamiento de los participantes e investigadores. En ningún caso los excipientes modificaron ni la farmacocinética ni la farmacodinamia de los principios activos, únicamente se añadieron por motivos tecnológicos.

La composición de CitrovenTM es la siguiente:



Figura 20. Aspecto del extracto en investigación usado en el ensayo.



Figura 19. Apariencia del Blíster con capsulas utilizadas en el estudio.

- Dos extractos hidroetanólicos diferentes de cítricos inmaduros de pomelo (*Citrus paradisi* Macfad, naringina, narirutina, rhoifolina, poncirina, apigenina, etc.). Representaban el 40% del peso total de CitrovenTM.
 - Extracto de frutos inmaduros de pomelo rico en flavanonas-glicosiladas (principalmente naringina). Proporción 30% p/p.
 - Extracto hidrolizado/derivatizado de frutos de pomelo rico en flavonas (principalmente apigenina). Proporción 10% p/p.

- Dos extractos hidroetanólicos diferentes de naranja amarga (*Citrus aurantium* L., naringina, neohesperidina, neodiosmina, luteolina, etc.). Representaban el 22.5% del peso total de Citroven™.
 - Extracto de frutos inmaduros de naranja amarga rico en flavanonas-glicosiladas (principalmente neohesperidina y naringina). Proporción 12.5% p/p.
 - Extracto hidrolizado/derivatizado de frutos de naranja amarga rico en flavonas (principalmente luteolina). Proporción 10% p/p.
- Un extracto hidroetanólico de hoja de olivo (*Olea europaea* L., secoiridoides de olivo, familia de las oleuropeínas, hidroxitirosol, etc.). Representaban el 37.5% del peso total de Citroven™.

La ingesta diaria total de compuestos activos fue:

- 250-300 mg de flavonoides tipo: flavanona-glicósidos (naringina, neohesperidina, narirutina, poncirina, etc.)
- 175-200 mg de flavonoides tipo: flavona-glicosidos y flavona aglicones (apigenina, luteolina, rhoifolina, neodiosmina, etc.)
- 85-90 mg de polifenoles de oliva (secoiridoides y compuestos fenólicos), principalmente oleuropeína e hidroxitirosol.

Las especificaciones del “blend” o producto estudiado puede consultarse en el Anexo 2 (“Especificaciones del producto investigado”).

A continuación, se describe el diagrama de flujo completo de Citroven™, que incluye las líneas de proceso de cada uno de los componentes antes descritos.

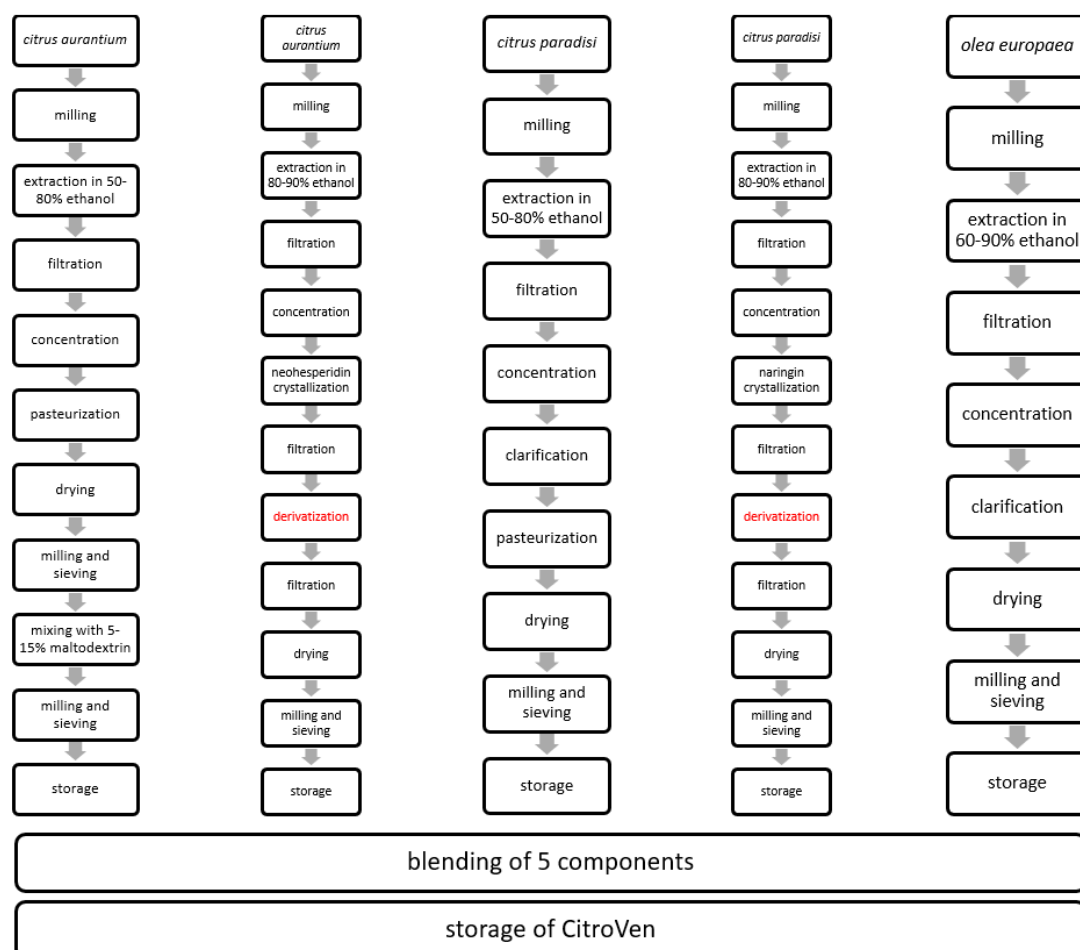


Figura 21. Diagrama de fabricación de los 5 ingredientes del extracto investigado.

El análisis de los compuestos polifenólicos anteriormente descritos se realizó mediante técnicas de cromatografía HPLC-DAD según descrito en [116]. Para la cuantificación de las flavanona-glicósidos, flavonas y polifenoles de oliva, el extracto se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) en la proporción de 3 mg / mL; esta solución se filtró a través de una membrana de nailon de 0,45 μ m. El caudal fue de 1 ml / min y los cambios de absorbancia se controlaron a 280 nm. Las fases móviles para el análisis cromatográfico fueron: (A) ácido acético / agua (2,5: 97,5) y (B) acetonitrilo. Se corrió un gradiente lineal desde 95% (A) y 5% (B) hasta 75% (A) y 25% (B) durante 20 min; luego se cambió al 50% (A) y (B) en 20 min (40 min, tiempo total); en 10 min se cambió a 20% (A) y 80% (B) (50 min, tiempo total), antes

de reequilibrarse en 10 min (60 min, tiempo total) a la composición inicial. Los compuestos fenólicos elucidados se identificaron y cuantificaron comparando sus tiempos de retención con el estándar correspondiente y mediante sus espectros UV obtenidos con el detector DAD de array de diodos [116] (Tabla 6).

Tabla 6. Tiempos de retención (Rt) de los principales activos y estándares de referencia

Compuesto	Rt (min)	Estándar de referencia
Naringina (NAR)	20,5-21,0	Naringina (Sigma Code: 71162 Batch: BCBT3477)
Neohesperidina (NEOH)	22,0-22,5	Neohesperidina (Extrasynthese Code: 1132S Batch: 09)
Oleuropeina (OLE)	23,0-23,5	Oleuropeina (Sigma Code: 92467 Batch: BCBV2990)
Luteolina (LUT)	28,5-29,0	Luteolina (Extrasynthese Code: 1125 S Batch: 22)
Apigenina (API)	32,5-33,0	Apigenina (Sigma Code: 10798 Batch: WE445301/1)

El cromatograma siguiente (Figura 22) muestra el perfil característico de CitrovenTM, tal y como se describe en la tabla anterior y a una longitud de onda de 280 nm.

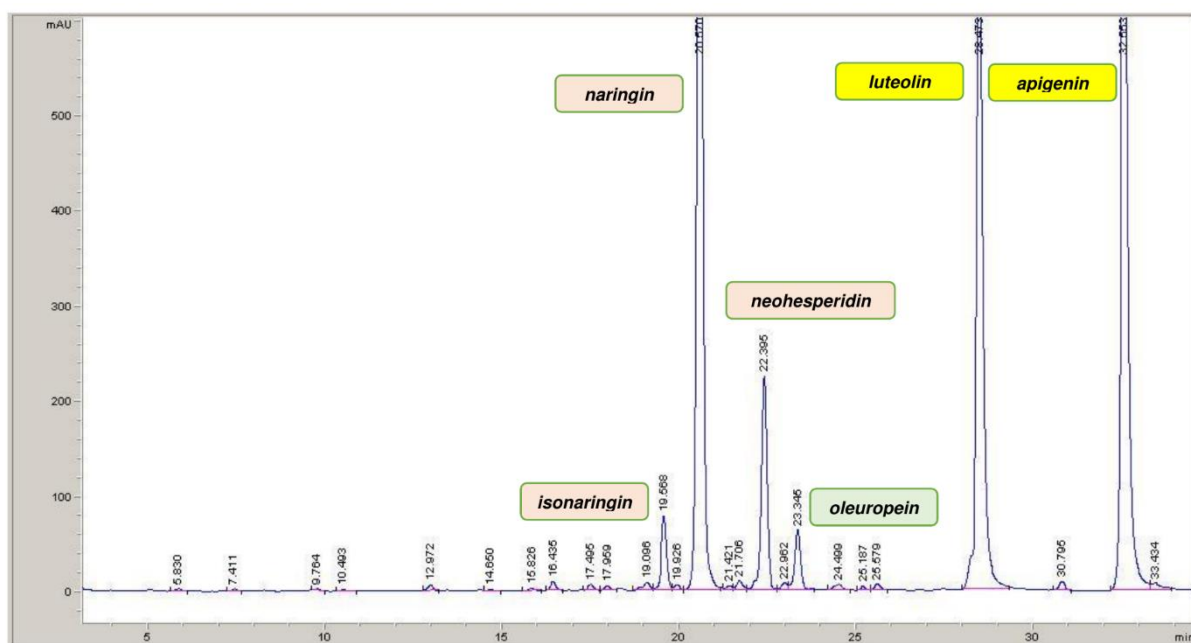


Figura 22. Cromatograma de CitrovenTM a longitud de onda de 280 nm.

Los análisis cromatográficos se realizaron a tres diferentes longitudes de onda: 280 nm, 340 nm y 370 nm. De esta forma puede realizarse una mayor confirmación espectral de las identidades de los diferentes compuestos activos presentes, comprobar que no existe solapamiento de otros compuestos que no absorben a 280 nm, e incluso evaluar la potencial presencia de estructuras flavonoides tipo chalcona, propias del equilibrio en disolución de los flavonoides tipo flavanona. La Figura 23 muestra el análisis simultaneo a esas tres longitudes de onda.

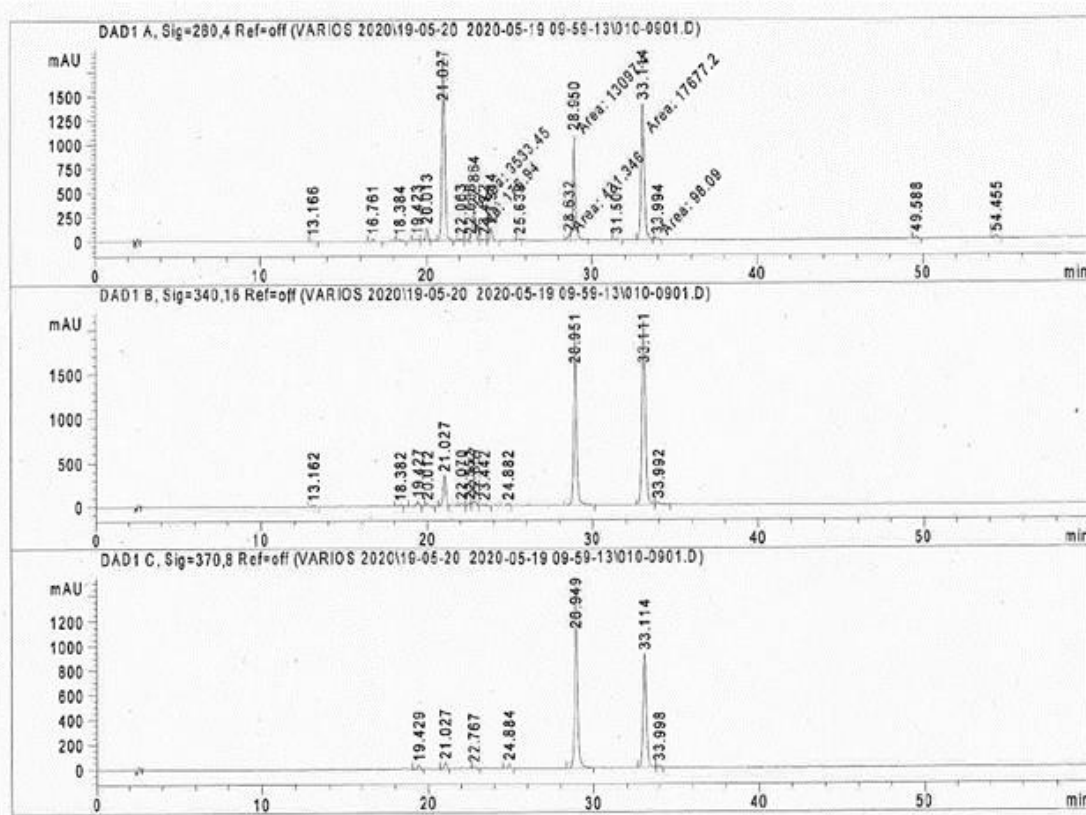


Figura 23. Cromatograma del extracto en investigación las longitudes de onda: 280, 340 y 370 nm analizado según [116].

La composición exacta de CitrovenTM, en cuanto a la proporción cuantitativa de cada uno de los compuestos activos, no puede ser incluida en esta Memoria por cuestiones de confidencialidad. De cualquier modo, creemos que el producto CitrovenTM ha quedado suficientemente caracterizado gravimétrica y molecularmente.

4.2.8.2. *Pauta de administración*

Vía de administración: oral

Posología: 2 cápsulas/día con intervalo de 12 horas entre ellas. Fue indiferente que su ingesta se realizase junto con la comida.

Tiempo de consumo: El tiempo de consumo de placebo y de producto fue de 8 semanas en ambos casos.

Mediación de rescate: Dada la naturaleza del producto y del estudio, no se requiso el establecimiento de una medicación de rescate.

Tratamientos previos y concomitantes: Cualquier tratamiento farmacológico o no, que se realizó durante el periodo de seguimiento debió de ser registrado en el CRD. El investigador principal del estudio juzgó la idoneidad de la continuidad del participante en el mismo.

Criterios para la modificación de pautas: Dado el carácter del ensayo, no se modificó la pauta. En el caso de reacción adversa en las fases iniciales del estudio, el sujeto fue excluido del estudio.

4.2.8.3. *Seguridad y toxicidad del producto*

La toxicidad oral aguda *in vivo* se evaluó previamente de acuerdo con las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) (Prueba nº 421: Prueba de detección de toxicidad para la reproducción/ desarrollo). El estudio de toxicidad oral aguda del producto mostró que la dosis letal LD50 del producto puede considerarse superior a 2000 mg/kg de peso corporal (Anexo 3 “Estudio de la toxicidad oral agua en ratas”). Teniendo en cuenta estos resultados y siguiendo las recomendaciones de la OCDE, el compuesto podría clasificarse según el Sistema Globalmente Armonizado (GHS) como una “sustancia no clasificada” o de muy baja toxicidad (categoría 5 del SGA). Cada ingrediente individual de Citroven™ podría clasificarse como categoría 5 del GHS (de muy baja toxicidad).

4.2.8.4. *Cumplimiento de la ingesta del producto*

Siguiendo el plan de aleatorización, el tratamiento correspondiente se proporcionó al participante bajo la supervisión del personal investigador, quien

anotó en el apartado pertinente del CRD el tratamiento asignado. Puesto que el tratamiento lo tomaron los voluntarios en su domicilio, el control del cumplimiento se realizó mediante la devolución de todos los envases vacíos, de esta forma el cumplimiento del tratamiento fue verificado por el equipo de investigación mediante la contabilidad del producto en investigación/placebo, sin usar, que fue devuelto.

El investigador principal mantuvo un archivo con las fechas, cantidades, código de lotes del producto en investigación /placebo entregado y recogido.

4.3. VARIABLES

Todas las variables se analizaron en la población de estudio, en cada una de las dos visitas que el sujeto realizó: en situación basal y tras 8 semanas de consumo ininterrumpido del producto.

Para poder participar en el estudio todos los sujetos debían seguir unas recomendaciones higiénico-dietéticas que fueron explicadas y suministradas por el investigador al comienzo del ensayo:

- No debían comenzar ni modificar ningún tratamiento hormonal durante el estudio si no estaba debidamente justificado.
- No cambiar significativamente los hábitos dietéticos (comenzar dietas especiales como hiperproteica o cetogénica) y en específico, no incrementar la ingesta de aquellos alimentos que contienen flavonoides, tipo café, té, chocolate, nueces, etc.
- No tomar ni seguir ningún tratamiento que pudiera afectar a los parámetros del estudio.
- No se permitió el uso de productos enriquecidos con esteroides vegetales.
- Al menos 24 horas antes de cada visita no deberán ingerir aspirina, ibuprofeno, naproxeno o cualquier inhibidor de la COX-2. En caso necesario pueden sustituir su ingesta por Paracetamol, siempre bajo supervisión médica.

Para llevar a cabo las extracciones sanguíneas se les determinó lo siguiente:

- Los individuos debían de venir a la unidad de investigación en ayunas de 12 horas mínimo. Solo se permitía la toma de agua de 250ml 3 horas antes de la extracción sanguínea.
- En caso de sujetos fumadores el último cigarro debía de haberse tomado 1 hora antes de la extracción.

No podían haber realizado ejercicio moderado-intenso, al menos 24 horas antes de la extracción sanguínea.

4.3.1. Variables de riesgo cardiovascular: función endotelial

La variable principal del estudio fue evaluar la evolución de la vasodilatación dependiente de endotelio en los sujetos tratados con el nutraceutico en comparación con aquellos tratados con placebo, durante el periodo de tratamiento de 8 semanas. Se evaluaron los cambios en la reactividad de la arteria braquial medida a través de vasodilatación dependiente de endotelio a través de pletismografía con un ECO-DOPLER de alta resolución (Sonosite micro Maxx HFL38, Sonosite Inc., Bothell, WA, EE.UU.) (Figura 24) con una sonda lineal vascular de 6-13 MHz.

La función endotelial se evaluó mediante la prueba de vasodilatación dependiente del endotelio medida por el flujo y la velocidad de onda de pulso. La primera, comprende la visualización de la arteria braquial, la medición de su diámetro y la velocidad del flujo sanguíneo, y tras un estímulo hiperérmico permite



Figura 24. Foto del ECO-DOPLER Sonosite micro Maxx HFL38.

la liberación del óxido nítrico que puede ser cuantificado como indicativo de la función vasomotora, a través de las imágenes por pletismografía vascular [139].

Esta medición se determinó en cada una de las visitas a estudio y se valoraron las modificaciones obtenidas en cada una de las ramas de estudio.

Los parámetros analizados fueron: evaluar el flujo sanguíneo periférico a través de pletismografía con un pletismógrafo piezoeléctrico, y determinación cuantitativa de la homocisteína plasmática.

El protocolo que se llevó a cabo para realizar estas mediciones fue (descripción gráfica en la Figura 25):

- Se colocó al sujeto en decúbito supino durante cinco minutos, en estado de reposo, y donde se tomó la presión arterial.
- La medición se realizó en el brazo dominante.
- Se realizaron tres mediciones del diámetro humeral y grosor de la pared arterial, un minuto antes y uno después de ocluirlo con el brazalete del esfigmomanómetro (Riester) durante cinco minutos. Posteriormente se hizo la media de dichas mediciones. La presión del brazalete debía ser de 60 mmHg por encima de la presión arterial sistólica basal. Se marcó la piel del brazo para la colocación posterior del transductor para posteriores mediciones.
 - FASE DE ISQUEMIA: Se infló el manguito del esfigmomanómetro (Riester) durante cinco minutos por encima de la presión sistólica en una región distal a la colocación de la sonda. La presión del brazalete debía ser de 60 mm Hg por encima de la presión arterial sistólica basal.
 - FASE DE HIPEREMIA: A los 5 minutos se desinfla el manguito y se realizan tres mediciones del diámetro de la arteria a los 30, 60 y 120 segundos del desinflado. La medición utilizada la que presenta mayor valor.
- Se colocó el transductor lineal a 60° en relación con el eje longitudinal del vaso, a unos 2 cm de la fosa antecubital. Se realizaron distintos cortes longitudinales de la arteria. El momento en el que se congeló la imagen fue

cuando coincidió con el periodo diástole cardiaca y se identificó la interfase luz-íntima.

La vasodilatación dependiente de endotelio (VDE) se expresó como el porcentaje de cambio del diámetro arterial calculado con la fórmula de vasodilatación dependiente de endotelio [140] (Ecuación 1):

Ecuación 1. Fórmula de vasodilatación dependiente de endotelio (VDE)

$$\text{VDE (\%)} = \frac{\text{Pico del diámetro hiperémico} - \text{Diámetro arterial basal}}{\text{Diámetro arterial basal}} \times 100$$

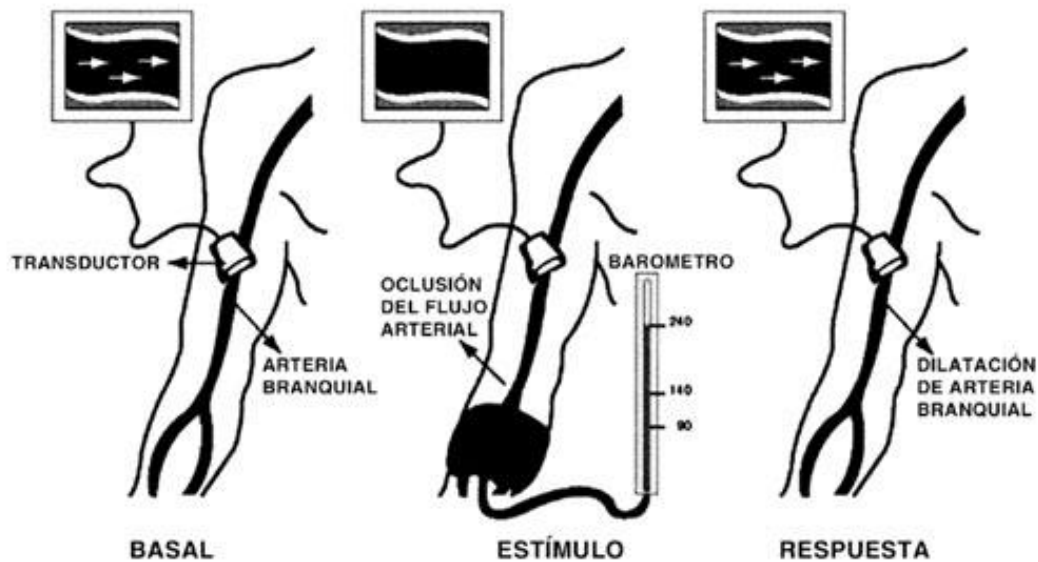


Figura 25. Técnica de evaluación de la función endotelial [140].

4.3.2. Variables de riesgo cardiovascular: Niveles séricos de homocisteína.

Se realizó una extracción sanguínea venosa de una de las venas situada en la fosa antecubital, tras un ayuno del sujeto de 12 horas. Esta medición se realizó al comenzar el estudio y tras la semana 8 del consumo del producto. La muestra sanguínea requerida para determinar las variables fue analizada en laboratorio mediante método enzimático cíclico con un analizador SPINTECH 240 (Spintech, Barcelona, España).

4.3.3. Variables de Metabolismo Lipídico

Se realizó una extracción sanguínea venosa de una de las venas del antebrazo próximas a la flexura del codo tras ayuno del sujeto de 12 horas. Esta medición se realizó al comenzar el estudio y tras la semana 8 del consumo del producto. En dicha muestra se evaluó los siguientes parámetros del perfil lipídico:

- Colesterol total.
- LDL-col.
- HDL-col.
- Triglicéridos.
- LDL- oxidada.

La muestra sanguínea requerida para determinar las variables fue analizada en laboratorio mediante analizador de química clínica ILAB 600 (Instrumentation Laboratory) que utiliza un método enzimático colorimétrico excepto la LDL oxidada que fue analizada mediante técnica ELISA (Human OxLDL (Oxidized Low Density Lipoprotein) ELISA KIT ELABSCIENCE Houston, Texas, USA).

4.3.4. Variables de tensión arterial

Se realizó y evaluó la evolución de la presión arterial sistólica entre los dos grupos a estudio con tensiómetro oscilométrico OMRON M6 AC (Omron Healthcare, España). Se determinó de manera manual en cada una de las visitas, obedeciendo la guía de buenas prácticas de la semFYC (Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria).

El protocolo que se siguió para realizar la medición fue [141]: sentar al sujeto cómodamente en una silla con una altura apropiada al sujeto, donde pudiese relajarse y tener la espalda bien apoyada y tener ambas piernas en contacto con el suelo, sin cruzarlos. El sujeto debía de estar en un lugar tranquilo durante un total de 5 minutos. Delante de él, una mesa estable donde debía de apoyar el brazo y tenerlo al mismo nivel que su corazón. Se colocó el manguito en la zona superior a la fosa antecubital. Se verificó que el brazalete estaba bien colocado y no se movía, no debía de estar muy tallado, ni tampoco muy flojo. Las cifras resultantes se anotaron en el CRD del sujeto participante. Se realizan un total de tres mediciones, con una diferencia de 2 minutos entre cada una de ellas, y se calcula el promedio de la última medición.

4.3.5. Variables del estado trombótico: niveles séricos del factor de Von Willebrand.

La lesión endotelial es el substrato fisiopatológico de la inmensa mayoría de los pacientes con cardiopatía isquémica. El factor de von Willebrand es una molécula proteica localizada a nivel subendotelial, con diversas funciones dentro de la hemostasia sanguínea, y cuya elevación puede ser observada en situaciones en las que se produce una lesión endotelial. En relación con la fisiopatología de la cardiopatía isquémica, en la que se produce una alteración endotelial, algunos estudios demuestran la existencia de una elevación en los niveles de Factor de Von Willebrand en estos pacientes, aunque con resultados diferentes en función del momento evolutivo y de la presentación clínica. Esta variable se analizó, en cada uno de los sujetos a estudio, en cada una de las visitas que realizaron a la unidad de investigación.

La muestra sanguínea requerida para determinar las variables fue analizada en laboratorio mediante método E.L.F.A. con un analizador VIDAS de BIOMERIEUX (Biomerieux, España).

4.3.6. Variables del estado antioxidante

Estas variables se analizaron, en cada uno de los sujetos a estudio, en cada una de las visitas que realizaron a la unidad de investigación.

- Defensas antioxidantes: Glutathion oxidado/reducido sérico. Se evaluaron los posibles cambios en la relación entre glutathion oxidado y reducido, en sangre, comparando ambas ramas a estudio. Se evaluó mediante técnica HPLC-masas.

- Daño oxidativo a proteínas: grupos carbonilo séricos. Se determinó grupos carbonilo en sangre analizándolos por método ELISA (Protein carbonyl ELISA KIT ENZO LIFE SCIENCES Lausen, Switzerland), valorando sus posibles modificaciones entre ambos grupos de tratamiento.

- Daño oxidativo a lípidos: colesterol LDL oxidado sérico. Se evaluó el colesterol LDL oxidado en sangre por método inmunológico, valorando sus posibles modificaciones entre ambos grupos de tratamiento. Se evaluó mediante técnica ELISA (Human OxLDL (Oxidized Low Density Lipoprotein) ELISA KIT ELABSCIENCE Houston, Texas, USA).

4.3.7. Variables de inflamación

Las variables que miden el componente inflamatorio en este estudio son:

- Proteína C reactiva ultrasensible sérica (PCR). La muestra sanguínea requerida para determinar las variables fue analizada en laboratorio mediante analizador de química clínica ILAB 600 (Instrumentation Laboratory) que utiliza un método enzimático colorimétrico.

- Interleucina 6 (IL-6). La interleucina-6 es una de las citocinas más abundantes en el suero. Mientras que los niveles normales de IL-6 son vitales para la homeostasis del proceso inflamatorio, los niveles elevados y persistentes de IL-6 pueden desempeñar un papel clave en la interrupción de la homeostasis, afectando a la función de una amplia variedad de células. Niveles elevados de IL-6 desempeñan una función clave en la inflamación crónica al estimular y facilitar las interacciones entre el sistema inmunitario innato y adaptativo.

Se evaluaron los niveles séricos de esta proteína por método inmunológico, valorando sus posibles modificaciones entre ambos grupos de tratamiento. Se evaluó mediante técnica ELISA (Interleukin 6 High Sensivity ELISA KIT IBL INTERNATIONAL Hamburgo, Alemania).

- Factor de necrosis tumoral α (TNF α). El factor de necrosis tumoral es una citoquina que producen varias células del sistema inmune, principalmente macrófagos y monocitos. Cuando se produce un daño tisular o una infección, el TNF- α desarrolla una acción proinflamatoria tanto por sí mismo como a través de la regulación de otros mediadores inflamatorios, como las interleucinas 1 y 6. Su acción se produce a dos niveles: a nivel celular favorece el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos, así como el reconocimiento de antígeno; a nivel tisular produce la remodelación y recuperación de los tejidos.

Se evaluaron los niveles séricos de esta proteína por método inmunológico, valorando sus posibles modificaciones entre ambos grupos de tratamiento. Se evaluó mediante técnica ELISA (TNF- α High Sensivity ELISA KIT IBL INTERNATIONAL Hamburgo, Alemania).

4.3.8. Variables antropométricas

Se llevó a cabo una bioimpedanciometría (BIA) para evaluar las variaciones en la composición corporal de los individuos del ensayo a lo largo del estudio, entendiéndose como composición corporal las medidas de: masa magra y masa muscular. Esta metodología está fundamentada en la capacidad que poseen los tejidos biológicos para conducir electricidad y la impedancia que estos pueden presentar ante la misma. Dicha medición se llevó a cabo en condiciones de ayuno, en el comienzo del estudio (visita basal) y al finalizar el mismo (semana 8). Además del ayuno, se tuvieron en cuentas las recomendaciones para la realización de la BIA. Estas recomendaciones se basan en: no realizar ejercicio físico extenuante y no beber alcohol en las últimas 24 horas, las mujeres no podían estar embarazadas y los sujetos debían de verificar que no llevaran ningún marcapaso o stent metálico. Para realizar esta medición se empleó un bioimpedanciómetro o tanita BC-420M (Tanita Corporation, Arlington Heights, IL, EE.UU.).

4.3.9. Variables de estilo de vida

Se evaluó el estilo de vida mediante la realización de:

- Cuestionario SF-12.

Es una escala genérica que proporciona un perfil del estado de salud y es aplicable a la población general. Ha resultado útil para evaluar la calidad de vida relacionada con la salud en la población general y en subgrupos específicos, comparar la carga de muy diversas enfermedades, detectar los beneficios en la salud producidos por un amplio rango de terapias diferentes y valorar el estado de salud de pacientes individuales. El Cuestionario de Salud SF-12 está compuesto por 12 preguntas (ítems) que valoran los estados tanto positivos como negativos de la salud. El cuestionario cubre 3 escalas, que representan los conceptos de salud empleados con más frecuencia en los principales cuestionarios de salud: rol físico, salud general y salud mental

- Encuesta dietética.

Se eligió un método retrospectivo siendo la encuesta alimentaria “Recuerdo de 24 horas”. Los datos se recogieron durante un periodo de 3 días al comienzo y al final de la intervención (siendo dos días entre semana y un día de fin de semana). En esta encuesta se reflejó la ingesta total cualitativa y cuantitativa de los alimentos ingeridos por los individuos a estudio. Para obtener una descripción adecuada de los alimentos y bebidas consumidas se les entregó junto con la encuesta un guion con las pautas a seguir para rellenarla correctamente. También se realizó una explicación oral con estas pautas.

Una vez completadas las encuestas, fueron recogidas, revisadas y valoradas mediante el programa informático Dietsource® v3.0, obteniendo así una clara muestra de la nutrición habitual de cada individuo. Las variables nutricionales que se analizaron fueron: consumo energético (Kcal.) e ingesta absoluta y relativa al consumo calórico de macronutrientes (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) y micronutrientes.

- Cuestionario de Actividad Física.

El Cuestionario Mundial sobre Actividad Física (GPAQ) recopila la información sobre la participación en la actividad física y sobre el comportamiento sedentario en tres campos. Estos campos son: actividad en el trabajo, actividad al desplazarse y actividad en el tiempo libre.

Se cumplimentó en la unidad de investigación, en cada una de las visitas que realizó el sujeto (visita basal y visita fina, tras 8 semanas del consumo del producto).

4.3.10. Variables de seguridad

Se realizó un análisis de bioquímica sanguínea donde se determinaron los valores de las enzimas GOT, GPT, GGT, LDH y de bilirrubina para la valoración de la función hepática, y biomoléculas tales como urea y creatinina para la valoración de la función renal. Así mismo se realizó un hemograma para valorar la serie roja, blanca y plaquetas. La obtención de la muestra sanguínea se realizó en condiciones de ayuno, y en dos ocasiones a lo largo del estudio, en situación basal y final.

En cada una de las visitas se realizó un registro y evaluación de los acontecimientos adversos. Cualquier tipo de acontecimiento adverso fue recogido cuando lo comunicó el participante, espontáneamente o por indicación del equipo de investigación, y fue descrito en registro correspondiente para documentar la tolerabilidad al mismo.

Estos registros contienen información sobre la naturaleza, severidad, tiempo de inicio y tiempo de duración de las reacciones adversas, las acciones tomadas para revertirlas y la probabilidad de que guarden relación con los productos del ensayo, además de cualquier otra cuestión que se estime oportuna. La notificación completa y oportuna de todos los acontecimientos adversos que se presentaron en asociación con la administración del producto en estudio sirvieron al promotor para identificar aquellas reacciones que pudieran estar posiblemente relacionadas con el compuesto.

4.4. DESARROLLO DEL ESTUDIO

Antes de la primera visita basal se llevó a cabo el reclutamiento, donde se le informó de forma oral y escrita sobre el procedimiento y desarrollo del estudio.

4.4.1. Fase de Reclutamiento

9 meses antes del inicio de la fase experimental se comenzó el periodo de reclutamiento. Se seleccionó a los posibles participantes de la población en general. Para ello se realizó una campaña de reclutamiento para la captación de voluntarios que querían participar en el estudio a través de material informativos, correo electrónico, sesiones informativas, etc.

4.4.2. Fase de Selección

En primer lugar, se entregó la Hoja de Información al Sujeto (Anexo 1), y una vez que los sujetos comprendieron todo lo referente al estudio y otorgaban su conformidad para participar en el mismo, firmaron el Consentimiento Informado.

Los sujetos fueron examinados y entrevistados previamente al comienzo del estudio para recoger los siguientes datos:

- Datos personales y demográficos.
- Anamnesis detallada, incluyendo datos sobre hábitos como alcohol, tabaco y otros referentes a su alimentación.
- Bioquímica inicial conforme a criterios de inclusión. Se realizó una analítica en ayunas para comprobar, el día de la visita basal, que los participantes cumplieran los criterios de selección del estudio.

4.4.3. Fase Experimental

Tras la fase de selección, los pacientes que cumplieron con todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión, se asignó a uno de los dos grupos del estudio.

El tiempo de desarrollo de la fase experimental fue de 8 semanas, tiempo en el que los participantes debían de consumir el producto objeto de estudio o placebo (dependiendo del grupo al que pertenecía).

Durante este proceso, los sujetos a estudio tuvieron que acudir a la unidad de investigación en dos ocasiones. La primera de ellas considerada visita 0 (visita basal), la cual realizaron antes de comenzar a consumir el producto; la segunda de ellas y última, coincidiendo con la semana 8 del consumo del producto. Para que todos los sujetos coincidieran en las visitas, se realizaron en un margen de 7 días.

El procedimiento y mediciones que se llevaron a cabo en cada una de las visitas fueron los siguientes:

Tabla 7. Procedimientos y mediciones en las visitas

Seguimiento	Basal	Visita semana 8
HIP y Consentimiento	X	

Criterios inclusión/exclusión.	X	
Antecedentes clínicos relevantes	X	
Historia dietética.	X	X
Cuestionario actividad física	X	X
Aleatorización.	X	
Entrega de producto	X	
Extracción sanguínea para determinación de las diferentes variables	X	X
Determinaciones composición corporal (BIA)	X	X
Presión arterial	X	X
Ecografía vascular	X	X
Pletismografía	X	X
Adherencia al producto	X	X
Acontecimientos adversos	X	X

4.5. COMITÉ DE ÉTICA

4.5.1. Comité de ética independiente

Una vez elaborado el protocolo del presente estudio de investigación, fue enviado al Comité de Ética de la Universidad Católica de Murcia y aprobado por este comité.

El informe de toxicidad oral aguda utilizado en el protocolo puede consultarse en el Anexo 3 (“Estudio de la toxicidad oral agua en ratas”).

Informe favorable emitido el 15/04/2016 por el comité de ética de la UCAM. Dicho informe puede consultarse en el Anexo 4 (“Comité de ética de la UCAM”).

4.5.2. Confidencialidad

El estudio se realizó siguiendo las Normas de Buena Práctica Clínica y las condiciones que deben regir los estudios de investigación con humanos que se delimitan en la Declaración de Helsinki.

Se mantuvo en todo momento los niveles más altos de conducta profesional y confidencialidad de todos los datos recogidos concernientes al estudio. Se

cumplió con la legislación nacional y europea vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos). De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, el participante pudo ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual únicamente debió dirigirse a su médico del estudio.

La identidad de los sujetos se codificó en los documentos del estudio y sólo personal debidamente autorizado tuvo acceso a los datos personales identificables en momentos donde los procedimientos de verificación de datos exigían la inspección de dicha información. Todos los datos consignados en los CRD fueron tratados de forma confidencial y siempre con el código del paciente, al igual que en los resultados del estudio y en las publicaciones derivadas del mismo, donde no aparecerán nunca sus datos personales.

4.5.3. Hoja de información y consentimiento informado de los sujetos

En el cumplimiento de lo establecido en la declaración de Helsinki, es responsabilidad del investigador informar al paciente sobre su participación en un estudio clínico, debiendo aclarar en tal caso, que esta participación es voluntaria. El investigador obtuvo por escrito, el consentimiento informado y voluntario del paciente. En el modelo de consentimiento se debió constar la fecha y firmas del investigador y del sujeto a estudio.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se nombró un técnico de apoyo a la investigación cuya principal función fue asegurarse de que el estudio se realizara conforme a lo exigido en el protocolo. Revisó los CRD individualmente y comprobó que todos los datos se habían recogido correctamente.

Los datos de todos los CRD fueron introducidos en una base de datos creada a tal fin y dotada de márgenes de seguridad y normas de coherencia interna, tras

lo cual se repasaron los casos que presentaron valores anómalos o incoherentes. Los datos de identificación de cada paciente no se incorporaron a la base de datos en la que se recogían las variables objeto de estudio. Al finalizar el estudio se procedió a su análisis estadístico.

4.6.1. Estudio descriptivo de las variables.

Se realizó un análisis descriptivo (media y desviación estándar) de todas las variables en estudio, tanto de las condiciones basales de cada una de ellas como de su evolución. Este análisis se realizó para el grupo total de individuos que participaron en el estudio.

4.6.2. Estudio comparativo entre grupos en estado basal.

La homogeneidad de la población en el estado basal con respecto a variables demográficas, antecedentes médicos y otros parámetros clínicos también fueron analizados. Para las variables cuantitativas se desarrollaron comparaciones de t-Student entre las dos ramas del estudio. Las variables cualitativas fueron analizadas mediante test de homogeneidad, basadas en la distribución Chi-cuadrado cuando los valores esperados lo hicieron posible y mediante test exactos de Fisher en caso contrario.

4.6.3. Evolución de las variables.

Para analizar las diferencias entre los grupos (experimental y control) en la evolución de las distintas variables se realizó un análisis de varianza para medidas repetidas con un factor intrasujeto (tiempo: basal y final) y un factor intersujeto (producto: producto experimental y producto placebo). De esta manera se establecieron diferencias en cada una de las variables analizadas, atendiendo a estos factores. Para el análisis post-hoc se realizó test de Tukey o de Bonferroni. Se realizaron las comparaciones para aquellos efectos significativos con la opción de asumir o no igualdad de varianzas.

En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizado fue de 0,05. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software informático SPSS 25.0 (Chicago, IL, EE.UU.).

V – RESULTADOS

V - RESULTADOS

5.1. DIAGRAMA DE FLUJO

Iniciaron el estudio 114 sujetos de los que 4 fueron excluidos por motivo de incumplimiento de los criterios de selección. Los 110 sujetos restantes fueron aleatorizados en los dos grupos a estudio. Durante el estudio se perdieron en el seguimiento 4 sujetos en el grupo experimental y 10 en el placebo por no acudir a las visitas y por motivos personales. Por tanto, se realizó el análisis por protocolo de 96 sujetos: 51 consumieron el producto experimental y 45 consumieron el producto placebo.

Si atendemos al grupo que consumió el producto experimental, de los 51 sujetos que finalizaron el estudio, 27 eran hombres (52,9%) y 24 eran mujeres (47,1%); la edad media de este grupo fue de $47,3 \pm 11,2$ años.

Si atendemos al grupo que consumió el producto placebo, de los 45 sujetos que finalizaron el estudio, 26 eran hombres (57,8%) y 19 eran mujeres (42,2%); la edad media de este grupo fue de $51,3 \pm 10,8$ años.

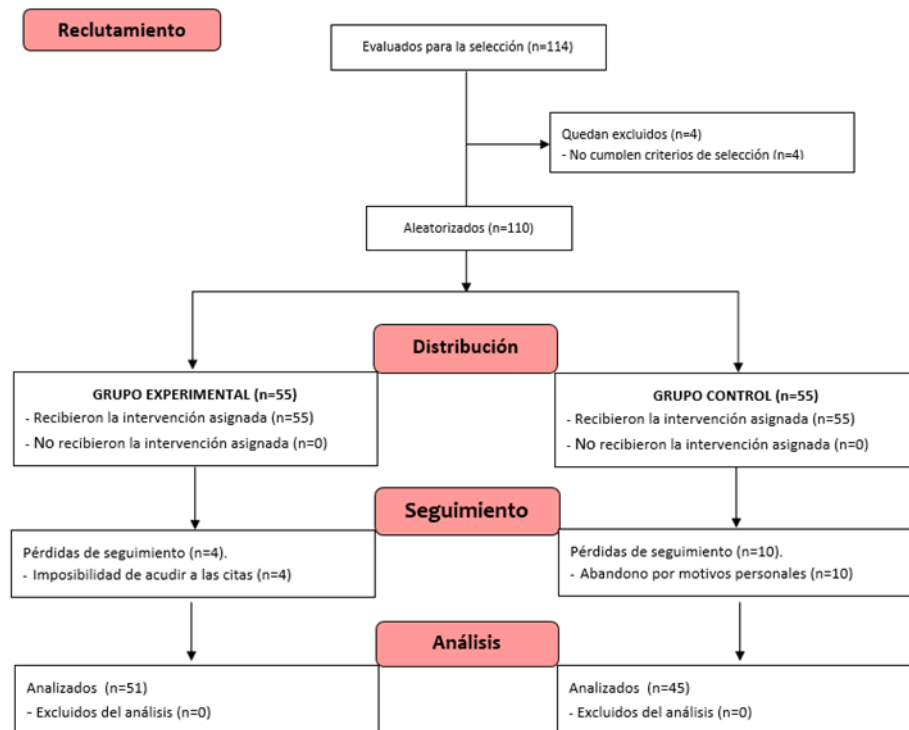


Figura 26. Diagrama de flujo de la población de estudio.

5.2. RIESGO CARDIOVASCULAR

5.2.1. Vasodilatación dependiente de endotelio

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 8. Vasodilatación dependiente de endotelio (%) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	6,73	5,27
	Placebo	6,85	4,56
FINAL	Experimental	9,77	5,56
	Placebo	7,39	5,81

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,370$), por lo que podemos afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,636$), por tanto, no podemos afirmar que en el consumo del placebo haya modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
 - Grupo experimental. Se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p<0,001$) por lo que podemos afirmar que el consumo del producto experimental mejora los niveles de esta variable durante la ingesta.

- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución entre ambos grupos, observamos diferencias significativas ($p=0,039$), es decir el producto incrementa la vasodilatación dependiente de endotelio al compararlo con el placebo.

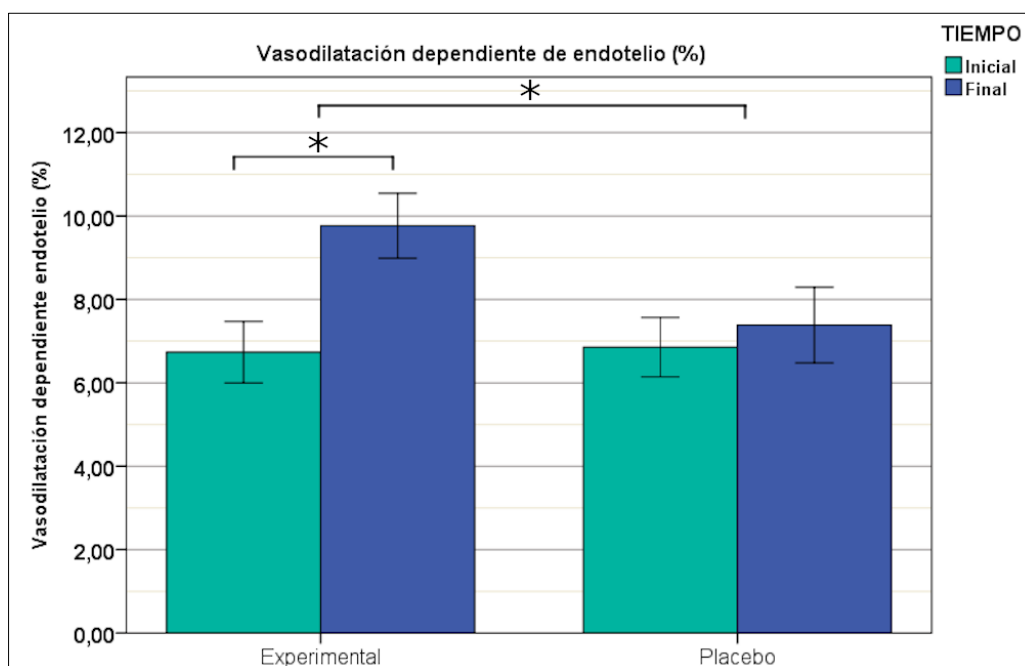


Figura 27. Vasodilatación dependiente de endotelio (%) en función del producto de ingesta. Significación estadística: * $p < 0.05$

5.2.2. Homocisteína sérica

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 9. Homocisteína sérica ($\mu\text{mol/L}$) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	9,42	3,15
	Placebo	9,23	2,92
FINAL	Experimental	9,02	2,87
	Placebo	9,15	3,09

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,751$). Por lo que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,879$), por tanto, no podemos afirmar que en el consumo de placebo haya modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
 - Grupo experimental. Apreciamos un pequeño descenso en los valores de esta variable, pero no presenta significación estadística ($p=0,417$).
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución entre ambos grupos, no observamos diferencias significativas ($p=0,656$), por lo que el producto experimental no mejora en mayor medida el valor de esta variable con respecto al producto placebo.

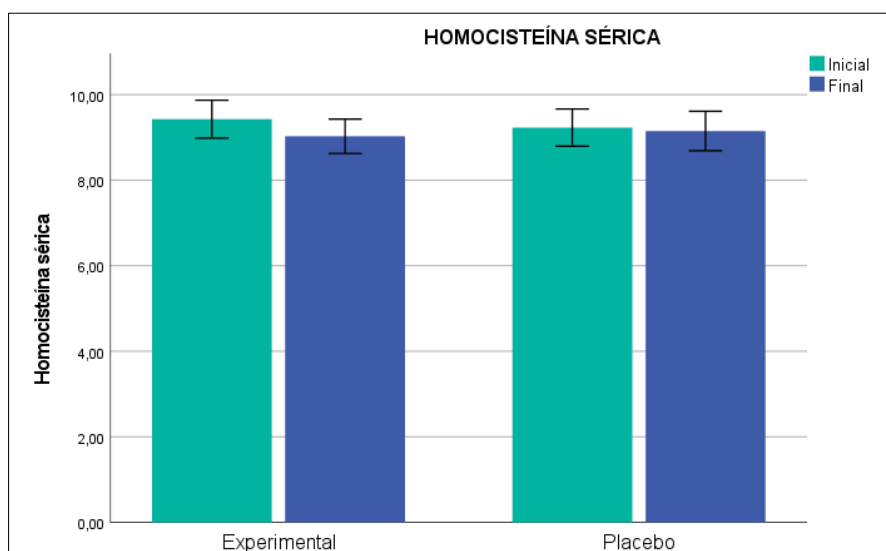


Figura 28. Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$) en función del producto de ingesta.

5.3. PRESIÓN ARTERIAL

5.3.1. Presión arterial sistólica

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 10. Presión Arterial Sistólica (mm Hg) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	123,59	13,80
	Placebo	122,81	8,85
FINAL	Experimental	118,69	11,88
	Placebo	120,83	11,60

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,753$), por lo que se puede afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el momento inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No hay diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,203$). Por lo que los sujetos que han consumido el producto placebo no han obtenido modificaciones en los niveles de esta variable durante el tiempo de ingesta.
 - Grupo experimental. Se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p<0,001$). Esto determina que el consumo del producto experimental disminuye los niveles de tensión arterial sistólica.

- Comparación entre grupos. A pesar de obtener resultados significativos en el grupo experimental, al comparar la evolución de ambos grupos, no se observan diferencias significativas ($p=0,168$), por lo que no se puede determinar que el producto experimental mejore los valores de la tensión arterial sistólica con respecto a los sujetos que consumieron el producto placebo, aunque si se puede indicar que existe una tendencia a que el producto experimental mejore en mayor medida la tensión arterial sistólica que el placebo.

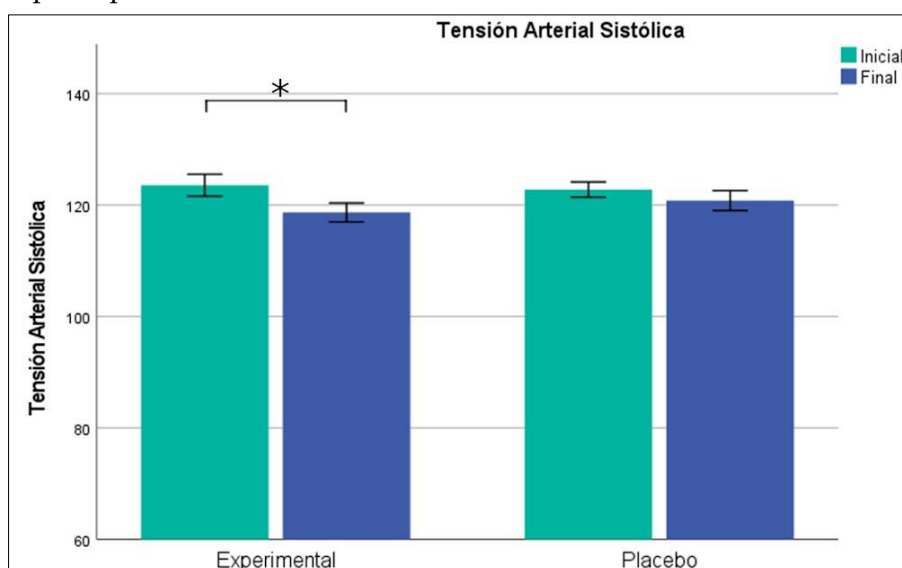


Figura 29. Presión Arterial Sistólica (mm Hg) en función del producto de ingesta.

5.3.2. Presión arterial diastólica

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 11. Presión Arterial Diastólica (mm Hg) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	84,16	9,19
	Placebo	79,67	8,28
FINAL	Experimental	81,67	8,91
	Placebo	80,79	7,82

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. Los grupos en su estado inicial son heterogéneos para esta variable, apreciando diferencias significativas ($p < 0,017$). El grupo experimental presenta valores iniciales mayores que el grupo placebo.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p = 0,392$) en la ingesta del producto placebo.
 - Grupo experimental. Se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p < 0,041$) por lo que se afirma que el consumo del producto experimental mejora los niveles de esta variable durante la ingesta. Los sujetos que han consumido este producto disminuyen la tensión arterial diastólica.
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución entre ambos grupos y teniendo en cuenta que se partía de grupos heterogéneos, se ha podido observar diferencias significativas ($p < 0,045$). Por tanto, el producto objeto de estudio mejora la tensión arterial diastólica con respecto al producto placebo.

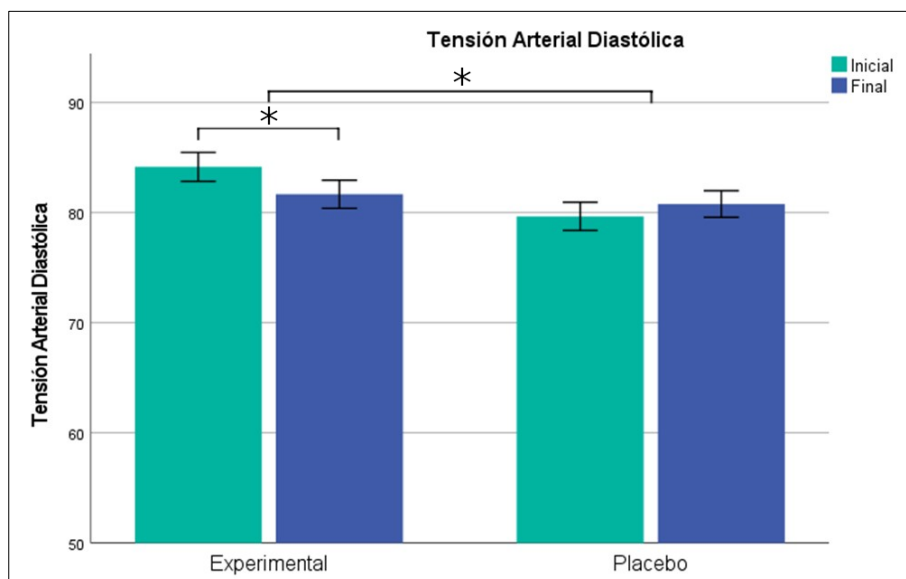


Figura 30. Presión Arterial Diastólica (mm Hg) en función del producto de ingesta.

5.4. PERFIL LIPÍDICO

5.4.1. Colesterol total.

Tabla 12. Niveles de colesterol total (mg/dL) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	242,22	31,95
	Placebo	235,67	38,92
FINAL	Experimental	228,65	29,57
	Placebo	242,04	35,63

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,368$), por lo que se puede determinar que ambos grupos son homogéneos para esta variable.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,117$). Por lo que para el consumo de placebo no modifica esta variable durante la ingesta.
- Grupo experimental. Se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p<0,001$). Se puede afirmar que el consumo del producto en experimentación mejora los niveles de esta variable durante la ingesta.
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución de ambos grupos, se observan diferencias significativas ($p<0,001$), por lo que podemos confirmar que el producto experimental mejora el valor de esta variable en mayor medida que el producto placebo.

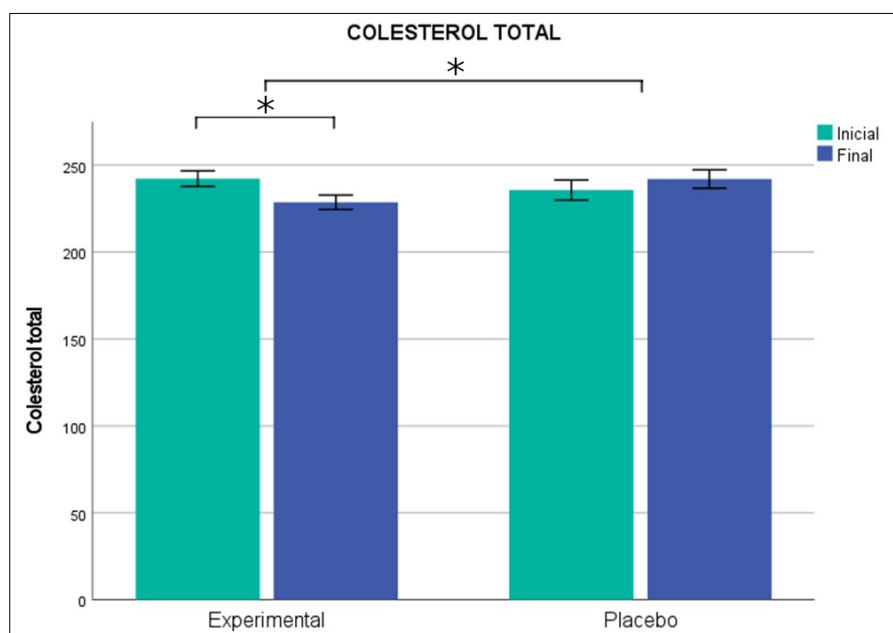


Figura 31. Niveles de colesterol total (mg/dL) en función del producto de ingesta.

5.4.2. Colesterol LDL

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 13. Niveles de colesterol LDL (mg/dL) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	144,20	28,08
	Placebo	138,80	31,32
FINAL	Experimental	135,39	26,56
	Placebo	139,91	28,01

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se observan diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,376$), por lo que son grupos homogéneos.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.

- Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,717$). Esto determina que el consumo de placebo no ha modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
- Grupo experimental. Se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p<0,003$), por lo que se puede afirmar que el consumo del producto experimental mejora los niveles de esta variable tras la ingesta.
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución de ambos grupos, se observan diferencias significativas ($p<0,020$). Es por ello por lo que se puede afirmar que el producto experimental mejora el valor de esta variable en mayor medida que el producto placebo.

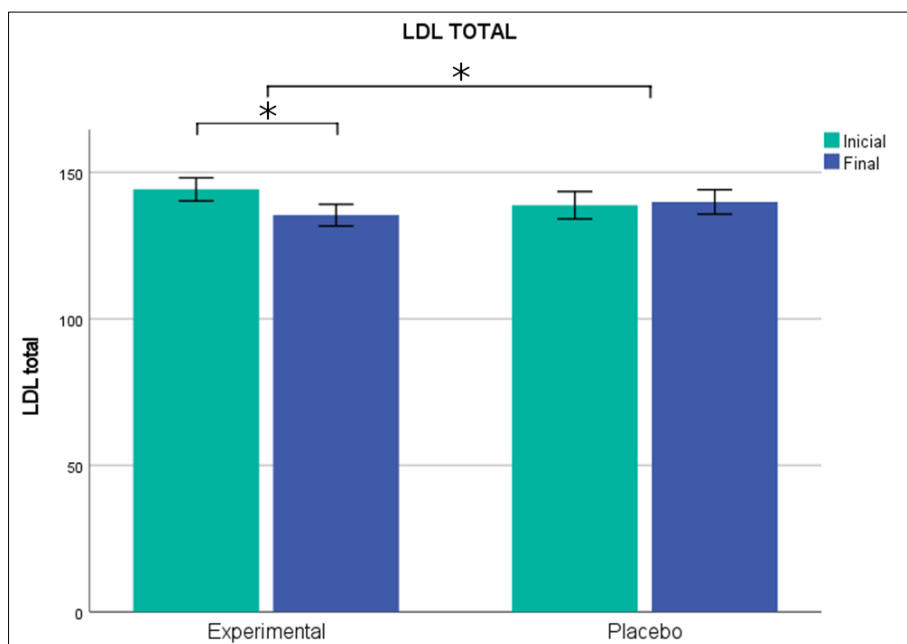


Figura 32. Niveles de colesterol LDL (mg/dL) en función del producto de ingesta.

5.4.3. Colesterol HDL

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 14. Niveles de colesterol HDL (mg/dL) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	63,63	12,85
	Placebo	63,16	15,77
FINAL	Experimental	65,27	13,12
	Placebo	62,07	16,45

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,872$). Es decir, se puede afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,412$). El consumo del placebo no ha modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
 - Grupo experimental. No se aprecia significación estadística ($p=0,188$) para la evolución de esta variable.
- Comparación entre grupos. La evolución de ambos grupos no presenta diferencias significativas ($p=0,135$) entre ellos. Por lo que no se puede afirmar que el producto experimental mejore más el valor de esta variable con respecto al producto placebo.

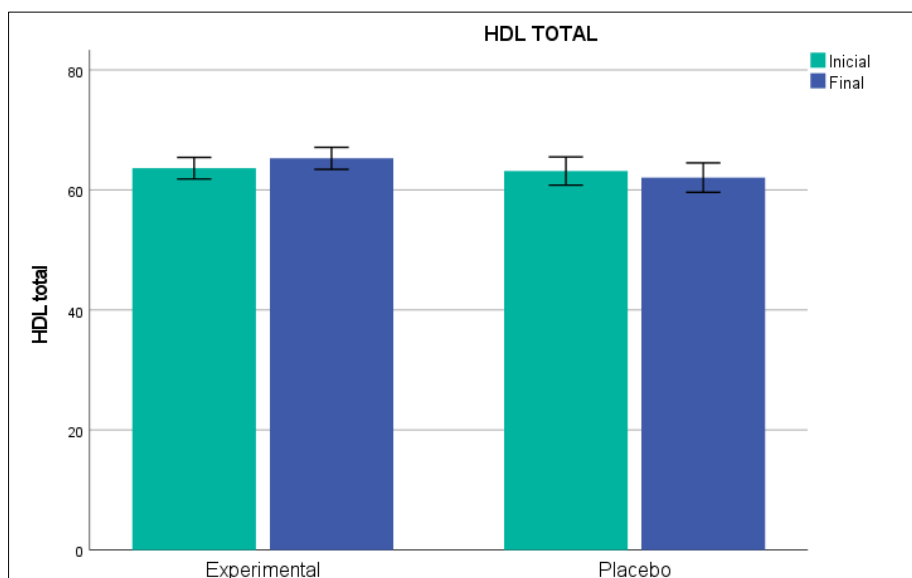


Figura 33. Niveles de colesterol HDL (mg/dL) en función del producto de ingesta.

5.4.4. Triglicéridos

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 15. Niveles de triglicéridos (mg/dL) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	115,08	53,99
	Placebo	118,93	55,07
FINAL	Experimental	115,55	67,10
	Placebo	124,96	74,07

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecia significación estadística al comparar los valores iniciales ($p=0,730$). Ambos grupos no son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,462$), por lo que no es posible afirmar

- que en el consumo del placebo provoque modificaciones en los niveles de esta variable durante la ingesta.
- Grupo experimental. No se observa ninguna modificación significativa ($p=0,951$) en los valores de esta variable tras el consumo del producto experimental.
 - Comparación entre grupos. Al comparar la evolución entre ambos grupos, no se observan diferencias significativas ($p=0,247$). Por lo que el producto experimental no provoca cambios para esta variable.

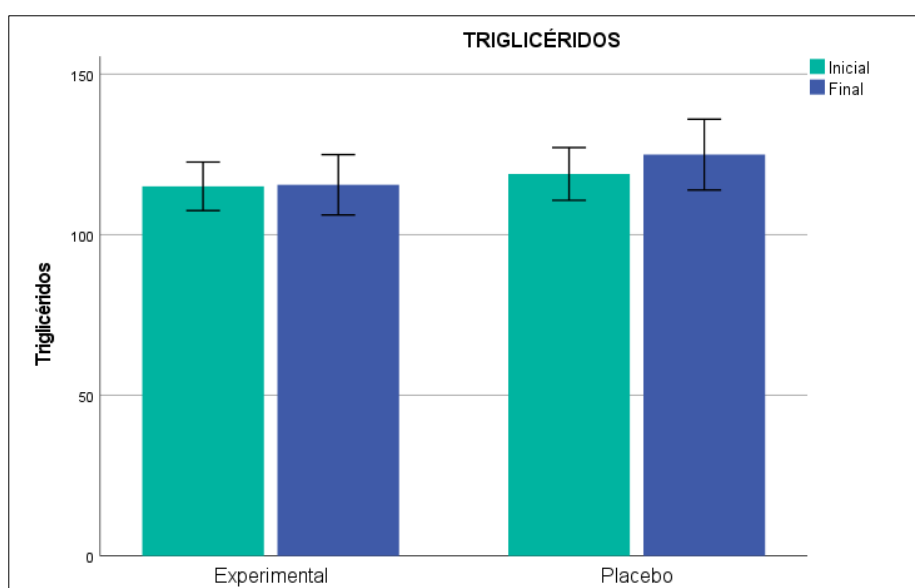


Figura 34. Niveles de triglicéridos (mg/dL) en función del producto de ingesta.

5.4.5. Colesterol LDL oxidada

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 16. Niveles de colesterol LDL oxidado (pg/mL) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	810,30	555,42
	Placebo	656,58	402,36
FINAL	Experimental	467,46	239,63
	Placebo	692,24	363,86

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,128$), por lo que son grupos homogéneos en esta variable.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,571$), por lo que no podemos afirmar que el consumo del placebo provoque modificaciones en los niveles de esta variable tras el consumo.
 - Grupo experimental. Se aprecia un gran descenso en los valores de esta variable, presentando significación estadística ($p<0,001$).
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución entre ambos grupos, observamos diferencias significativas ($p<0,001$), lo que hace que se pueda confirmar que el producto experimental mejora el valor de esta variable, algo que no ocurre con el producto placebo.

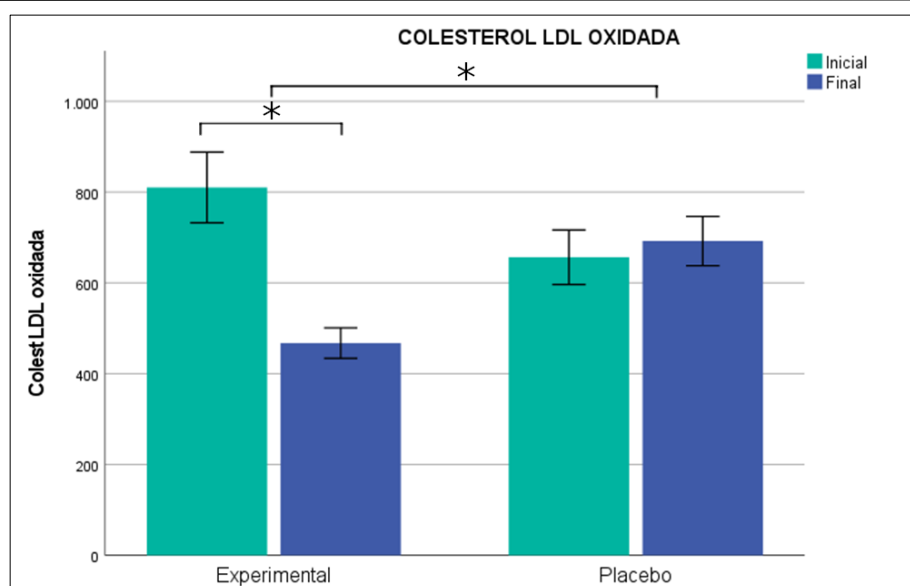


Figura 35. Niveles de colesterol LDL oxidada (pg/mL) en función del producto de ingesta.

5.5. ESTATUS TROMBÓTICO

5.5.1. Factor de Von Willebrand

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 17. Factor de Von Willebrand (%) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	120,95	45,92
	Placebo	119,46	50,39
FINAL	Experimental	119,86	36,74
	Placebo	124,40	46,01

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,882$), por lo que podemos afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se determinan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,374$), por lo que los sujetos que han consumido el placebo no han modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
 - Grupo experimental. No se determina ninguna diferencia significativa a nivel estadístico ($p=0,833$) para los valores de esta variable tras el consumo de esta variable.
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución de ambos grupos no observamos diferencias significativas ($p=0,426$), por lo que no podemos confirmar que el producto experimental mejora el valor de esta variable en mayor medida que el producto placebo.

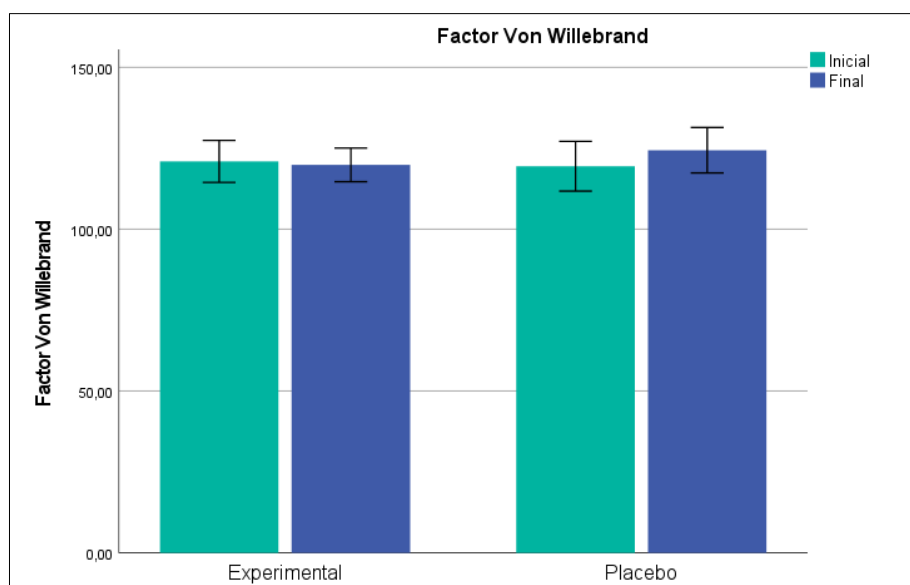


Figura 36. Factor de Von Willebrand (%) en función del producto de ingesta.

5.6. ESTATUS ANTIOXIDANTE

5.6.1. Glutación oxidado (GSSG)

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 18. Glutación oxidado (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	0,471	0,095
	Placebo	0,519	0,092
FINAL	Experimental	0,347	0,159
	Placebo	0,483	0,115

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,070$), por lo que son grupos homogéneos.

- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. Los sujetos que han consumido el producto placebo no tienen diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,345$), por lo que no se puede determinar que tengan modificaciones después de la ingesta.
 - Grupo experimental. Se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p<0,001$), por lo que podemos afirmar que el consumo del producto experimental disminuye los niveles de esta variable durante la ingesta.
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución de los dos grupos para esta variable, no se observan diferencias significativas ($p=0,081$). A pesar de que los sujetos que han consumido el producto experimental mejoran los valores para esta variable después de la ingesta, no se puede determinar que dicha mejora sea mayor que la que realizan los sujetos que consumen el producto placebo.

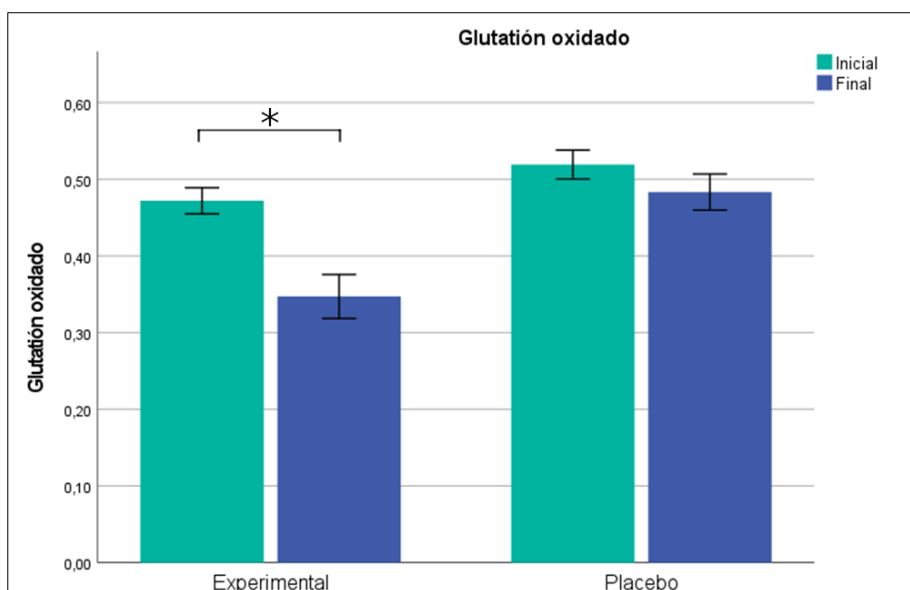


Figura 37. Glutación oxidado (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.

5.6.2. Glutación reducido (GSH)

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 19. Glutación reducido (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	22,61	6,03
	Placebo	21,87	3,07
FINAL	Experimental	23,60	3,01
	Placebo	22,07	3,11

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se consideran diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,590$), por lo que podemos determinar que ambos grupos son homogéneos para esta variable.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,864$), por lo que no hay modificaciones en los niveles de esta variable tras la ingesta del producto placebo.
 - Grupo experimental. Los sujetos que han consumido el producto experimental no presentan modificaciones en los valores de forma estadísticamente significativa ($p=0,342$), a pesar de observarse una tendencia al aumento de los valores en esta variable.

- Comparación entre grupos. Al igual que no se observan mejoras en ambos grupos, tampoco se encuentran mejoras significativas cuando se observa la evolución de ambos grupos ($p=0,617$).

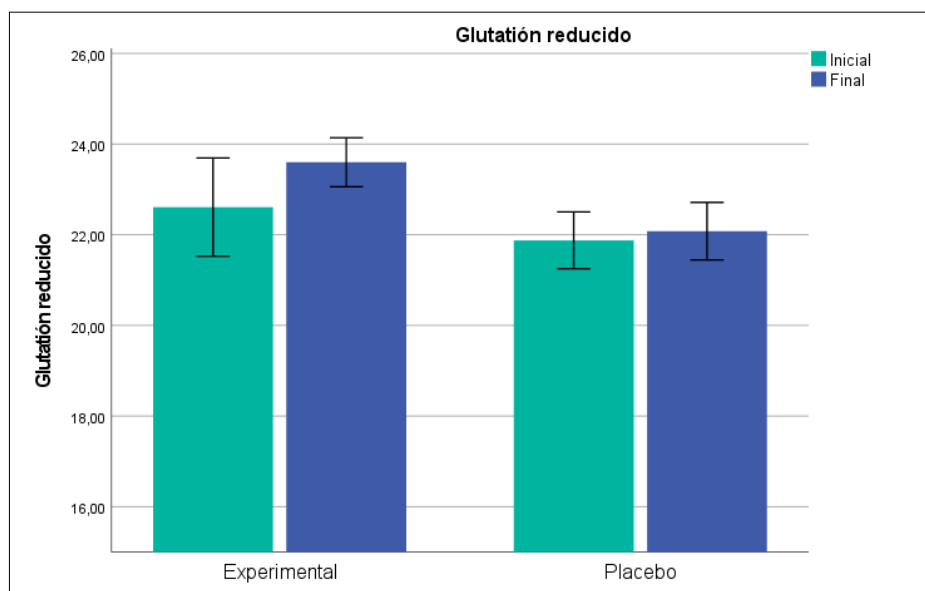


Figura 38. Glutación reducido (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.

5.6.3. Cociente GSH / GSSG

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 20. Glutación reducido entre el glutación oxidado (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	49,84	15,37
	Placebo	43,76	11,95
FINAL	Experimental	81,87	33,84
	Placebo	47,58	10,92

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. Teniendo en cuenta esta variable, ambos grupos son homogéneos ya que parten de las mismas características en el instante inicial del estudio ($p=0,116$).

- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas ($p=0,580$) en la evolución de esta variable, tras el consumo del producto placebo.
 - Grupo experimental. Se aprecia un aumento en los valores de esta variable, mostrando diferencias significativas ($p<0,001$).
- Comparación entre grupos. Al comparar el grupo placebo y experimental, se determinan diferencias significativas ($p<0,003$). Es decir, el producto experimental mejora el valor de esta variable en mayor medida que el producto placebo.

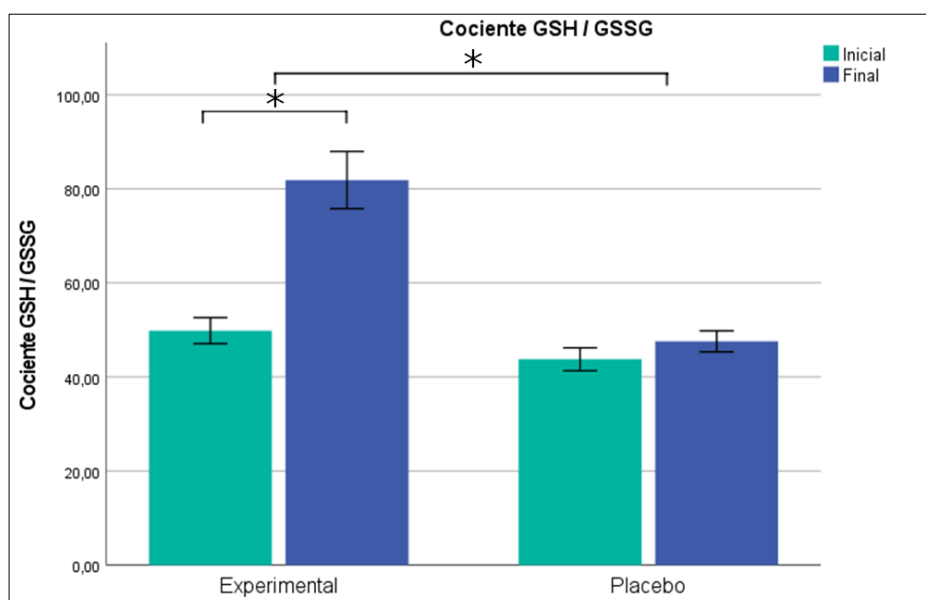


Figura 39. Glutatión reducido entre el glutatión oxidado (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.

5.6.4. Grupos carbonilo

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 21. Niveles de los grupos carbonilos (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	0,940	0,476
	Placebo	0,773	0,538
FINAL	Experimental	0,648	0,297
	Placebo	0,786	0,442

Los resultados de la media se expresan en nmol/mg proteína.

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,110$), por lo que se consideran homogéneos para esta variable.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. La evolución de los sujetos que han consumido el producto placebo no tiene diferencias significativas ($p=0,881$) en los valores de esta variable, por lo que no presentan ninguna modificación en sus niveles.
 - Grupo experimental. Se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p<0,001$). Se puede afirmar que el consumo del producto en experimentación disminuye los niveles de esta variable durante la ingesta.

- Comparación entre grupos. A la hora de comparar la evolución de ambos grupos se pueden observar diferencias significativas ($p < 0,012$). Por lo que el grupo experimental consigue mejoras que los sujetos que tomaban producto placebo no tenían.

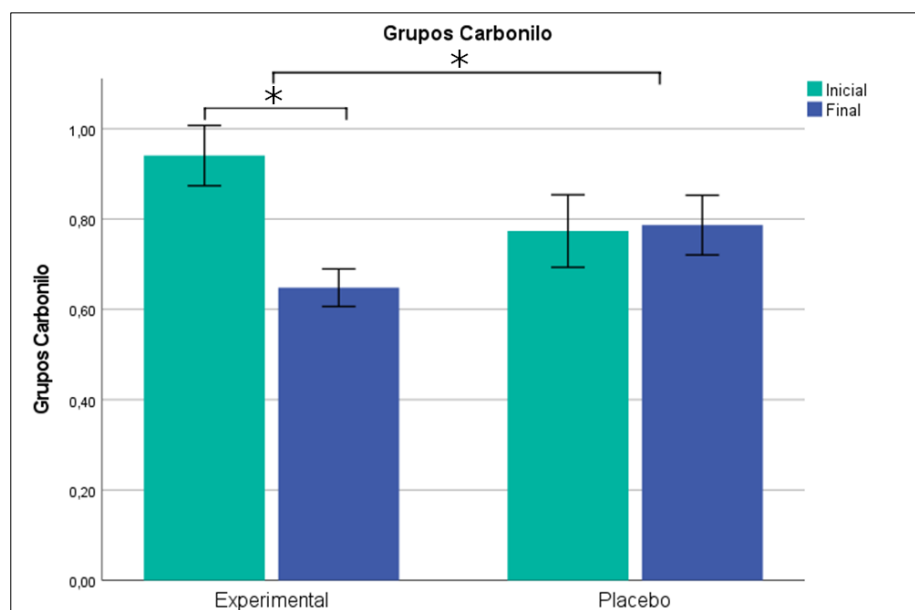


Figura 40. Niveles de los grupos carbonilos (nmol/mg proteína) en función del producto de ingesta.

5.7. ESTATUS INFLAMATORIO

5.7.1. Proteína C reactiva

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 22. Niveles de la proteína C reactiva (mg/L) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	2,53	3,07
	Placebo	2,06	2,50
FINAL	Experimental	2,35	2,61
	Placebo	1,91	1,87

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,427$), por lo que podemos afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,716$), por tanto, no podemos afirmar que en el consumo del placebo haya modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
 - Grupo experimental. No se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,641$) por lo que no podemos afirmar que el consumo del producto experimental no mejora los niveles de esta variable durante la ingesta.
- Comparación entre grupos. Tampoco se encuentran diferencias significativas al comparar la evolución entre ambos grupos ($p=0,960$), por lo que no se puede determinar que el producto experimental mejore el valor de esta variable en mayor medida con respecto al producto placebo.

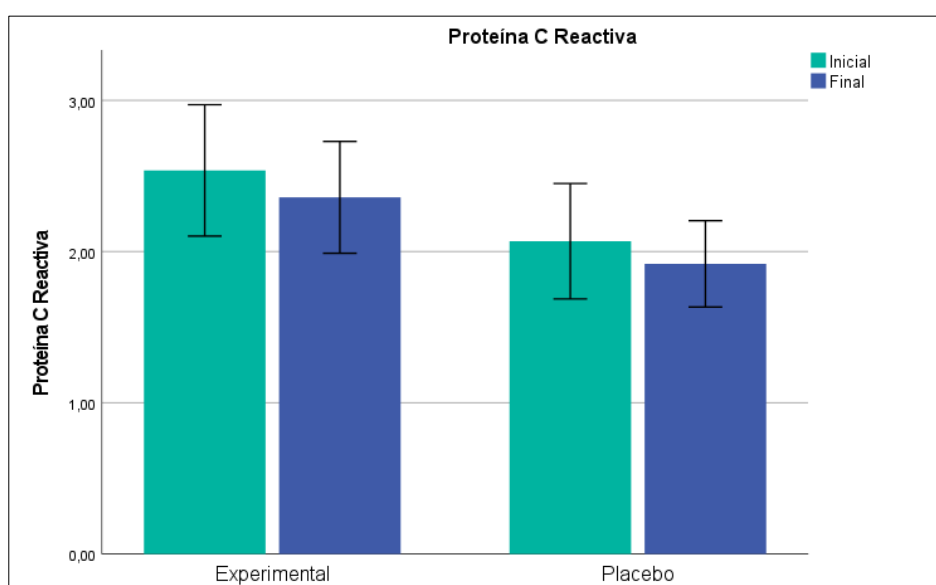


Figura 41. Niveles de la proteína C reactiva (mg/L) en función del producto de ingesta.

5.7.2. Interleucina 6

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 23. Niveles de Interleucina 6 reactiva (pg/mL) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	1,49	0,96
	Placebo	1,38	1,82
FINAL	Experimental	0,91	0,56
	Placebo	1,52	2,24

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,730$), por lo que se puede determinar que ambos grupos son homogéneos para esta variable.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,251$). Por lo que para el consumo de placebo no modifica esta variable durante la ingesta.
 - Grupo experimental. Se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p<0,001$). Se puede afirmar que el consumo del producto en experimentación mejora los niveles de esta variable durante las 8 semanas de ingesta.
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución de ambos grupos, se observan diferencias significativas ($p<0,001$), por lo que se puede determinar que el producto experimental disminuye el valor de esta variable en mayor medida que el producto placebo.

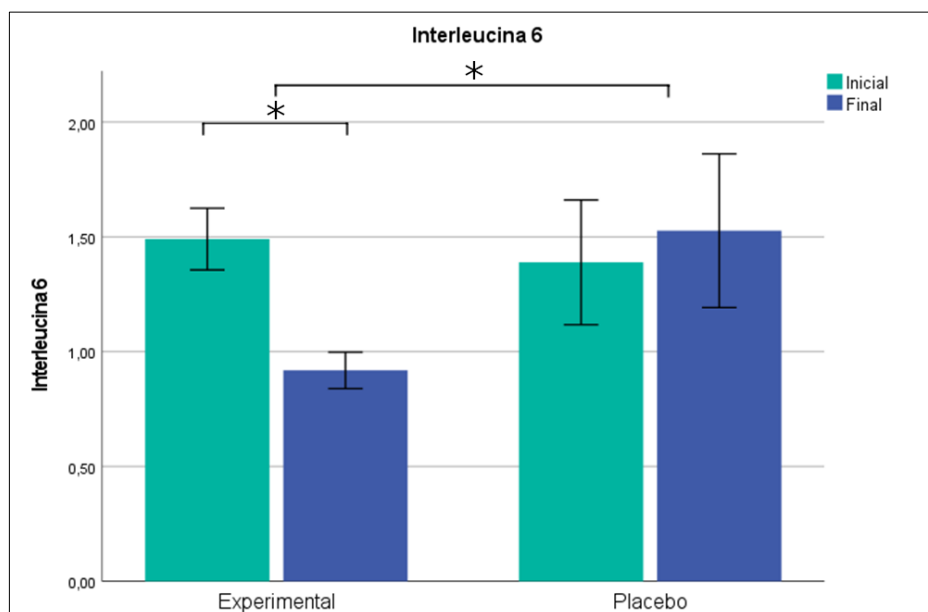


Figura 42. Niveles de Interleucina 6 reactiva (pg/mL) en función del producto de ingesta.

5.7.3. Factor de necrosis tumoral alfa

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 24. Niveles del factor de necrosis tumoral alfa (pg/mL) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	6,82	0,64
	Placebo	6,96	0,61
FINAL	Experimental	6,63	1,04
	Placebo	6,97	0,81

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,255$). Es decir, se puede afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.

- Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,974$). Esto determina que el consumo de placebo no ha modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
- Grupo experimental. No se aprecia significación estadística ($p=0,250$) para la evolución de esta variable.
- Comparación entre grupos. La evolución de ambos grupos no presenta diferencias significativas ($p=0,417$) entre ellos. Por lo que no se puede afirmar que el producto experimental mejore más el valor de esta variable con respecto al producto placebo.

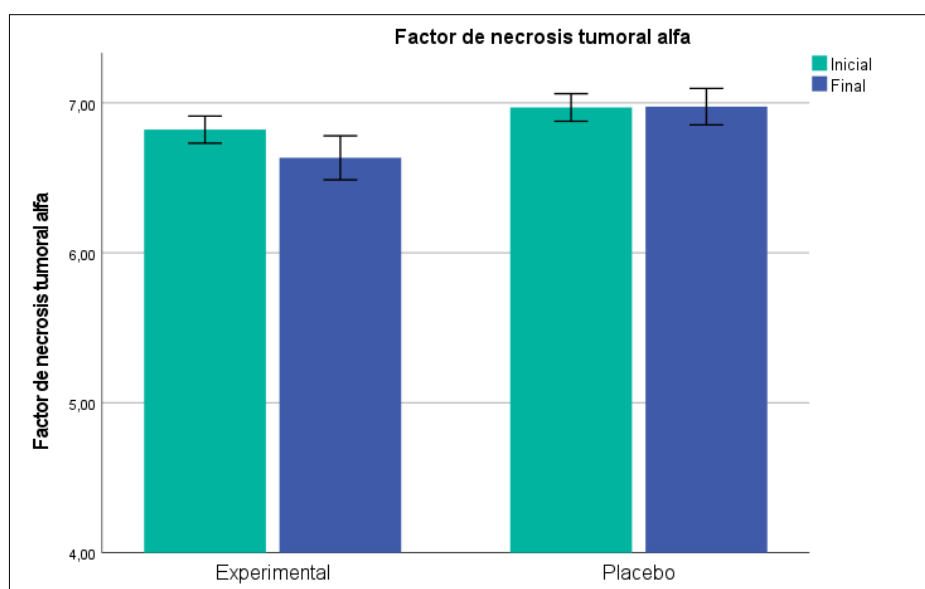


Figura 43. Niveles del factor de necrosis tumoral alfa (pg/mL) en función del producto de ingesta.

5.8. ANTROPOMETRÍA

5.8.1. Peso

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 25. Peso corporal (kg) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	76,85	13,90
	Placebo	76,74	14,83
FINAL	Experimental	76,70	14,63
	Placebo	76,79	14,92

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,969$), por lo que podemos afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,891$), por tanto, no podemos afirmar que en el consumo del placebo haya modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
 - Grupo experimental. No se determina ningún cambio en los valores de esta variable a nivel estadísticamente significativo ($p=0,695$).
- Comparación entre grupos. No se observan diferencias significativas ($p=0,712$) para la variable peso entre el grupo experimental y grupo placebo.

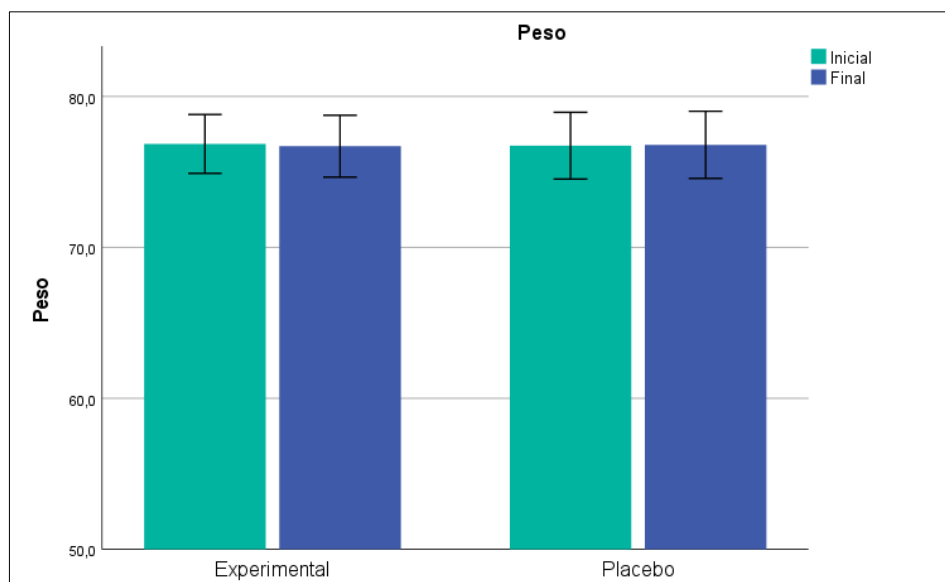


Figura 44. Peso corporal (kg) en función del producto de ingesta.

5.8.2. Índice de masa corporal

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 26. Índice de masa corporal (kg/m^2) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	27,16	4,25
	Placebo	26,48	3,86
FINAL	Experimental	27,08	4,25
	Placebo	26,51	3,84

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,417$). Es decir, se puede afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.

- Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,711$). El consumo del placebo no ha modificado los niveles de esta variable durante la ingesta.
- Grupo experimental. No se aprecia significación estadística ($p=0,286$) para la evolución de esta variable.
- Comparación entre grupos. La evolución de ambos grupos no presenta diferencias significativas ($p=0,317$) entre ellos. Por lo que no se puede afirmar que el producto experimental mejore más el valor de esta variable con respecto al producto placebo.

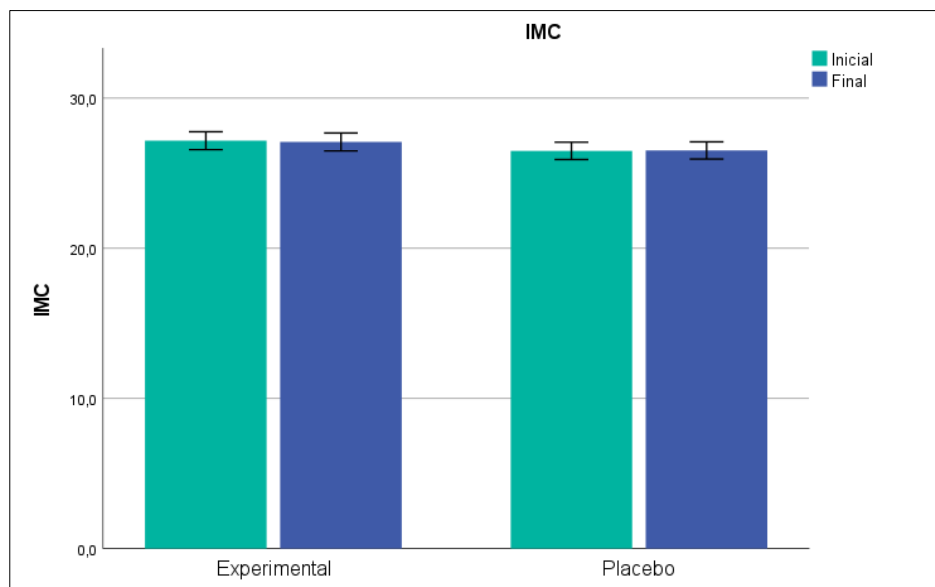


Figura 45. Índice de masa corporal (kg/m^2) en función del producto de ingesta.

5.8.3. Masa grasa

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 27. Masa grasa (kg) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	25,43	11,75
	Placebo	21,84	7,54
FINAL	Experimental	25,11	11,43
	Placebo	22,15	8,05

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se encuentran diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,084$).
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,775$), por lo que no existen modificaciones para el grupo placebo de esta variable.
 - Grupo experimental. No hay diferencias significativas en la evolución de esta variable para los sujetos que han consumido producto experimental ($p=0,752$).
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución entre ambos grupos, no observamos diferencias significativas ($p=0,671$), por lo que no podemos afirmar que el producto experimental mejore más el valor de esta variable que el producto placebo.

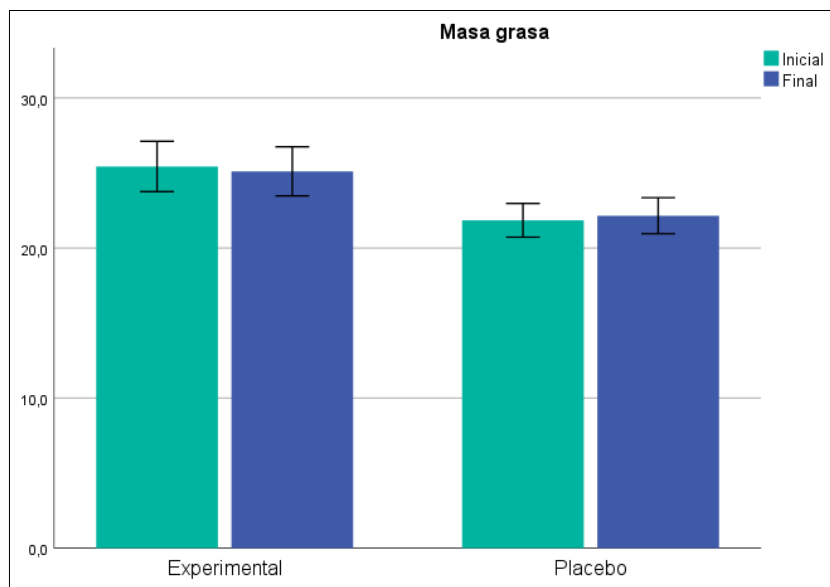


Figura 46. Masa grasa (kg) en función del producto de ingesta.

5.9. CALIDAD DE VIDA

5.9.1. Salud física

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 28. Nivel de salud física (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	76,58	17,35
	Placebo	82,18	11,15
FINAL	Experimental	78,96	16,81
	Placebo	82,84	11,92

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,090$), por lo que podemos afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial del estudio.

- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. La evolución de esta variable no muestra diferencias significativas ($p=0,721$), por lo que el consumo del placebo no provoca modificaciones en los niveles de esta variable.
 - Grupo experimental. No hay ninguna modificación significativa en la evolución de esta variable de los niveles de salud física ($p=0,163$).
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución de ambos grupos, no se aprecia diferencias significativas ($p=0,493$).

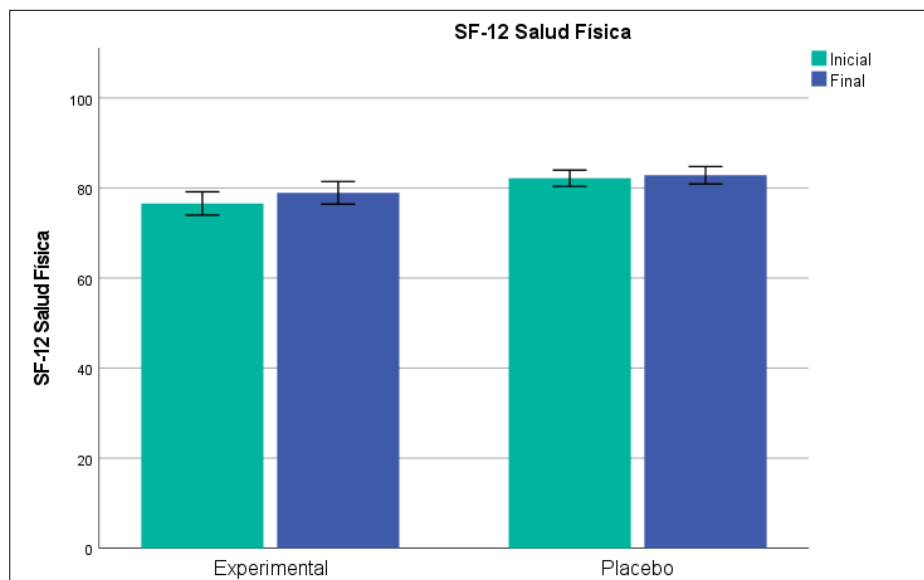


Figura 47. Nivel de salud física (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.

5.9.2. Salud mental

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 29. Nivel de salud mental (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	75,00	17,07
	Placebo	78,53	12,55
FINAL	Experimental	77,71	17,22
	Placebo	78,47	13,83

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,295$). Es por ello por lo que son grupos homogéneos para esta variable.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. El consumo de placebo no ofrece ninguna modificación en los niveles de esta variable durante la ingesta. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,980$).
 - Grupo experimental. Para el grupo experimental no se observan diferencias significativas en la evolución de esta variable ($p=0,168$), por lo que no se puede determinar que mejore los niveles de la variable durante la ingesta.
- Comparación entre grupos. El producto placebo y experimental no modifican la salud mental de los sujetos durante el consumo. Por lo que no se aprecia significación estadística ($p=0,340$).

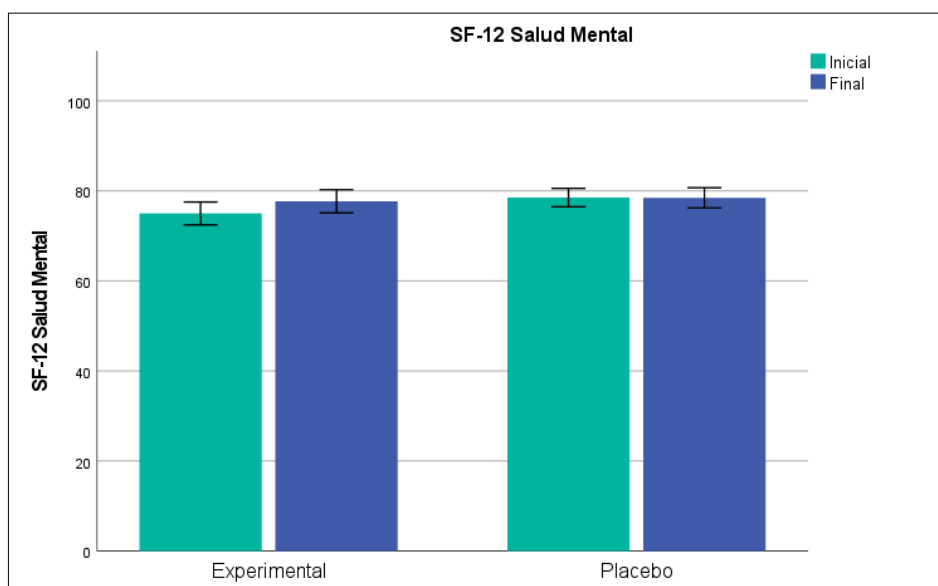


Figura 48. Nivel de salud mental (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.

5.9.3. Puntuación global

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 30. Nivel de calidad de vida (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	75,67	15,73
	Placebo	80,74	9,95
FINAL	Experimental	77,87	15,09
	Placebo	80,24	10,53

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de puntuación global del cuestionario SF-12 en el momento de inicio del estudio ($p=0,090$). Por lo que para esta variable se consideran grupos homogéneos.
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.

- Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución de esta variable para los sujetos que consumieron producto placebo ($p=0,768$).
- Grupo experimental. No se aprecian diferencias estadísticas para esta variable en los sujetos que consumieron producto experimental ($p=0,161$).
- Comparación entre grupos. Al comparar la evolución entre ambos grupos, no observamos diferencias significativas ($p=0,243$), por lo que no podemos afirmar que el producto experimental mejore más el valor de esta variable que el producto placebo.

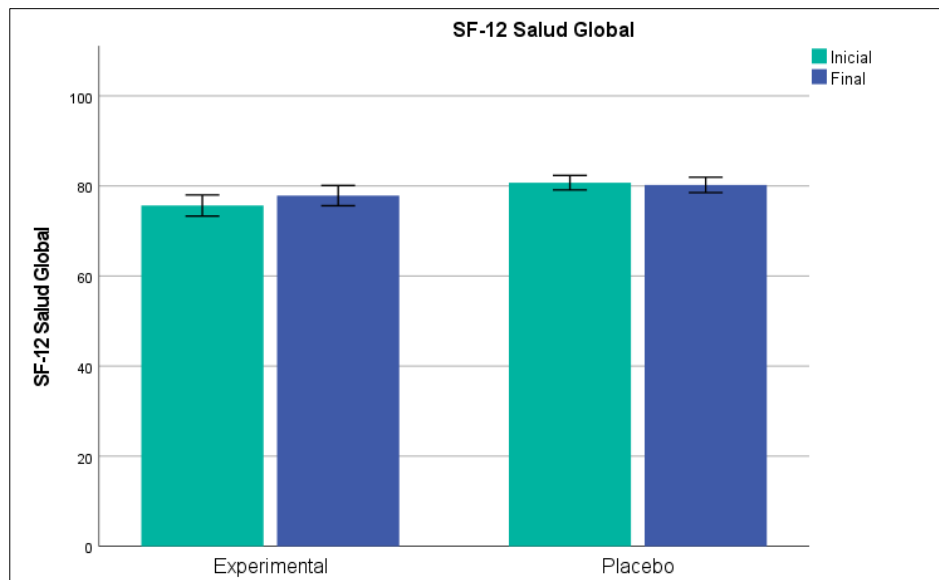


Figura 49. Nivel de calidad de vida (valor de puntuación de la escala SF-12) en función del producto de ingesta.

5.10. ACTIVIDAD FÍSICA

5.10.1. Nivel de actividad física

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 31. Nivel de actividad física (MET-minutos/semana) en función del producto de ingesta.

	Producto	Media	Desviación típica
INICIAL	Experimental	3125,22	3582,13
	Placebo	3260,62	3261,04
FINAL	Experimental	3004,35	3254,07
	Placebo	3254,55	3121,69

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo:

- Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. El nivel de actividad física para ambos grupos era homogéneo, ya que no se encuentran diferencias significativas entre ambos en el momento de inicio del estudio ($p=0,864$).
- Evolución de cada uno de los grupos por separado.
 - Grupo placebo. No se aprecian diferencias significativas en la evolución del grupo placebo ($p=0,987$).
 - Grupo experimental. El grupo experimental tampoco realiza cambios en su nivel de actividad física, por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p=0,698$).
- Comparación entre grupos. La comparación de ambas evoluciones no determina ninguna diferencia entre ambos grupos ($p=0,811$).

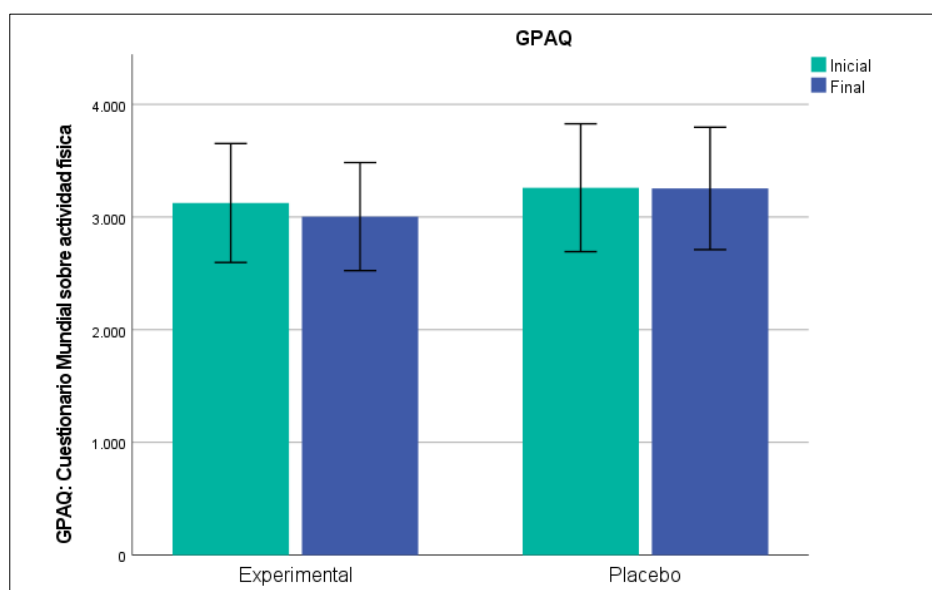


Figura 50. Nivel de actividad física (MET-minutos/semana) en función del producto de ingesta.

5.11. SEGURIDAD

No se han evidenciado acontecimientos adversos relacionados con la ingesta del producto en ninguno de los sujetos del estudio. Tampoco se ha evidenciado modificaciones en el hemograma, ni en la función hepática ni renal de los sujetos evaluados.

Por tanto, la ingesta del producto es segura.

5.12. TABLA GENERAL DE RESULTADOS

Tabla 32. Tabla general de resultados.

Variables	Grupos de estudio						Valor P entre Grupos (F Snedecor)
	Grupo activo (n = 51)			Grupo placebo (n = 45)			
	Base (1) ±DE	8 Semanas (2) ±DE	Δ 2-1 (95% IC) Valor P	Base (1) ±DE	8 Semanas (2) ±DE	Δ 2-1 (95% IC) Valor P	
Vasodilatación Dependiente de Endotelio (VDE), %	6.73 ± 5.27	9.77± 5.56	3.04 (1.448 a 4.617) < 0.001	6.85 ± 4.56	7.39 ± 5.81	0.53 (-1.237 a 2.297) 0.636	0.039 (F=4.39)
Presión Sanguínea, mm Hg							
Sistólica	123.6 ± 13.8	118.7 ± 11.9	-4.89 (-7.7 a -2.06) 0.001	122.8 ± 8.8	120.8 ± 11.6	-1.98 (-5.04 a 1.09) 0.203	0.168 (F=1.94)
Diastólica	84.2 ± 9.2	81.7 ± 8.9	-2.49 (-4.88 a -0.01) 0.041	79.7 ± 8.3	80.8 ± 7.8	1.12 (-1.46 a 3.70) 0.392	0.045 (F=4.15)
Análisis de laboratorio							
Colesterol total, mg/dL	242.2 ± 31.9	228.6 ± 29.6	-13.57 (-21.09 a -6.05) 0.001	235.7 ± 38.9	242.0 ± 35.6	6.38 (-1.63 a 14.38) 0.117	0.001 (F=12.99)

LDL-C, mg/dL	144.2 ± 28.1	135.4 ± 26.6	-8.80 (-14.49 a -3.12) 0.003	138.8 ± 31.3	139.9 ± 28.0	1.11 (-4.94 a 7.16) 0.717	0.02 (F=5.62)
HDL-C, mg/dL	63.6 ± 12.8	65.3 ± 13.1	1.65 (-0.82 a 4.11) 0.188	63.2 ± 15.8	62.1 ± 16.4	-1.09 (-3.71 a 1.54) 0.412	0.135 (F=2.28)
Triglicéridos, mg/dL	115.1 ± 54.0	115.5 ± 67.1	0.471 (-14.73 a 15.67) 0.951	118.9 ± 55.1	125.0 ± 74.1	6.02 (-10.16 a 27.20) 0.462	0.621 (F=0.25)
factor de Von Willebrand, %	120.9 ± 45.9	119.9 ± 36.7	-1.08 (-11.28 a 9.11) 0.833	119.5 ± 50.4	124.4 ± 46.0	4.95 (-6.04 a 15.94) 0.374	0.426 (F=0.64)
LDL-oxidasa, pg/mL	810.3 ± 555.4	467.5 ± 239.6	-342.84 (-459.68 a - 226.00) < 0.001	656.6 ± 402.3	692.2 ± 363.9	35.66 (-88.72 a 160.05) 0.571	< 0.001 (F=19.39)
Glutación oxidado (GSSH), nmol/mg proteína	0.47 ± 0.95	0.35 ± 1.59	-0.12 (-0.19 a -0.06) < 0.001	0.52 ± 0.92	0.48 ± 0.11	-0.04 (-0.11 a 0.04) 0.345	0.081 (F=3.16)
Glutación reducido (GSH), nmol/mg proteína	22.6 ± 6.0	23.6 ± 3.0	0.99 (-1.08 a 3.06) 0.342	21.9 ± 3.1	22.1 ± 3.1	0.20 (-2.15 a 2.56) 0.864	0.617 (F=0.25)

GSH/GSSH, ratio	49.8 ± 15.4	81.9 ± 33.8	32.02 (19.90 a 44.15) < 0.001	43.8 ± 11.9	47.6 ± 10.9	3.8 (-9.96 a 17.60) 0.580	0.003 (F=9.50)
Grupos Carbonilo, nmol/ mg proteína	0.94 ± 0.48	0.65 ± 0.29	-0.29 (-0.45 a -0.13) 0.001	0.77 ± 0.54	0.79 ± 0.44	0.013 (-0.16 a 0.19) 0.881	0.012 (F= 6.52)
Proteína C reactiva, mg/L	2.53 ± 3.07	2.35 ± 2.61	-0.18 (-0.94 a 0.58) 0.641	2.06 ± 2.50	1.91 ± 1.87	-0.15 (-0.97 a 0.67) 0.716	0.960 (F=0.003)
Interleucina-6 (IL-6), pg/mL	1.49 ± 0.96	0.91 ± 0.56	-0.57 (-0.79 a -0.35) < 0.001	1.38 ± 1.82	1.52 ± 2.24	0.14 (-0.10 a 0.37) 0.251	< 0.001 (F=18.78)
Factor de Necrosis Tumoral α, pg/mL	6.82 ± 0.64	6.63 ± 1.04	-0.19 (-0.51 a 0.13) 0.250	6.96 ± 0.61	6.97 ± 0.81	0.01 (-0.34 a 0.35) 0.974	0.417 (F=0.66)
Peso Corporal, kg	76.8 ± 13.9	76.7 ± 14.6	-0.15 (-0.90 a 0.60) 0.695	76.4 ± 14.8	76.8 ± 14.9	0.06 (-0.74 a 0.86) 0.891	0.712 (F=0.14)
Índice de Masa Corporal, kg/m2	27.2 ± 4.2	27.1 ± 4.2	-0.08 (-0.24 a 0.07) 0.286	26.5 ± 3.9	26.5 ± 3.8	0.03 (-0.13 a 0.20) 0.711	0.317 (F=1.01)
Masa Grasa, kg	25.4 ± 11.7	25.1 ± 11.4	-0.32 (-2.36 a 1.71) 0.752	21.8 ± 7.5	22.1 ± 8.0	0.31 (-1.82 a 2.43) 0.775	0.671 (F=0.18)

Cuestionario de Calidad de Vida (SF-12)							
Puntuación de Salud Física	76.6 ± 17.3	79.0 ± 16.8	2.38 (-0.98 a 5.74) 0.163	82.2 ± 11.1	82.8 ± 11.9	0.66 (-3.00 a 4.32) 0.721	0.493 (F=0.47)
Puntuación de Salud Mental	75.0 ± 17.1	77.7 ± 17.2	2.71 (-1.17 a 6.59) 0.168	78.5 ± 12.5	78.5 ± 13.8	-0.05 (-4.27 a 4.17) 0.980	0.340 (F=0.92)
Puntuación Total	75.7 ± 15.7	77.9 ± 15.1	2.2 (-0.89 a 5.29) 0.161	80.7 ± 9.9	80.2 ± 10.5	-0.5 (-3.87 a 2.87) 0.768	0.243 (F=1.38)
Actividad Física, MET-min/Semana	3125.2 ± 3582.1	3004.3 ± 3254.1	-120.9 (-738.1 a 496.4) 0.698	3260.6 ± 3261.0	3254.5 ± 3121.7	-6.1 (-734.8 a 722.7) 0.987	0.811 (F=0.06)

Los datos se muestran como media y desviación estándar (DE) con respecto al valor inicial y después de 8 semanas de consumo de producto y placebo. Δ 2-1 representa la diferencia entre las medias de esos dos grupos (intervalo de confianza (IC) del 95%). También se informa el valor de p entre grupos en ANOVA para medidas repetidas con dos factores de estudio (tiempo $\times$ grupo). Los valores significativos se destacan en negrita.

VI – DISCUSIÓN

VI -DISCUSIÓN

En el presente estudio de 8 semanas, el consumo diario de un suplemento nutricional basado en una combinación particular y específica de flavonas y flavanonas cítricas y polifenoles de oliva se asoció con cambios beneficiosos en una serie de variables relacionadas con la salud y las enfermedades cardiovasculares, abarcando la función endotelial (vasodilatación mediada por flujo), la presión arterial, el perfil lipídico (colesterol total, LDL-C, LDL-oxidada), así como biomarcadores del estado antioxidante (relación GSH oxidado/reducido y daño oxidativo evaluado por el nivel de grupos carbonilo proteicos), e inflamación (incremento de interleucina IL-6). Estos hallazgos añaden evidencia a los efectos positivos de los polifenoles y flavonoides sobre los mecanismos subyacentes involucrados en la enfermedad cardiovascular [86,142–144].

6.1. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

En la lucha contra las enfermedades cardiovasculares, las estrategias preventivas están pasando a ser el principal centro de interés. Una de estas estrategias propone identificar a los individuos con riesgo elevado de sufrir enfermedad cardiovascular. La disfunción endotelial podría facilitar una mejor estratificación del riesgo y la puesta en práctica de estrategias preventivas. técnicas no invasivas que se han introducido recientemente para evaluar la función endotelial: vasodilatación mediada por flujo medida con ecografía de la arteria humeral, análisis de la onda del pulso y pletismografía digital [145].

En cuanto al papel de la disfunción endotelial en el desarrollo de ECV, un endotelio disfuncional tiene un mayor consumo de óxido nítrico (NO), lo que crea condiciones favorables para la activación y adhesión de plaquetas más leucocitos, así como la activación de citocinas que aumentan la permeabilidad de la pared del vaso a lipoproteínas oxidadas y mediadores de inflamación. Esto finalmente da como resultado un daño estructural de la pared arterial con proliferación de células de músculo liso y formación de placa aterosclerótica [146].

Existen algunos estudios que han evidenciado que los algunos flavonoides presentes en la dieta parecen mejorar la función endotelial y reducen la presión arterial al causar vasodilatación en la vasculatura periférica [147]. Varios flavonoides aumentan la biodisponibilidad de factores vasodilatadores endoteliales, principalmente NO y también factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), e inhiben la producción de sustancias proinflamatorias, lo que mejora considerablemente, de forma indirecta, la función del endotelio vascular [142,148,149]. Como resultado de nuestro estudio, podemos concluir que se encontró una mejora de la vasodilatación dependiente de flujo (FMD) entre los sujetos asignados al producto activo, con diferencias significativas al final del estudio en comparación con la línea de base, y diferencias dentro del grupo frente a los sujetos tratados con placebo (+ 45-47%). Si, tal y como hemos comentado anteriormente, consideramos la FMD como una variable predictiva de riesgo cardiovascular [146,150,151], el uso de CitrovenTM puede asociarse de forma directa con una reducción del riesgo cardiovascular.

6.1.1. Comparación de mejora en función endotelial respecto a otros nutraceúticos

No obstante, para establecer cuál es la relevancia de estos resultados, es necesario evaluarlos comparativamente con los mostrados por otros estudios clínicos precedentes, lo cual no es sencillo. Debemos considerar que son escasos los estudios de intervención similares a este que emplean como ingredientes activos extractos polifenólicos, lo que hace difícil la comparación de sus resultados. No obstante, sí que es posible establecer ciertas consideraciones en cuanto a la evaluación de la potencial capacidad de prevención de la disfunción endotelial.

En un estudio realizado en 2010, los autores tratan de dilucidar el efecto de los flavonoides del té verde (catequinas) sobre la disfunción endotelial en fumadores (incluido el uso de pletismografía) [152]. Los datos obtenidos solo muestran resultados positivos asociados con efectos anti-ateroscleróticos en vasos disfuncionales, tras un mínimo de dos semanas de ingesta en el grupo que ingiere más de 500 mg/día de catequinas, y no en el placebo o el que ingiere solo 80 mg/día.

Otro estudio realizado en 2016 [153] realizado sobre 93 voluntarios hipertensos, sugiere que un significativo aumento de la ingesta de alimentos ricos

en polifenoles (verduras, bayas y chocolate amargo, con consumos elevados de polifenoles totales alrededor de 50-100 mg / día, principalmente catequinas / antocianinas) durante 8 semanas, supuso una mejora en la vasodilatación dependiente de endotelio en participantes hipertensos. Reseñar que los resultados de este estudio muestran resultados inferiores a los obtenidos por nosotros, considerando las diferencias entre dosis empleada y naturaleza de los flavonoides/polifenoles ingeridos.

Por el contrario, en un estudio cruzado con sujetos sanos [154], el consumo de una dosis de extracto de té negro (400 mg de flavonoides) y una dosis de mantenimiento (130 mg) después de 120 minutos, no mostró evidencia alguna de que la ingesta aguda de té negro alterara significativamente la vasodilatación dependiente del endotelio de las arterias del antebrazo en sujetos sanos de mediana edad mejorando la función endotelial. Los autores sugieren que se requieren intervenciones con una mayor duración de la ingesta de estos flavonoides. En la misma línea la ingesta diaria de 25 mg de epicatequina pura durante 2 semanas no redujo los factores de riesgo cardio metabólico en adultos con sobrepeso y obesidad [155]. Aparentemente esto es debido a que se trata de un tiempo corto-medio y una dosis muy baja, similar a la potencialmente presente en una dieta normal saludable. Por último, otro estudio cruzado con consumo de un extracto de manzana (270 mg de epicatequina (monómero) y procianidinas (polímeros/oligómeros) durante 4 semanas no afectó la función endotelial, confirmando la ausencia de efectos beneficiosos sobre marcadores cardio metabólicos y su aparente ineficacia clínica en la prevención del riesgo cardiovascular [156].

6.1.2. Mejora en la función endotelial debida a los flavonoides cítricos

Finalmente, consideremos dos estudios realizados con flavonoides cítricos, hesperidina y naringina, una de ellas, naringina, incluida en nuestro estudio y la otra, hesperidina, con un esqueleto flavonoide similar al de la neohesperidina presente en Citroven TM, además de indicar que ambas flavononas glicosiladas generan el mismo metabolito principal, la hesperetina.

La hesperidina es el flavonoide cítrico empleado desde hace más tiempo en el ámbito de los suplementos nutricionales, ella misma y su metabolito, la hesperetina, pueden tener acciones vasculares relevantes y beneficiosas para la

salud. Sus mecanismos de actuación han sido previamente descritos por nuestro equipo. Significativamente, gran parte de la actividad de los flavonoides cítricos parece afectar al endotelio microvascular y aunque estos flavonoides han sido estudiados y empleados desde hace unos 50 años, los mecanismos celulares implicados en su acción biológica aún no están completamente establecidos, tanto por su multifactorialidad, como por la variedad de estructuras moleculares y su influencia en la eficacia. De cualquier forma, muchos estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta regular de flavonoides cítricos asociado con un riesgo reducido de enfermedades cardiovasculares, mecanismos de vasodilatación, disminución de la capacidad de coagulación de las plaquetas en la sangre y previniendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Es igualmente significativa la importancia de sus propiedades antiinflamatorias, debidas a su capacidad epigenética para regular la síntesis y actividades biológicas de diferentes mediadores proinflamatorios, principalmente la de los derivados del ácido araquidónico, prostaglandinas E2, F2 y tromboxano A2 [157].

Cuando estos flavonoides son ingeridos a través de bebidas ricas en ellos, tales como zumos cítricos, aunque se presupone que ejercen efectos positivos sobre la función vascular, sin embargo, los datos relacionados con los efectos en el estado posprandial son limitados. En un estudio realizado en 2016, se estudió el impacto posprandial, dependiente del tiempo (0-7 h), de la ingesta de flavanona cítrica en la función vascular [158]. Se realizó un estudio de intervención cruzado, aleatorizado, controlado, doble ciego y agudo, que incluyó a hombres sanos de mediana edad (30-65 años, n 28) para evaluar el impacto de la ingesta de flavanonas (jugo de naranja: 128,9 mg; zumo de naranja rico en flavanonas: 272,1 mg; naranja entera homogeneizada: 452, 8 mg; control isoenergético: 0 mg de flavanonas) en la función endotelial posprandial (doble comida con un total de 81 g de grasa). La función endotelial se evaluó mediante dilatación mediada por flujo (FMD) de la arteria braquial a las 0, 2, 5 y 7 h. También se midieron los niveles plasmáticos de metabolitos de naringenina / hesperetina (sulfatos y glucurónidos) y especies de óxido nítrico. Todas las intervenciones con flavanonas fueron eficaces para atenuar las alteraciones transitorias de la FMD inducidas por la doble comida (7 h después de la ingesta; $P < 0,05$), pero no se observaron efectos de dosis-respuesta. Los efectos sobre la FMD coincidieron con el pico de metabolitos de naringenina / hesperetina en circulación (7 h) y niveles sostenidos de nitrito plasmático. Los autores

concluyen que las flavanonas cítricas son eficaces para contrarrestar el impacto negativo de una doble comida secuencial en la función vascular humana, potencialmente a través de las acciones de los metabolitos de flavanona sobre el óxido nítrico (NO).

En otro ensayo cruzado, doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo con hesperidina pura, los autores estudiaron si la ingesta de esta flavanona, durante tres semanas, estimula la producción de óxido nítrico (NO) del endotelio vascular y evaluaron la función endotelial en sujetos ($n = 24$) con síndrome metabólico [159](ClinicalTrials.gov NCT00914251). Adicionalmente, estudiaron los mecanismos celulares de acción de la hesperetina, el principal metabolito de la hesperidina, en células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) en cultivo primario. La variable principal clínica fue la medida de la diferencia en la dilatación mediada por el flujo de la arteria braquial entre los períodos de tratamiento con placebo y hesperidina. El tratamiento de BAEC con hesperetina estimuló de forma aguda la fosforilación de Src, Akt, AMP quinasa y NO sintasa endotelial para producir NO; el aumento de la adhesión de monocitos a BAEC y la expresión de la molécula de adhesión de células vasculares-1 en respuesta al tratamiento con TNF- α se redujo mediante el pretratamiento con hesperetina. El tratamiento redujo las concentraciones de algunos biomarcadores inflamatorios circulantes, tales como proteína C reactiva de alta sensibilidad, proteína sérica A amiloide y E-selectina soluble. En este estudio clínico, en comparación con placebo, el tratamiento con hesperidina aumentó la dilatación mediada por flujo ($10,26 \pm 1,19$ frente a $7,78 \pm 0,76\%$; $P = 0,02$), es decir, un valor en el entorno $[+ 31-32\%]$, significativamente inferior al obtenido en nuestro estudio $[+ 45-47\%]$. ¿Es posible considerar alguna hipótesis para justificar esta diferencia? En primer lugar, resultaría lógico considerar la diferente duración de la intervención, 3 frente a 8 semanas. Sin embargo, a nuestro juicio, el potencial origen tiene una base de naturaleza más molecular. Es bien conocido que flavonoides cítricos más abundantes son las flavanonas glicosiladas, hesperidina, naringina o neohesperidina y, lógicamente, la práctica totalidad de suplementos nutricionales del mercado están constituidos y basados en estos compuestos. Sin embargo, generalmente, las flavonas, como diosmina, apigenina o luteolina, muestran una mayor actividad biológica, tanto vasoprotectora general, como antiinflamatoria, aunque están presentes en los cítricos en concentraciones mucho más bajas [157]. Pues bien, en este estudio se

emplea una ingesta diaria de 500 mg de hesperidina, en nuestro estudio, la ingesta diaria de flavonoides es de unos 400-450 mg, relativamente similar, sin embargo, el 55% de esos flavonoides son flavanonas glicosiladas como la hesperidina, mientras que el 45% restante está constituido por flavonas, principalmente apigenina y luteolina.

6.1.3. Mejora en la función endotelial debida a la apigenina y luteolina

Estos dos flavona-aglicones han mostrado en diversos estudios (no clínicos) una significativa actividad vasodilatadora y antiinflamatoria [114,160]. La mayor potencia de los flavonoides aglicona en comparación con los flavonoides glicosilados puede deberse a que los restos azucarados (ramnosa-glucosa) interfieren con la molécula que interactúa con los puntos de unión responsables de la vasorrelajación como se sugirió anteriormente, es decir, los grupos lipofílicos en el esqueleto de los flavonoides aumentaron su actividad vasorrelajante [161]. Se ha investigado el papel del NO usando el inhibidor de eNOS (L-NAME) con los compuestos de prueba. L-NAME aumentó la EC50 y redujo la Emax, sugiriendo que la relajación fue mediada principalmente por NO [162]. Nuestros propios estudios en ratas hipertensas L-NAME confirman estas consideraciones. La apigenina y algunos otros flavonoides cítricos (naringina, neohesperidina, eriocitrina...) mejoraron la vasodilatación aórtica dependiente e independiente de óxido nítrico y la excreción urinaria elevada de nitritos. Este efecto se acompañó, en el caso de la apigenina, de una normalización de la reducida reactividad vascular a los vasoconstrictores y una menor retención de sodio. También se observó una mayor capacidad vasodilatadora, relacionada con una mayor producción de NO, junto con cambios beneficiosos en los parámetros histopatológicos en el corazón y el riñón [142]. Asimismo, en otro de los trabajos publicado por nosotros, la apigenina, también mejoró la relajación vascular aórtica y aumentó la excreción plasmática y urinaria de nitritos en ratas SHR y redujo la excreción urinaria de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la proteinuria [91].

Además, estos datos estarían también relacionados con otras investigaciones en las que se indica que luteolina actúa directamente sobre las células endoteliales vasculares, al inducir la fosforilación de eNOS en Ser1177, lo que conduce a la

producción de NO [98]. El músculo liso vascular expresa canales de Ca^{2+} tipo L en la membrana plasmática que permiten la despolarización dependiente de la entrada de Ca^{2+} para desencadenar la contracción. La luteolina y la apigenina probadas en vasos desnudos bloquearon/deprimieron este mecanismo de contracción que también puede explicar en parte, el efecto vasorrelajante. La apigenina parecía ser más eficaz que la luteolina, mientras que era menos eficaz en estudios de relajación que sugieren cierta heterogeneidad en el mecanismo de acción de los flavonoides. La liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares también regula la contracción a través del trifosfato de inositol (IP3) o canales asociados a receptores de rianodina (RyR) en las membranas SR. Los canales asociados a IP3 son comúnmente activados por receptores acoplados a proteína G de la membrana plasmática, incluidos los receptores α_1 que son activados por PE. Los canales RyR son activados por Ca^{2+} . La luteolina y la apigenina también inhibieron Ca^{2+} liberado de los depósitos, lo cual puede al menos parcialmente una cierta relajación vascular de los vasos pre-contraídos por PE [163].

Los canales de K^+ también juegan un papel en la regulación del tono vascular, es decir, los canales de K^+ (Kv) dependientes del voltaje se abren tras la despolarización de la membrana plasmática en las células del músculo liso vascular y, por lo tanto, se inhibe el flujo de Ca^{2+} a través de los VOCC, lo que produce vasodilatación [164]. Jiang y col. también evaluaron que la luteolina inhibió los canales de Ca^{2+} , inhibió la liberación de Ca^{2+} almacenado, mientras se activaron los canales de K^+ , específicamente vía KATP, KCa, KV y KIR [165].

De cualquier forma, y con independencia de las consideraciones mecanísticas, todos estos datos, comparados con los resultados de nuestro estudio nos permiten sugerir que para obtener un efecto positivo para la reducción de enfermedades cardiovasculares y, sobre todo, en su relación con la prevención de la disfunción endotelial, una intervención nutricional debería cumplir dos requisitos básicos: una ingesta mínima de 300 mg/día de compuestos activos y que esta sea a largo plazo, dada la inexistencia de efectos agudos. Adicionalmente, podríamos añadir, con la obligada prudencia, que la combinación de flavonas y flavanonas de origen cítrico, combinadas con secoiridoides de olivo parece mostrar mucha mayor eficacia que la familia de los flavan-3-ols (catequinas), habitualmente presentes en suplementos procedentes de extractos de té verde, semilla de uva, cacao y manzana.

6.2. PERFIL LIPÍDICO

6.2.1. Importancia del perfil lipídico en la enfermedad cardiovascular

Otro de los aspectos fundamentales en el mantenimiento de una correcta salud cardiovascular, es el mantenimiento de un correcto perfil lipídico plasmático. Este perfil resulta ser, no solo un objetivo básico para reducir el riesgo cardiovascular sino, además, una herramienta en la evaluación y evolución de cualquier actuación/estrategia preventiva que quiera desarrollarse en ese sentido.

La propia EFSA incluye y desarrolla este concepto y va más allá de la propia distribución plasmática de lipoproteínas, incluyendo el concepto de oxidación de lipoproteínas. De forma específica, en el preámbulo de la opinión del panel EFSA sobre las alegaciones saludables de los polifenoles del olivo se establece: “Los efectos reivindicados son “reduce el estrés oxidativo”, “propiedades antioxidantes”, “metabolismo de los lípidos”, “actividad antioxidante, protegen las células corporales y el LDL de los daños oxidativos” y “propiedades antioxidantes”. El Panel asume que la población objetivo es la población general. En el contexto de la redacción propuesta, se supone que los efectos alegados se refieren a la protección de las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) del daño oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluidos varios tipos de radicales, se generan en procesos bioquímicos (por ejemplo, la cadena respiratoria) y como consecuencia de la exposición a factores exógenos (por ejemplo, radiación y contaminantes). Estos intermediarios reactivos pueden dañar moléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos si no son interceptados por la red de antioxidantes que incluye captadores de radicales libres como los nutrientes antioxidantes. El Panel considera que la protección de las partículas de LDL del daño oxidativo puede ser un efecto fisiológico beneficioso”[166].

El Panel observa que se demostró que los polifenoles que se encuentran naturalmente en el aceite de oliva disminuyen significativamente la cantidad de partículas de LDL oxidadas circulantes in vivo de una manera dependiente de la dosis en una escala grande (n = 200) [167], y tres en pequeña escala (12 sujetos) [168], 30 sujetos [169], y 36 sujetos [170], respectivamente estudios de intervención humana, uno de los cuales fue a corto plazo (cuatro días) [168]. También se encontró una disminución dependiente de la dosis en la cantidad de partículas de

LDL oxidadas circulantes in vivo en un estudio posprandial agudo a pequeña escala (n = 12) [167]. La dosis diaria más baja de hidroxitirosol y sus derivados (medida por HPLC) en aceite de oliva que mostró un efecto significativo sobre la peroxidación de LDL in vivo fue de 5 mg. También se ha informado de una disminución significativa en relación con el consumo de polifenoles de aceite de oliva para los dienos conjugados no inducidos por LDL sérico [167,170] y para la resistencia ex vivo de LDL a la oxidación [169], que pueden considerarse como marcadores de apoyo para evaluar la peroxidación de las partículas de LDL. El Panel también observa que se observó una disminución significativa en el plasma de hidroxiácidos grasos C18 [167,170] y MDA urinario [168] después del consumo de aceituna. polifenoles del aceite, pero que los polifenoles del aceite de oliva no parecen tener un efecto sobre los F2 α -isoprostanos [167,168].

Al sopesar la evidencia, el Panel tomó en cuenta que un estudio bien realizado y potenciado, y dos estudios a menor escala, mostraron un efecto dependiente de la dosis y significativo del consumo de polifenoles del aceite de oliva (durante tres semanas) sobre los marcadores apropiados de peroxidación de LDL (oxLDL), que estos resultados fueron respaldados por un estudio a corto plazo y uno agudo, y por marcadores de apoyo de la peroxidación de LDL (dienos conjugados, resistencia ex vivo de LDL a la oxidación) que van en la misma dirección, y que la evidencia de una biológicamente plausible Se ha proporcionado un mecanismo por el cual los polifenoles del aceite de oliva podrían ejercer el efecto reivindicado. El Panel concluye que se ha establecido una relación de causa y efecto entre el consumo de polifenoles del aceite de oliva (estandarizados por su contenido de hidroxitirosol y sus derivados) y la protección de las partículas LDL del daño oxidativo. [166].

6.2.2. Mejora del perfil lipídico: LDL-oxidada

Algunos estudios abordaron la biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos en la aceituna que muestran que la absorción de los fenólicos del aceite de oliva es probablemente superior al 55-66% en moles, y que la absorción del hidroxitirosol depende de la dosis, lo que sugiere que los fenólicos del aceite de oliva se absorben en el intestino, que el tirosol y el hidroxitirosol se incorporan en las fracciones de lipoproteínas y que el hidroxitirosol se excreta en la orina como

conjugado de glucurónido [170–174]. Se ha propuesto la incorporación de compuestos fenólicos del aceite de oliva en las partículas de LDL como el mecanismo por el cual los fenólicos de la aceituna pueden proteger las partículas de LDL de la peroxidación [166].

En dos estudios experimentales previos, nuestro grupo evaluó la influencia de una combinación de diversos extractos de origen cítrico (flavonoides) y extracto de hoja de olivo sobre el metabolismo de los lípidos en ratas con una dieta alta en grasas; se observó una reducción significativa en el nivel posprandial de TAG, junto con una disminución en torno al 20% de la concentración plasmática de LDL con respecto al grupo control [142,149]. Los compuestos estudiados no mostraron una significativa capacidad para inhibir lipasas. Los resultados obtenidos, permitieron considerar que estas combinaciones pueden reducir la captación intestinal de colesterol, influyendo en la síntesis y eliminación de LDL, sin mostrar una capacidad real para influir en la biosíntesis hepática de colesterol.

Los resultados de este ensayo de intervención son realmente significativos en este aspecto. La reducción de ox-LDL en el grupo de intervención con una diferencia media de $-342,84$ pg / ml en comparación con el valor inicial es un hallazgo más que notable del estudio, ya que, porcentualmente, estamos hablando de una reducción promedio del [40-45%], a través de la ingesta de unos 85-90 mg/día de polifenoles de olivo, incluidos en la combinación empleada.

Al igual que en el caso de la función endotelial, no se han realizado demasiados estudios de intervención con suplementos nutricionales evaluando en el perfil lipídico la posible influencia del tratamiento en el valor de LDL-oxidado. Los resultados son diversos y deben intentar entenderse en función de las características moleculares y la dosis ingerida de los diversos compuestos polifenólicos estudiados.

En un ensayo aleatorizado doble ciego, el consumo de un extracto estandarizado de bayas de maqui (ricas en ácido ascórbico y antocianinas) [175], evalúan la eficacia en diversos marcadores de estrés oxidativo vascular de extractos de antocianinas a medio plazo, 4 semanas y 6 semanas. Los voluntarios consumen, de acuerdo con los datos analíticos de los autores, 486 mg/día de antocianinas. Dicha ingesta muestra una cierta reducción del valor de ox-LDL a las 4 semanas respecto al grupo placebo, pero no a las seis semanas de seguimiento. Es importante considerar que la valoración del contenido en antocianinas se realiza por métodos

espectrofotométricos inespecíficos, lo que supone una cuantificación gravimétrica no real de las mismas, posiblemente el contenido real de antocianinas podría situarse en un 10-20% de ese valor.

En otro ensayo clínico [176], el consumo de un extracto de procianidinas de bajo peso molecular 150 mg / día durante 5 años resultó en una disminución de -31,7 U / L en el grupo de intervención, con un porcentaje de cambio frente a placebo del -32,7%[176]. Sin embargo, en otros dos estudios ya mencionados anteriormente (ingesta durante 2 semanas de 25 mg de epicatequina pura [155] y el de ingesta durante 2 h y 4 semanas de hasta 270 mg de catequinas de la manzana/flavan-3-oles [156]), se comprueba que ambas suplementaciones no son capaces de modular/reducir el nivel de LDL-oxidado.

En pacientes con síndrome metabólico, la suplementación con extracto de aceituna (9-10 mg / día de hidroxitirosol) combinado con arroz de levadura roja (10-11 mg / día de monacolina, incluidos 5-6 mg / día de lovastatina) durante 8 semanas resultó en una reducción del 20% de ox-LDL frente a un aumento del 5% en el grupo de placebo [177]. Por el contrario, el consumo de galletas enriquecidas con orujo de oliva (15-20 mg / día de hidroxitirosol y derivados) durante 8 semanas no indujo cambios estadísticamente significativos en el ox-LDL [178].

Parece deducirse pues que, en el caso de los dos compuestos polifenólicos de la aceituna, la oleuropeína y el hidroxitirosol, potencialmente responsables de la reducción de los niveles de ox-LDL, la dosis utilizada en un estudio de 15-20 mg / día que no pareció ser suficiente para una eficacia real [178], y la disminución del 20% de ox-LDL mostrada en el otro estudio [177] fue inferior al 40-45% obtenido con una ingesta de 80-90 mg / día en nuestro estudio. Además, resulta muy complejo evaluar si dicha reducción del 20% es resultado exclusivo del hidroxitirosol o, sobre todo, de la acción de las monacolinas incluidas en el suplemento.

Esta reducción tan significativa de los niveles de ox-LDL, ¿es responsabilidad exclusiva de los polifenoles del olivo incluidos en CitrovenTM?. Nuestra opinión es que no, y otros compuestos flavonoides presentes en el compuesto estudiado podrían contribuir en un cierto grado en estos resultados. Algunos de ellos, adicionalmente, han mostrado de forma directa o indirecta una actividad significativa en este aspecto, contribuyendo al efecto beneficioso global.

6.2.3. Mejora del perfil lipídico: Lipoproteínas, colesterol y triglicéridos

En el presente estudio pudo observarse una disminución significativa del colesterol, mientras que los valores de triglicéridos, LDL y HDL no fueron significativamente modificados. En estudios realizados sobre ratones de diferentes edades, tratados con naringenina, sobre el riesgo cardiovascular (cociente colesterol total / HDL) en comparación con ratones control, se observó que el tratamiento diario con esta flavanona redujo notablemente los triglicéridos y aumentó los niveles de HDL en ratones de 12 meses. En general, el riesgo cardiovascular de los ratones viejos fue significativamente menor en los animales tratados con naringenina, siendo además similar al de los controles jóvenes [179].

Además, se ha descrito también que otros componentes del producto nutricional, como la flavona cítrica luteolina, inhiben la expresión de LDL oxidada y VCAM-1 inducida por TNF- α , así como la supresión de la vía de señalización I κ B α / NF- κ B [180]. Además, la luteolina es capaz de proteger el miocardio contra la lesión por isquemia-reperfusión, que se atribuye a las acciones de la luteolina mediadas por la regulación a la baja de la producción de NO y sus propias propiedades antioxidantes [101,181].

Todos estos datos permiten confirmar, en este parámetro, que, para obtener un efecto positivo a través de una intervención nutricional, deben cumplirse los mismos requisitos básicos que en el caso del mantenimiento de la función endotelial, tanto a nivel de dosificación como de duración mínima del tratamiento. Adicionalmente, también podríamos añadir, con la misma obligada prudencia, que la combinación de secoiridoides de olivo con flavonas y flavanonas de origen cítrico, parece mostrar mucha mayor eficacia que los propios polifenoles del olivo aislados y que la familia de los flavan-3-ols (catequinas-procianidinas) y antocianinas, algunos de los compuestos habitualmente más estudiados.

6.3. PRESIÓN ARTERIAL

Los resultados de nuestro ensayo muestran que el consumo del producto activo durante 8 semanas tuvo como resultado una ligera, pero significativa, reducción de la presión arterial sistólica y diastólica, con diferencias también significativas en relación con el grupo placebo. Es importante considerar, para valorar estos resultados específicos, que estas modestas disminuciones de la

presión arterial entre 4% y 7% se explican por la lógica y necesaria condición saludable que deben tener los participantes en un ensayo de intervención de suplementos nutricionales.

Al igual que hemos hecho en apartados anteriores, en un análisis específico de este parámetro, cabe preguntarse cuáles serían los compuestos polifenólicos activos teóricamente responsables modesta, pero significativa reducción de la presión arterial.

Desde el punto de vista directo de la dieta, la evidencia actualmente disponible del efecto beneficioso de una dieta enriquecida con aceite de oliva sobre la presión arterial (actualmente se encuentra en revisiones sistemáticas y metaanálisis), también se confirmó en nuestro estudio, en función de la presencia de polifenoles de olivo en el producto empleado. En dichos estudios dietético-epidemiológicos con aceite de oliva virgen, la reducción de la presión arterial, tanto sistólica como diastólica, es similar a la obtenida en nuestro estudio [182–184].

Adicionalmente, también existen precedentes de estudios de intervención acerca de la influencia del consumo de extractos de hoja de olivo en la presión arterial, aunque, en general y hasta ahora, los resultados han carecido de consistencia, quizás sobre todo debido a las diferencias en la dosis ingerida de compuestos polifenólicos ingeridos, la duración y el diseño del estudio. Podemos destacar algunos de ellos. A finales de los años 90 y comienzos del presente siglo, diversos autores, a partir de diversos estudios observacionales, sugieren que reducciones de 2 mm Hg en la PAS y la PAD se asociarían con reducciones del 6 % y el 7 % en el riesgo de cardiopatía coronaria y reducciones del 10 % y el 15 % en accidentes cerebrovasculares y ataques cardíacos, respectivamente [185,186].

En ese mismo periodo de tiempo, la extrapolación de esto sugeriría que la ingesta regular de oleuropeína (extracto de hoja de olivo), puede estar asociada con una reducción del 9 al 14 % en el riesgo de cardiopatía coronaria y una reducción del 20 al 22,5 % en el riesgo de accidente cerebrovascular y ataque cardíaco. Desde el punto de vista mecanístico, se ha postulado que la oleuropeína actuaría a través de los efectos antagónicos en los canales de Ca^{2+} de tipo L [187,188]. En estudios realizados ya a partir de 2008, se emplean extractos de olivo en dosis que permiten la ingesta de 136-200 mg/día de oleuropeína, lo cual resultó en reducciones medias en la presión arterial sistólica y diastólica de 13 y 5 mm Hg, respectivamente, en gemelos MZ prehipertensos [189] y 12 y 5 mm Hg, respectivamente, en pacientes

hipertensos [190]. En cambio, otro estudio posterior en el que se emplea una dosis de 51 mg de oleuropeína/día no indujo reducciones estadísticamente significativas en la PA [191]. Lockier et al., más recientemente, muestran que la oleuropeína, (ingesta de 136 mg/día) tiene el potencial de reducir significativamente la PAS diurna/y 24 horas y la PAD diurna/y 24 horas en relación con el control. La magnitud de los cambios de PA observados aquí (PAS de 3,33 y 3,95 mm Hg y PAD de 2,42 y 3,00 mm Hg (valores de 24 h y diurnos, respectivamente)) puede considerarse fisiológicamente significativa [192].

Evaluando de forma global estos y otros estudios, parece sugerirse la existencia de un cierto comportamiento dosis-respuesta en cuanto a la presión arterial, cuando se consumen suplementos basados exclusivamente en extractos de hoja de olivo, con reducciones no significativas a dosis de oleuropeína de 50 mg/día (probablemente a dosis 70-80 mg/día) y si significativas a dosis superiores a 100 mg/día. En nuestro ensayo de intervención, el compuesto empleado, CitrovenTM, aporta unos 85-90 mg de oleuropeína/día, situándose en una zona de ese concepto dosis-respuesta que podríamos definir como intermedia. No obstante, es evidente que no solo oleuropeína podría ser el compuesto responsable de esta acción que, como ya hemos mencionado anteriormente, se enmarca dentro de una estrategia y abordaje multifactoriales de la prevención del riesgo cardiovascular. Hablamos, obviamente, de los compuestos flavonoides.

Muchos de los datos descritos en apartados anteriores nos han confirmado que es evidente que los flavonoides cítricos confieran protección contra las enfermedades cardiovasculares. La capacidad de los flavonoides cítricos para reducir el estrés oxidativo, la hiperlipidemia y la inflamación y para mejorar la función endotelial, la presión arterial y el metabolismo de los lípidos puede ser responsable de su función terapéutica contra la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares [89].

Recordemos que flavonoides principales están presentes en CitrovenTM: neohesperidina, naringina, apigenina y luteolina. ¿Qué podemos decir de la acción de estos flavonoides específicamente respecto a la presión arterial?

En experimentos con animales, la administración de flavonoides ejerció efectos de vasorrelajación y redujo la presión arterial. Existe evidencias de que una vía clave a través de la cual los flavonoides regulan la salud vascular es a través del metabolismo alterado del óxido nítrico (NO). La influencia de los flavonoides sobre

el NO podría dividirse en mecanismos directos e indirectos. Algunos flavonoides pueden aumentar directamente la expresión y la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (la principal fuente de NO en la vasculatura), lo que lleva a una mayor producción de NO. Los efectos sobre el nivel de eNOS podrían estar mediados por la activación de AMPK. Los flavonoides también podrían mejorar indirectamente la biodisponibilidad del NO mediante la reducción de la producción o la mejora de la eliminación de especies reactivas de oxígeno que se sabe que descomponen el NO. Además de regular la función vascular a través de NO, también se han observado otros mecanismos independientes del NO en estudios *in vitro* para flavonoides, como la estimulación directa o la inhibición de los canales vasculares de iones de calcio [193].

En el caso de la neohesperidina los estudios realizados son muy escasos, pero su eficacia aplicada es enteramente similar a la del isómero hesperidina, ya que ambos generan tras su ingesta el mismo metabolito activo, la hesperetina. Recordemos que la diferencia estructural entre ambas flavanonas es la diferente estructura de glicosidación (ramnosa + glucosa), tipo neohesperidosido en la primera y rutinosido en la segunda.

Además de lo mencionado en un párrafo anterior, varios estudios indican que no sólo la potenciación del NO está involucrada en el efecto antihipertensivo que ejerce la hesperidina, y que otro mecanismo potencial por el cual la hesperidina y sus derivados, incluidas la G-hesperidina y la hesperetina, ejercen sus efectos beneficiosos sobre la hipertensión, sería a través de su demostrado efecto antioxidante indirecto, mejorando la biodisponibilidad del NO y protegiendo la función endotelial de las especies reactivas del oxígeno [194–196].

La administración de hesperidina en SHR redujo la presión arterial al reducir el estrés oxidativo mediante la supresión de la cascada del sistema renina-angiotensina [197]. Además, la hesperidina mejoró el estrés oxidativo observado en condiciones hipertensivas como consecuencia de una sobreexpresión de NADPH oxidasa a través de la supresión de esta enzima, lo que resulta en una mayor biodisponibilidad de NO [198,199].

Un estudio reciente realizado por Wunpathe et al., demostraron el papel de la hesperidina en la supresión de la producción excesiva de ROS mediada por la sobreexpresión de NADPH oxidasa (NOX2) mediada por el sistema renina-angiotensina en ratas hipertensas. En un modelo de rata de hipertensión de dos

riñones y uno cortado (2K-1C), la hesperidina redujo la presión arterial de una manera dependiente de la dosis y disminuyó los niveles plasmáticos de angiotensina (AT) II y la expresión de la proteína del receptor AT I aórtico. Además, la hesperidina atenuó el estrés oxidativo mediante la supresión de la NADPH oxidasa en ratas hipertensas [197]. En otro estudio, en el que las SHR se trataron con hesperidina, los resultados mostraron una relación inversa dependiente de la dosis con la DE y la presión arterial sistólica [200].

Sin embargo, a pesar de los efectos beneficiosos observados en estudios con animales e in vitro, los resultados mostrados por los estudios de intervención en humanos no parecen ser del todo consistentes. Además, una revisión sistemática y un metaanálisis de ensayos aleatorios controlados que evaluaron la eficacia de la suplementación con hesperidina sobre la presión arterial, concluyeron que la ingesta de hesperidina no está asociada con cambios significativos en la presión arterial [201]. Resultados similares fueron reportados por Plà et al., concluyendo que los efectos del consumo de hesperidina sobre la presión arterial no fueron concluyentes [202]. Hay muchas hipótesis que podrían explicar por qué la hesperidina carece de un efecto significativo sobre la presión arterial en humanos, incluida su metabolización y absorción. En este sentido, Yamamoto et al., investigaron sobre la potencial actividad de diversos metabolitos de la hesperidina, sugiriendo que el metabolito hesperetina-7-O-glucurónido, pero no la hesperetina-3-O-glucurónido, era el agente responsable del efecto antihipertensivo observado [203]. En consecuencia, es posible que la hesperidina, y en consecuencia sus metabolitos más activos, no alcancen las concentraciones circulantes suficientes que se necesitan para la regulación real de la presión arterial [204].

Consideremos que el principal flavonoide-glicosilado en CitrovenTM, es la flavanona naringina. La naringina es un flavonoide que desempeña un papel fundamental en el tratamiento del síndrome metabólico, en virtud de diferentes capacidades, algunas de ellas relacionadas con la regulación del ciclo oxidación-inflamación, característico de este síndrome. En 2005, Reshef et al, realizaron un estudio acerca de la potencial influencia específica de la ingesta de naringina (y su isómero isonaringina) a través de zumos cítricos. El objetivo del estudio fue determinar, en pacientes con hipertensión arterial en estadio I, el efecto antihipertensivo del zumo de la llamada “fruta dulce” (un híbrido entre toronja y pomelo) con y sin alto contenido en flavonoides. Se realizó un estudio doble ciego

cruzado; cada paciente recibió alternativamente zumo con alto contenido de flavonoides (HF) y con bajo contenido de flavonoides (LF), cada uno durante un período de 5 semanas. El zumo LF tenía un 25 % de contenido de naringina en comparación con el zumo HF. HF fue más efectivo que LF en la reducción de la presión arterial diastólica ($p = 0,04$). La presión arterial sistólica disminuyó en ambos grupos, sin embargo, no fue estadísticamente significativa [205].

Posteriormente, en estudios preclínicos, la naringina en una dosis de 80 mg/kg durante 4 semanas mostró un potencial antihipertensivo significativo al restablecer la presión arterial sistólica y diastólica a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos en comparación con las ratas control [206]. La naringina en dosis de (250, 500 y 1000 mg/kg) suprimió significativamente el aumento de la presión arterial sistólica después del tratamiento durante 4 semanas en ratas espontáneamente hipertensas [195]. La presión arterial sistólica elevada en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y carbohidratos se redujo con el tratamiento de naringina en dosis de 100 mg/kg durante 8 semanas [207].

Consideremos que la cantidad de naringina presente en CitrovenTM, es de unos 200 mg/dosis/día. Esto representa, aproximadamente, una dosis de 3,3 mg/kg peso/día. Comparando esta dosis a través de los criterios de extrapolación general entre humanos y animales, podría representar en ratas una dosis de 25-39 mg/kg peso/día [208]. Esta ingesta de naringina podría parecer insuficiente, pero, no olvidemos que la composición de CitrovenTM permite un abordaje multifactorial también de la regulación de la presión arterial.

Una reciente revisión preclínica sistemática dirigida a estudiar los efectos de la naringina en las enfermedades metabólicas, identificó 34 artículos publicados sobre el tema. Según la evaluación, la naringina podría aliviar el síndrome metabólico al reducir la obesidad visceral, la glucosa en sangre, la presión arterial y el perfil de lípidos y al regular las citoquinas, pero es necesario realizar una investigación adecuada para confirmar los efectos de la naringina en los seres humanos, incluyendo una potencial evaluación dosis-respuesta [209].

Un estudio realizado el pasado año 2021 por Wu et al, sobre la hipertensión arterial pulmonar (HAP) causada por el aumento de la presión arterial aumenta la resistencia de los vasos en el pulmón, ha permitido aportar nuevas informaciones sobre los potenciales mecanismos de actuación de esta flavanona [210]. La transición endotelial a mesenquimatosa (EndMT) juega un papel clave en la

remodelación vascular en la hipertensión (HPA). En este estudio, se administró monocrotalina (MCT) (60 mg/kg) para la inducción de HPA en ratas. Posteriormente, se utilizó naringina a concentraciones: 25, 50 y 100 mg/kg peso/día para los tratamientos. El estudio proporcionó evidencias novedosas que sugieren los efectos beneficiosos de la naringina en HPA a través de la inhibición de las vías de señalización de ERK y NF- κ B y la progresión de EndMT en las arterias pulmonares [210].

En marzo de 2022, se ha publicado la más reciente revisión sobre el papel cardioprotector de la naringina. Esta revisión sistemática y metaanálisis se centraron en resumir y concluir los beneficios terapéuticos de la naringina en diversos trastornos cardiovasculares utilizando evidencia preclínica. El metaanálisis reveló que la naringina podría aliviar significativamente varios trastornos cardiovasculares inducidos por estímulos físicos y químicos, como la miocardiopatía diabética, las cardiopatías isquémicas, la lesión cardíaca inducida por el estrés oxidativo, las disfunciones cardiovasculares inducidas por la dieta en modelos experimentales que involucran múltiples mecanismos como el antioxidante (ROS /RNS), antiinflamatorio (vías COX-2, IL-6, TNF- α , NF- κ B), potenciadores de los factores angiogénicos (VEGF, VCAM, HIF-1 α , iNO), inhibidores de los factores apoptóticos (BCL-2, BAX, caspasas) y la modulación de las vías asociadas a PCSK-9, PKC α/β , PPAR- α , JAK/STAT, MAPK (p38 α , ERK1/2, JNK) y PI3K/AKT/mTOR/p70S6K. Además, estos cambios a nivel celular y molecular se manifestaron como una mejora estructural, funcional y fisiológica del corazón tras el tratamiento con naringina. En conclusión, esta revisión sistemática y metaanálisis respaldan la evidencia científica disponible sobre los beneficios terapéuticos de la naringina en el manejo de diversas afecciones cardiovasculares [211].

Tal y como hemos mencionado en varias ocasiones, todos los componentes activos de Citroven TM, intervienen en mayor o menor grado los efectos saludables del producto, incluida la regulación de la presión arterial. En este caso, la flavona luteolina tiene un papel muy relevante.

Uno de los estudios más citados acerca de la relación entre los flavonoides y su capacidad para regular la presión arterial a través de la capacidad de inhibir la ECA fue publicado en 2012 en la revista PlosOne por nuestro grupo en colaboración con la Universidad Rovira i Virgili y el CTNS (Reus). Se llevó a cabo un amplio

estudio con gran número de compuestos flavonoides con el objetivo principal de establecer una relación estructura-actividad entre flavonoides y actividad IECA [212].

Se determinó el valor IC₅₀ para aquellos flavonoides que mostraron una actividad IECA superior al 60 %, siendo el orden de eficacia: luteolina >> apigeninaK > rutina > rhoifolina > quercetina > kaempferol. Desde el punto de vista estructural, nuestra evaluación de las capacidades de diferentes flavonoides para inhibir la actividad de la ECA confirmó que las principales características estructurales de su actividad inhibidora son las siguientes: (a) el doble enlace entre C2 y C3 en el anillo C; (b) el grupo catecol en el anillo B (3',4'-dihidroxi) y (c) el grupo cetona en el carbono C4 del anillo C. Adicionalmente, mostramos que a la concentración fisiológica de flavonoides el efecto relativo de las diferentes subestructuras en la actividad de IECA es el siguiente: doble enlace C2 =C3 > 4'-O-metoxilación = grupo carbonilo en C4 > 3'-hidroxilación > 3-hidroxilación > 3-O-glicosilación. A través de este estudio podemos evaluar la influencia de diferentes grupos estructurales, a nivel estérico y en sus efectos inductivo-mesoméricos en el esqueleto molecular de los flavonoides.

En este estudio demostramos que cambios en el núcleo activo del flavonoide afectan a su capacidad de inhibir la ECA, de forma similar a lo descrito para otras metaloproteinasas de zinc [213]. Es notable cómo estos flavonoides comparten la mayoría de las interacciones intermoleculares en el sitio S1 de la ECA que se han encontrado para los inhibidores sintéticos de la ECA (p. ej., lisinopril, enalaprilat, captopril) y, por lo tanto, sugiere que la unión al subsitio S1 de ECA es esencial para la actividad IECA. Los estudios *in silico* realizados en este trabajo, muestran que, esa posición, los dos hidroxilos del anillo B de la luteolina pueden realizar interacciones carga-carga con el sitio activo Zn²⁺ (de una manera similar a las interacciones realizadas por el ácido carboxílico de lisinopril y enalaprilato). Curiosamente, la interacción carga-carga con el hidroxilo 3' es más fuerte que la interacción con el 4' (es decir, la distancia entre el ion Zn²⁺ y el oxígeno hidroxilo es de 2,1 y 4,3 Å para 3' y 4', respectivamente), lo que podría explicar por qué la apigenina muestra una disminución de aproximadamente el 50 % en su capacidad IECA respecto a la luteolina [212].

Posteriormente se han realizado algunas investigaciones sobre la luteolina y su potencial capacidad para contribuir al mantenimiento de una presión arterial

normal. Entre ellas, destaca el trabajo en 2015 de Su et al., en él, los autores trataron de establecer el efecto de la luteolina en la remodelación vascular hipertensiva y su mecanismo molecular mediante estudios en ratas SHR [214]. Se encontró que la luteolina podría disminuir significativamente la presión arterial y el grosor medio de la aorta in vivo, y que dichos efectos podrían producirse a través de diversos mecanismos. La luteolina podría inhibir la proliferación y migración inducida por la angiotensina II- (Ang II-) de las células del músculo liso vascular (VSMC). El resultado de la tinción con diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) mostró que la luteolina redujo la producción de ROS estimulada por Ang II en VSMC. Además, los resultados de Western blot y zimografía de gelatina mostraron que el tratamiento con luteolina condujo a una disminución en el nivel de proteína ERK1/2, p-ERK1/2, p-p38, MMP2 y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). En definitiva, según los autores, estos datos respaldan que la luteolina puede mejorar la remodelación vascular hipertensiva al inhibir la proliferación y migración de VSMC inducidas por Ang II. Su mecanismo está mediado por la regulación de la vía de señalización de MAPK y la producción de ROS.

6.4. ESTATUS TROMBÓTICO

En relación con este concepto, a nivel plasmático, pueden existir diversos biomarcadores, no obstante, uno de los más utilizados es el Factor de von Willebrand (FvW), esta proteína es sintetizada en las células del endotelio vascular y megacariocitos y son almacenadas en los gránulos alfa de las plaquetas. Esta proteína cumple funciones como: a) mediar la adhesión de las plaquetas a los sitios de daño vascular al unirse al complejo glicoprotéico de membrana Gplb/IX y al colágeno en el subendotelio vascular, b) facilitar la agregación plaquetaria por medio de su unión al receptor plaquetario glicoproteína IIb/IIIa; y c) unirse al factor prototrombótico Factor VIII (FVIII) para protegerlo de la degradación proteolítica provocada por la proteína C activada en el torrente sanguíneo [215].

Las variaciones en la concentración de esta proteína en pacientes, incrementa el riesgo de presentar problemas trombóticos o en algunos casos de sangrado. Los modificadores de nivel del FvW están relacionados con los valores de referencia plasmáticos del mismo (50 a 150%), teniendo en cuenta que los niveles bajos se asocian con sangrado, y que los eventos trombóticos se han visto relacionados con

una mayor concentración de FvW. Obviamente esto no es fácil de definir en individuos sanos [215], pero se puede establecer que a partir de estos resultados que los individuos cuyas concentraciones plasmáticas de FvW + factor VIII están elevadas (> mayores de 150 UI/dL) tienen un mayor riesgo de sufrir una trombosis venosa profunda [216].

Los resultados obtenidos en nuestro estudio no muestran variaciones significativas en este parámetro (FvW). Al realizar el análisis comparativo de los valores de la variable en el estado inicial no se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p=0,882$), por lo que podemos afirmar que ambos grupos son homogéneos para esta variable en el instante inicial.

Si analizamos la evolución de cada uno de los grupos por separado obtenemos conclusiones muy similares. En el grupo placebo no se determinan diferencias significativas en su evolución de esta variable ($p=0,374$), por lo que los sujetos que han consumido el placebo no han modificado los niveles de esta variable durante la ingesta. Del mismo modo, en el grupo experimental, no se determina ninguna diferencia significativa a nivel estadístico ($p=0,833$) para los valores de esta variable tras el consumo del producto objeto de estudio.

Al comparar la evolución de ambos grupos no observamos diferencias significativas ($p=0,426$), por lo que no podemos confirmar que el producto experimental mejora el valor de esta variable en mayor medida que el producto placebo. En definitiva, la ingesta del producto en experimentación durante 56 días (8 semanas) no ha mejorado el status trombótico de los sujetos. La pregunta que surge es sencilla, ¿había que mejorar ese status trombótico?, ¿podía realmente mejorarse ese status trombótico en los sujetos sanos objeto de estudio?, obviamente, este es uno de los condicionantes de los ensayos de intervención con suplementos nutricionales/nutracéuticos.

En la composición de Citroven TM, como ya ha sido descrito, se habían incluido algunos compuestos que ya han demostrado una cierta capacidad para inhibir/reducir algunos procesos pro-trombóticos inducidos por diversos agentes, hablamos de las flavonas apigenina y luteolina. Este hecho estaba basado sobre todo en un estudio previo de nuestro grupo en colaboración con la Universidad Rovira i Virgili [212].

El objetivo de aquel estudio fue investigar la interacción de nueve flavonoides representativos de varias clases químicas, con respuestas plaquetarias dependientes de la generación de tromboxano A2 (TxA2) y del antagonismo del receptor, y analizar los requisitos estructurales para tales efectos. Se investigó el efecto de varios tipos de flavonoides sobre la agregación plaquetaria, la liberación de serotonina y la generación de TxA2. Se utilizaron ensayos competitivos de unión de radio ligandos para detectar la afinidad de estos compuestos a los receptores TxA2. Las flavonas apigenina y luteolina y la isoflavona genisteína anularon las respuestas plaquetarias inducidas por ácido araquidónico y colágeno, como la agregación y la secreción, con un efecto menos sustancial sobre la síntesis de TxA2. Estos compuestos se identificaron como ligandos específicos del receptor TxA2 en el rango de 1 mol/L, siendo este efecto responsable de los efectos antiplaquetarios relacionados con la estimulación con esos agonistas. La unión estrecha de los flavonoides al receptor TxA2 humano se basa en características estructurales como la presencia del doble enlace en C2=C3 y un grupo ceto en C4. La inhibición por flavonoides específicos de las respuestas plaquetarias in vitro inducidas por colágeno o ácido araquidónico parecía estar relacionada, en gran medida, con su capacidad para competir por la unión al receptor TxA2. Por lo tanto, el antagonismo de este receptor TxA2 puede representar un mecanismo adicional para el efecto inhibidor de estos compuestos en la función plaquetaria.

Como ya hemos mencionado, en este ensayo clínico no ha podido evaluarse ningún aspecto ni resultado relacionado con los resultados de este estudio previo in vitro.

6.5. ESTATUS ANTIOXIDANTE.

Este es uno de los aspectos más significativos en cuanto a los resultados obtenidos en el presente estudio y, sobre todo, con una relación muy directa con los mecanismos potenciales de protección del ámbito vascular/cardiovascular.

Tal y como ya hemos mencionado en esta memoria, en nuestro organismo existen diferentes mecanismos para evitar la extensión del daño causado por los radicales libres. Estos, incluyen sistemas enzimáticos endógenas, como el glutatión reducido (GSH), metabolito empleado como parámetro de estrés oxidativo para evaluar implicaciones clínicas, integridad y funcionalidad, incluso en el ámbito

cardiovascular, es más, los cambios de concentración de GSH en sangre podrían dar una medida del estrés oxidativo fisiológico in vivo. El glutatión oxidado (GSSG) es luego reducido por glutatión reductasa, manteniendo así la proporción GSH/GSSG.

Los resultados de nuestro estudio resultan especialmente significativos, con un aumento de la ratio GSH/GSSG del 62-65% (estatus oxidativo) y una reducción de carbonilos totales del 30-32% (reducción del daño oxidativo a proteínas), siendo estos resultados coherentes y, sobre todo, complementarios a los obtenidos en la reducción del nivel de LDL-oxidado como biomarcadores de la reducción del riesgo cardiovascular.

Algunos recientes ensayos clínicos de intervención han evaluado la relación GSH/GSSH como marcador del estado antioxidante.

Un ensayo realizado por Atkin et al. [217], empleando durante 4 semanas 1200 mg/día de extracto de ajo (suponen unos 50-60 mg de alliina y otros compuestos disulfuro), no mostró efectos significativos en el valor de GSH/GSSG, ni tampoco en la mejora de la función endotelial.

El único ensayo que muestra datos relevantes es el realizado por Kar et al. [218], que emplea, también durante 4 semanas, 600 mg/día de un extracto de semilla de uva rico en procianidinas (equivale a unos 450-500 mg/día de procianidinas). El aumento de la ratio GSH/GSSG se sitúa en valores similares a los obtenidos en nuestro estudio, sin embargo, se confirma, al igual que en casos anteriores, que este tipo de flavonoides no muestra una mejora estadísticamente significativa en la función endotelial, a diferencia de lo obtenido en nuestro estudio.

Nielsen et al. [219] llevaron a cabo un ensayo cruzado aleatorizado de dos semanas para estudiar el efecto de la ingesta de perejil, *Petroselinum crispum*, que contiene altos niveles de apigenina, sobre la excreción urinaria de flavonas y sobre los biomarcadores del estrés oxidativo. El estudio mostró que, en una dieta suplementada con perejil que contenía de 3,73 a 4,49 mg de apigenina/12 h, generó un incremento de las actividades de glutatión reductasa y superóxido dismutasa de los eritrocitos durante la intervención, en comparación con los niveles de la dieta básica.

Es importante considerar en este punto que una buena parte de la potencialidad y del efecto antioxidante de flavanonas cítricas, como es el caso de la

naringina, se atribuye principalmente a la reducción de ROS y la mejora de las defensas antioxidantes, incluida superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), vía epigenética [220]. La naringina en dosis de 0,2 g/mg durante 10 semanas proporciona protección contra el estrés oxidativo al aumentar la actividad de SOD, glutatión peroxidasa (GSH-Px), CAT, GSH, capacidad antioxidante total y disminuir la actividad de malondialdehído (MDA) en ratones con dieta rica en grasas.

La eficacia antioxidante de la hesperidina, un isómero de la neohesperidina presente en Citroven[™], y su aglicón hesperetina (primer metabolito tras su ingesta), no se limitó únicamente a su actividad de eliminación de radicales, sino que también mejoró las defensas antioxidantes celulares a través de la vía de señalización de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK)/factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar a 2 (Nrf2) [67]. Nrf2 es un factor de transcripción sensible a la oxidación-reducción que activa la transcripción de enzimas antioxidantes y citoprotectoras [221].

Sin embargo, son muy escasos los estudios clínicos en los que se menciona específicamente esta valoración del estatus oxidativo a través de la relación GSH/GSSG, ya que la mayoría relacionan este efecto antioxidante en la valoración de la proporción de ox-LDL únicamente, lo cual es básico, pero no ofrece una visión completa de dicho estatus.

Musolino V. et al. demostraron bien el efecto sinérgico de Bergacyn, un extracto de bergamota (una especie de naranja amarga conteniendo como flavonoides principales neohesperidina y naringina), sobre la inflamación vascular y el estrés oxidativo en un estudio clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de pacientes con DM2 y EHGNA [222]. Después de 16 semanas de tratamiento con Bergacyn (300 mg/día/p.o.), se demostró una mejora significativa de los biomarcadores: alanina aminotransferasa-ALT, aspartato aminotransferasa-AST, gamma-glutamyl transferasa-GT y fosfatasa alcalina-ALP. Estos efectos están asociados con una modulación sustancial del estrés oxidativo y los biomarcadores inflamatorios. De hecho, se demostró un aumento en los niveles de glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) y una reducción de los niveles de MDA y TNF- α [222].

Recordemos que los polifenoles del olivo constituyen una parte fundamental de la composición de Citroven[™]. Desde el punto de vista específicamente clínico

no existen estudios en los que se valore específicamente la ratio GSH/GSSG. No obstante, si puede destacarse un estudio comparativo realizado por Perez-Herrera et al. [223], en el que indica claramente que los aceites con compuestos fenólicos, como es el caso del aceite de oliva virgen (hidroxitirosol, oleuropeína, etc.) podrían reducir el estrés oxidativo postprandial en comparación con el aceite de girasol precisamente al incrementar comparativamente el valor de la ratio GSH/GSSG y reducir los niveles de carbonilos proteicos.

Este último es el segundo parámetro empleado para evaluar el estatus oxidativo, específicamente el daño oxidativo a proteínas. A través de la determinación de grupos carbonilo. En primer lugar, se determinaron los valores de la variable en el estado inicial, no apreciándose diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial ($p = 0,110$), por lo que se consideran homogéneos para esta variable y, a partir de ahí, se estudió la evolución de cada uno de los grupos por separado.

La evolución de este biomarcador en los sujetos que han consumido el producto placebo no muestra diferencias significativas ($p = 0,881$), no existiendo modificación en sus niveles. En el caso del grupo experimental, la situación es diferente. En este caso, sí que se observan diferencias significativas en la evolución de la variable ($p < 0,001$). Se puede afirmar que el consumo del producto en experimentación disminuye los niveles de carbonilos totales durante la ingesta. A la hora de comparar la evolución de ambos grupos se observan claras diferencias significativas ($p < 0,012$), es evidente que el grupo experimental consigue mejoras que los sujetos que tomaban producto placebo no tenían, en concreto, tal y como ya se ha mencionado en páginas anteriores, una reducción de carbonilos totales del 30-32% (reducción del daño oxidativo a proteínas), algo muy importante, no solo desde el punto de vista de la salud cardiovascular, sino de otros aspectos más globales como el propio concepto del envejecimiento saludable, no olvidemos que los sujetos de este estudio son voluntarios sanos, estamos trabajando siempre en estos ensayos de intervención con el concepto de prevención.

Para evaluar comparativamente nuestros resultados con estudios precedentes, hemos buscado otros ensayos clínicos en los que se hubieran empleado como ingredientes activos, bien flavonoides cítricos o bien polifenoles de olivo. Solo hemos encontrado un ensayo clínico específico, realizado en el año 2010, en el que se evalúa el efecto de suplementar una dieta hipocalórica con jugo de

mandarina, un alimento con un alto contenido de antioxidantes, principalmente flavonoides, sobre los biomarcadores del estado oxidativo en niños con obesidad severa. Cuarenta niños obesos fueron aleatorizados en dos grupos por pares en un estudio de intervención controlado de 4 semanas. Ambos grupos siguieron una dieta hipocalórica. Un grupo recibió adicionalmente un suplemento de 500 ml de jugo de mandarina al día. Se recogieron datos clínicos, antropometría, ingesta dietética y muestras de sangre en ayunas al inicio y después de la intervención. La peroxidación lipídica se evaluó mediante los niveles circulantes de malonildialdehído, y la oxidación de proteínas se determinó mediante la concentración de grupos carbonilo en el plasma. El grupo suplementado experimentó una disminución en los niveles de malonildialdehído (-9,6%, $p = 0,014$) y grupos carbonilo (-36,1%, $p = 0,006$) [224]. Podemos ver que en este trabajo la ingesta de flavonoides cítricos tipo flavanona/flavona genera una disminución de grupos carbonilo casi idéntica a la que hemos obtenido en nuestro estudio.

Como una consideración final en relación con todos los aspectos relacionados con el denominado estrés oxidativo, claramente presente en el ámbito de la salud cardiovascular, síndrome metabólico, etc. consideramos que CitrovenTM es una combinación de moléculas activas que permite abordar estructuralmente con enorme garantía el control de estos procesos. Están presentes compuestos que pueden actuar como captadores de radicales libres, están presentes compuestos que pueden actuar como agentes epigenéticos vía Nrf2, estimulando la expresión de las defensas endógenas del organismo y están presentes compuestos que pueden actuar interaccionado con diversos enzimas prooxidantes (lipooxigenasas, ciclooxigenasas, etc.), todo ello, tal y como hemos descrito, a través de diversos mecanismos, incluida una sinergia específica entre ellos.

6.6. ESTATUS ANTINFLAMATORIO

Este es uno de los aspectos más importantes en cuanto a la actividad del producto estudiado, la dicotomía oxidación-inflamación es clave en casi todos los aspectos relacionados con el sistema vascular y el síndrome metabólico, globalmente considerado. Casi todos los compuestos activos presentes en CitrovenTM cuentan con publicaciones relacionadas con su potencial actividad antiinflamatoria y, específicamente, en relación con la IL-6, el principal

biomarcador estudiado en este estudio en este ámbito. Sin embargo, creemos que el mayor soporte de la actividad antiinflamatoria de Citroven[™] radica en la presencia y concentración de las flavonas apigenina y luteolina.

Tal y como vimos en el capítulo de resultados, un hallazgo destacado del estudio fue una reducción significativa de la citoquina IL-6, un marcador de inflamación. Las altas concentraciones de IL-6 se han asociado con un mayor riesgo de infarto de miocardio (IM) en hombres sanos. Además, la IL-6 y los niveles de su receptor tienen un pico temprano en la fase aguda del IM, probablemente relacionado con la inestabilidad de la placa [225]. Se ha propuesto que la inflamación persistente contribuye a varias etapas en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular, con la señalización del receptor de IL-6 que propaga cascadas de inflamación descendentes [226]. En el estudio Salud, Envejecimiento y Composición Corporal de 2225 participantes de 70 a 79 años de edad, sin enfermedad cardiovascular de base, la IL-6 se asoció significativamente con todos los resultados: enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca congestiva [227].

En definitiva, y de ahí su enorme importancia en cualquier estrategia de prevención, los valores de IL-6 circulante en sujetos sin enfermedad vascular son predictivos de enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca e ictus. Este importante valor de la IL-6 como predictor de riesgo fue evaluado en el estudio prospectivo de cohortes ABC [228]. En este estudio, IL-6 y TNF- α mostraron resultados más consistentes que la PCR en la predicción de eventos cardiovasculares. Recientemente, Vasan et al. [229] exploraron el valor predictivo de estos marcadores inflamatorios en la aparición de ICC en sujetos mayores sin infarto de miocardio previo. Sus hallazgos son consistentes con los del estudio ABC, mostrando un fuerte valor predictivo para todos los marcadores, particularmente para IL-6. Hallazgos similares también fueron reportados por Koukkunen et al [230] explorando el valor pronóstico de estos 3 marcadores inflamatorios en pacientes mayores con cardiopatía congénita. Quizás, especialmente debido a su amplia gama de acciones, incluyendo efectos sobre plaquetas, endotelio y factores de metabolismo y coagulación, IL-6 puede tener un papel más importante en el desarrollo de cardiopatía congénita que algunos otros marcadores inflamatorios [231].

En este sentido, la contribución del suplemento activo a la reducción estadísticamente significativa de los niveles de IL-6 (38-40%) tras un corto periodo de tratamiento es clínicamente relevante y, hasta donde sabemos, no se ha descrito previamente una reducción de los niveles plasmáticos de IL-6 de esta magnitud en ensayos clínicos de intervención con suplementos nutricionales, repetimos, es un hallazgo realmente muy relevante.

Para entender esta relevancia hemos evaluado los ensayos clínicos más recientes en los que se han empleado suplementos dietéticos, nutraceúticos, etc. y en los que se ha evaluado este biomarcador. Diversos ensayos de intervención realizados recientemente no mostraron resultado alguno en la reducción del valor circulante de IL-6. Ensayos realizados con jugos y/o extractos con punicalaginas de granada [232], antocianinas de cerezas (cherry) [233,234], antocianinas de fresas (strawberries) [235], tanto agudos como a medio plazo, no mostraron efectos sobre IL-6. Otros ensayos realizados con activos polifenólicos como el resveratrol, empleando una dosis de 150 mg/día [236], e incluso un flavonoide cítrico tan conocido como la hesperidina (600 mg/día durante 4 semanas) [237], muestran solo una ligera disminución de la IL-6 respecto al grupo placebo, pero no estadísticamente significativa.

¿A que puede deberse esa falta de actividad? Se sabe que los flavonoides tienen buenas propiedades antiinflamatorias, sin embargo, su estructura molecular juega un papel importante en la actividad antiinflamatoria. Tener una estructura de anillo planar con insaturación en C2-C3, y las posiciones del grupo hidroxilo son cruciales para impartir la propiedad. El grupo hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B es muy importante, sin cuya presencia puede perderse la actividad antiinflamatoria del compuesto [238]. Esas características estructurales identifican a flavonoides tipo flavona y/o flavonol, pero, sobre todo, identifican a las flavonas apigenina y luteolina, ambas presentes en el producto estudiado, como ya se ha descrito ampliamente.

Es evidente que la potencialidad general de esta combinación de flavonas y flavanonas de origen cítrico y de polifenoles del olive es la responsable de todos y cada uno de los datos obtenidos en este estudio, no obstante, podría sugerirse que uno de los flavonoides presentes en la combinación, en concreto la flavona apigenina, contribuiría de manera especial a la disminución del nivel de IL-6.

En el caso de la apigenina, se han publicado cerca de 300 artículos en los que se identifica directamente la actividad de apigenina sobre IL-6, in vitro y preclínicos, sin embargo, por sorprendente que sea, no se han publicado ensayos clínicos con este compuesto en los que se evalúe esta relación. No obstante cabría destacar el artículo de revisión sistemática sobre apigenina, publicado en 2022 por Rahimi et al. [239], en el que un amplio metanálisis de los datos agrupados de biomarcadores inflamatorios demostró que la administración de apigenina disminuyó significativamente la expresión de IL-6, así como otros biomarcadores relacionados con oxidación/inflamación.

Si que hemos encontrado una intervención clínica con el empleo de un suplemento que contenía extracto de manzanilla, cuyo principal compuesto activo es la apigenina en forma glucosilada [240]. El estudio no demostró una relevancia significativa en cuanto a su actividad antiinflamatoria, sin embargo, sí que se observó una disminución del nivel de IL-6.

Ante esta ausencia de datos clínicos específicos y la relevancia de nuestros resultados, debemos hacer algunos comentarios acerca del potencial mecanismo de actuación de la apigenina. Se ha demostrado que la apigenina inhibe la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacáridos a través de múltiples mecanismos en los macrófagos, como las vías NF- κ B, MAPK/ERK y JNK [241].

Las propiedades antiinflamatorias de la apigenina son evidentes a través de una supresión dependiente de la dosis del mediador inflamatorio óxido nítrico (NO) y prostaglandina, a través de la inhibición de la NO sintasa inducible y la ciclooxigenasa-2 (Cox-2) en células microgliales murinas BV-2 [242]. La apigenina también suprime fuertemente los niveles de Cluster of Differentiation 40 (CD40), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) a través de la inhibición de la fosforilación inducida por interferón- γ (IFN- γ) del transductor de señal y activador de la transcripción 1 en la microglia murina [243].

Liang et al. [244] han investigado el efecto terapéutico de la apigenina sobre la neuroinflamación en ratones que expresan la proteína ácida fibrilar glial-interleucina 6 (GFAPIL6) utilizando pruebas inmunohistoquímicas y de comportamiento. La tinción histológica mostró que la apigenina disminuyó la cantidad de microglía activada de ratones GFAP-IL6 tanto en el cerebelo como en el hipocampo en alrededor de un 30% y un 25%, respectivamente.

Nuestro propio equipo en colaboración con la Universidad de Murcia [245] estudió el efecto de la apigenina (20 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.), (1 h antes de la adquisición) sobre el rendimiento de retención de 24 h y el olvido de una tarea de evitación pasiva paso a paso, en ratas Wistar macho jóvenes. Este pretratamiento con apigenina generó una mejora significativa en la memoria a largo plazo.

Tal y como hemos mencionado previamente, el otro flavonoide que sería responsable principal de la disminución del valor de IL-6, sería la flavona luteolina, procedente de una derivatización de un extracto de naranja amarga. Como en el caso de la apigenina, son muchos los artículos publicados en los que se relacionan ambos elementos, luteolina y IL-6, en concreto, más de 400 publicaciones científicas en últimos 25 años. Sin embargo, tampoco hemos encontrado ensayos clínicos con luteolina en los que se estudie específicamente la IL-6 como biomarcador. El único encontrado es una reciente publicación sobre un extracto de origen asiático en el que luteolina es uno de sus compuestos activos principales [246]. En este estudio, tanto in vivo como in vitro, el extracto estudiado ejerció efectos antiinflamatorios al inhibir la producción de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-1 β y TNF- α). Estos efectos fueron acompañados por la inhibición de la activación de NF- κ B y la fosforilación de I κ B α .

Es también destacable un reciente metaanálisis acerca de extractos botánicos conteniendo como compuesto activo esta flavona. Sabemos que la medicina tradicional China se utiliza a menudo como principal terapia para la fatiga relacionada con el cáncer. Sin embargo, existen pruebas limitadas que demuestren su efecto y mecanismo terapéuticos, en este estudio [247] los autores confirman que la luteolina actúa a través de múltiples dianas, como la proteína quinasa B α (AKT1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-6 (IL-6).

Otro metaanálisis realizado en el mismo ámbito confirma igualmente esta relación luteolina y IL-6. En esta revisión, el análisis farmacológico global identificó metabolitos clave en formulaciones de medicina tradicional china, incluidos beta-sitosterol, estigmasterol, quercetina, naringenina, luteolina, kaempferol, nobiletina, wogonina, formononetina e isorhamnetina. Utilizando la base de datos STRING y el software Cytoscape v3.9.0, una red de interacción proteína-proteína (PPI) reveló los ocho objetivos clave principales: IL-6, TNF, PPARG, PTGS2, ESR1, NOS3, MAPK8 y AKT1, implicados en respuestas antiinflamatorias, modulación del estrés antioxidante y mantenimiento de la homeostasis de los neurotransmisores [248].

Si nos referimos expresamente al mecanismo a través del cual la luteolina regula la expresión de IL-6, podemos encontrar diversas variantes.

La luteolina suprimió intensamente la producción de NO e IL-6 tanto a nivel de transcripción como de traducción génica en células RAW264.7 activadas por LPS de Pi. Las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno no estuvieron involucradas en la inhibición de la liberación de NO e IL-6 inducida por LPS de Pi por la luteolina. La luteolina no redujo la actividad transcripcional de NF- κ B a nivel de degradación de I κ B- α . La luteolina bloqueó la señalización de NF- κ B a través de la inhibición de la translocación nuclear y la actividad de unión al ADN de la subunidad p50 de NF- κ B y suprimió la señalización de STAT1 [249].

La luteolina inhibe las células madre del glioma. La IL6 liberada por las células madre del glioma se bloquea durante la acción del medicamento e inhibe la proliferación e invasión de las células madre del glioma a través de la vía de señalización IL6/STAT3. Además, la luteolina inhibe la secreción de TGF β 1, afecta la función de polarización de los macrófagos en el microambiente, inhibe la polarización de los macrófagos M2 en TAM e inhibe además varias funciones de las células madre del glioma al afectar la vía de señalización IL6/STAT3, la comunicación cruzada de la luteolina con la vía de señalización TGF β 1/SMAD3, etc.[250].

La luteolina puede reducir significativamente la liberación de IL-6 y TNF- α . Después de la intervención con luteolina, en la vía de la lipoxigenasa, los niveles de proteína de ALOX5, ALOX12 y ALOX15 se redujeron significativamente en comparación con los del grupo modelo. Estos resultados indican que la luteolina puede inhibir la liberación de IL-6 y TNF- α al restringir la activación de la vía de la lipoxigenasa, desempeñando así un papel protector en el modelo de lesión de cardiomiocitos inducida por OGD/R. [251].

En este muy reciente trabajo de este mismo año, los autores descubren que un extracto de una planta de origen tibetano (GYAC), cuyo compuesto activo principal es luteolina, puede mejorar la tolerancia a la hipoxia al regular varios genes diana, incluidos IL6, IFNG, etc. Las principales vías reguladoras fueron la vía de señalización HIF-1. El acoplamiento molecular mostró que la afinidad entre la luteolina y los genes diana (IL6, IFNG) era mejor. In vitro, observamos que la hipoxia puede inhibir la viabilidad celular y promover la apoptosis de las células H9C2. Y la hipoxia puede promover la expresión de LDH. Después de la adición

de luteolina, se inhibió la disminución de la viabilidad celular, el aumento de la apoptosis celular, la liberación de LDH y la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Además, la expresión de factores relacionados con la inflamación (IL-6, IL-10, IL-2, IFNG y VEGFA) también se inhibió en modelos de células hipóxicas [252].

Podríamos considerar igualmente la potencial contribución del resto de compuestos activos de Citroven[™] a la capacidad de regular la expresión de IL-6. Se han publicado más de 100 artículos que relacionan a la flavanona naringina con IL-6. Sería destacable la revisión y metaanálisis publicada en 2022 por Viswanatha et al, relacionada con el tema vascular [211]. El metaanálisis reveló que la naringina podría aliviar significativamente varios trastornos cardiovasculares inducidos por estímulos físicos y químicos, como la miocardiopatía diabética, las enfermedades cardíacas isquémicas, la lesión cardíaca inducida por estrés oxidativo y las disfunciones cardiovasculares inducidas por la dieta en modelos experimentales que involucran múltiples mecanismos como los antioxidantes (vías ROS/RNS), antiinflamatorios (vías COX-2, IL-6, TNF- α , NF- κ B), potenciadores de factores angiogénicos (VEGF, VCAM, HIF-1 α , iNO), supresores de factores apoptóticos (BCL-2, BAX, caspasas) y moduladores de PCSK-9, PKC α/β , PPAR- α , JAK/STAT, MAPK (p38 α , ERK1/2, JNK) y vías asociadas a PI3K/AKT/mTOR/p70S6K.

Un reciente estudio publicado en 2024 por Munir et al., los autores confirman que los flavonoides presentes en la cáscara de los cítricos (en este caso, naringina y hesperidina, isómero e la neohesperidina presente en Citroven[™]) tienen propiedades antioxidantes, que pueden ayudar a reducir el estrés oxidativo en un 30% y las enfermedades cardiovasculares en un 25%. También se han demostrado potentes efectos antiinflamatorios, reduciendo los marcadores inflamatorios como IL-6 y TNF- α hasta en un 40% en estudios de cultivo celular. Estos hallazgos resaltan el potencial de la cáscara de los cítricos como una valiosa fuente de nutraceuticos en terapias basadas en la dieta [253].

En relación con los compuestos polifenólicos de olivo, el número de estudios publicados en cuanto a su relación con IL-6, es también muy elevado, más de 400 publicaciones, pero está prácticamente relacionado con el consumo de aceite de oliva virgen, haciendo referencia específica a extractos de hoja de olivo únicamente unas 20 publicaciones.

Como más destacable, podríamos considerar la publicada en 2021 por Daniel González-Hedström et al. [254], realizado por varios grupos de las Universidades Autónoma y Complutense y que empleo, curiosamente, un extracto fabricado por nosotros (IFF). La oleuropeína redujo los niveles circulantes de colesterol LDL e IL-6 y aumentó las concentraciones de leptina y adiponectina. En el hígado, atenuó la expresión génica disminuida de SOD-1, GSR, GCK y GSK-3 β y redujo la sobreexpresión inducida por el envejecimiento de NOX-4, Alox-5, iNOS y TNF- α . En los segmentos de la aorta, previno la disfunción endotelial y la resistencia vascular a la insulina y mejoró la vasoconstricción en respuesta a KCl y NA. La mejora de la función vascular se asoció con la atenuación de las alteraciones en la expresión génica de COX-2, IL-6, GPx, NOX-1 e IL-10.

Finalmente destacar, entre esas publicaciones, un ensayo clínico específico con extracto de hoja de olivo publicado por Ismail et al., en 2021 [255]. Los resultados de esta revisión sugieren una reducción de la presión arterial sistólica, el LDL y los biomarcadores inflamatorios, pero es posible que no proporcionen una conclusión sólida sobre los efectos del extracto de hoja de olivo en el perfil cardiometabólico debido al número limitado de participantes en los ensayos incluidos. Lo que si resulta manifiesta es la reducción del nivel de IL-6, en el grupo de tratamiento, de unas 6 veces respecto al valor del grupo placebo.

6.7. ANTROPOMETRÍA. CALIDAD DE VIDA. ACTIVIDAD FÍSICA

Todas estas mejoras en la densidad mineral ósea, la presión arterial, el perfil lipídico, los biomarcadores antioxidantes y la IL-6 no estaban relacionadas con cambios en variables más generales como el peso corporal, el IMC, la masa grasa o el nivel de actividad física.

Antropometría: La composición corporal de los sujetos en estudio no ha sufrido modificaciones durante el estudio, no ha mejorado.

Calidad de vida: La calidad de vida no ha mejorado en los sujetos con la ingesta del producto experimental respecto al grupo placebo.

Actividad física: Las modificaciones observadas en el estudio no han sido causadas por un cambio en el nivel de actividad física de los sujetos en estudio.

6.8. SEGURIDAD

El consumo diario del nutraceutico durante 56 días no presenta eventos adversos relacionados con la ingesta del producto en ninguno de los sujetos del estudio ni modificaciones en la función hepática, ni renal de los sujetos evaluados.

6.9. LIMITACIONES Y FUTURAS DIRECCIONES

Los resultados obtenidos en este estudio deben interpretarse teniendo en cuenta las limitaciones del mismo, incluida la naturaleza exploratoria del ensayo, el tamaño reducido de la muestra y el período de tratamiento de solo 8 semanas.

En conclusión, este estudio demuestra que la suplementación con una combinación de varios extractos de frutas cítricas, pomelo (*Citrus paradisi* Macfad), naranja amarga (*Citrus aurantium* L.) y un extracto de hoja de olivo (*Olea europaea* L.), con la presencia principal de naringina, neohesperidina, apigenina, luteolina, oleuropeina e hidroxitirosol, durante 8 semanas, mejoró la función endotelial medida por vasodilatación dependiente de endotelio, redujo la presión arterial y los parámetros relacionados con el metabolismo lipídico, y mejoró el estado antioxidante e inflamatorio. Todos estos hallazgos, tomados en conjunto, respaldan un efecto beneficioso del suplemento nutraceutico sobre los mecanismos subyacentes que pueden interactuar entre sí para aumentar el riesgo cardiovascular en personas sanas. No obstante, se necesitan más estudios, con un tamaño de muestra y una duración de tratamiento mayores para confirmar los resultados del presente ensayo exploratorio.

VII – CONCLUSIONES

VII - CONCLUSIONES

7.1. CONCLUSIONES PRINCIPALES

El consumo diario del Nutraceutico durante 56 días demuestra:

- Una mejoría en la vasodilatación dependiente de endotelio. Si consideramos esta variable como predictora del riesgo cardiovascular, podemos confirmar que el producto disminuye el riesgo cardiovascular.

Respecto a las funciones específicas de la función endotelial:

- Una mejoría del perfil lipídico. El consumo del producto ha mejorado los niveles de colesterol total sérico, de colesterol LDL sérico y colesterol LDL oxidado sérico.
- Un descenso de las cifras de tensión arterial. Se ha apreciado una disminución de la tensión arterial diastólica.
- No se encontraron mejoras en el status trombótico.
- Una mejoría en el estatus antioxidante. Se ha observado un incremento en las defensas antioxidantes de los sujetos (cociente GSH/GSSG) y una disminución del daño oxidativo provocado a proteínas (grupos carbonilos).
- Una mejoría del estatus inflamatorio. Se observa una disminución de interleucina 6 que es considerada como un mediador inflamatorio importante.

7.2. CONCLUSIONES SECUNDARIAS

- No se encontró ningún cambio en los parámetros antropométricos.
- El consumo del producto experimental no produjo variación en la calidad de vida.
- El consumo diario del nutraceutico durante 56 días no muestra acontecimientos adversos relacionados con la ingesta del producto en

ninguno de los sujetos del estudio ni modificaciones en la función hepática, ni renal de los sujetos evaluados.

VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

8.1 VALORACIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

El mundo vegetal es un mundo de oportunidades, ya que proporciona nutrientes y numerosas moléculas para ser utilizadas en el mundo de la salud, y esta riqueza de soluciones potenciales requiere responsabilidad en la forma en que obtenemos, extraemos y producimos estos elementos de manera sustentable. La evolución, la ciencia y la regulación nos han llevado a establecer límites y pautas que amplían los casos de uso de los ingredientes botánicos en suplementos nutricionales, nutracéuticos, alimentos funcionales, cosmeceúticos, nutrición médica y aplicaciones farmacéuticas.

El proyecto sobre el que se fundamente el desarrollo del presente trabajo experimental tiene como objetivo científico y tecnológico, algo que cada vez resulta más necesario en este ámbito de trabajo, desarrollar un nuevo enfoque para la producción de alimentos funcionales y complementos alimenticios que supere la estrategia tradicional derivada de los enfoques de la industria farmacéutica (un fármaco para un objetivo / un ingrediente para un objetivo) y que añada nuevos conceptos nutrigenómicos, personalizando los ingredientes bioactivos a tipos específicos de la población.

Añadir funcionalidad a los alimentos para dotarlos de propiedades más saludables ha sido una importante estrategia industrial de los últimos años que ha propiciado el desarrollo de alimentos funcionales, productos que aportan valor, mejoran la imagen de marca y podrían ser una herramienta para reducir los costes de salud pública al permitir la reducción del consumo de medicamentos. Como resultado, los denominados alimentos funcionales están cada vez más presentes en el mercado. La industria, sin embargo, tiene grandes problemas en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales y complementos alimenticios, especialmente aquellos que utilizan extractos de plantas, tanto por el rigor y lentitud que impone la EFSA en la Unión Europea, como por la falta de biomarcadores válidos para demostrar causa/efecto o la dificultad de protección industrial, pero sobre todo por la falta de aproximaciones innovadoras que permitan un avance conceptual.

El proceso de diseño e innovación de productos funcionales, tanto alimentarios como nutracéuticos, responde a una lógica con gran analogía a la utilizada en la innovación de productos del sector farmacéutico. Esta lógica establece que al consumir un principio activo contenido en un fármaco se modifica (mejora) una diana biológica, ejerciendo con ello un efecto beneficioso sobre la patología del individuo. La transferencia de esta lógica al sector industrial alimentario ha dado como resultado nuevos alimentos que contienen uno o varios compuestos bioactivos pero cuya acción se centra en una diana biológica cuya modulación es beneficiosa para el individuo. Este enfoque ha permitido un gran salto y evolución del mercado alimentario, con una amplia gama de productos en el mercado con alegaciones beneficiosas para la salud. En todo este proceso, sin embargo, no se ha considerado que la prevención del riesgo de patología debe, o puede, abordarse desde otra perspectiva más acorde con los conocimientos actuales de las ciencias de la nutrición, la bioquímica y la medicina.

La mayor parte de los “drivers” que mueven el mercado alimentario con funcionalidad se centran en enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, bienestar digestivo, obesidad, dolores articulares, etc., todas ellas multifactoriales, situaciones derivadas de la afectación de un conjunto poliédrico de dianas biológicas. Del mismo modo, las situaciones vitales que atravesamos en determinados momentos de nuestra vida (crecimiento, estrés laboral, estrés deportivo, menopausia, envejecimiento, etc.) afectan a un amplio abanico de procesos biológicos y son también multifactoriales.

La mayoría de las patologías multifactoriales son el resultado de un desequilibrio del conjunto de procesos responsables de que los organismos mantengan una situación de equilibrio u homeostasis que les permita adaptarse a los cambios del medio. La capacidad de los organismos para mantener la homeostasis se conoce como resiliencia. Por tanto, mejorar la resiliencia metabólica es una forma eficaz de prevenir la aparición de patologías aumentando la capacidad del organismo para restablecer los procesos fisiológicos a un estado normal, estable pero dinámico tras la exposición a situaciones de estrés o a desafíos específicos. Este enfoque implica la combinación de un conjunto de ingredientes bioactivos en un mismo alimento que actúan en armonía para mantener la homeostasis. Un enfoque multifactorial permite el desarrollo de nuevos productos/mezclas que pueden ser más eficaces para prevenir estos desequilibrios,

simplificando la elección del consumidor, aportando nuevos argumentos comerciales y, en definitiva, permitiendo el crecimiento de la industria alimentaria.

Realizando una simple valoración general industrial de los resultados obtenidos en este estudio, diríamos que dichos resultados han mostrado una consistencia más que significativa y una coherencia mecanística entre compuestos activos y evaluación de las variables fisiológicas consideradas. Se ha puesto de manifiesto, y creemos que es un éxito considerable de este estudio, el uso de una estrategia basada en el criterio de multifactorialidad en el ámbito de los suplementos nutricionales, es decir en un ámbito de acción preventiva, no terapéutica, y no tiene nada que ver con el uso de simples mezclas de compuestos de origen natural buscando una especie de sinergia milagrosa. Cada uno de los componentes de este nutracéutico tiene una misión específica, pretende actuar a través de un mecanismo bien definido y debe consolidar con su propia participación fisiológica los efectos globales sobre el riesgo cardiovascular. Los resultados obtenidos constituyen un prudente, pero significativo, éxito en el uso del mismo y nos hacen ver con perspectiva positiva su próximo lanzamiento comercial.

8.2 PRESENTE Y FUTURO DEL PRODUCTO.

Durante los 4 últimos años, después de la publicación oficial de los resultados del estudio, se ha trabajado en una serie de actuaciones totalmente necesarias y obligatorias dentro de la compañía. Además, todas estas actividades eran condicionantes para poder publicar adecuadamente esta tesis doctoral con la correspondiente autorización de la empresa.

Teníamos los resultados y el trabajo estaba terminado, pero la finalización de estas actividades, siguiendo las recomendaciones de la compañía, han condicionado la presentación de la tesis y su defensa y por este motivo lo hacemos 4 años después de la publicación del artículo.

Durante este tiempo hemos trabajado intensamente en conseguir la aprobación completa para que el producto pueda salir al mercado, cosa que finalmente hemos conseguido este año. Todo este trabajo ha supuesto, además, gran parte de mi tiempo laboral durante todo este periodo.

A continuación, pasamos a describir en orden cronológico todas estas actividades:

1-Conseguir la aprobación global del uso y lanzamiento del producto (proceso denominado comúnmente “Stewardship”) por parte de la compañía. La revisión Stewardship dentro de una multinacional consiste en una revisión global del producto en cuestión donde se valoran cosas como la consistencia en la fabricación del producto, sus características, la seguridad. Todo esto nos obligó a generar una serie de documentos necesarios para poder justificar esta revisión. Esto fue lo primero que necesitamos para que la compañía aprobara el lanzamiento del producto, Fue un gran trabajo de equipó que nos llevó entre 6 y 9 meses.

Lista de acciones necesarias para cumplimentar la revisión Stewardship:

Product	
<i>Product Identity</i>	<i>Descriptive nature of the product, its form (powder, liquid, paste etc.) and its packaging; sales unit</i>
<i>Product Composition</i>	<i>Provide a quantitative breakdown of all known components, as a result of the production process; not the list of raw materials, except if this is a blend. Provide information on potential other components (ie. process impurities, processing aid residues, solvent residues, reaction compounds etc.)</i>
<i>Product Safety Data</i>	<i>Information on available product safety studies: official toxicological monographs, scientific opinions from Agencies or independant scientific panels....Internal safety data.</i>
<i>Product Efficacy</i>	<i>What is the functionality; how is it measured and controlled</i>
<i>Shelf Life</i>	<i>Shelf life period during which the product remain within specification. Provide information on existing shelf life studies, storage conditions (optimal and extreme)</i>
<i>Proposed Claims</i>	<i>Description of the claim proposed (health, compositional, efficacy). Provide information on existing data if available.</i>
<i>Proposed Product Certification(s)</i>	<i>Kosher/Halal/organic/non-GMO, etc.</i>

<i>Packaging (primary, secondary)</i>	<i>Describe the packaging material, primary and secondary and indicate whether already in use for similar products</i>
Manufacturing	
<i>Raw Materials, etc.</i>	<i>Raw materials, processing aids, solvents, fermentation nutrients etc...used in the process. Indicate if the materials are already in use for similar production. Information on the origin (animal, vegetal, mineral) with emphasis on possible GMOs, allergens and food contaminants.</i>
<i>Production Process</i>	<i>Description of the manufacturing process. Specify what is changed compared to an existing process (MOC)</i>
<i>Manufacturing Location(s)</i>	
<i>Contact Manufacturing</i>	<i>Description of contract manufacturing service to be provided, name of the facility and description of the type of agreement and whether CM has been audited before.</i>
<i>Co-Products/Bi- Products</i>	<i>Description of the co-products or by-products, application areas, sales countries/regions</i>
<i>Wastes</i>	<i>Provide information on waste stream composition, disposal.</i>
Distribution	
<i>Warehousing</i>	<i>Provide information on storage locations, whether 3PL will be used and if they have been audited (SHE/Q&FS).</i>
<i>Transportation</i>	<i>Describe the shipping conditions, carrier companies, containers to be used and any other specific information about transportation.</i>
<i>Distributors</i>	<i>Information on whether distributors will be involved in the sales and marketing; Describe the type of agreement. Indication whether the distributor as already been evaluated by DuPont.</i>
Uses	
<i>Intended Uses</i>	<i>Provide information on the recommended applications, on the foreseeable misuses.</i>
<i>Conditions of Use</i>	<i>Provide information on the use levels, exposure scenarios for consumers, for workers.</i>
<i>Customers</i>	<i>Information on targeted customers (customer-driven projects)</i>
<i>Countries</i>	<i>Regions/countries where the product will be sold in order to prepare the pre market approvals and import/export control process.</i>
PS&R Budget	

<i>Tox studies, Ecotox, Clinical, Analytical, etc.</i>	<i>How much is required</i>
Nagoya Evaluation	
<i>Is this project in scope for Nagoya, and if so, how is compliance ensured</i>	<i>If Nagoya is irrelevant to this project, then please indicate so (out of scope for Nagoya). If in doubt, then consult with the Nagoya team</i>

PS&R Assessment:
Perception Analysis <i>Identification of any perception showstopper and any mitigation plan to turn around the obstacle. (GMOs, black listed products, green washing....) Indicate positive perception and how to maintain it over time.</i>
Product Safety & Regulatory Assessment <i>Regulatory status, product safety including exposure, labelling requirements, permitted uses and max levels</i>
Claim review, including health, efficacy, compositional claims etc. <i>for the targeted countries / application(s) Claim authorization (countries) and careful communication</i>
Quality & Food Safety assessment <i>Food/feed safety hazard identification (contaminants, allergen management etc.), GMP, GHP. Discuss the suitable HACCP plan for safeguarding the product integrity.</i>
Occupational safety assessment <i>Product safety hazard identification, exposure scenarios and risk characterization, internal and external</i>
Environment assessment (internal, external) <i>Taking account of co-products and waste</i>
Biodiversity law assessment

<i>Sustainability assessment (1 Hour)</i> <i>Using the sustainability rating tool.</i>
<i>Suppliers/contract manufacturing evaluation</i> <i>Only applies if you are contract manufacturing this - would require contract manufacturing training</i>
<i>Distributor assessment</i>
<i>PS&R competitive advantage assessment</i>

Para poder acometer todos estos requerimientos internos de la compañía, se generaron una serie de documentos:

- *DOC 1-nutrients-Citroven™ Clinical Trial*
- *DOC 2-New Cardiovascular study Amsterdam 2019*
- *DOC 3-CITROVEN™ Specification_V1*
- *DOC 4-CITROVEN RMQ_V2*
- *DOC 5-Flow chart extended Citroven™*
- *DOC 6-Flow chart Olive leaf extract_rev. 11*
- *DOC 7-Flow chart Grapefruit extracts_rev. 14*
- *DOC 8-Flow chart Bitter Orange extract_rev. 12*
- *DOC 9-Flow chart Apigenin_rev. 6*
- *DOC 10-Flow chart Luteolin_rev 2*
- *DOC 11-Citroven FDA DI Dossier*
- *DOC 12-CITROVEN™_MSDS_EU(EN)-*
- *DOC 13-Citroven Stability Study 6 months*
- *DOC 14-Potential Health claims Citroven™ V4*
- *DOC 15-IFF Murcia - Nutrafur Kosher Certificate 2022*
- *DOC 16-IFF Murcia - Nutrafur Halal Certificate 2022_2*
- *DOC 17-GMO-Statement 2021*
- *DOC 18-ISO 14000 CertificadoGA-2020-0097_ES_2021-12-21(1)*
- *DOC 19-FS22 20200007 IFF Murcia Natural Ingredients MOD 20220201-nut*

2- Documento de toxicología (IFF DIETARY INGREDIENT SAFETY INFORMATION). Una vez aprobado el proceso “Stewardship”, era necesario generar un documento de seguridad interno que fuera aprobado por el estricto

equipo de regulatorio de la compañía. Se realizó un intenso estudio toxicológico por parte de la compañía donde intervinieron muchos departamentos. Esto era indispensable para que la empresa diera el visto bueno al producto y asumiera toda la responsabilidad de una futura venta.

A modo de ejemplo, aquí detallamos el índice de dicho documento con todos los apartados necesarios para cumplimentarlo:

Dietary Ingredient (DI) Identity Information

1.1 Description of the identity of the DI

1.2 Description of the evidence verifying the identity of the DI

1.3 DI Manufacture

1.3.1 Raw Materials and Harvest

1.3.2 Formulation Ingredients

1.3.3 Manufacturing process

1.3.4 DI Specifications

1.3.5 Methods of analysis

1.3.6 Analysis of potentially toxic processes

1.3.7 Disintegration and dissolution profile

1.3.8 Shelf-life and conditions of storage

2. History of Use or Other Evidence of Safety

2.1 History of use

2.1.1 Description of the relationship between the historically consumed material and the DI or dietary supplement containing the DI

2.1.2 Describe identity information verifying the relationship between the historically consumed material and the DI or dietary supplement containing the DI

2.1.3 Historical conditions of use and cumulative exposure estimate for the historically consumed material

2.1.4 Adverse events associated with historically consumed material

2.1.5 *Alternative rationale for reasonable expectation of safety based on history of use*

3. *Other evidence of safety*

3.1 *In vitro and Animal studies*

3.2 *Human Clinical Studies*

3.2.1 *Citation for the clinical safety studies*

3.2.2 *Identity information verifying the relationship between the test article and the DI or the dietary supplement*

4. *Basis for Concluding That the New Dietary Ingredient Will Reasonably Be Expected to Be Safe for Use in the Dietary Supplement*

4.1 *Determination of the No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) or Lowest-Observed Adverse Effect Level (LOAEL)*

4.2 *Determination of safety factor*

4.3 *Determination of the Acceptable Daily Intake (ADI)*

4.4 *Determination of margin of safety*

4.5 *Safety narrative and conclusion*

4.6 *Alternative basis for reasonable expectation of safety*

Estas son las conclusiones a las se llegaron en dicho documento:

Safety narrative and conclusion

This dietary supplement powder consists of grapefruit extract (citrus paradisi), bitter orange extract (citrus aurantium), olive leaves extract (olea europaea), Apigenin and luteolin and is used to support cardiovascular health at a dose of 1000 mg/day.

In the recent guidance document published by the FDA on new dietary ingredient notification, daily chronic use refers to ingestion at least once a day, every day, for at least three months in a row. Daily chronic use includes long-term use. This product is intended for chronic supplement use.

The supplement is safe and approved under the current dosage regimen and supported by the following:

- *The identity of the product has been well characterized and sample lots are routinely assayed to verify compliance with specifications.*
- *The method of manufacture, safety, specifications and high-quality control standards have been demonstrated. It is manufactured in accordance with cGMP. Stability studies demonstrate that extract was satisfactorily stable under normal conditions.*
- *The components of the extract have been a part of the human diet since prehistoric times and is common in the U.S. food supply. The extracts are also GRAS as per the FDA and have a history of use in dietary supplements. No evidence of toxicity in humans has been recorded and hence they have a long history of safe use in human diet.*
- *There has been no evidence of serious adverse effects from individual extracts as well as Citroven[™] based on available clinical data.*
- *Based on clinical trials with Citroven[™] and the individual extracts it can be concluded that the dietary supplement is safe for intended use, taking into account recommended contraindications, warnings and precautions for use.*
- *The dietary supplement mainly contains flavonoids. The pharmacokinetic properties of the flavonoid glycosides, suggest they are hydrolyzed by gut microbiota to their respective aglycones, which have relatively low bioavailability and rapid excretion, thus are not expected to bioaccumulate.*
- *Preclinical studies have shown that individual extracts are safe to use and have an adequate margin of safety (>100).*

3- Introducción del producto en la cadena de marketing. Una vez solventados los dos puntos anteriores, el producto se introdujo en la cadena de marketing de la compañía, la valoración positiva por parte de este equipo llevó incluso a que el producto fuera nominado (algo muy importante) del mes:



Algunos ejemplos de la publicidad y estudios de mercado internos realizados. El equipo de I+D trabajó intensamente con los departamentos de ventas para avanzar en este tema:



CITROVEN®

Natural blend for cardiovascular support

What is it? A unique formula of Mediterranean botanical actives from Olive and citrus with synergetic activity to support cardiovascular health

What does it do? The main phytochemicals, polyphenols and flavonoids of these botanical extracts support multiple cardiovascular health related functions including:

- Endothelial function
- Blood pressure
- Lipid profile
- Oxidative and inflammatory status

The product delivers the protective phytonutrients of the Mediterranean diet in a tailor-made optimized blend, covering a wide scope of benefits and related health claims.

Is it clinically studied? Besides extensive research on the individual actives, a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial demonstrates CitroVen™ has a positive effect on the reduction of multiple cardiovascular risk factors in healthy subjects*

How is it made? Proprietary blend of botanical extracts

* Effect of a Combination of Citrus Flavones and Flavonones and Olive Polyphenols for the Reduction of Cardiovascular Disease Risk An Exploratory Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study in Healthy Subjects. Masaro et al. Nutrients 2020, 12, 1475.

iff



POSITIONING & STRATEGY

Citroven as combo product

Citroven is to be positioned as the **combination formula**, with **synergetic effect** in which **multiple pathways of action** are covered, supported by **strong clinical data**



Value proposition:

- Exclusive, unique formula
- 1 ingredient to cover multiple aspect of CVH
- Extensive scientific substantiation + proprietary study



Target customers:

- Science based ingredients, at higher end of the market
- Fit for value proposition, cost/dose within acceptable scope
- Focus on CVH
- To use Health practitioner's sales channels (where possible)



MARKET EVALUATION

Positioning / Activity / Claims

Cardiovascular	Cholesterol	Lipid profile	Endothelial function	Blood pressure	Inflammation	Antioxidant	Vascular protection	Artherosclerosis	General CV support	Claims*
Citroven										AX, CV, CH, BP, TG
Citrolive										AX, CV
Bioflavonoids										AX, CV
Quercetin										AX, CV
Co Q10										AX, CV
Pomegranate										AX, CV
Bergamot										AX, CV, CH, TG
RYR										CV, CH
Pycnogenol										AX, CV
Apigenin										
Omega 3										CV
Artichoke										
Phytosterols										CV, CH
Olive Leaf extract										AX, CV, BP
Benolea										AX, CV, BP
Garlic										CV, CH, BP
Beetroot										CV, BP
Vit K2										CV

*Claims currently used on packaging in US:

Mostly limited to general claims:

- AX: Antioxidant support
- CV: Cardiovascular support, heart health, circulatory support
- CH: Cholesterol support, healthy cholesterol levels, cholesterol balance
- BP: Healthy blood pressure
- TG: Balance triglyceride levels



MARKET EVALUATION

Main competitive products in the market

Low cost or dose with CV health claims:



Quercetin



Grape seed



Coenzyme Q10



Phytosterols



Red Yeast Rice



Beetroot

Middle/Higher cost or dose with CV health claims:



Omega 3



(Black) Garlic



Olive leaf extract



Pomegranate



Bergamote



Pine Bark / Pycnogenol

— > — > —



4- Presentación del producto en el mercado. Principalmente, Citroven se ha presentado recientemente en el mercado americano, fundamentalmente en Estados Unidos y Canadá. Como prueba de ello, la Agencia de Salud Pública de Canadá ha aceptado varios de los claims propuestos para el blend.

A continuación, se detallan, a modo de ejemplo, las alegaciones de salud aceptadas por la autoridad canadiense para el lanzamiento del producto:

Recommended use:

- *Helps to support healthy endothelial function.*
- *Helps maintain endothelium-dependent vasodilation, which contributes to normal blood flow.*
- *Helps to maintain and/or support cardiovascular health.*
- *Antioxidant support for heart health.*
- *Source of (an) antioxidant(s)/Provides (an) antioxidant(s).*
- *Source of (an) antioxidant(s)/Provides (an) antioxidant(s) that help(s) fight/protect (cell) against/reduce (the oxidative effect of/the oxidative damage caused by/cell damage caused by) free radicals.*
- *Helps reduce blood Interleukin-6 (IL-6) levels, a clinical marker of inflammation.*

Lo cual es realmente todo un éxito, dada la exigencia de esta agencia.

Por último, ya con todos estos trámites superados, y tras un muy largo camino recorrido en todos los aspectos, cercano a los 8 años, esperamos que el lanzamiento del producto en el 2025 sea un lanzamiento más exitoso.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global health estimates: Leading causes of death [Internet]. [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
2. Luengo-Fernandez R, Little M, Gray A, Torbica A, Maggioni AP, Huculeci R, et al. Cardiovascular disease burden due to productivity losses in European Society of Cardiology countries. *European Heart Journal - Quality of Care and Clinical Outcomes*. 2024 Jan 1;10(1):36–44.
3. Jagannathan R, Patel SA, Ali MK, Narayan KMV. Global Updates on Cardiovascular Disease Mortality Trends and Attribution of Traditional Risk Factors. *Curr Diab Rep*. 2019 Jun 20;19(7):44.
4. Reinikainen J, Kuulasmaa K, Oskarsson V, Amouyel P, Biasch K, Brenner H, et al. Regional and temporal differences in the associations between cardiovascular disease and its classic risk factors: an analysis of 49 cohorts from 11 European countries. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2024 Mar 15;31(5):569–77.
5. Wang T, Li Y, Zheng X. Association of socioeconomic status with cardiovascular disease and cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *J Public Health (Berl)*. 2024 Mar 1;32(3):385–99.
6. Yu J, Yang X, Deng Y, Krefman AE, Pool LR, Zhao L, et al. Incorporating longitudinal history of risk factors into atherosclerotic cardiovascular disease risk prediction using deep learning. *Sci Rep*. 2024 Jan 31;14(1):2554.
7. Wong ND. Cardiovascular risk assessment: The foundation of preventive cardiology. *American Journal of Preventive Cardiology*. 2020 Mar 1;1:100008.
8. Yusuf S, Joseph P, Rangarajan S, Islam S, Mente A, Hystad P, et al. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*. 2020 Mar 7;395(10226):795–808.

9. Gao W, Sanna M, Chen YH, Tsai MK, Wen CP. Occupational Sitting Time, Leisure Physical Activity, and All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality. *JAMA Network Open*. 2024 Jan 19;7(1):e2350680.
10. Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Archives of Medical Research*. 2015 Jul 1;46(5):328–38.
11. Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: Pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovascular Pathology*. 2004 May 1;13(3):125–38.
12. Martin SS, Blaha MJ, Blankstein R, Agatston A, Rivera JJ, Virani SS, et al. Dyslipidemia, Coronary Artery Calcium, and Incident Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2014 Jan 7;129(1):77–86.
13. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*. 2017 Aug 21;38(32):2459–72.
14. Frostegård J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med*. 2013 May 1;11(1):117.
15. Díaz-Vidal DM, Téllez-T LA, Camelo-Prieto D, Tordecilla-Sanders A, Hernández-Quinónez PA, Sabogal E, et al. Función endotelial y lipemia postprandial en adultos con presencia de criterios asociados a síndrome metabólico: efecto del estado nutricional. *Revista Colombiana de Cardiología*. 2017 Jul 1;24(4):394–405.
16. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología Suplementos*. 2006 Jan 1;6(1):21A-30A.
17. Corban MT, Lerman LO, Lerman A. Endothelial Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019 Jul;39(7):1272–4.
18. Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential

- Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan;22(8):3850.
19. Vogel RA. Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilation. *The American Journal of Cardiology*. 2001 Jul 19;88(2, Supplement 1):31–4.
 20. Lakshmanan S, Shekar C, Kinninger A, Birudaraju D, Dahal S, Onuegbu A, et al. Association of flow mediated vasodilation and burden of subclinical atherosclerosis by coronary CTA. *Atherosclerosis*. 2020 Jun 1;302:15–9.
 21. Inoue T, Matsuoka H, Higashi Y, Ueda S ichiro, Sata M, Shimada K ei, et al. Flow-Mediated Vasodilation as a Diagnostic Modality for Vascular Failure. *Hypertens Res*. 2008 Dec;31(12):2105–13.
 22. Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, et al. Relationship between flow-mediated vasodilation and cardiovascular risk factors in a large community-based study. *Heart*. 2013 Dec 15;99(24):1837–42.
 23. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-Mediated Vasodilation: A Diagnostic Instrument, or an Experimental Tool? *Chest*. 2005 Jun 1;127(6):2254–63.
 24. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric Oxide Is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries In Vivo. *Circulation*. 1995 Mar;91(5):1314–9.
 25. Meredith IT, Currie KE, Anderson TJ, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. Postischemic vasodilation in human forearm is dependent on endothelium-derived nitric oxide. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996 Apr;270(4):H1435–40.
 26. Cooke JP, Rossitch E, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(5):1663–71.
 27. Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR, Saito T, Miura M, et al. Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles. *Circulation*. 2001 Apr 17;103(15):1992–8.

28. Olesen SP, Clapham D, Davies P. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*. 1988 Jan;331(6152):168–70.
29. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*. 1986 Jan;8(1):37–44.
30. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Endothelial Barrier and Its Abnormalities in Cardiovascular Disease. *Front Physiol* [Internet]. 2015 Dec 9 [cited 2024 May 23];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2015.00365/full>
31. Noble MIM, Drake-Holland AJ, Vink H. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2008 Jul 1;101(7):513–8.
32. De Caterina R, Libby P. Endothelial dysfunctions in vascular disease. 2008 [cited 2024 May 23]; Available from: <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=et-Pl-xh2vQC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Endothelial+Dysfunctions+in+Vascular+Disease&ots=C6gGUsR671&sig=2aDrUN66q6z9hTVRnqwaOxdR0a4>
33. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, et al. Primary Prevention of Acute Coronary Events With Lovastatin in Men and Women With Average Cholesterol Levels Results of AFCAPS/TexCAPS. *JAMA*. 1998 May 27;279(20):1615–22.
34. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. 1992 Jan;12(1):120–34.
35. Nielsen LB, Nordestgaard BG, Stender S, Kjeldsen K. Aortic permeability to LDL as a predictor of aortic cholesterol accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. 1992 Dec;12(12):1402–9.

36. Hajjar DP, Gotto AM. Biological Relevance of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Arterial Diseases. *The American Journal of Pathology*. 2013 May 1;182(5):1474–81.
37. Østerud B, Bjørklid E. Role of Monocytes in Atherogenesis. *Physiological Reviews*. 2003 Oct;83(4):1069–112.
38. Gyárfás I, Keltai M, Salim Y. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries in a case-control study based on the INTERHEART study. *Orvosi hetilap*. 2006;147(15):675–86.
39. Nakanishi R, Baskaran L, Gransar H, Budoff MJ, Achenbach S, Al-Mallah M, et al. Relationship of Hypertension to Coronary Atherosclerosis and Cardiac Events in Patients With Coronary Computed Tomographic Angiography. *Hypertension*. 2017 Aug;70(2):293–9.
40. Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. *Curr Hypertens Rep*. 2010 Dec;12(6):448–55.
41. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *BioMed research international* [Internet]. 2014 [cited 2024 May 23];2014. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/406960/abs/>
42. Rafflenbeul W. Hypertension Treatment and Prevention of New Atherosclerotic Plaque Formation. *Drugs*. 1994 Dec 1;48(1):11–5.
43. Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandenbroeck K, et al. Pathophysiology of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Jan;23(6):3346.
44. Okhota S, Melnikov I, Avtaeva Y, Kozlov S, Gabbasov Z. Shear Stress-Induced Activation of von Willebrand Factor and Cardiovascular Pathology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Jan;21(20):7804.
45. Taylor A, Vendramin C, Singh D, Brown MM, Scully M. von Willebrand factor/ADAMTS13 ratio at presentation of acute ischemic brain injury is predictive of outcome. *Blood Advances*. 2020 Jan 28;4(2):398–407.

46. Mundi S, Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, van Hinsbergh VWM, Iruela-Arispe ML, et al. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors—a review. *Cardiovascular Research*. 2018 Jan 1;114(1):35–52.
47. Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002 Dec 30;1585(2):213–21.
48. Matuz-Mares D, Riveros-Rosas H, Vilchis-Landeros MM, Vázquez-Meza H. Glutathione Participation in the Prevention of Cardiovascular Diseases. *Antioxidants*. 2021 Aug;10(8):1220.
49. López-Mirabal HR, Winther JR. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2008 Apr 1;1783(4):629–40.
50. Atmaca G. Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids. *Yonsei Medical Journal*. 2004 Oct 1;45(5):776–88.
51. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2007 Jan 1;113(4–5):234–58.
52. Wang L, Wang L, Xia T, Bian G, Dong L, Tang Z, et al. A highly sensitive assay for spectrofluorimetric determination of reduced glutathione using organic nano-probes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005 Sep 1;61(11):2533–8.
53. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB Journal*. 1999;13(10):1169–83.
54. Moris D, Spartalis M, Spartalis E, Karachaliou GS, Karaolanis GI, Tsourouflis G, et al. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of Translational Medicine*. 2017 Aug;5(16):326–326.
55. Panth N, Paudel KR, Parajuli K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. *Advances in Medicine*. 2016 Sep 28;2016:e9152732.

56. Bajic VP, Van Neste C, Obradovic M, Zafirovic S, Radak D, Bajic VB, et al. Glutathione “Redox Homeostasis” and Its Relation to Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019 May 9;2019:e5028181.
57. Sekhar RV, Patel SG, Guthikonda AP, Reid M, Balasubramanyam A, Taffet GE, et al. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation¹²³⁴. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011 Sep 1;94(3):847–53.
58. Diaz Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardó FV, Foyer CH. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochemical Journal*. 2010 Sep 28;431(2):169–78.
59. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 2002 Sep 1;64(5):1019–26.
60. Osman R, L’Allier PL, Elgharib N, Tardif JC. Critical Appraisal of C-Reactive Protein Throughout the Spectrum of Cardiovascular Disease. *Vascular Health and Risk Management*. 2006 Sep 30;2(3):221–37.
61. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PWM, Badiwala MV, et al. A Self-Fulfilling Prophecy. *Circulation*. 2002 Aug 20;106(8):913–9.
62. Bisioendial RJ, Boekholdt SM, Vergeer M, Stroes ESG, Kastelein JJP. C-reactive protein is a mediator of cardiovascular disease. *European Heart Journal*. 2010 Sep 1;31(17):2087–91.
63. Sara JDS, Prasad M, Zhang M, Lennon RJ, Herrmann J, Lerman LO, et al. High-sensitivity C-reactive protein is an independent marker of abnormal coronary vasoreactivity in patients with non-obstructive coronary artery disease. *American Heart Journal*. 2017 Aug 1;190:1–11.
64. Ridker PM, MacFadyen JG, Glynn RJ, Bradwin G, Hasan AA, Rifai N. Comparison of interleukin-6, C-reactive protein, and low-density lipoprotein cholesterol as biomarkers of residual risk in contemporary practice: secondary analyses from the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial. *European Heart Journal*. 2020 Aug 14;41(31):2952–61.

65. Idriss HT, Naismith JH. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*. 2000;50(3):184–95.
66. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X ping, Lee S, Yang J, et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clinical Science*. 2009 Jan 8;116(3):219–30.
67. Naya M, Tsukamoto T, Morita K, Katoh C, Furumoto T, Fujii S, et al. Plasma Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Can Predict Coronary Endothelial Dysfunction in Hypertensive Patients. *Hypertens Res*. 2007 Jun;30(6):541–8.
68. Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, et al. Plasma tumour necrosis factor- α and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *European Heart Journal*. 2002 Mar 1;23(5):376–83.
69. Kaptoge S, Seshasai SRK, Gao P, Freitag DF, Butterworth AS, Borglykke A, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *European Heart Journal*. 2014 Mar 1;35(9):578–89.
70. Safranow K, Dziedziejko V, Rzeuski R, Czyżycka E, Wojtarowicz A, Bińczak-Kuleta A, et al. Plasma concentrations of TNF- α and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. *Tissue Antigens*. 2009;74(5):386–92.
71. Zhu M, Lei L, Zhu Z, Li Q, Guo D, Xu J, et al. Excess TNF- α in the blood activates monocytes with the potential to directly form cholesteryl ester-laden cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2015 Nov 1;47(11):899–907.
72. Duan HO, Simpson-Haidaris PJ. Functional Analysis of Interleukin 6 Response Elements (IL-6REs) on the Human γ -Fibrinogen Promoter: BINDING OF HEPATIC Stat3 CORRELATES NEGATIVELY WITH TRANSACTIVATION POTENTIAL OF TYPE II IL-6REs *. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Oct 17;278(42):41270–81.
73. Teixeira BC, Lopes AL, Macedo RCO, Correa CS, Ramis TR, Ribeiro JL, et al. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. *J vasc bras*. 2014 Jun;13:108–15.

74. Koyama K, Yoneyama K, Mitarai T, Ishibashi Y, Takahashi E, Kongoji K, et al. Clinical research Association between inflammatory biomarkers and thin-cap fibroatheroma detected by optical coherence tomography in patients with coronary heart disease. *Arch Med Sci.* 2015 Jun 30;11(3):505–12.
75. Held C, White HD, Stewart RAH, Budaj A, Cannon CP, Hochman JS, et al. Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial. *Journal of the American Heart Association.* 6(10):e005077.
76. Salvo F, Bezin J, Bosco-Levy P, Letinier L, Blin P, Pariente A, et al. Pharmacological treatments of cardiovascular diseases: Evidence from real-life studies. *Pharmacological Research.* 2017 Apr 1;118:43–52.
77. Carrizzo A, Izzo C, Forte M, Sommella E, Di Pietro P, Venturini E, et al. A Novel Promising Frontier for Human Health: The Beneficial Effects of Nutraceuticals in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020 Jan;21(22):8706.
78. Nasri H, Baradaran A, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. New Concepts in Nutraceuticals as Alternative for Pharmaceuticals. *Int J Prev Med.* 2014 Dec;5(12):1487–99.
79. Alissa EM, Ferns GA. Functional Foods and Nutraceuticals in the Primary Prevention of Cardiovascular Diseases. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 2012 Apr 10;2012:e569486.
80. Santini A, Tenore GC, Novellino E. Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017 Jan 1;96:53–61.
81. Sharifi-Rad J, Rodrigues CF, Sharopov F, Docea AO, Can Karaca A, Sharifi-Rad M, et al. Diet, Lifestyle and Cardiovascular Diseases: Linking Pathophysiology to Cardioprotective Effects of Natural Bioactive Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2020 Jan;17(7):2326.

82. Ciumărnean L, Milaciu MV, Runcan O, Vesa Ștefan C, Răchișan AL, Negrean V, et al. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules*. 2020 Jan;25(18):4320.
83. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 2012 Feb;27(1):76–89.
84. Perez-Vizcaino F, Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med*. 2010 Dec;31(6):478–94.
85. Tenorio López FA, del Valle Mondragón L, Pastelín Hernández G. [Flavonoids and the cardiovascular system: can they be a therapeutic alternative?]. *Arch Cardiol Mex*. 2006 Dec;76 Suppl 4:S33-45.
86. Benavente-García O, Castillo J, Alcaraz M, Vicente V, Del Río JA, Ortuño A. Beneficial action of Citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 Dec;7(8):795–809.
87. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep*. 2009 Feb;61(1):67–75.
88. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2008;7(3):1089–99.
89. Mahmoud AM, Hernández Bautista RJ, Sandhu MA, Hussein OE. Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019 Mar 10;2019:1–19.
90. Rees A, Dodd G, Spencer J. The Effects of Flavonoids on Cardiovascular Health: A Review of Human Intervention Trials and Implications for Cerebrovascular Function. *Nutrients*. 2018 Dec 1;10(12):1852.
91. Paredes MD, Romecín P, Atucha NM, O'Valle F, Castillo J, Ortiz MC, et al. Moderate Effect of Flavonoids on Vascular and Renal Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients*. 2018 Aug 16;10(8).
92. Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kęrgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *IJMS*. 2019 Mar 15;20(6):1305.

93. Xu Y, Li X, Wang H. Protective Roles of Apigenin Against Cardiometabolic Diseases: A Systematic Review. *Front Nutr* [Internet]. 2022 Apr 15 [cited 2024 May 8];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.875826>
94. Choi JS, Nurul Islam Md, Yousof Ali Md, Kim EJ, Kim YM, Jung HA. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food and Chemical Toxicology*. 2014 Feb 1;64:27–33.
95. Thomas SD, Jha NK, Jha SK, Sadek B, Ojha S. Pharmacological and Molecular Insight on the Cardioprotective Role of Apigenin. *Nutrients*. 2023 Jan;15(2):385.
96. Tian C, Liu X, Chang Y, Wang R, Lv T, Cui C, et al. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *South African Journal of Botany*. 2021 Mar 1;137:257–64.
97. Qi L, Pan H, Li D, Fang F, Chen D, Sun H. Luteolin improves contractile function and attenuates apoptosis following ischemia–reperfusion in adult rat cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*. 2011 Oct 1;668(1):201–7.
98. Si H, Wyeth RP, Liu D. The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. *Eur J Nutr*. 2014 Feb 1;53(1):269–75.
99. Luo Y, Shang P, Li D. Luteolin: A Flavonoid that Has Multiple Cardio-Protective Effects and Its Molecular Mechanisms. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017 Oct 6 [cited 2024 Jun 26];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2017.00692/full>
100. Kim S, Chin YW, Cho J. Protection of Cultured Cortical Neurons by Luteolin against Oxidative Damage through Inhibition of Apoptosis and Induction of Heme Oxygenase-1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2017;40(3):256–65.
101. Liao PH, Hung LM, Chen YH, Kuan YH, Zhang FBY, Lin RH, et al. Cardioprotective Effects of Luteolin During Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Circulation Journal*. 2011;75(2):443–50.

102. Cheng WY, Chiao MT, Liang YJ, Yang YC, Shen CC, Yang CY. Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity. *Mol Biol Rep*. 2013 Sep 1;40(9):5315–26.
103. Kritas SK, Saggini A, Varvara G, Murmura G, Caraffa A, Antinolfi P, et al. Luteolin inhibits mast cell-mediated allergic inflammation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2013 Oct 1;27(4):955–9.
104. Díaz-Juárez JA, Tenorio-López FA, Zarco-Olvera G, Valle-Mondragón L del, Torres-Narváez JC, Pastelín-Hernández G. Effect of Citrus paradisi extract and juice on arterial pressure both in vitro and in vivo. *Phytotherapy Research*. 2009;23(7):948–54.
105. Bär A, Borrego F, Benavente O, Castillo J, Del Rio AJ. Neohesperidin dihydrochalcone: Properties and applications. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie*. 1990;23(5):371–6.
106. Castillo J, Benavente O, Borrego F, Del Rio JA. Analysis of commercial hesperidin methyl chalcone by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1991;555(1–2):285–90.
107. Borrego F, Castillo J, Benavente-García O, Del Rio JA. Application potential of the citrus origin sweetener neohesperidin dihydrochalcone. *Int Food Ingredients*. 1991;2:23–6.
108. Castillo J, Benavente O, Del Río JA. Naringin and Neohesperidin Levels during Development of Leaves, Flower Buds, and Fruits of Citrus aurantium. *Plant Physiol*. 1992 May;99(1):67–73.
109. Lucas-Abellán C, Pérez-Abril M, Castillo J, Serrano A, Mercader MT, Fortea MI, et al. Effect of temperature, pH, β - and HP- β -cds on the solubility and stability of flavanones: Naringenin and hesperetin. *LWT*. 2019 Jul 1;108:233–9.
110. Castillo Julian, Benavente Obdulio, del Rio JA. Hesperetin 7-O-glucoside and prunin in Citrus species (*C. aurantium* and *C. paradisi*). A study of their quantitative distribution in immature fruits and as immediate precursors of neohesperidin and naringin in Citrus aurantium. *J Agric Food Chem*. 1993 Nov 1;41(11):1920–4.

111. Benavente-Garcia O, Castillo J, del Rio Conesa JA. Changes in neodiosmin levels during the development of *Citrus aurantium* leaves and fruits. Postulation of a neodiosmin biosynthetic pathway. *J Agric Food Chem.* 1993 Nov 1;41(11):1916–9.
112. Del Rio JA, Benavente O, Castillo J, Borrego F. Neodiosmin, a flavone glycoside of *Citrus aurantium*. *Phytochemistry.* 1992 Feb 1;31(2):723–4.
113. Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, Arya DS. Preclinical Evidence for the Pharmacological Actions of Naringin: A Review. *Planta Med.* 2014 Apr;80(6):437–51.
114. Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, et al. The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals.* 2019 Mar;12(1):11.
115. Heidary Moghaddam R, Samimi Z, Moradi SZ, Little PJ, Xu S, Farzaei MH. Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review. *European Journal of Pharmacology.* 2020 Nov;887:173535.
116. Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry.* 2000 Mar 1;68(4):457–62.
117. Guo Z, Jia X, Zheng Z, Lu X, Zheng Y, Zheng B, et al. Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochem Rev.* 2018 Oct 1;17(5):1091–110.
118. Elliott GA, Buthala DA, DeYoung EN. Preliminary safety studies with calcium elenolate, an antiviral agent. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda).* 1969;9:173–6.
119. Soret MG. Antiviral activity of calcium elenolate on parainfluenza infection of hamsters. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda).* 1969;9:160–6.
120. Tassou CC, Nychas GJ. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Lett Appl Microbiol.* 1995 Feb;20(2):120–4.

121. Koutsoumanis, Tassou, Taoukis, Nychas. Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *J Appl Microbiol*. 1998 Jun 1;84(6):981–7.
122. Aziz NH, Farag SE, Mousa LA, Abo-Zaid MA. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 1998;93(374):43–54.
123. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, et al. Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014 Oct;15(10):18508–24.
124. Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, et al. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International*. 2018 Mar 1;105:654–67.
125. Huang PL, Huang PL, Lee-Huang S. Oleuropein and Related Compounds Reduce Atherosclerosis. *The Open Conference Proceedings Journal* [Internet]. 2010 Aug 13 [cited 2024 May 30];1(1). Available from: <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOPROCJ-1-2-81>
126. Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T, Pujia A, Russo D. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J Transl Med*. 2014 Aug 3;12(1):219.
127. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010 Feb;11(2):458–79.
128. Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*. 2008 Nov 25;176(2):88–98.
129. Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A, Isoda H, et al. Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Its Triacetylated Derivative Recovered from Olive Tree Leaves in Cholesterol-Fed Rats. *J Agric Food Chem*. 2008 Apr 1;56(8):2630–6.

130. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, et al. Olive Oil and Red Wine Antioxidant Polyphenols Inhibit Endothelial Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003 Apr;23(4):622–9.
131. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res*. 1995 Apr 15;78(2):151–60.
132. González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of Hydroxytyrosol and Hydroxytyrosol Acetate Administration to Rats on Platelet Function Compared to Acetylsalicylic Acid. *J Agric Food Chem*. 2008 Sep 10;56(17):7872–6.
133. Abe R, Beckett J, Abe R, Nixon A, Rochier A, Yamashita N, et al. Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2011 Jun 1;41(6):814–20.
134. Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M, et al. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2004 Aug 1;15(8):461–6.
135. Andreadou I, Mikros E, Ioannidis K, Sigala F, Naka K, Kostidis S, et al. Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014 Apr 1;69:4–16.
136. Granados-Principal S, El-azem N, Pamplona R, Ramirez-Tortosa C, Pulido-Moran M, Vera-Ramirez L, et al. Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2014 Jul 1;90(1):25–33.
137. Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Paul D, Maulik N. Akt/FOXO3a/SIRT1-Mediated Cardioprotection by n-Tyrosol against Ischemic Stress in Rat in Vivo Model of Myocardial Infarction: Switching Gears toward Survival and Longevity. *J Agric Food Chem*. 2008 Oct 22;56(20):9692–8.

138. Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, Constantinou M, Agalias A, Magiatis P, et al. The Olive Constituent Oleuropein Exhibits Anti-Ischemic, Antioxidative, and Hypolipidemic Effects in Anesthetized Rabbits¹². *The Journal of Nutrition*. 2006 Aug 1;136(8):2213–9.
139. Lp-PLA(2) Studies Collaboration, Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet*. 2010 May 1;375(9725):1536–44.
140. Germain A AM, Irribarra P V, Valdés S G, Romanik F MC, Leighton P F, Mardones S F, et al. Evaluación ultrasonográfica de la función endotelial en niños y adultos chilenos. *Revista médica de Chile*. 2004 Apr;132(4):437–44.
141. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J*. 2018;39(33):3021–104.
142. Paredes M, Romecín P, Atucha N, O'Valle F, Castillo J, Ortiz M, et al. Beneficial Effects of Different Flavonoids on Vascular and Renal Function in L-NAME Hypertensive Rats. *Nutrients*. 2018 Apr 13;10(4):484.
143. Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Vicente V, Rivera J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost*. 2005 Feb;3(2):369–76.
144. Benavente-García O, Castillo J, Marin FR, Ortuño A, Del Río JA. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *J Agric Food Chem*. 1997 Dec 1;45(12):4505–15.
145. Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Revista Española de Cardiología*. 2012 Jan;65(1):80–90.
146. Jay Widmer R, Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Global Cardiology Science and Practice*. 2014 Oct;2014(3):43.
147. Eilat-Adar S, Sinai T, Yosefy C, Henkin Y. Nutritional Recommendations for Cardiovascular Disease Prevention. *Nutrients*. 2013 Sep 17;5(9):3646–83.

148. Merola N, Castillo J, Benavente-García O, Ros G, Nieto G. The Effect of Consumption of Citrus Fruit and Olive Leaf Extract on Lipid Metabolism. *Nutrients*. 2017 Sep 26;9(10):1062.
149. López-Carreras N, Castillo J, Muguerza B, Aleixandre A. Endothelium-dependent vascular relaxing effects of different citrus and olive extracts in aorta rings from spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*. 2015 Nov;77:484–90.
150. Vita JA, Keaney JF. Endothelial Function. *Circulation*. 2002 Aug 6;106(6):640–2.
151. Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial Function as a Functional Expression of Cardiovascular Risk Factors. *Biomarkers in Medicine*. 2010 Jun 1;4(3):351–60.
152. Oyama JI, Maeda T, Sasaki M, Kozuma K, Ochiai R, Tokimitsu I, et al. Green Tea Catechins Improve Human Forearm Vascular Function and Have Potent Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects in Smokers. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2010 Dec 1;49:2553–9.
153. Noad RL, Rooney C, McCall D, Young IS, McCance D, McKinley MC, et al. Beneficial effect of a polyphenol-rich diet on cardiovascular risk: a randomised control trial. 2016 Sep 1 [cited 2024 Aug 24]; Available from: <https://heart.bmj.com/content/102/17/1371.short>
154. Greyling A, Wolters TLC, Bresser DM de, Roerink SHPP, Riksen NP, Mulder TP, et al. The acute effect of black tea consumption on resistance artery endothelial function in healthy subjects. A randomized controlled trial. [cited 2024 Jul 16]; Available from: [https://clinicalnutritionespen.com/article/S2405-4577\(17\)30400-X/abstract](https://clinicalnutritionespen.com/article/S2405-4577(17)30400-X/abstract)
155. Kirch N, Berk L, Liegl Y, Adelsbach M, Zimmermann BF, Stehle P, et al. A nutritive dose of pure (–)-epicatechin does not beneficially affect increased cardiometabolic risk factors in overweight-to-obese adults—a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover study. [cited 2024 Jul 16]; Available from: [https://ajcn.nutrition.org/article/S0002-9165\(22\)02888-X/fulltext](https://ajcn.nutrition.org/article/S0002-9165(22)02888-X/fulltext)
156. Hollands WJ, Voorspoels S, Jacobs G, Aaby K, Meisland A, Garcia-Villalba R, et al. Development, validation and evaluation of an analytical method

for the determination of monomeric and oligomeric procyanidins in apple extracts. *Journal of Chromatography A*. 2017 Apr 28;1495:46–56.

157. Benavente-García O, Castillo J. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *J Agric Food Chem*. 2008 Aug;56(15):6185–205.
158. Rendeiro C, Dong H, Saunders C, Harkness L, Blaze M, Hou Y, et al. Flavanone-rich citrus beverages counteract the transient decline in postprandial endothelial function in humans: a randomised, controlled, double-masked, cross-over intervention study | *British Journal of Nutrition*. Cambridge Core [Internet]. [cited 2024 Jul 16]; Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/flavanonerich-citrus-beverages-counteract-the-transient-decline-in-postprandial-endothelial-function-in-humans-a-randomised-controlled-doublemasked-crossover-intervention-study/5FE66F45B50FB7B4D1376DD7C7CC737D>
159. Rizza S, Muniyappa R, Iantorno M, Kim J a, Chen H, Pullikotil P, et al. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 May 1;96(5):E782-92.
160. Chen X, Lai Y, Song X, Wu J, Wang L, Zhang H, et al. Polysaccharides from *Citrus grandis* associate with luteolin relieves chronic pharyngitis by anti-inflammatory via suppressing NF-κB pathway and the polarization of M1 macrophages. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018 Jun 7;32:2058738418780593.
161. Wu H, Jiang H, Wang L, Hu Y. Relationship between vasorelaxation of flavonoids and their retention index in RP-HPLC. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006 Aug 1;61(8):667–9.
162. Jin B hui, Qian L bo, Chen S, Li J, Wang H ping, Bruce IC, et al. Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *European Journal of Pharmacology*. 2009 Aug 15;616(1):200–5.
163. Kamkaew N, Paracha TU, Ingkaninan K, Waranuch N, Chootip K. Vasodilatory Effects and Mechanisms of Action of *Bacopa monnieri* Active Compounds on Rat Mesenteric Arteries. *Molecules*. 2019 Jun 15;24(12):2243.

164. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2008;44(2):65–81.
165. Jiang H, Xia Q, Wang X, Song J, Bruce IC. Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005 Jun 1;60(6):444–7.
166. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*. 2011;9(4):2033.
167. Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJF, Kiesewetter H, et al. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors. *Ann Intern Med*. 2006 Sep 5;145(5):333–41.
168. Weinbrenner T, Fitó M, Torre R de la, Saez GT, Rijken P, Tormos C, et al. Olive Oils High in Phenolic Compounds Modulate Oxidative/Antioxidative Status in Men. *The Journal of Nutrition*. 2004 Sep 1;134(9):2314–21.
169. Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schroder H, Mirocasas E, Gimeno E, et al. Effects of differing phenolic content in dietary olive oil on lipids and LDL oxidation: A randomized controlled trial. *European journal of nutrition*. 2004 Jun 1;43:140–7.
170. De La Torre-Carbot K, Chávez-Servín JL, Jaúregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, Nurmi T, et al. Elevated Circulating LDL Phenol Levels in Men Who Consumed Virgin Rather Than Refined Olive Oil Are Associated with Less Oxidation of Plasma LDL. *The Journal of Nutrition*. 2010 Mar;140(3):501–8.

171. Edgecombe SC, Stretch GL, Hayball PJ. Oleuropein, an Antioxidant Polyphenol from Olive Oil, Is Poorly Absorbed from Isolated Perfused Rat Intestine. *The Journal of Nutrition*. 2000 Dec 1;130(12):2996–3002.
172. Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuño J, Weinbrenner T, et al. Hydroxytyrosol Disposition in Humans. *Clinical Chemistry*. 2003 Jun 1;49(6):945–52.
173. Visioli F, Galli C. Antiatherogenic components of olive oil. *Current Atherosclerosis Reports*. 2001 Jan;3(1):64–7.
174. Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB. Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition*. 2002 Mar;132(3):409–17.
175. Davinelli S, Bertoglio JC, Zarrelli A, Pina R, Scapagnini G. A Randomized Clinical Trial Evaluating the Efficacy of an Anthocyanin–Maqui Berry Extract (Delphinol®) on Oxidative Stress Biomarkers. *Journal of the American College of Nutrition*. 2015 Sep 15;34(sup1):28–33.
176. Valls RM, Llauradó E, Fernández-Castillejo S, Puiggrós F, Solà R, Arola L, et al. Effects of low molecular weight procyanidin rich extract from french maritime pine bark on cardiovascular disease risk factors in stage-1 hypertensive subjects: Randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention trial. *Phytomedicine*. 2016 Nov 15;23(12):1451–61.
177. Verhoeven V, Van der Auwera A, Van Gaal L, Remmen R, Apers S, Stalpaert M, et al. Can red yeast rice and olive extract improve lipid profile and cardiovascular risk in metabolic syndrome?: a double blind, placebo controlled randomized trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015 Mar 10;15(1):1–8.
178. Conterno L, Martinelli F, Tamburini M, Fava F, Mancini A, Sordo M, et al. Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Nutrition*. 2017 Nov 9;58(1):63–81.
179. Testai L, Piragine E, Piano I, Flori L, Da Pozzo E, Miragliotta V, et al. The Citrus Flavonoid Naringenin Protects the Myocardium from Ageing-Dependent Dysfunction: Potential Role of SIRT1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020(1):4650207.

180. Jia Z, Nallasamy P, Liu D, Shah H, Li JZ, Chitrakar R, et al. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF-alpha-induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing IKB α /NF- κ B signaling pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015 Mar 1;26(3):293–302.
181. Chen G, Shen H, Zang L, Su Z, Huang J, Sun Y, et al. Protective effect of luteolin on skin ischemia-reperfusion injury through an AKT-dependent mechanism. *Int J Mol Med*. 2018 Dec;42(6):3073–82.
182. George ES, Marshall S, Mayr HL, Trakman GL, Tatucu-Babet OA, Lassemillante ACM, et al. The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019 Sep 25;59(17):2772–95.
183. Schwingshackl L, Krause M, Schmucker C, Hoffmann G, Rucker G, Meerpohl JJ. Impact of different types of olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and network meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2019 Oct 1;29(10):1030–9.
184. Rees K, Takeda A, Martin N, Ellis L, Wijesekara D, Vepa A, et al. Mediterranean-style diet for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease - Rees, K - 2019 | Cochrane Library. [cited 2024 Aug 25]; Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009825.pub3/full>
185. Cook NR, Cohen J, Hebert PR, Taylor JO, Hennekens CH. Implications of Small Reductions in Diastolic Blood Pressure for Primary Prevention. *Archives of Internal Medicine*. 1995 Apr 10;155(7):701–9.
186. Neutel JM. The role of combination therapy in the management of hypertension. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006 Jun 1;21(6):1469–73.
187. Rauwald HW, Brehm O, Odenthal KP. Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. *Phytotherapy Research*. 1994;8(3):135–40.

188. Scheffler A, Rauwald HW, Kampa B, Mann U, Mohr FW, Dhein S. *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca²⁺ channel antagonistic effects. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008 Nov 20;120(2):233–40.
189. Perrinjaquet-Moccetti T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Bradl B, Aydogan C. Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research*. 2008;22(9):1239–42.
190. Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Nofiarny D, Perrinjaquet-Moccetti T, et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*. 2011 Feb 15;18(4):251–8.
191. Bock M de, Derraik JGB, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, et al. Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. [cited 2024 Aug 25]; Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057622>
192. Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *Eur J Nutr*. 2017 Jun;56(4):1421–32.
193. Mozaffarian D, Wu JHY. Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health: A Review of Emerging Biologic Pathways. *Circ Res*. 2018 Jan 19;122(2):369–84.
194. Li C, Schluesener H. Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017 Feb 11;57(3):613–31.
195. Ikemura M, Sasaki Y, Giddings JC, Yamamoto J. Preventive Effects of Hesperidin, Glucosyl Hesperidin and Naringin on Hypertension and Cerebral Thrombosis in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Phytotherapy Research*. 2012;26(9):1272–7.
196. Wilmsen PK, Spada DS, Salvador M. Antioxidant Activity of the Flavonoid Hesperidin in Chemical and Biological Systems. *J Agric Food Chem*. 2005 Jun 1;53(12):4757–61.

197. Wunpathe C, Potue P, Maneesai P, Bunbupha S, Prachaney P, Kukongviriyapan U, et al. Hesperidin Suppresses Renin-Angiotensin System Mediated NOX2 Over-Expression and Sympathoexcitation in 2K-1C Hypertensive Rats. *Am J Chin Med*. 2018 Jan;46(04):751–67.
198. Yamamoto M, Suzuki A, Jokura H, Yamamoto N, Hase T. Glucosyl hesperidin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*. 2008 May 1;24(5):470–6.
199. Yousefian M, Shakour N, Hosseinzadeh H, Hayes AW, Hadizadeh F, Karimi G. The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension. *Phytomedicine*. 2019 Mar 1;55:200–13.
200. Yamamoto M, Suzuki A, Hase T. Short-Term Effects of Glucosyl Hesperidin and Hesperetin on Blood Pressure and Vascular Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2008;54(1):95–8.
201. Mohammadi M, Ramezani-Jolfaie N, Lorzadeh E, Khoshbakht Y, Salehi-Abargouei A. Hesperidin, a major flavonoid in orange juice, might not affect lipid profile and blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Phytotherapy Research*. 2019;33(3):534–45.
202. Pla-Pagà L, Companys J, Calderón-Pérez L, Llauradó E, Solà R, Valls RM, et al. Effects of hesperidin consumption on cardiovascular risk biomarkers: a systematic review of animal studies and human randomized clinical trials. *Nutrition Reviews*. 2019 Dec 1;77(12):845–64.
203. Yamamoto M, Jokura H, Hashizume K, Ominami H, Shibuya Y, Suzuki A, et al. Hesperidin metabolite hesperetin-7-O-glucuronide, but not hesperetin-3'-O-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activities. [cited 2024 Aug 25]; Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/fo/c3fo60030k>
204. Mas-Capdevila A, Teichenne J, Domenech-Coca C, Caimari A, Del Bas JM, Escoté X, et al. Effect of Hesperidin on Cardiovascular Disease Risk Factors: The Role of Intestinal Microbiota on Hesperidin Bioavailability. *Nutrients*. 2020 May 20;12(5):1488.

205. Reshef N, Hayari Y, Goren C, Boaz M, Madar Z, Knobler H. Antihypertensive Effect of Sweetie Fruit in Patients With Stage I Hypertension*. *American Journal of Hypertension*. 2005 Oct 1;18(10):1360–3.
206. Visnagri A, Adil M, Kandhare AD, Bodhankar SL. Effect of naringin on hemodynamic changes and left ventricular function in renal artery occluded renovascular hypertension in rats. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015 Apr 1;7(2):121–7.
207. Alam MA, Kauter K, Brown L. Naringin Improves Diet-Induced Cardiovascular Dysfunction and Obesity in High Carbohydrate, High Fat Diet-Fed Rats. *Nutrients*. 2013 Feb 27;5(3):637–50.
208. Floyd Z, Ribnicky D, Raskin I, Hsia D. Designing a Clinical Study With Dietary Supplements: It's All in the Details. Faculty and Student Publications [Internet]. 2022 Jan 18; Available from: https://egrove.olemiss.edu/pharmacy_facpubs/192
209. Raja Kumar S, Mohd Ramli ES, Abdul Nasir NA, Ismail NHM, Mohd Fahami NA. Preventive Effect of Naringin on Metabolic Syndrome and Its Mechanism of Action: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019;2019(1):9752826.
210. Pu P, Gao DM, Mohamed S, Chen J, Zhang J, Zhou XY, et al. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012 Feb 1;518(1):61–70.
211. Viswanatha GL, Shylaja H, Keni R, Nandakumar K, Rajesh S. A systematic review and meta-analysis on the cardio-protective activity of naringin based on pre-clinical evidences. *Phytotherapy Research*. 2022;36(3):1064–92.
212. Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, et al. Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. Lu JR, editor. *PLoS ONE*. 2012 Nov 21;7(11):e49493.
213. Parellada J, Suárez G, Guinea M. Inhibition of Zinc Metallopeptidases by Flavonoids and Related Phenolic Compounds: Structure-Activity Relationships. *Journal of Enzyme Inhibition*. 1998 Jan 1;13(5):347–59.

214. Su J, Xu HT, Yu JJ, Gao JL, Lei J, Yin QS, et al. Luteolin Ameliorates Hypertensive Vascular Remodeling through Inhibiting the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015;2015(1):364876.
215. Márquez-Benítez Y, Lancheros-Silva AM, Díaz-Chaves E. Grupos sanguíneos y su relación con los niveles plasmáticos del Factor de von Willebrand. Universidad y Salud. 2019 Aug 31;21(3):277–87.
216. Hari P, Prasad Chemitu GK, Lankipalli RS. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. N Engl J Med. 2000 Dec 1;343(26):1968–9.
217. Atkin M, Laight D, Cummings MH. The effects of garlic extract upon endothelial function, vascular inflammation, oxidative stress and insulin resistance in adults with type 2 diabetes at high cardiovascular risk. A pilot double blind randomized placebo controlled trial. Journal of Diabetes and its Complications. 2016 May 1;30(4):723–7.
218. Kar P, Laight D, Rooprai HK, Shaw KM, Cummings M. Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. Diabetic Medicine. 2009;26(5):526–31.
219. Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandström B, et al. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. Br J Nutr. 1999 Jun 1;81(6):447–55.
220. Zaidun NH, Thent ZC, Latiff AA. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. Life Sciences. 2018 Sep 1;208:111–22.
221. Satta S, Mahmoud AM, Wilkinson FL, Yvonne Alexander M, White SJ. The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017;2017(1):9237263.
222. Musolino V, Gliozzi M, Bombardelli E, Nucera S, Carresi C, Maiuolo J, et al. The synergistic effect of *Citrus bergamia* and *Cynara cardunculus* extracts on vascular inflammation and oxidative stress in non-alcoholic fatty liver

disease. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2020 May 1;10(3):268–74.

223. Perez-Herrera A, Rangel-Zuñiga OA, Delgado-Lista J, Marin C, Perez-Martinez P, Tasset I, et al. The antioxidants in oils heated at frying temperature, whether natural or added, could protect against postprandial oxidative stress in obese people. *Food Chemistry*. 2013 Jun 15;138(4):2250–9.
224. Codoñer-Franch P, López-Jaén AB, De La Mano-Hernández A, Sentandreu E, Simó-Jordá R, Valls-Bellés V. Oxidative markers in children with severe obesity following low-calorie diets supplemented with mandarin juice. *Acta Paediatrica*. 2010;99(12):1841–6.
225. Cesari M, Penninx BWJH, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory Markers and Onset of Cardiovascular Events: Results from the Health ABC Study. [cited 2024 Aug 22]; Available from: <https://researchinformation.amsterdamumc.org/en/publications/inflammatory-markers-and-onset-of-cardiovascular-events-results-f>
226. Ginwala R, Bhavsar R, Chigbu DGI, Jain P, Khan ZK. Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. *Antioxidants*. 2019 Feb 5;8(2):35.
227. Zhang X, Wang G, Gurley EC, Zhou H. Flavonoid Apigenin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response through Multiple Mechanisms in Macrophages. [cited 2024 Aug 22]; Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0107072>
228. Cesari M, Penninx BWJH, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory Markers and Onset of Cardiovascular Events. *Circulation*. 2003 Nov 11;108(19):2317–22.
229. Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, et al. Inflammatory Markers and Risk of Heart Failure in Elderly Subjects Without Prior Myocardial Infarction. *Circulation*. 2003 Mar 25;107(11):1486–91.
230. Koukkunen H, Penttilä K, Kemppainen A, Halinen M, Penttilä I, Rantanen T, et al. C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis

- factor- α in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Annals of Medicine*. 2001 Jan 1;33(1):37–47.
231. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 2000 Feb 1;148(2):209–14.
232. Razani Z, Dastani M, Kazerani HR. Cardioprotective Effects of Pomegranate () Juice in Patients with Ischemic Heart Disease. *Phytotherapy Research*. 2017;31(11):1731–8.
233. McCormick R, Peeling P, Binnie M, Dawson B, Sim M. Effect of tart cherry juice on recovery and next day performance in well-trained Water Polo players. *J Int Soc Sports Nutr*. 2016 Nov 14;13:41.
234. Kent K, Charlton K, Roodenrys S, Batterham M, Potter J, Traynor V, et al. Consumption of anthocyanin-rich cherry juice for 12 weeks improves memory and cognition in older adults with mild-to-moderate dementia. *European Journal of Nutrition*. 2015 Oct 19;56(1):333–41.
235. Park E, Edirisinghe I, Wei H, Vijayakumar LP, Banaszewski K, Cappozzo JC, et al. A dose–response evaluation of freeze-dried strawberries independent of fiber content on metabolic indices in abdominally obese individuals with insulin resistance in a randomized, single-blinded, diet-controlled crossover trial. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2016;60(5):1099–109.
236. Kjær TN, Ornstrup MJ, Poulsen MM, Stødkilde-Jørgensen H, Jessen N, Jørgensen JOL, et al. No Beneficial Effects of Resveratrol on the Metabolic Syndrome: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017 May 1;102(5):1642–51.
237. Haidari F, Heybar H, Jalali MT, Ahmadi Engali K, Helli B, Shirbeigi E. Hesperidin Supplementation Modulates Inflammatory Responses Following Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Nutrition*. 2015 May 4;34(3):205–11.
238. Choy KW, Murugan D, Leong XF, Abas R, Alias A, Mustafa MR. Flavonoids as Natural Anti-Inflammatory Agents Targeting Nuclear Factor-Kappa B (NF κ B) Signaling in Cardiovascular Diseases: A Mini Review. *Front Pharmacol*. 2019 Jan 1;10:1295.

239. Rahimi A, Alimohammadi M, Faramarzi F, Alizadeh-Navaei R, Rafiei A. The effects of apigenin administration on the inhibition of inflammatory responses and oxidative stress in the lung injury models: a systematic review and meta-analysis of preclinical evidence. *Inflammopharmacology*. 2022 Aug 1;30(4):1259–76.
240. Drummond EM, Harbourne N, Marete E, Jacquier JC, O’Riordan D, Gibney ER. An In Vivo Study Examining the Antiinflammatory Effects of Chamomile, Meadowsweet, and Willow Bark in a Novel Functional Beverage. *Journal of Dietary Supplements*. 2013 Dec 1;10(4):370–80.
241. Paredes-Gonzalez X, Fuentes F, Jeffery S, Saw CLL, Shu L, Su ZY, et al. Induction of NRF2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones apigenin and luteolin. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 2015;36(7):440–51.
242. Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J, et al. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation*. 2008 Sep 25;5:41.
243. Elsisi NS, Darling-Reed S, Lee EY, Oriaku ET, Soliman KF. Ibuprofen and apigenin induce apoptosis and cell cycle arrest in activated microglia. *Neuroscience Letters*. 2005 Feb 28;375(2):91–6.
244. Liang H, Sonogo S, Gyengesi E, Rangel A, Niedermayer G, Karl T, et al. OP-25 - Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effect of Apigenin: Studies in the GFAP-IL6 Mouse Model of Chronic Neuroinflammation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017 Jul 1;108:S10.
245. Popović M, Caballero-Bleda M, Benavente-García O, Castillo J. The flavonoid apigenin delays forgetting of passive avoidance conditioning in rats. *J Psychopharmacol*. 2014 May;28(5):498–501.
246. Feng Y, Zhu B, Liu Y, Liu Y, Zhou G, Yang L, et al. *Yindan Jiedu* granules exhibit anti-inflammatory effect in patients with novel Coronavirus disease (COVID-19) by suppressing the NF- κ B signaling pathway. *Phytomedicine*. 2022 Jan 1;95:153784.
247. Zhang C, Guo W, Yao X, Xia J, Zhang Z, Li J, et al. Database mining and animal experiment-based validation of the efficacy and mechanism of Radix Astragali (Huangqi) and Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

- (Baizhu) as core drugs of Traditional Chinese medicine in cancer-related fatigue. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022 Mar 1;285:114892.
248. Bai C, Wang J, Wang Y, Liu H, Li J, Wang S, et al. Exploration of the mechanism of Traditional Chinese Medicine for anxiety and depression in patients with diarrheal irritable bowel syndrome based on network pharmacology and meta-analysis. *Front Pharmacol*. 2024 May 21;15:1404738.
249. Choi EY, Jin JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Effects of Luteolin on the Release of Nitric Oxide and Interleukin-6 by Macrophages Stimulated With Lipopolysaccharide From *Prevotella Intermedia*. *Journal of Periodontology*. 2011;82(10):1509–17.
250. Zong S, Li X, Zhang G, Hu J, Li H, Guo Z, et al. Effect of luteolin on glioblastoma's immune microenvironment and tumor growth suppression. *Phytomedicine*. 2024 Jul 25;130:155611.
251. Ren P, Cao JL, Lin PL, Cao BY, Chen JL, Gao K, et al. [Molecular mechanism of luteolin regulating lipoxygenase pathway against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in H9c2 cardiomyocytes based on molecular docking]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2021 Nov 1;46(21):5665–73.
252. Jin T, Liu X, Wang Y, Qi Y, Li X, Wang L, et al. Network pharmacology prediction, molecular docking and in vitro experiment explored the potential mechanism of Gaoyuan'an capsule in improving hypoxia tolerance. *The Pharmacogenomics Journal*. 2024 Mar 14;24(2):1–10.
253. Munir H, Yaqoob S, Awan KA, Imtiaz A, Naveed H, Ahmad N, et al. Unveiling the Chemistry of Citrus Peel: Insights into Nutraceutical Potential and Therapeutic Applications. *Foods*. 2024 May 27;13(11):1681.
254. González-Hedström D, García-Villalón ÁL, Amor S, de la Fuente-Fernández M, Almodóvar P, Prodanov M, et al. Olive leaf extract supplementation improves the vascular and metabolic alterations associated with aging in Wistar rats. *Scientific Reports*. 2021 Apr 14;11(1):8188.
255. Ismail MA, Norhayati MN, Mohamad N. Olive leaf extract effect on cardiometabolic profile among adults with prehypertension and

hypertension: a systematic review and meta-analysis. PeerJ. 2021 Jan 1;9:e11173.

X – ANEXOS

X - ANEXOS

ANEXO 1. Hoja de información al paciente.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TITULO DEL ESTUDIO: “Ensayo clínico para evaluar la eficacia de un nutracéutico frente a placebo en la reducción de riesgo cardiovascular en sujetos sanos”

PROMOTOR: Natrafur

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. F. Javier López Román

CENTRO: UCAM

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité ético de estudios de la Universidad San Antonio de Murcia (UCAM).

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y decidir si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que usted considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Usted presenta unos valores de colesterol sérico total iguales o superiores a 180mg/dL y unos valores de LDL-colesterol sérico iguales o superiores a 110mg/dL.

Actualmente hay muchos fármacos que provocan una disminución en los valores de colesterol sérico total así como en los valores de LDL, sin embargo este estudio nos planteamos administrar un compuesto natural para comprobar su eficacia frente a un placebo.

En este estudio participarán un total de 110 pacientes con las mismas características que usted.

Si usted decide tomar parte en este estudio de investigación, se le asignará al azar (como tirar una moneda al aire) a uno de dos tratamientos, o el compuesto natural o el placebo (sustancia inerte sin ningún tipo de actividad). Tendrá la misma posibilidad de ser asignado a cualquiera de los dos.

El estudio es enmascarado, esto es que ni usted ni el investigador sabrá qué tipo de producto le han asignado, si el producto en estudio o el placebo.

Todos los días debe tomar dos capsulas, una por la mañana y otra por la noche, con o sin comida.

El tratamiento del estudio durará 8 semanas consecutivas.

En la visita inicial se le entregará dos botes de tratamiento/placebo, Así mismo, debe devolver los botes de medicación no utilizada para que procedamos a la contabilidad de la misma.

En cada visita del estudio, la inicial y la final, se le realizarán una extracción sanguínea para pruebas de laboratorio, además el día marcado deberá acudir al hospital Quiron para proceder a realizarse una ecco-doppler y una pleistimografía, ambas pruebas no invasiva e indoloras.

Contenido de las capsulas: Las cápsulas del producto en investigación contendrán apigenina, luteonina, extracto de pomelo, citrolive y excipientes en c.s.p. Las del placebo contendrán maltodextrina y excipientes en c.s.p. En ningún caso los excipientes modificarán ni la farmacocinética ni la farmacodinamia de los principios activos, únicamente se añadirán por motivos tecnológicos.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Los beneficios esperados de este tratamiento es disminuir su colesterol y mejorar la elasticidad de vasos sanguíneos, y con ello reducir el riesgo de sufrir enfermedades más graves en el futuro de tipo cardiovascular. Sin embargo, es posible que no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, aunque en ningún caso encontrara un perjuicio por su participación.

No se han descrito los efectos secundarios asociados con la toma del producto en investigación.

CONFIDENCIALIDAD

Se mantendrá la confidencialidad de todos los datos recogidos concernientes al estudio. Se cumplirá lo establecido en la legislación vigente sobre la protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal). De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

La información recogida sobre usted se mantendrá por y bajo la supervisión del Promotor durante el tiempo que sea necesario. Todos sus datos se identificarán mediante un código y no aparecerán su nombre y datos personales en ninguno de los documentos relacionados con el estudio. En los resultados del estudio y en las publicaciones derivadas del mismo, no aparecerán nunca sus datos personales.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen, para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto y le serán reintegrados los gastos extraordinarios (p. ejem. comidas y traslados). Usted no tendrá que pagar por los productos intervinientes en el estudio.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información referente a los productos en el estudio y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por el equipo investigador lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor, o los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca, por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Cuando acabe su participación no se le pueda seguir administrando la medicación del estudio. Por lo tanto, ni el investigador ni el promotor adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.

PREGUNTAS

Si tiene alguna duda o pregunta con relación al estudio, no dude en comunicárselo al equipo de investigación. Puede ponerse en contacto con nosotros en el teléfono 968.27.87.57.

Ellos estarán dispuestos a contestarle todas sus dudas y preguntas antes, durante, y después del estudio.

ANEXO 2. Especificaciones del producto investigado.



Page 1 of 2

Spec Name: 4130040091.01
Control Number: FRDB-236046967

Specification

Issue Date	Version 1 26-Aug-2020
Product Number	40091
Product Name	CITROVEN™
Product Description	Citrus fruits and olive leaf extract blend

1.Description

Plant species	Citrus paradisi, Citrus aurantium & Olea europaea
Plant material	whole immature fruits & leaves
Extraction medium	60 - 90 % Ethanol
Drug Extract Ratio	N.A.

2.Analytical Data

Parameter	Method/Monograph	Specification	Unit
Appearance	Visual	Brown-yellowish powder	
Odour/taste	Sensory	Characteristic odour and bitter taste	
Water content KF	Ph.Eur. 2.5.12	≤ 5.0	% m/m
Ash	Ph.Eur. 2.4.16	≤ 5.0	% m/m
Total flavanone-glycosides (as naringin)	HPLC	22.00 - 28.00	% m/m
Total flavones (as apigenin)	HPLC	15.00 - 18.00	% m/m
Total olive polyphenols (as oleuropein)	HPLC	7.00 - 9.00	% m/m
Residual solvent ethanol	Ph.Eur. 2.4.24	≤ 0.50	% m/m
Lead (Pb)	Ph.Eur. 2.4.27	≤ 3.00	mg/kg
Cadmium (Cd)	Ph.Eur. 2.4.27	≤ 1.00	mg/kg
Mercury (Hg)	Ph.Eur. 2.4.27	≤ 0.10	mg/kg
Arsenic (As)	Ph.Eur. 2.4.27	≤ 1.00	mg/kg
Aflatoxin B1	Ph.Eur. 2.8.18	≤ 2.0	µg/kg
Sum of aflatoxins (B1+B2+G1+G2)	Ph.Eur. 2.8.18	≤ 4.0	µg/kg
Benzo(a)pyrene	GPC/GC-MS	≤ 10.00	µg/kg
Sum PAH4	GPC/GC-MS	≤ 50.0	µg/kg
Microbiology assay			
Total aerobic microbial count (TAMC)	Ph.Eur. 2.6.12	≤ 10 000	cfu/g
Yeasts and moulds (TYMC)	Ph.Eur. 2.6.12	≤ 100	cfu/g
Enterobacteria	Ph.Eur. 2.6.31	≤ 100	cfu/g
E. Coli	Ph.Eur. 2.6.31	n.d.	cfu/g
Salmonella spp	Ph.Eur. 2.6.31	n.d.	cfu/25g

3.Composition

Product composition	Function	Quantity (% m/m)
Grapefruit extract and its flavonoids		40.0
Olive leaf extract		37.5
Bitter orange extract and its flavonoids		22.5

4.Additional Information

Allergens	No substances to declare according to annex II of the regulation (EU) No 1169/2011
Storage Temperature	AMBIENT TEMPERATURE
Shelf Life	24 months
Standard Packaging size	25 kg
Halal Status	Halal Certified
Kosher Status	Kosher



40091 CITROVEN™ Specification_V1

Page 2 of 2

Spec Name: 4130040091.01
Control Number: FRDB-236046967

Natural variations in the raw material may lead to color variations.

Pesticides residues are tested on the raw material and assessed according to EC 396/2005 and 149/2008 including their amendments. Heavy metals, mycotoxins and polycyclic aromatic hydrocarbons comply with Commission Regulation (EU) 2023/915 including their amendments and are analyzed according to a control plan.

This product is not irradiated and is non-GMO according to EC 1829/2003 and EC 1830/2003.

This product contains no ingredients which might pose a BSE/TSE risk.

Please note that the raw materials & our products have been assessed for their safety and suitability of use in human food applications only, unless otherwise specified.

This specification has been generated electronically and is valid without signature

All statements are drawn to the best of our knowledge.

The information set out in our specifications and/or in any other document provided with the products does not constitute any warranty other than conformity to the current product specifications. Any relevant legislation governing the use of the product should be observed by the user to ensure that the use of the products and any labeling is in compliance with any local or national legislation, regulation or standard. All other warranties, expressed or implied are hereby explicitly excluded, nor does it release the user from carrying out any relevant QC inspections of the product received.

ANEXO 3. Estudio de la toxicidad oral agua en ratas.



Estudio de la toxicidad oral aguda en ratas de una formulación CVD

Índice

Objetivo	3
Metodología	3
Resultados	4
Referencias	5

Objetivo

El objetivo principal del estudio es determinar la toxicidad oral aguda de dos formulaciones en ratas ~~Wistar~~ (Formulación CDV)

Metodología

El ensayo se llevó a cabo según la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) 421. Para dicho ensayo se utilizaron 10 ratas macho ~~Wistar~~. El vehículo utilizado para disolver la formulación fue agua (Figura 1).

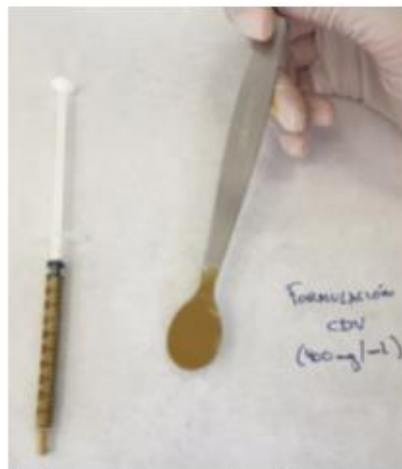


Figura 1. Formulación disuelta en agua a la máxima concentración ensayada.

En primer lugar, se administró a una rata una dosis de 300 mg/kg peso corporal (n=1). Una vez confirmado que no existe mortalidad o signos de toxicidad, se administró a otra rata una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal. No se detectó aparentemente ningún signo de toxicidad, por lo tanto, se procedió a la administración de más animales con la dosis de 2000 mg/kg (n=6). Como controles se utilizaron tres animales (n=3). Los animales se mantuvieron con pienso y agua *ad libitum*, a una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, un fotoperiodo de 12 horas y una humedad relativa de $70 \pm 5\%$.

Durante el periodo de valoración toxicológica de los animales, se pesaron cada 3-4 días ya que la bajada de peso evidencia un claro efecto tóxico (Figura 2) [1]. Una vez terminado dicho periodo, los animales se sacrificaron mediante asfixia por CO_2 . A continuación se realizó una valoración macroscópica de los siguientes órganos: bazo, corazón, pulmón, riñones e hígado.

Resultados

Como se observa en la **Figura 2**, la evolución del peso corporal en las dos formulaciones estudiadas es óptima, alcanzando una media de 345 g/animal el día del sacrificio.

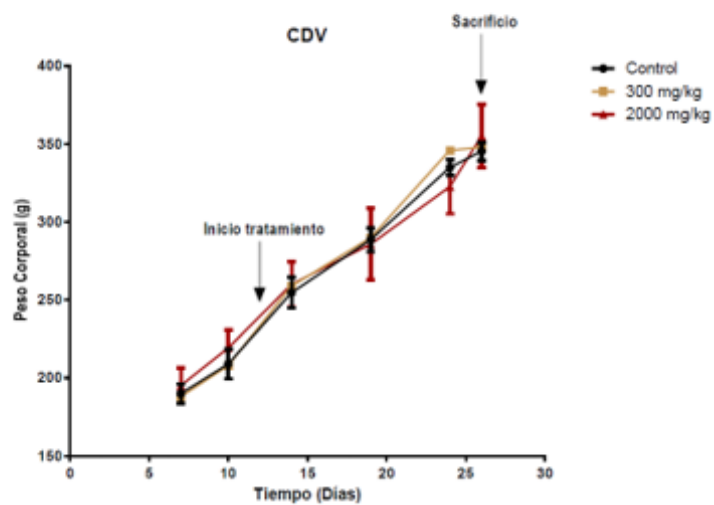


Figura 2. Evolución del peso corporal (g) de las ratas durante el ensayo.

Respecto a la necropsia, no se observaron signos de toxicidad en ningún órgano estudiado (hígado, riñones, bazo, corazón y pulmón) (Figura 3).

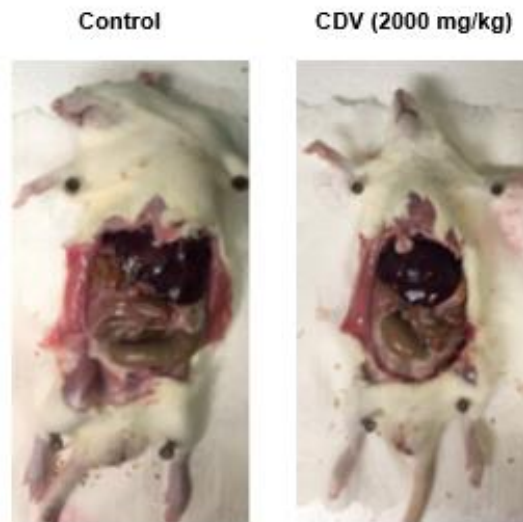


Figura 3. Imágenes representativas de la valoración macroscópica de los principales órganos.

Referencias

1. Aleman, C.L., et al., Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratory animals. *Lab Anim*, 2000. 34(4): p. 379-85.

Elche, 4 de Julio de 2017

|

Firma: Vicente Micol Molina

ANEXO 4. Comité de ética de la UCAM.



COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

DATOS DEL PROYECTO

Título:	"Ensayo clínico para evaluar la eficacia de un nutraceutico frente a placebo en la reducción de riesgo cardiovascular en sujetos sanos". Estudio dentro del contrato de investigación industrial y desarrollo experimental de alimento inteligente, Smartfood.	
Investigador Principal	Nombre	Correo-e
Dr.	Francisco Javier López Román	jloroman@ucam.edu

INFORME DEL COMITÉ

Fecha	15/04/2016
--------------	-------------------

Tipo de Experimentación

Investigación experimental clínica con seres humanos.	X
Utilización de tejidos humanos procedentes de pacientes, tejidos embrionarios o fetales.	X
Utilización de tejidos humanos, tejidos embrionarios o fetales procedentes de bancos de muestras o tejidos.	
Investigación observacional con seres humanos, psicológica o comportamental en humanos.	
Uso de datos personales, información genética, etc.	
Experimentación animal.	
Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o las plantas.	
Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs).	

Comentarios Respecto al tipo de Experimentación

<i>Nada Obsta</i>

Comentarios Respecto a la metodología de experimentación

<i>Nada Obsta</i>



COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

Sugerencias al Investigador
<i>Marquesi Carilla B</i>

A la vista de la solicitud de informe adjunto por el Investigador y de las recomendaciones anteriormente expuestas el dictamen del Comité es:

Emitir informe favorable	☒
Emitir informe desfavorable	☐
Emitir informe favorable condicionado a subsanación	☐

MOTIVACIÓN
<i>Puede incrementar el compromiso</i>

Vº Bº El Presidente,

Fdo.: José Alberto Cánovas Sánchez



El Secretario,

Fdo.: José Alarcón Teruel

ANEXO 5. Estudios previos del grupo

Estrés oxidativo/inflamatorio (Antioxidant Activity Of Phenolics Extracted From *Olea Europaea* L. Leaves. Food Chemistry, 68: 457-462. 2000.) (Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *olea europaea* l. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulfur compounds. J. Med. Food, 5 (3): 125-136. 2002) (Beneficial action of citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. Current Cancer Drugs Targets. 7, 325-334. 2007) (Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. Mol. Nutr. Food Res., 52, 427-438. 2008) (Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids. New Findings in Anticancer, Cardiovascular and Anti-inflammatory Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56, 6185-6205. 2008) (Development of a high throughput system for the simultaneous identification of anti-inflammatory and neuroprotective compounds. Journal of Alzheimer's Disease. 19(2): 451-464. 2010) (Effects of plant-derived polyphenols on TNF release and nitric oxide production induced by advanced glycation endproducts. Mol. Nutr. Food Res., 54, 141-150. 2010) (Neuroprotective mechanisms-Oxidative stress as a target for neuroprotective therapies in Alzheimer's and Parkinson's disease. Frontiers in Medicinal Chemistry. Bentham Science Publishers Ltd. 2010. ISBN: 978-1-60805-208-0; ISSN: 1567-2042)

Agregación plaquetaria (Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. J. of Thrombosis and Haemostasis. 3(2): 369-76. 2005) (Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation, and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56, 2970-2976. 2008) (: Thromboxane A(2) Receptor Antagonism by Flavonoids: Structure-Activity Relationships. J Agric Food Chem. 57(4): 1589-1594. 2009)

Perfil lipidico (The Effect of Consumption of Citrus Fruit and Olive Leaf Extract on Lipid Metabolism. Nutrients 2017, 9(10), 1062) (Effectiveness of Consumption of a Combination of Citrus Fruit Flavonoids and Olive Leaf Polyphenols to Reduce Oxidation of Low-Density Lipoprotein in Treatment-Naïve Cardiovascular Risk Subjects: A Randomized Double-Blind Controlled Study. Antioxidants 2021, 10, 589)

Aspectos vasculares/tensión arterial (Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE-I) activity by flavonoids. Structure-activity relationship. Plos-One Nov 2012 | Volume 7 | Issue 11 | e49493) (Endothelium dependent vascular relaxing effects of different citrus and olive extracts in spontaneously hypertensive rats. Food Research International. 2015. 77: 484-490) (Beneficial Effects of Different Flavonoids on Vascular and Renal Function in L-NAME Hypertensive Rats. Nutrients 2018, 10(4), 484) (Moderate Effect of Flavonoids on Vascular and Renal Function in Spontaneously Hypertensive Rats. Nutrients 2018, 10(8), 1107)

