

Estudio de las repercusiones clínicas y analíticas de una intervención nutricional en pacientes no hospitalizados con claudicación intermitente. Estudio aleatorio controlado

J.J. Carrero^a, L.M. Salmerón-Febres^b, V.E. Ramos-Gutiérrez^b,
E. López-Huertas^c, E. Ros-Díe^b

ESTUDIO DE LAS REPERCUSIONES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN PACIENTES NO HOSPITALIZADOS CON CLAUDICACIÓN INTERMITENTE. ESTUDIO ALEATORIO CONTROLADO

Resumen. Introducción. La dieta es un pilar fundamental, a veces olvidado, en el control y tratamiento de la enfermedad vascular periférica (EVP). Objetivo. Estudiar los efectos de la ingesta de ciertos nutrientes con probado efecto beneficioso en la prevención de la enfermedad coronaria en la clínica y el perfil bioquímico de enfermos claudicantes. Pacientes y métodos. Estudio longitudinal, descriptivo, aleatorio y doble ciego, con 60 varones claudicantes (grado IIB de Fontaine), distribuidos en dos grupos. Grupo I (n = 30): además de su dieta habitual consumieron 500 mL/día de leche semidesnatada adicionada de ácidos eicosapentanoico, docosahexanoico, oleico y fólico y vitaminas A, D, E y B₆. Grupo C (n = 26): además de su dieta habitual consumieron 500 mL/día de leche semidesnatada. Ambos grupos obtuvieron los mismos consejos higienicodietéticos, un antiagregante plaquetario (triflusal) y un hemorreológico (pentoxifilina). Con control trimestral, la intervención duró 12 meses. En cada control se realizó una exploración clínica vascular, claudicometría, índice de Yao, placentismografía y analítica. Resultados. La concentración plasmática de los nutrientes suministrados aumentó en el grupo I (p < 0,05), seguido de un descenso en colesterol total y la concentración de apolipoproteína B. La homocisteína total disminuyó en aquellos pacientes con hiperhomocisteinemia (p < 0,01). Paralelamente, la distancia de claudicación triplicó su valor (p < 0,001) y el índice de Yao aumentó de manera gradual (p < 0,05). Conclusiones. La inclusión diaria en la dieta de ciertos nutrientes cardiosaludables produjo, junto con otras recomendaciones dietéticas y hábitos de vida, una mejora significativa en los parámetros clínicos y analíticos de este grupo de claudicantes. La nutrición puede desempeñar un papel importante en el tratamiento y control de la EVP. [ANGIOLOGÍA 2006; 58: 19-30]

Palabras clave. Ácido fólico. Ácido oleico. Ácidos grasos omega 3. Enfermedad vascular periférica. Vitamina B₆. Vitamina E.

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada. ^b Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Clínico San Cecilio. ^c Departamento de Nutrición y Salud. Puleva Biotech. Granada, España.

Correspondencia: Dr. Luis Miguel Salmerón Febres. Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Clínico San Cecilio. Avda. Doctor Oloriz, 12. E-18012 Granada. E-mail: lmsalmeron@yahoo.es

Agradecimientos. A. M. Gómez Lopera, por su ayuda en la extracción de sangre y mediciones clínicas; a C. Rodríguez y A. D. Valero, por su asistencia técnica en el laboratorio, y a J.J. Boza, L. Baro y J. Fonolla, por su inspiración en el diseño del estudio y en la revisión crítica de los resultados del presente trabajo.

J. J. Carrero posee una beca predoctoral de la Universidad de Granada.

Conflicto de intereses. Este estudio estuvo financiado por Puleva Food.

© 2006, ANGIOLOGÍA

Introducción

Recientes trabajos han denunciado la falta de atención sobre estrategias preventivas y corrección de hábitos de vida en la enfermedad vascular periférica (EVP), tanto por parte de los pacientes como de los propios especialistas. Tras una intervención quirúrgica, un 36% de los pacientes no son prescritos con medicación cardioprotectora [1]; tras un cese hospitalario, tan sólo el 18% de los especialistas consideraría el uso de medicación hipolipemiente [2] y apenas un

40% de los pacientes modificarían sus hábitos dietéticos para el control de los lípidos [3]. La búsqueda de medidas correctoras podría contribuir a la prevención y el tratamiento de esta enfermedad y a la mejora de la calidad de vida de los enfermos de la EVP.

La arterioesclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos en las capas íntima y media arterial que termina por invadir la luz de las arterias, de manera que dificulta la llegada de la sangre a los tejidos irrigados. La localización de este acúmulo de lípidos determina diversas manifestaciones clínicas, como la EVP. La claudicación intermitente (CI) es la manifestación clínica más frecuente de la EVP, y está presente en más del 40% de estos pacientes [4]. El tratamiento de la CI se centra en la mejora de los síntomas y en el control de los factores de riesgo de la arterioesclerosis [5]. Los principales factores de riesgo son: la edad (por encima de los 40 años), el tabaquismo, la obesidad, la diabetes, la dislipemia, la hipertensión y la hiperhomocistinemia [6].

Una elevada proporción de enfermos de EVP acaba desarrollando un episodio de infarto agudo de miocardio o un ictus cerebral [7,8]. De hecho, el 70% de los enfermos de la EVP en general y el 90% de los sintomáticos con CI muere por estas causas [9,10]. Se calcula que los que padecen EVP poseen un riesgo cardiovascular cinco veces mayor que sus controles [11-13]. Este riesgo elevado, que parece ser independiente de los factores de riesgo clásicos antes descritos y que sólo se puede justificar de manera parcial mediante la asociación plausible de la EVP con la enfermedad cerebrovascular o coronaria, parece ser directamente proporcional a la gravedad de la sintomatología con la que cursen [14].

La evidencia científica de las últimas décadas avala el papel positivo que una alimentación saludable tiene en la prevención de la enfermedad coronaria. En concreto, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su informe sobre prevención cardiovascular del año 2003 [15] elaboró una lista de ali-

mentos ‘cardiosaludables’, para los que existe cierto aval científico acerca de su efecto directo sobre los principales factores de riesgo cardiovascular. En este sentido, la OMS recomienda el consumo regular de pescado para asegurar un aporte mínimo de entre 200-500 mg de ácido eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA) por semana, sustituir la grasa saturada por monoinsaturada (ácido oleico) y aumentar la ingesta de frutas y verduras para conseguir niveles óptimos de folato y antioxidantes. Los mecanismos de acción por los que estos nutrientes disminuyen el riesgo cardiovascular no están del todo claros, aunque parecen implicar acciones directas sobre el metabolismo de lípidos, la reducción de la inflamación y la disfunción endotelial, la disminución del estrés oxidativo y la relajación de los vasos; inciden en un aumento del flujo sanguíneo.

Sin embargo, la relación entre la EVP y la dieta no es tan firme, y muy pocos trabajos han abordado el papel de los nutrientes en la prevención y progresión de esta patología. La malnutrición suele ser común en esta comunidad de pacientes al tiempo que directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad [16]. A pesar de que algunos estudios intervencionistas con ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA) [17], aceite de oliva [18], aceite de girasol [19], vitamina E [20], B₆ [21] y ácido fólico [22] han descrito interesantes mejoras en la clínica y la bioquímica de esta enfermedad, la evidencia es aún inconsistente para elaborar una guía dietética clara de utilidad en este tipo de pacientes [23].

Objetivo

El presente trabajo establece la hipótesis de que una dieta equilibrada puede contribuir a la mejora de los marcadores bioquímicos de riesgo y a la progresión clínica de la EVP. Para ello, enriquecimos diariamente durante un año la dieta de un grupo de enfermos claudicantes con cantidades dietéticas de nu-

Tabla I. Criterios de inclusión.

Isquemia crónica de miembros inferiores de causa arterioesclerótica, grado IIB de Fontaine
Índice de Yao < 0,7
Residencia en el área metropolitana de Granada
Sin intolerancia a lácteos
Sin infarto agudo de miocardio en el último año
Sin tratamiento con estatinas a la fecha de inclusión
Sin estar indicados para cirugía revascularizadora de miembros inferiores

trientes cardiosaludables (ácidos grasos poliinsaturados omega 3, ácido oleico, ácido fólico y vitaminas B₆ y E).

Pacientes y métodos

Se diseñó un estudio prospectivo, descriptivo, longitudinal, aleatorio, controlado y doble ciego. Los sujetos fueron reclutados por el Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Clínico San Cecilio de Granada. Se incluyeron todos aquellos varones con el diagnóstico de isquemia crónica de miembros inferiores de causa arterioesclerótica, grado IIB de Fontaine (claudicación a menos de 150 m), y un índice de Yao inferior a 0,7. Los criterios de inclusión se detallan en la tabla I.

Mediante una tabla de números aleatorios, 73 posibles participantes se distribuyeron en dos grupos hasta completar 30 pacientes por grupo. A todos los pacientes se les recomendó encarecidamente que abandonaran el hábito tabáquico y se les instó a caminar durante una hora al día hasta el límite de su dolor de claudicación; se les explicó la importancia de esta medida en la evolución de su enfermedad. A todos los sujetos se les prescribió un tratamiento farmacológico

base, consistente en 300 mg/12 h de triflusal (antiagregante plaquetario) y 600 mg/12 h de pentoxifilina (hemorreológico). El protocolo fue aprobado por el comité ético del hospital y los sujetos dieron su consentimiento informado para participar.

Los grupos consumieron durante un año, además de su dieta habitual, 500 mL/día de un preparado lácteo. El grupo de intervención (I) consumió de manera diaria dosis dietéticas de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y ácido oleico, y el 75% de la ingesta diaria recomendada de las vitaminas B₆, E y ácido fólico, administradas de manera conjunta mediante un producto lácteo enriquecido. El grupo de control (C) consumió leche semidesnatada. Ambos productos poseen idéntico aporte calórico y cantidad de grasas, con la excepción de que el perfil graso del grupo I era nutricionalmente más saludable, como se refleja en la tabla II.

Ambos productos lácteos se envasaron en *tetra-bricks* blancos codificados, sin rotular ni etiquetar, de forma que ni los investigadores ni los pacientes conocieran el tipo de leche consumido. Los participantes recibían mensualmente los envases en sus domicilios y tanto la recepción como el consumo se controlaron por medio un sistema de cupones y mediante la recogida de los envases vacíos.

Antes de comenzar el estudio, los sujetos y sus cónyuges recibieron charlas de educación nutricional acerca de cómo preparar los alimentos, cocinar con aceite de oliva, evitar grasas de origen animal y embutidos, evitar alimentos precocinados y 'comida rápida', tomar abundantes legumbres, frutas y verduras, y se hizo hincapié en la adopción de un patrón de dieta mediterránea.

Análisis clínico y bioquímico

Se mantuvo un seguimiento de los pacientes durante 12 meses y se realizó una visita clínica en basal, y después de los 3, 6, 9 y 12 meses de intervención. En cada visita se realizó una exploración clínica y angiográfica completa que incluía la medida de presio-

nes parciales en miembros inferiores con el cálculo del índice de Yao, pletismografía neumática, claudicometría y extracción de 30 cm³ de sangre previo ayuno de al menos 10 horas. En la pletismografía se determinaba el flujo arterial en el muslo, la pantorrilla y el tobillo de ambos miembros inferiores, mediante un trazado gráfico, y se valoraba la amplitud y la forma de la onda obtenida. Como marcadores bioquímicos de riesgo cardiovascular se midieron los niveles plasmáticos de los nutrientes administrados –ácidos grasos, niveles de folato sérico y eritrocitario, concentración plasmática de vitamina E y B₆–, niveles de lípidos –triglicéridos, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, apolipoproteína B (ApoB)– y niveles de homocisteína (Hci) total.

Un estado de estrés oxidativo es otro de los factores contribuyentes a la aparición de eventos cardiovasculares. Dicho estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre la producción de radicales libres en nuestro organismo y la acción de las defensas antioxidantes. Dado que el estrés oxidativo es común en esta patología –y dado que en la intervención nutricional proporcionamos algunos nutrientes con capacidad antioxidante como las vitaminas E o B₁₂–, decidimos estudiar diversos parámetros bioquímicos indicativos tanto de la oxidación plasmática (malondialdehído) como de las propias partículas de LDL (unidades de lipoproteína de baja densidad oxidada), cuya oxidación y deposición en la capa íntima del endotelio se cree desencadenante del proceso aterosclerótico.

Análisis estadístico

Los datos se trataron mediante el programa informático estadístico SPSS v. 12.0. Las comparaciones entre ambos grupos al principio del estudio se realizaron mediante el test de Mann-Whitney. Para las variables que siguió una distribución normal; el efecto longitudinal de cada producto a lo largo del tiempo se analizó mediante un ANOVA de medidas repetidas de una vía, mientras que el efecto intergrupo

Tabla II. Composición nutricional de los productos lácteos empleados.

	Leche semidesnatada	Leche enriquecida
Energía (kJ/L)	19,5	21,8
Proteínas (g/L)	31	35
Carbohidratos (g/L)	47	52
Grasa total (g/L)	19	19
Saturados (g/100 g grasa total)	70,5	23,7
Monounsaturados (g/100 g grasa total)	27,2	56,8
Poliinsaturados (g/100 g grasa total)	2,3	19,5
Ácidos grasos específicos		
Ácido oleico (g/100 g grasa total)	21,5	54,4
ALA (g/100 g grasa total)	ID	0,6
EPA (g/100 g grasa total)	ID	1,4
DHA (g/100 g grasa total)	ID	2,1
Calcio (mg/100 mL)	120	132
Vitamina A (µg/100 mL)	120	12
Vitamina D (µg/100 mL)	0,75	0,75
Vitamina E (mg/100 mL)	ID	1,5
Vitamina B ₆ (mg/100 mL)	ID	0,3
Vitamina B ₁₂ (µg/100 mL)	0,38	0,38
Ácido fólico (µg/100 mL)	ID	30
ALA: ácido α-linolénico; DHA: ácido docosahexaico; EPA: ácido eicosapentanoico; ID: indetectable.		

(grupo I frente a C) se estudió mediante un ANOVA de medidas repetidas de dos vías. Para las variables no homogéneas, las diferencias intra e intergrupo se fijaron con los tests de Wilcoxon y Kruskal-Wallis,

Tabla III. Características basales de los pacientes en los grupos I y C ($n = 30$).

	Grupo I	Grupo C
Edad, años	62,4 \pm 1,6	65,6 \pm 1,7
IMC, kg/m ²	27,8 \pm 0,6	28,04 \pm 0,8
Tabaquismo, n (%)	13 (43)	14 (47)
Diabetes mellitus de tipo II, n (%)	5 (16)	6 (20)
Cardiopatía isquémica, n (%)	4 (13)	3 (10)
Hipertensión arterial, n (%)	12 (40)	14 (47)

Los valores son medias \pm error estándar de la media, a menos que se indique lo contrario. IMC: índice de masa corporal.

respectivamente. Cuando el análisis intergrupo mostró una significación estadística ($p < 0,05$), el test de Mann-Whitney o comparación de muestras t independientes se usó para determinar en qué puntos en el tiempo ambos grupos difirieron. La relación entre el aumento de las concentraciones plasmáticas de los nutrientes suministrados y la mejoría en la distancia de claudicación se estudió mediante una correlación bivariada de Pearson de dos colas.

Resultados

Las características de los sujetos al inicio del estudio se describen en la tabla III; no se encontraron diferencias entre ambos grupos ni al principio ni al final del estudio. Los productos lácteos utilizados se aceptaron bien y hubo un alto grado de cumplimiento. Cuatro pacientes del grupo C no completaron el estudio por cambio de residencia ($n = 2$), depresión ($n = 1$) o prescripción no controlada de estatinas ($n = 1$).

Las cantidades de ácido oleico, DHA y EPA proporcionadas diariamente en 500 mL de leche enriquecida fueron de 5,12, 0,13 y 0,2 g, respectivamente, mientras que la leche semidesnatada contenía sólo 1,82 g de ácido oleico/500 mL, con niveles indetecta-

bles de DHA y EPA. Mientras que no variaron los perfiles de ácidos grasos plasmáticos de los pacientes del grupo C, el grupo I incrementó de forma significativa las concentraciones de EPA y PUFA plasmáticos, y disminuyó la ratio entre ácido araquidónico (AA) y EPA (Tabla IV). El ácido oleico plasmático y el DHA se incrementaron en el grupo I, pero sin diferencias significativas entre ambos grupos.

La distancia de claudicación aumentó hasta 3,5 veces en el grupo I (Tabla V). Este aumento fue progresivo a partir del tercer mes. Estos incrementos en la distancia de claudicación estuvieron directamente relacionados con los aumentos de las concentraciones de EPA en plasma ($r = 0,37$; $p = 0,006$) y de folato eritrocitario ($r = 0,28$; $p = 0,04$). El índice de Yao también se elevó en el grupo I.

La concentración plasmática de colesterol total (CT) descendió en el grupo I, mientras que las de colesterol-LDL y triglicéridos no varió a lo largo del estudio (Tabla VI). La concentración de colesterol-HDL plasmático también descendió en ambos grupos desde el sexto mes. Los niveles de ApoB descendieron únicamente en el grupo I. En los individuos con hipercolesterolemia basal ($> 5,12$ mM/L) [24], se produjo un descenso significativo del colesterol a partir del tercer mes en el grupo I.

Las cantidades de ácido fólico y vitamina B₆ proporcionadas diariamente en los 500 mL de leche enriquecida fueron de 150 μ g y 1,5 mg, respectivamente. La vitamina B₆ en plasma y la concentración de folato sérico y eritrocitario se incrementaron en el grupo I, pero no se alteraron en el grupo C (Tabla VII). La concentración de Hci no varió cuando se tomaron en consideración todos los datos en conjunto. Sin embargo, en individuos con hiperhomocisteinemia basal (> 15 μ M/L) [25], la Hci descendió de manera significativa en el grupo I a partir del sexto mes. El consumo de vitamina E incrementó la concentración plasmática de ésta y de la ratio entre vitamina E y CT.

Las concentraciones plasmáticas de malondialdehído y LDL oxidada no variaron a lo largo del estudio.

Tabla IV. Ácidos grasos plasmáticos (en g/100 g ácidos grasos totales) en los grupos I ($n = 30$) y C ($n = 26$) al principio del estudio (0) y después de 6 y 12 meses de intervención.

		Grupo 0	Grupo 6	Grupo 12
Ácido oleico	I	24,37 \pm 0,82	25,41 \pm 0,91	26,85 \pm 0,89 ^a
	C	24,34 \pm 0,93	24,2 \pm 0,98	25,84 \pm 0,84
Ácido araquidónico (AA)	I	6,03 \pm 0,25	5,99 \pm 0,27	5,94 \pm 0,28
	C	6,35 \pm 0,37	6,14 \pm 0,29	6,28 \pm 0,29
Ácido eicosapentanoico (EPA)	I	0,74 \pm 0,05	0,98 \pm 0,08 ^{a,b}	1,22 \pm 0,11 ^{a,c}
	C	0,81 \pm 0,09	0,7 \pm 0,12	0,76 \pm 0,09
Ácido docosahexanoico (DHA)	I	1,96 \pm 0,1	2,18 \pm 0,17 ^b	2,39 \pm 0,13 ^{a,c}
	C	1,8 \pm 0,11	1,86 \pm 0,11	1,83 \pm 0,12
Poliinsaturados	I	35,66 \pm 0,91	35,24 \pm 0,83	36,62 \pm 0,83 ^{a,b}
	C	34,83 \pm 1,26	35,28 \pm 1,16	34,2 \pm 0,97
Ratio AA/EPA	I	8,95 \pm 0,75	6,88 \pm 0,59 ^{a,b}	5,9 \pm 0,59 ^{a,c}
	C	9,69 \pm 1,05	12,64 \pm 2,29	10,02 \pm 1,24

Los valores son medias \pm error estándar de la media. ^a Diferente respecto al valor basal: $p < 0,01$. Diferente respecto al grupo C: ^b $p < 0,05$; ^c $p < 0,01$.

Tabla V. Distancia de claudicación e índice de Yao en los grupos I ($n = 30$) y C ($n = 26$) al principio del estudio (0) y después de 3, 6, 9 y 12 meses de intervención.

		Grupo 0	Grupo 3	Grupo 6	Grupo 9	Grupo 12
Distancia de claudicación (m)	I	108 (63-153)	146 (101-192) ^b	184 (132-237) ^b	285 (193-378) ^b	388 (266-509) ^b
	C	99 (63-135)	97 (62-132)	137 (80-194)	148 (93-204)	143 (84-202)
Índice de Yao	I	0,46 \pm 0,02	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02	0,50 \pm 0,02	0,52 \pm 0,02 ^a
	C	0,43 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03	0,43 \pm 0,02	0,44 \pm 0,02

Los valores son medias o medias \pm error estándar de la media (entre paréntesis, intervalo de confianza al 95%). ^a Diferente respecto al valor basal: $p < 0,05$. ^b Diferente respecto al grupo C: $p < 0,001$.

Discusión

El presente trabajo muestra que la inclusión de determinados nutrientes (EPA, DHA, ácido oleico, ácido fólico, vitaminas B₆ y E) en la dieta diaria puede

mejorar los resultados clínicos y reducir los factores de riesgo en pacientes claudicantes con EVP.

Las concentraciones de ácidos grasos en plasma variaron en función de las grasas proporcionadas en el suplemento dietético. En el grupo I, los niveles de

Tabla VI. Lípidos plasmáticos y ApoB en los grupos I ($n = 30$) y C ($n = 26$) al principio del estudio (0) y después de 3, 6, 9 y 12 meses de intervención.

		Grupo 0	Grupo 3	Grupo 6	Grupo 9	Grupo 12
Colesterol total (mM/L)	I	5,43 \pm 0,17	5,19 \pm 0,13	5,13 \pm 0,16	5,07 \pm 0,14 ^a	5,15 \pm 0,13 ^a
	C	5,42 \pm 0,21	5,35 \pm 0,2	5,42 \pm 0,21	5,4 \pm 0,22	5,48 \pm 0,23
Colesterol > 5,12 mM/L ^e	I	6,06 \pm 0,16	5,5 \pm 0,15 ^c	5,45 \pm 0,22 ^a	5,34 \pm 0,19 ^{c,d}	5,53 \pm 0,15 ^c
	C	5,97 \pm 0,17	5,87 \pm 0,16	5,9 \pm 0,25	5,79 \pm 0,27	5,8 \pm 0,3
Colesterol-LDL (mM/L)	I	3,3 \pm 0,15	3,12 \pm 0,13	3,16 \pm 0,14	3,1 \pm 0,13	3,21 \pm 0,15
	C	3,1 \pm 0,16	3,05 \pm 0,2	3,17 \pm 0,18	3,29 \pm 0,17	3,3 \pm 0,19
Colesterol-HDL (mM/L)	I	1,27 \pm 0,05	1,22 \pm 0,07	1,17 \pm 0,06 ^b	1,14 \pm 0,05 ^c	1,17 \pm 0,06 ^c
	C	1,3 \pm 0,05	1,24 \pm 0,06	1,21 \pm 0,05 ^c	1,17 \pm 0,04 ^c	1,22 \pm 0,05 ^a
Triglicéridos (mM/L)	I	1,81 \pm 0,13	1,75 \pm 0,11	1,84 \pm 0,14	2,07 \pm 0,2	1,88 \pm 0,17
	C	1,87 \pm 0,18	1,9 \pm 0,19	1,8 \pm 0,19	1,78 \pm 0,19	1,93 \pm 0,18
ApoB (g/L)	I	10,9 \pm 4,1	nd	10,3 \pm 3,1	nd	10,1 \pm 2,8 ^c
	C	10,2 \pm 3,5	nd	10 \pm 3,5	nd	10,1 \pm 3,2

Los valores son medias \pm error estándar de la media. Diferente con respecto al valor basal: ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; ^dDiferente del grupo de control: $p < 0,05$. ^eSelección de varones con hipercolesterolemia (colesterol total > 5,12 mM/L) al principio del estudio, $n = 18$ (I) o $n = 17$ (C). HDL: lipoproteína de alta densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; nd: no determinado.

ácido oleico, DHA y EPA aumentaron en un 10%, 64% y 21% respectivamente, junto con el total de PUFA. Las vitaminas proporcionadas también elevaron las concentraciones de folatos sérico y eritrocitario, así como las concentraciones de vitaminas B₆ y E en plasma. Otros estudios llevados a cabo con un vehículo lácteo han mostrado incrementos similares [26-28], y suponen un efectivo biomarcador de ingesta. El vehículo de administración de los nutrientes (en una bebida consumida de manera diaria) puede haber contribuido al alto grado de cumplimiento.

Si bien la prescripción de fármacos, las recomendaciones de cambios en el estilo de vida y la adhesión al patrón de dieta mediterránea produjeron mejoras en la distancia de claudicación de ambos grupos, el incremento observado en el grupo I fue excepcional. Mientras que la distancia de claudica-

ción media aumentó en 44 m en el grupo C, en el grupo I lo hizo en 280 m. Este aumento fue gradual y sostenido a partir del tercer mes. La correlación entre el incremento de la distancia de claudicación y las concentraciones plasmáticas de EPA, ácido oleico y folatos sugiere que los nutrientes complementarios pueden ser responsables de las mejorías clínicas. Estos resultados concuerdan con el aumento en el índice de Yao, que además sugiere una elevación del flujo en grandes arterias.

Este incremento del flujo sanguíneo puede haberse conseguido a través de la disminución de la respuesta inflamatoria por parte de los ácidos grasos omega 3. La respuesta inflamatoria desencadenada en la pared del vaso sanguíneo es uno de los principales factores desencadenantes de la arterioesclerosis, y numerosos trabajos han descrito un componente anti-

Tabla VII. Concentraciones de vitaminas y de homocisteína (Hci) total en plasma en los grupos I ($n = 30$) y C ($n = 26$) al principio del estudio (0) y después de 3, 6, 9 y 12 meses de intervención.

		Grupo 0	Grupo 3	Grupo 6	Grupo 9	Grupo 12
Folato sérico (nM/L)	I	10,94 \pm 1,58 ^c	24,37 \pm 3,74 ^{c,d}	24,35 \pm 3,79 ^{c,e}	19,39 \pm 1,7 ^{c,f}	20,98 \pm 1,7 ^{c,f}
	C	13,62 \pm 3,7	13,71 \pm 7,8	12,8 \pm 1,4	12,32 \pm 1,23	11,51 \pm 1,16
Folato eritrocitario (nM/L)	I	1270 \pm 139	2033 \pm 241 ^{ct}	2051 \pm 235 ^{c,d}	1985 \pm 242 ^{c,e}	2058 \pm 235 ^{c,f}
	C	1148 \pm 144	1289 \pm 170	1359 \pm 142	1096 \pm 113	1009 \pm 89
tHci (μ M/L)	I	12,87 \pm 0,61	11,83 \pm 0,69 ^a	12,32 \pm 0,36	12,76 \pm 0,5	12,28 \pm 0,38
	C	13,57 \pm 0,71	13,17 \pm 0,6	14,18 \pm 0,64	14,42 \pm 0,59	14 \pm 0,51
tHci > 15 μ M/L	I	17,45 \pm 0,41	16,38 \pm 1,07	14,83 \pm 0,77 ^{b,d}	14,98 \pm 1,22 ^{a,e}	14,84 \pm 0,79 ^{a,e}
	C	17,27 \pm 0,67	16,24 \pm 0,72	16,92 \pm 0,98	16,76 \pm 0,73	16,01 \pm 0,69
Vitamina B ₆ (nM/L)	I	56,84 \pm 6,38	ND	79,07 \pm 8,26 ^{c,f}	ND	70,86 \pm 7,2 ^{b,f}
	C	36,49 \pm 3	ND	39,13 \pm 4,78	ND	39,6 \pm 3,51
Vitamina E (μ M/L)	I	22,52 \pm 2,13	ND	25,04 \pm 2,07	ND	27,02 \pm 2,07 ^{b,d}
	C	20,28 \pm 1,84	ND	22,43 \pm 2,25	ND	21,01 \pm 1,99
Ratio vitamina E/colesterol	I	4,12 \pm 0,32	ND	4,94 \pm 0,4 ^a	ND	5,22 \pm 0,28 ^{c,d}
	C	3,81 \pm 0,84	ND	4,23 \pm 0,38	ND	3,94 \pm 0,36

Los valores son medias \pm error estándar de la media. Diferente con respecto al valor basal: ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$. Diferente del grupo C: ^d $p < 0,05$; ^e $p < 0,01$; ^f $p < 0,001$. ^g Selección de pacientes con hiperhomocisteinemia (tHci > 15 μ M/L) al principio del estudio, $n = 8$ (I) o $n = 9$ (C). ND: no determinado.

inflamatorio asociado a la ingesta de DHA y el EPA [29]. En nuestro estudio, el aumento en las concentraciones de EPA y DHA del grupo I se vio acompañado de un descenso en la ratio entre AA y EPA. El EPA y el DHA compiten con el AA por la inserción en la posición sn-2 de fosfolípidos de membrana, y participan en la producción de eicosanoides menos potentes que los derivados del AA. Por tanto, la prostaglandina I₃ formada a partir de EPA en el endotelio es un vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria más activo que la prostaglandina I₂ formada a partir del AA. Un descenso en la ratio AA/EPA puede relacionarse con un aumento en la vasodilatación y con la inhibición de la agregación plaquetaria [30].

Además, el EPA y el DHA aumentan la deformabilidad del hematíe [31] y reducen la agregación de éstos [32], quizá como consecuencia de su incorporación y modificación estructural en su membrana. Así pues, una reducción de la agregación plaquetaria y eritrocitaria mejora la hemorreología y favorece el flujo sanguíneo [33]. Recientes trabajos han demostrado que el EPA y DHA procedentes de la dieta son capaces de incorporarse de manera efectiva a la composición estructural de placas arterioescleróticas, y aumentar la estabilidad de la ésta, de manera que reducen tanto la posibilidad de formación del trombo como la infiltración de los macrófagos. Por ello, podrían contribuir a ralentizar el avance de la lesión

vascular [34] y quizá la aparición de eventos clínicos. Es probable que estos efectos hayan podido contribuir a la mejora en la distancia de claudicación de nuestro trabajo. Otros estudios demuestran que una ingesta de ácido oleico, DHA o EPA disminuye la activación endotelial y la producción de moléculas de adhesión [29].

Las concentraciones de lípidos plasmáticos al comienzo del estudio se encontraban ligeramente elevados [24]. Aunque el nivel de colesterol-LDL en plasma no se alteró, el de ApoB plasmático descendió claramente en el grupo I. Se ha sugerido que la concentración de ApoB supone un mejor indicador de riesgo de enfermedad cardiovascular que la de LDL, ya que la ApoB es un indicador de todas las partículas potencialmente aterogénicas [35]. De hecho, esta reducción en los niveles de ApoB indica una disminución en el número de partículas de LDL proaterogénicas pequeñas y densas que no sería evidente si se observan sólo los niveles de colesterol-LDL. El CT plasmático descendió en el grupo I, pero se observaron mayores disminuciones cuando se estudió a aquellos individuos con hipercolesterolemia basal [24]. Estos resultados sugieren que los nutrientes proporcionados pueden haber contribuido en mayor medida a la estabilización de lípidos en sangre en el contexto de un desequilibrio de éstos. Estudios previos [27,28] describen un efecto de disminución de lípidos similar en el CT y colesterol-LDL, pero –al contrario que en estos estudios– en el presente trabajo no se observó ningún efecto en la concentración de triglicéridos. Casi la mitad de los individuos incluidos en el estudio eran fumadores (> 15 cigarrillos al día), lo que puede explicar la reducción de ~7% en colesterol-HDL plasmático en ambos grupos [36,37].

Debido al gran número de insaturaciones que poseen los ácidos grasos omega 3, se ha sugerido que su ingesta continuada puede favorecer a un estado prooxidativo tanto en plasma como en las partículas de LDL. Por ello, se propuso administrar este tipo de

grasa junto con pequeñas cantidades de vitamina E, que aparte de prevenir la oxidación de ésta, pudiera contribuir a mejorar las defensas antioxidantes del organismo. De hecho, en este estudio, el estado oxidativo tanto en plasma como en LDL, no se vio alterado durante el período de intervención. En cambio, la concentración plasmática de vitamina E y la ratio entre vitamina E y colesterol del grupo I aumentaron significativamente y hasta los valores > 5,2 µM/L. Esta ratio se considera más útil cuando se describe el estado de la vitamina E, y los valores > 5,2 µM/L se consideran óptimos en términos de protección cardiovascular [38]. Un reciente metaanálisis sugiere que la vitamina E puede contribuir a la mejoría observada en la distancia de claudicación protegiendo a los PUFA de las membranas celulares de la oxidación, mejorando el estrés oxidativo inducido por la isquemia en las extremidades inferiores, y disminuyendo el daño peroxidativo en general [20].

El producto lácteo adicionado con los nutrientes proporcionó un 75% de las ingestas diarias recomendadas para el ácido fólico y la vitamina B₆ [20]. El estado nutricional de folato aumentó durante la intervención en el grupo I hasta valores óptimos (> 15 nM/L) [39]. Las concentraciones de vitamina B₆ en plasma y folato eritrocitario se incrementaron de igual manera. Los niveles de folato y de vitamina B₆ son predictores independientes de aparición de la EVP en varones con más de 50 años [22] y son los principales factores responsables del descenso de la hiperhomocisteinemia, que en sí misma se considera un factor de riesgo de la EVP, presente en el 30% de los pacientes con CI [40]. En este estudio, la concentración plasmática de Hci disminuyó (un 15%) en los individuos del grupo I con hiperhomocisteinemia basal (> 15 µM/L) [25]. Una ingesta disminuida de folato y vitamina B₆, o una homocisteinemia elevada, se ha asociado a cambios en la respuesta de coagulación, a una menor relajación dependiente del endotelio, una menor síntesis de óxido nítrico y una menor de producción de prostaciclina [41], que afec-

ta también al factor hiperpolarizante derivado del endotelio, y que recientemente se ha descrito como uno de los principales mecanismos vasodilatadores en los capilares de bajo calibre [42]. Tales efectos pueden haber contribuido a aumentar el flujo sanguíneo en nuestro estudio, responsable de la mejora clínica.

Los efectos aislados de estos nutrientes se han abordado en anteriores trabajos, pero no se ha estudiado ninguna intervención dietética 'integral' como la que proponemos en este estudio. Estudios previos con aceite de oliva en pacientes con CI [18,19] muestran una mayor protección frente a la oxidación de las LDL. La ingesta de (n-3) PUFA parece tener ciertos efectos beneficiosos en la EVP, pero no se ha observado una evidencia clara de mejora de los resultados clínicos [17]. En muchos casos, la poca duración de los estudios, unos criterios de inclusión inadecuados o la metodología empleada ha podido encubrir posibles efectos beneficiosos clínicos que se han pasado por alto.

Las cantidades de nutrientes que hemos usado en este estudio son inferiores a las recomendaciones nutricionales españolas y pueden conseguirse fácilmente con una dieta equilibrada. La ingesta de pescado (ácidos grasos omega 3), aceite de oliva (ácido oleico y antioxidantes) y frutas y verduras (vitaminas y antioxidantes), constituye la base de nuestra dieta mediterránea. Aunque la bioquímica explicada no puede justificar de manera total la gran mejora clínica que se describe en esta cohorte, quizás el éxito de

la intervención resida en la mezcla combinada de estos nutrientes mediterráneos.

Trichopoulou et al [43] demostraron que la adopción del patrón dietético mediterráneo se asocia a una menor tasa de mortalidad en general y a una menor mortalidad coronaria en particular (casi un 50% menos tanto en hombres como mujeres), especialmente en aquellas personas de más de 55 años de edad. Pero un aspecto notable de este trabajo es que, a pesar de esta firme asociación dieta mediterránea-mortalidad, no se encontraron asociaciones significativas para ninguno de los nutrientes típicos de esta dieta por separado. Una explicación plausible a este hecho pudiera ser que el efecto que ejerce cada nutriente o cada alimento puede ser demasiado pequeño como para detectarse, mientras que la ingesta conjunta de todos los alimentos y nutrientes esenciales que la caracteriza puede, de manera acumulativa, ejercer un efecto sustancial en la salud. Además, las múltiples interacciones entre los distintos alimentos y nutrientes pueden ser las responsables de una sinergia en el efecto saludable producido.

Esta observación refuerza la idea de la ingesta conjunta de los nutrientes descritos en este trabajo (en el contexto de una dieta equilibrada), y no la ingesta separada de los mismos, la que posiblemente explique los beneficios saludables observados en esta cohorte de claudicantes. El papel de la nutrición en el tratamiento y control de esta patología debería evaluarse en mayor profundidad.

Bibliografía

1. Henke PK, Blackburn S, Proctor MC, Stevens J, Mukherjee D, Rajagopalan S, et al. Patients undergoing infrainguinal bypass to treat atherosclerotic vascular disease are underprescribed cardioprotective medications: effect on graft patency, limb salvage, and mortality. *J Vasc Surg* 2004; 39: 357-65.
2. Cassar K, Coull R, Bachoo P, Macaulay E, Brittenden J. Management of secondary risk factors in patients with intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 26: 262-6.
3. Mukherjee D, Lingam P, Chetcuti S, Grossman PM, Moscucci M, Luciano AE, et al. Missed opportunities to treat atherosclerosis in patients undergoing peripheral vascular interventions: insights from the University of Michigan Peripheral Vascular Disease Quality Improvement Initiative (PVD-QI2). *Circulation* 2002; 106: 1909-12.
4. Hirsch AT, Hiatt WR, PARTNERS Steering Committee. PAD awareness, risk, and treatment: new resources for survival: the USA PARTNERS program. *Vasc Med* 2001; 6: 9-12.
5. Regensteiner JG, Hiatt WR. Current medical therapies for patients with peripheral arterial disease: a critical review. *Am J Med* 2002; 112: 49-57.

6. Hiatt WR. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286: 1317-24.
7. Leng GC, Fowkes FGR. The epidemiology of peripheral arterial disease. *Vasc Med Rev* 1993; 4: 5-18.
8. Muluk SC, Muluk VS, Kelley ME, Whittle JC, Tierney JA, Webster MW, et al. Outcome events in patients with claudication: a 15-years study in 2777 patients. *J Vasc Surg* 2001; 33: 251-7.
9. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC) Working Group. Management of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2001; 31: 5-14, 93-101.
10. Ouriel K. Peripheral arterial disease. *Lancet* 2001; 358: 1257-64.
11. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, et al. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 1992; 326: 381-6.
12. Vogt MT, Wolfson SK, Kuller LH. Segmental arterial disease in the lower extremities: correlates of disease and relationship to mortality. *J Clin Epidemiol* 1993; 46: 1267-76.
13. Leng GC, Fowkes FG, Lee AJ, Dunbar J, Housley E, Ruckley CV. Use of ankle brachial pressure index to predict cardiovascular events and death: a cohort study. *BMJ* 1996; 313: 1440-4.
14. Brevetti G, Chiariello M, Ferulano G, Policicchio A, Nevola E, Rossini A, et al. Increases in walking distance in patients with peripheral vascular disease treated with L-carnitine: a double-blind, cross-over study. *Circulation* 1998; 77: 767-73.
15. WHO Study Group. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Technical Report Series 2003; 916.
16. Spark JJ, Robinson JM, Gallavin L, Gough MJ, Homer-Vaniasinkam S, Kester RC et al. Patients with chronic critical limb ischemia have reduced total antioxidant capacity and impaired nutritional status. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 24: 535-9.
17. Sommerfield T, Hiatt WR. Omega-3 fatty acids for intermittent claudication (Cochrane review). The Cochrane Library, Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2004.
18. Ramírez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gómez MC, Mir A, et al. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr* 1999; 129: 2177-83.
19. Aguilera CM, Mesa MD, Ramírez-Tortosa MC, Nestares MT, Ros E, Gil A. Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease. *Clin Nutr* 2004; 23: 673-81.
20. Kleijnen J, Mackerras D. Vitamin E for intermittent claudication (Cochrane review). The Cochrane Library, Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2004.
21. Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattstrom L, Boers G, Ueland P, et al. Low circulating folate and vitamin B₆ concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 1998; 97: 437-43.
22. Wilmink AB, Welch AA, Quick CR, Burns PJ, Hubbard CS, Bradbury AW, et al. Dietary folate and vitamin B₆ are independent predictors of peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg* 2004; 39: 513-6.
23. Hooper L, Griffiths E, Abrahams B, Alexander W, Atkins S, Atkinson G, et al. Dietetic guidelines: diet in secondary prevention of cardiovascular disease (first update, june 2003). *J Hum Nutr Diet* 2004; 17: 337-49.
24. Third Report of the National Cholesterol Education Programme Expert Panel on 'Detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (ATP III)'. National Institutes of Health (NIH), núm. 02-5215; 2002.
25. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 230-6.
26. Visioli F, Rise P, Plasmati E, Pazzucconi F, Sirtori C, Galli C. Very low intakes of n-3 fatty acids incorporated into bovine milk reduce plasma triacylglycerols and increase HDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Pharmacol Res* 2000; 41: 571-6.
27. Baro L, Fonolla J, Pena JL, Martínez-Ferez A, Lucena A, Jiménez J, et al. n-3 fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin Nutr* 2003; 22: 175-82.
28. Carrero JJ, Baro L, Fonolla J, González-Santiago M, Martínez-Ferez A, Castillo R, et al. Cardiovascular effects of milk enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and vitamins E and B₆ in volunteers with mild hyperlipidemia. *Nutrition* 2004; 20: 521-7.
29. Calder PC. N-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 1-11.
30. Singleton CB, Walker BD, Campbell TJ. N-3 polyunsaturated fatty acids and cardiac mortality. *Aust N Z J Med* 2000; 30: 246-51.
31. Ernst E. Effects of n-3 fatty acids on blood rheology. *J Intern Med* 1989; 225: 129-32.
32. Ho M, Maple C, Bancroft A, McLaren M, Belch JJ. The beneficial effects of omega-3 and omega-6 essential fatty acid supplementation on red blood cell rheology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999; 61: 13-7.
33. Vicaute E. Opposite effects of red blood cell aggregation on resistance to blood flow. *J Cardiovasc Surg* 1995; 36: 361-8.
34. Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 477-85.
35. Grundy SM. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. *Circulation* 2002; 106: 2526-9.
36. Senti M, Nogues X, Pedro-Botet J, Rubies-Prat J, Vidal-Barrquer F. Lipoprotein profile in men with peripheral vascular disease. Role of intermediate density lipoproteins and apolipoprotein E phenotypes. *Circulation* 1992; 85: 30-6.
37. Garrison RJ, Kannel WB, Feinleib M, Castelli WP, McNamara

- PM, Padgett SJ. Cigarette smoking and HDL cholesterol: the Framingham offspring study. *Atherosclerosis* 1978; 30: 17-25.
38. Morrissey PA, Sheehy PJ. Optimal nutrition: vitamin E. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 459-68.
39. Bronstrup A, Hages M, Prinz-Langenohl R, Pietrzik K. Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B₁₂ on plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1104-10.
40. Taylor LM Jr, DeFrang RD, Harris EJ Jr, Porter JM. The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1991; 13: 128-36.
41. Riba R, Nicolau A, Troxler M, Homer-Vaniasinkam S, Naseem KM. Altered platelet reactivity in peripheral vascular disease complicated with elevated plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2004; 175: 69-75.
42. De Vriese AS, Blom HJ, Heil SG, Mortier S, Kluijtmans LA, van de Voorde J, Lameire NH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated renal vasodilatory response is impaired during acute and chronic hyperhomocysteinemia. *Circulation* 2004; 109: 2331-6.
43. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a mediterranean diet and survival in a greek population. *N Engl J Med* 2003; 348: 2599-608.

A STUDY OF THE CLINICAL AND ANALYTICAL REPERCUSSIONS OF A NUTRITIONAL INTERVENTION IN NON-HOSPITALISED PATIENTS WITH INTERMITTENT CLAUDICATION. A CONTROLLED RANDOMISED STUDY

Summary. Introduction. Diet is a sometimes neglected cornerstone in the control and treatment of peripheral vascular disease (PVD). Aims. To study how the intake of certain nutrients with a proven beneficial effect in the prevention of heart disease affects the clinical symptoms and biochemical profile of patients with claudication. Patients and methods. A longitudinal, descriptive, randomised, double-blind study was conducted with 60 males with claudication (Fontaine grade IIB), distributed in two groups. Group I (n = 30): in addition to their usual diet, subjects consumed 500 ml/day of semi-skimmed milk with added eicosapentaenoic, docosahexaenoic, oleic and folic acids, as well as vitamins A, D, E and B₆. Group C (n = 26): in addition to their usual diet, subjects consumed 500 mL/day of semi-skimmed milk. Both groups received the same hygienic-dietary guidelines, an antiplatelet drug (triflusal) and a haemorrheologic agent (pentoxifylline). Including a three-monthly control, the intervention lasted 12 months. At each control the following tests were carried out: vascular clinical examination, treadmill exercise testing, Yao index, plethysmography and analyses. Results. The plasma concentration of the nutrients given to patients increased in group I (p < 0.05), followed by a decrease in total cholesterol and apolipoprotein B concentration. The total homocysteine level dropped in patients with hyperhomocysteinemia (p < 0.01). In a parallel fashion, the claudication distance become three times longer (p < 0.001) and the Yao index gradually increased (p < 0.05). Conclusions. Including certain nutrients that are good for the heart in the daily diet, along with other guidelines concerning nutrition and lifestyle, led to a significant improvement in the clinical and analytical parameters of this group of patients with claudication. Nutrition can play an important role in the treatment and control of PVD. [ANGIOLOGÍA 2006; 58: 19-30]

Key words. Folic acid. Oleic acid. Omega-3 fatty acids. Peripheral vascular disease. Vitamin B₆. Vitamin E.