



Programa de Doctorado en CIENCIAS DE LA SALUD

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**Estudio del efecto neuroprotector de la asociación de
polifenoles del aceite de oliva virgen extra**

Inmaculada Pérez de Algaba Fuentes

Málaga, mayo 2023

DIRECTORES:

José Antonio González Correa y José Pedro de la Cruz Cortés



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Inmaculada Pérez de Algaba Fuentes

 <https://orcid.org/0000-0003-3423-0165>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña INMACULADA PÉREZ DE ALGABA FUENTES

Estudiante del programa de doctorado CIENCIAS DE LA SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIO DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ASOCIACIÓN DE POLIFENOLES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

Realizada bajo la tutorización de JOSÉ NAPOLEÓN PÉREZ FARINOS y dirección de JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ CORREA Y JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 18 de MAYO de 2023

Fdo.: INMACULADA PEREZ DE ALGABA Doctorando/a	Fdo.: JOSÉ NAPOLEÓN PÉREZ FARINOS Tutor/a
Fdo.: JOSE A. GONZÁLEZ CORREA, JOSÉ P. DE LA CRUZ CORTÉS	
Director/es de tesis	





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA. Departamento de Farmacología y Pediatría

D. JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ CORREA, Catedrático de Farmacología y
D. JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS, Catedrático de Farmacología, adscritos al
Departamento de Farmacología y Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad
de Málaga,

CERTIFICAN:

Que Dña. INMACULADA PÉREZ DE ALGABA FUENTES ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “Estudio del efecto neuroprotector de la asociación de polifenoles del aceite de oliva virgen extra”, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que la suscriben revisado su tesis y estando conformes para ser juzgada; y que la publicación que avala la misma no ha sido utilizada en Tesis anteriores.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en Málaga, a 18 de mayo de 2023.

J.A. González Correa

J.P. de la Cruz Cortés



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA. Departamento de Farmacología y Pediatría

D. NAPOLEÓN PÉREZ FARINÓS, Profesor Titular de Universidad, adscrito al Departamento de Salud Pública y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que Dña. INMACULADA PÉREZ DE ALGABA FUENTES ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi tutela el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “Estudio del efecto neuroprotector de la asociación de polifenoles del aceite de oliva virgen extra”, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que la suscriben revisado su tesis y estando conformes para ser juzgada; y que la publicación que avala la misma no ha sido utilizada en Tesis anteriores.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Málaga, a 13 de junio de 2023.

Napoleón Pérez Farinós

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin los Dres. José Pedro de la Cruz Cortés y José Antonio González Correa, no sólo por su amplio conocimiento y experiencia, sino también por su dedicación y atención en cada una de las etapas que hemos ido recorriendo. Muchas gracias de corazón.

Al departamento de Farmacología de la Universidad de Málaga y mis compañeras en el grupo de investigación.

A mis padres y mi hermano, que sin ellos y su apoyo incondicional nada de esto tendría sentido ni cabida.

Y, por último, a Diego que, con su paciencia, ha sabido demostrarme de lo que soy capaz.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	3
1.1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ACCIDENTES CEREBRO- VASCULARES DE TIPO ISQUÉMICO	6
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL ACCIDENTE CEREBRO- VASCULAR ISQUÉMICO	11
1.1.3. FISIOPATOLOGÍA	17
1.2. ESTRÉS OXIDATIVO	21
1.3. DIETA MEDITERRÁNEA Y SU CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES NATURALES	23
1.3.1. HIDROXITIRO SOL	27
1.3.2. TIROSOL	31
1.3.3. OLEUROPEÍNA	32
1.3.4. OLEOCANTAL	35
1.3.5. DIHIDROXIFENILGLICOL	35
HIPÓTESIS	37
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. MATERIAL	45
3.2. TIPO DE ESTUDIO	47
3.3. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	47
3.4. TEJIDO DE ESTUDIO Y PROCEDIMIENTOS	48
Incubación de los polifenoles	50
Modelo experimental ex vivo de diabetes	50
Grupos experimentales de animales diabéticos	51
3.5. VARIABLES ANALÍTICAS	52



Lactato dehidrogenasa	52
Peroxidación lipídica	53
3-nitrotirosina	53
8-hidroxi-2-desoxi-guanosina	54
Concentración de glutatión	54
Actividad glutatión-peroxidasa	55
Capacidad antioxidante total	55
Análisis de variables bioquímicas del perfil glucémico y lipídico	55
Análisis morfométrico de la retina	55
3.6. MÉTODO ESTADÍSTICO	57
4. RESULTADOS	59
4.1. INTERACCIÓN IN VITRO ENTRE DISTINTOS POLIFENOLES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN CORTES CEREBRALES DE RATA SANA SOMETIDOS A UN PROCESO DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN	61
4.1.1. EFECTO DEL MODELO EXPERIMENTAL SOBRE LAS VARIABLES DETERMINADAS	61
4.1.2. VALORACIÓN DEL EFECTO DE DISTINTAS COMBINACIONES DE POLIFENOLES, RESPECTO A HIDROXITIRO SOL, EN EL MODELO EXPERIMENTAL	62
4.1.3. VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DE DISTINTOS POLIFENOLES EN LA ACCIÓN DE HIDROXITIRO SOL EN EL MODELO EXPERIMENTAL	69
4.2. INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL Y 3',4'-DIHIDROXIFENILGLICOL, SOLOS O COMBINADOS, EN CORTES CEREBRALES DE RATA DIABÉTICAS SOMETIDOS A UN PROCESO DE HIPOXIA- REOXIGENACIÓN	78
4.2.1. MODIFICACIONES DE LAS VARIABLES ANALIZADAS DEBIDAS A LA DIABETES MELLITUS	79
4.2.2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL (HT) Y 3',4'-DIHIDROXIFENILGLICOL (DHPG) SOBRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LOS ANIMALES CON DIABETES MELLITUS	85

5. DISCUSIÓN	99
6. CONCLUSIONES	109
7. BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXOS	125
ANEXO I. Fuentes de financiación	127
ANEXO II. Artículos publicados	129
ANEXO III. Documentación Comité de Experimentación Animal	131



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN



1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

Los accidentes cerebrovasculares (ACV), también conocidos como ictus, constituyen una emergencia médica y se han convertido, entre otros motivos por el mayor envejecimiento poblacional, en uno de los principales problemas de salud pública en los países desarrollados.

Los accidentes cerebrovasculares se encuentran englobados fundamentalmente en tres tipos, cada uno con sus características clínicas, epidemiológicas, evolutivas y terapéuticas:

- Accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico: en estos casos se produce un defecto del aporte sanguíneo necesario para transportar el oxígeno.
- Accidentes cerebrovasculares de tipo hemorrágico: en este tipo de accidente cerebrovascular ocurre justo lo contrario que en los de tipo isquémico: se produce un sangrado excesivo que puede ocurrir dentro del tejido cerebral, que es lo que se conoce como hemorragia intracerebral, o a través del líquido cefalorraquídeo, que es lo que se conoce como hemorragia subaracnoidea.
- Ataque isquémico transitorio: se da cuando se produce una interrupción temporal del flujo sanguíneo al cerebro. Es lo que se conoce también como micro ictus. La principal diferencia con el accidente cerebrovascular isquémico es que no deja secuelas.

Accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico:

Los accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico representan casi un 65% del número total de ictus (Martin et al., 2019). Como ya se ha dicho, se produce como consecuencia de una interrupción del flujo sanguíneo en las arterias cerebrales. En función del grado de hipoperfusión que tenga lugar, aparecerá un área cerebral en ausencia completa de oxígeno, que se conoce como núcleo o *core* del infarto, y otra área que rodea a esta última, llamada penumbra isquémica, que presenta una reducción del flujo sanguíneo, pero todavía hay presente tejido cerebral viable. Dentro de los accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico, se puede hacer una clasificación en tres subtipos diferentes en función de la etiología de estos:

- a) Trombosis: se da cuando se produce una obstrucción en una arteria, lo que va a impedir o disminuir el flujo sanguíneo que irriga al cerebro. La formación de la placa va a provocar una constricción de la luz del vaso sanguíneo y la generación de coágulos, causando lo que se conoce como accidente cerebrovascular trombótico. El hecho de que la obstrucción se de en una arteria de gran tamaño o en una de menor tamaño es muy relevante y deben diferenciarse, dado que el tratamiento y el manejo del paciente van a ser diferente.

Se consideran arterias o vasos de gran tamaño dentro del sistema arterial cerebral a la arteria carótida común, la arteria carótida interna y aquellas que componen el círculo de Willis, así como sus ramas más próximas. Estas arterias pueden ser obstruidas a causa de diferentes patologías, entre las que se encuentran la arteriosclerosis o displasia fibromuscular. Los vasos de menor tamaño son, por su parte, pequeños vasos que se encuentran dentro del sistema arterial intracerebral y que surgen desde la arteria vertebral distal, la arteria basilar, la parte medial del tallo cerebral y del círculo de Willis. Estos vasos son obstruidos fundamentalmente como consecuencia, entre otras posibilidades, de una lipohialinosis, condición que supone un estrechamiento de las pequeñas arterias del cerebro, o por la formación de una placa de ateroma. Los accidentes cerebrovasculares que tienen lugar en estos vasos son conocidos como infartos lacunares.

- b) Embolismo: puede ser de origen cardiaco, arterial o desconocido. El embolismo produce una disminución del flujo sanguíneo a nivel cerebral y, en última instancia, la muerte celular o necrosis. La necrosis es el paso anterior a la ruptura de la membrana plasmática en la célula, junto con la hinchazón de las organelas celulares y la salida del contenido celular al espacio extracelular, constituyendo la pérdida de la función neuronal. Otras causas, aparte de la necrosis, que contribuyen a que se produzca el accidente cerebrovascular son la inflamación, la pérdida de energía y homeostasis, el aumento de los niveles de calcio intracelulares, la excitotoxicidad, la toxicidad provocada por la presencia de radicales libres (que veremos más adelante), la citotoxicidad mediada por citoquinas, la activación del complemento, la pérdida de funcionalidad de la

barrera hematoencefálica, la activación de las células de la glía, y la infiltración de los leucocitos.

- c) Hipoperfusión sistémica: se da cuando hay una disminución del flujo sanguíneo de manera generalizada y no suele afectar a una determinada zona aislada, sino a una zona generalizada. La hipoperfusión puede ser debida a diferentes razones como puede ser un fallo cardíaco a consecuencia de una arritmia, o una reducción del gasto cardíaco debido a un infarto agudo de miocardio, embolismo pulmonar, etc.
- d) Desorden hematológico: es la causa menos frecuente de accidente cerebrovascular (Feske, 2021), pero debe tenerse en cuenta en pacientes menores de 45 años o con coagulopatías. Dentro de las enfermedades hematológicas, las que con mayor frecuencia se asocian a la aparición de accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico son la anemia perniciosa, policitemia vera, déficit de proteína C o S, el factor V Leiden (lo que produce una resistencia a la proteína C activa), déficit de antitrombina III, síndrome antifosfolípido, hiperhomocisteinemia o la púrpura trombocitopénica (Feske, 2021).

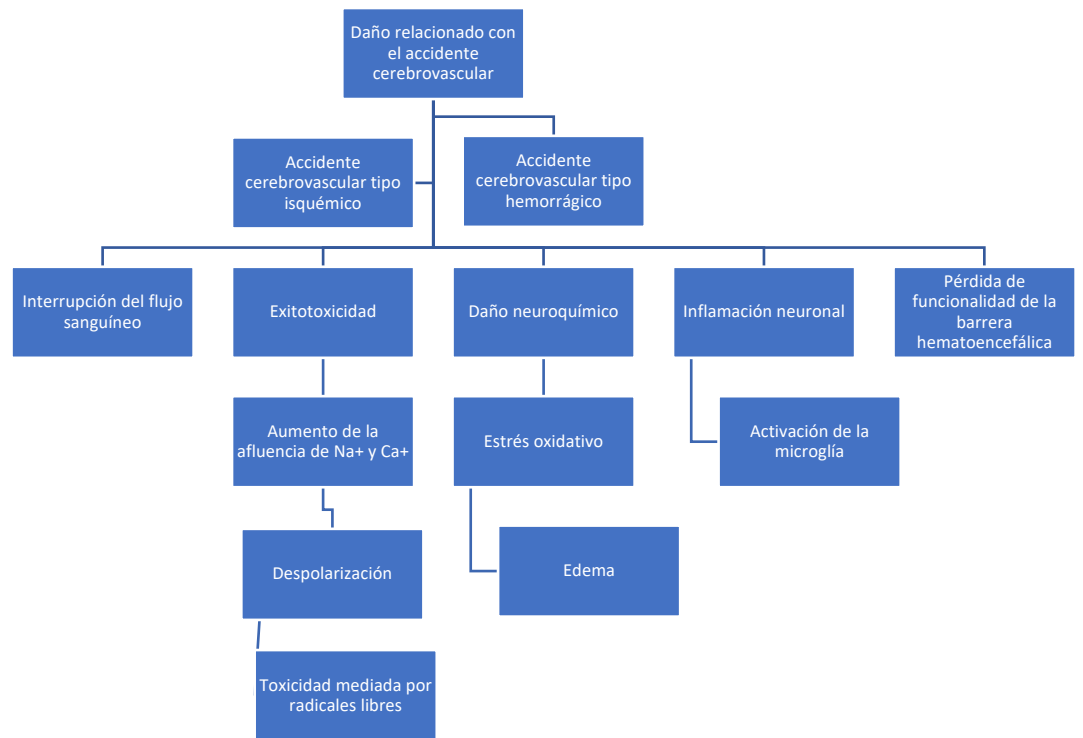


Figura 1.1. Mecanismo molecular del accidente cerebrovascular (Adaptado de Kuriakose et al., 2009.)

1.1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ACCIDENTES CEREBROVASCULARES DE TIPO ISQUÉMICO

La clasificación más utilizada y mejor valorada de los accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico es la clasificación TOAST. Este sistema los clasifica en función de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la mayoría de los accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico y los divide en cinco subtipos en función de la clínica del paciente y algunas pruebas complementarias como son imágenes cerebrales, evaluaciones neuromusculares, pruebas para la evaluación cardíaca y pruebas de laboratorio, lo que suele incluir una coagulación básica con el estudio de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA), además del Dímero D. Los cinco subtipos son los siguientes:

- Arteriosclerosis de arterias grandes.
- Cardioembolismo
- Oclusión de arterias pequeñas
- Accidente cerebrovascular de otra etiología determinada
- Accidente cerebrovascular de etiología indeterminada.

Cuando se habla de enfermedad cerebrovascular de etiología indeterminada, el sistema de clasificación TOAST se refiere a aquella cuya causa no se puede establecer con un nivel de confianza determinado y, por definición, incluye aquellas con dos o más posibles causas identificadas, con una evaluación negativa o con una evaluación incompleta. En este grupo se incluiría, por ejemplo, el accidente cerebrovascular de tipo isquémico embólico de origen desconocido.

Dado que el sistema de clasificación TOAST fue publicado en el año 1993, los avances hasta el día de hoy en el diagnóstico y tratamiento de los accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico han hecho que, si se sigue de manera muy estricta este sistema clasificatorio, sean muchos los que se engloben en la categoría de “Accidente cerebrovascular de etiología indeterminada”, ya que en dicha categoría entrarían todos aquellos que tienen dos o más posibles causas identificadas.

Es por este motivo que, en el año 2005, se publicó una modificación del sistema de clasificación TOAST: el SSS-TOAST, el cual dividía cada subtipo de la clasificación TOAST en tres categorías diferentes en función del nivel de evidencia científica a la hora del diagnóstico, utilizando criterios clínicos y radiológicos: “evidente”, “probable” o “posible”. Más tarde, en el año 2007, este algoritmo se automatizó para dar lugar al sistema de clasificación “Causative Classification System for Ischemic Stroke (CCS)” (Tabla 1.1). Este sistema se trata de un algoritmo automatizado tipo cuestionario en el que, basándose en las respuestas proporcionadas es capaz de facilitar el mecanismo por el cual se está produciendo el accidente cerebrovascular con un nivel de evidencia determinado.

Tabla 1.1. Modificado del sistema de clasificación “Causative Classification System for Ischemic Stroke (CCS). Disponible en https://ccs.mgh.harvard.edu/ccs_intro.php.

Mecanismo causante del accidente cerebrovascular tipo isquémico	Nivel de evidencia	Criterios
Arteriosclerosis de arterias grandes	Evidente	<ol style="list-style-type: none"> 1. Enfermedad vascular oclusiva o por estenosis (reducción del diámetro mayor o igual a un 50%, o reducción del diámetro de menos de un 50% con ulceración, o trombosis de la placa o placa con reducción del diámetro menor o igual a un 50% que se encuentra en el sitio del origen de la arteria penetrante que irriga la región de un infarto lacunar agudo (que se considera debida a aterosclerosis en las arterias extracraneales o intracraneales clínicamente relevantes) y, 2. Ausencia de infarto agudo en territorios vasculares distintos de la arteria afecta.
	Probable	<ol style="list-style-type: none"> 1. Antecedentes de una o más ceguera monocular transitoria, microictus o accidente cerebrovascular del territorio de la arteria índice afectada por aterosclerosis dentro

		<p>del mes anterior al accidente cerebrovascular índice, o</p> <p>2. Evidencia de trombosis, estenosis casi oclusiva u oclusión completa no crónica que se considera debida a aterosclerosis en las arterias extracraneales o intracraneales clínicamente relevantes (excepto las arterias vertebrales), o</p> <p>3. La presencia de infartos agudos ipsilaterales y unilaterales de cuenca interna o infartos múltiples, temporalmente separados exclusivamente dentro del territorio de la arteria afectada.</p>
	Posible	<p>1. La presencia de una placa aterosclerótica que sobresale en la luz y causa estenosis leve (<50%) en ausencia de cualquier ulceración o trombosis detectable de la placa, en una arteria extracraneal o intracraneal clínicamente relevante, y antecedentes de dos o más eventos de ceguera, monocular transitoria, micro ictus o accidente cerebrovascular del</p>

		territorio de la arteria índice afectada por aterosclerosis, al menos un evento en el último mes.
Cardioembolismo	Evidente	1. Presencia de una fuente de origen cardíaco de alto riesgo de producir embolia cerebral
	Probable	1. Evidencia de embolismo sistémico o, 2. La presencia de múltiples infartos agudos que se han producido estrechamente relacionados en el tiempo dentro de la circulación anterior derecha e izquierda o ambas circulaciones anterior y posterior en ausencia de oclusión no embólica o estenosis casi oclusiva de todos los vasos relevantes. Otras enfermedades que pueden causar lesión cerebral isquémica multifocal como vasculitis, vasculopatías y alteraciones hemostáticas o hemodinámicas no deben estar presentes.
	Posible	1. La presencia de una afección cardíaca con riesgo primario bajo o incierto de embolia cerebral
Oclusión de arterias pequeñas	Evidente	1. Evidencia radiológica de un infarto agudo único y clínicamente

		relevante de menos de 20 mm del diámetro mayor dentro del territorio de las arterias penetrantes basales o del tronco encefálico, en ausencia de cualquier patología focal en la arteria principal en el sitio del origen de la arteria penetrante (ateroma focal, disección del vaso principal, vasculitis, vasoespasma, etc.), o
	Probable	<ol style="list-style-type: none"> 1. La presencia de ataques isquémicos transitorios lacunares estereotípicos en la última semana, o 2. La presencia de un síndrome lacunar
	Posible	<ol style="list-style-type: none"> 1. Presentar un síndrome lacunar clásico en ausencia de imágenes que sean lo suficientemente sensibles para detectar pequeños infartos
Accidente cerebrovascular de otra etiología determinada	Evidente	<ol style="list-style-type: none"> 1. La presencia de un proceso patológico específico que involucre arterias cerebrales clínicamente relevantes
	Probable	<ol style="list-style-type: none"> 1. Un proceso patológico específico que se ha producido en relación temporal o espacial clara y estrecha con el inicio del infarto cerebral, como la disección arterial, la cirugía

		cardíaca o arterial y las intervenciones cardiovasculares.
	Posible	1. Evidencia de otra causa clara en ausencia de un estudio diagnóstico completo de los mecanismos enumerados anteriormente.
Accidente cerebrovascular de etiología indeterminada	Desconocido	<p>Embolia criptogénica:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Evidencia angiográfica de corte abrupto consistente con un coágulo de sangre dentro de arterias intracraneales de aspecto normal en la angiografía, o 2. Evidencia radiológica de recanalización completa de la arteria previamente ocluida, o 3. La presencia de múltiples infartos agudos que han ocurrido estrechamente relacionados en el tiempo sin anormalidad detectable en los vasos relevantes. <p>Otros criptogénicos: aquellos que no cumplen con los criterios de ictus criptogénico.</p>

		Evaluación incompleta: La ausencia de pruebas diagnósticas cuya presencia, a juicio del examinador, hubiera sido fundamental para desvelar la etiología subyacente.
	Sin determinar	La presencia de más de un mecanismo posible o evidente donde hay evidencia probable para cada uno, o no hay evidencia probable para poder establecer una sola causa.

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR ISQUÉMICO

Los accidentes cerebrovasculares son la segunda causa de muerte a nivel global de discapacidad, calculado a través de años de vida ajustados por discapacidad (Feske, 2021). A pesar de esto, son muy pocos los estudios que analizan su incidencia y evolución (Purroy et al., 2021).

En España, en el caso de los ictus isquémicos, se llevaron a cabo dos estudios con relevancia:

- En el año 2016, Satué et al. analizaron desde el año 2008 (1 de diciembre) al año 2011 (30 de Noviembre), un total de 343 casos con edad superior a 60 años procedentes del sur de Cataluña. El estudio arrojó los siguientes resultados:

Tabla 1.2. Resultados del estudio de Satué et al., 2016.

Año de análisis	Nº total de casos	Incidencia cruda de hombres	Incidencia cruda de mujeres	Incidencia cruda total (IC95%)
2008-2011	343	531	392	453 (408-504)

- Vena et al, en el año 2020: en este estudio se analizó la incidencia estratificada por sexo desde el año 2010 al 2014 en la población de Lérida. Se incluyeron un total de 3.969 casos de todas las edades y se obtuvieron los siguientes resultados en cuanto a incidencia de accidentes cerebrovasculares de tipo isquémico (Tabla 3):

Tabla 1.3. Resultados del estudio de Vena AB et al., 2022.

Año de análisis	Nº total de casos	Incidencia cruda de hombres (IC95%)	Incidencia cruda de mujeres (IC95%)	Incidencia cruda total (IC95%)	Incidencia estandarizada total (IC95%)
2010	813	217 (198-237)	151 (135-169)	185 (172-198)	120 (108-132)
2011	758	200 (182-220)	142 (126-158)	171 (159-184)	114 (103-127)
2012	765	208 (190-228)	136 (121-152)	173 (161-185)	114 (104-127)
2013	842	229 (209-250)	152 (136-169)	191 (178-204)	128 (116-140)
2014	791	221 (202-241)	139 (124-156)	181 (168-194)	122 (111-135)

Tal y como se puede deducir de ambos estudios, la incidencia en hombres es superior a la incidencia en mujeres, lo que podría quedar explicado por el mayor acúmulo de factores de riesgo cardiovasculares (Kuriakose et al., 2020; Purroy et al., 2021).

- **Edad:** En cuanto a la edad, la aparición de accidentes cerebrovasculares es mayor a medida que avanza la edad en el paciente, siendo el riesgo dos veces superior cuando se pasa la edad de los 55 años (Kuriakose et al., 2020). Sin embargo, en los últimos años la incidencia de accidentes cerebrovasculares en personas con edades comprendidas entre 20 y 54 años ha aumentado de un 12.9 a un 18.6% .
- **Ámbito geográfico:** La mayor incidencia de accidentes cerebrovasculares se encuentra en China (331-378 individuos por cada 100000 habitantes), seguida de Europa del Este (181-218 por 100000 habitantes. La menor incidencia la podemos encontrar en América Latina (85-100 por cada 100000 habitantes).
- **Aspecto socioeconómico:** existe una fuerte relación inversamente proporcional entre la aparición de accidentes cerebrovasculares y el estatus socioeconómico, lo que puede deberse a la falta de accesibilidad a servicios sanitarios adecuados y a los cuidados recibidos tras el accidente cerebrovascular en las poblaciones con menos recursos.

En cuanto a los factores de riesgo relacionados con la aparición de accidentes cerebrovasculares se pueden clasificar en modificables y no modificables (Figura 1.2).

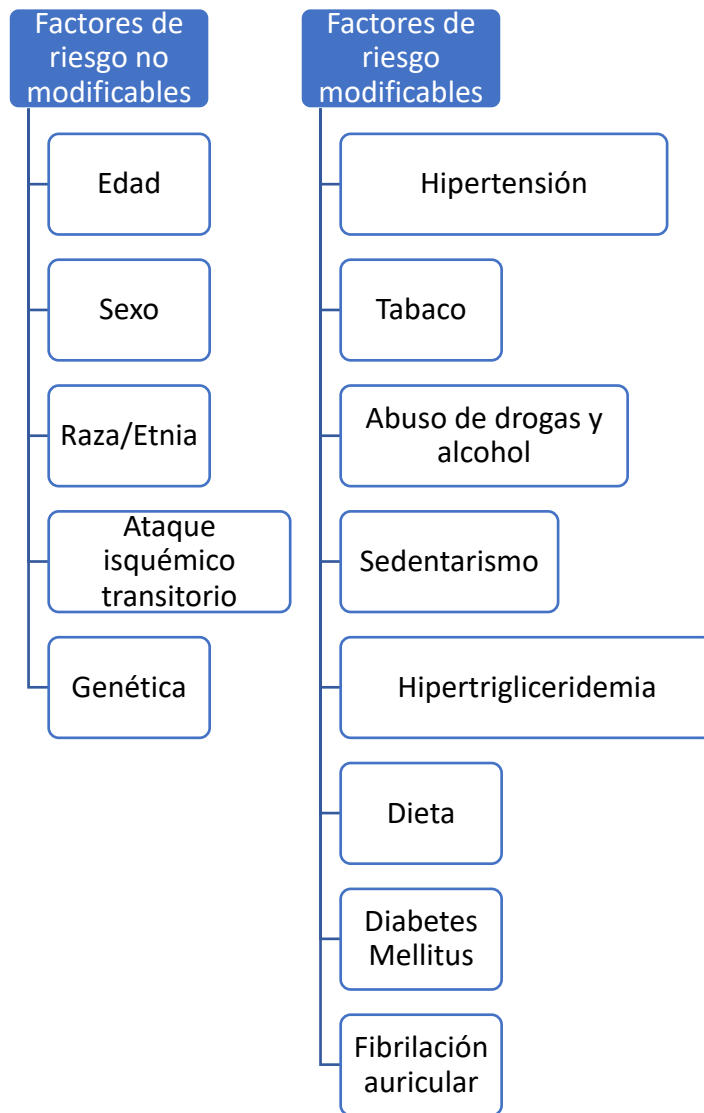


Figura 1.2. Factores de riesgo asociados con el accidente cerebrovascular (Adaptado de Kuriakose et al., 2020)

1.1.3. FISIOPATOLOGÍA

Cuando tiene lugar un accidente cerebrovascular, a nivel fisiopatológico tiene lugar, por un lado, una trombogénesis y, por otro lado, un proceso de isquemia-reperusión. El accidente cerebrovascular se puede definir como una explosión neurológica abrupta causada por un fallo en la perfusión al cerebro a través de los vasos sanguíneos (Feske, 2021; Kuriakose et al., 2020). En condiciones fisiológicas, el flujo sanguíneo cerebral tiene lugar a través de las dos arterias carótidas internas que se encuentran en la parte anterior y las dos arterias vertebrales que se encuentran en la parte posterior conformando el círculo de Willis.

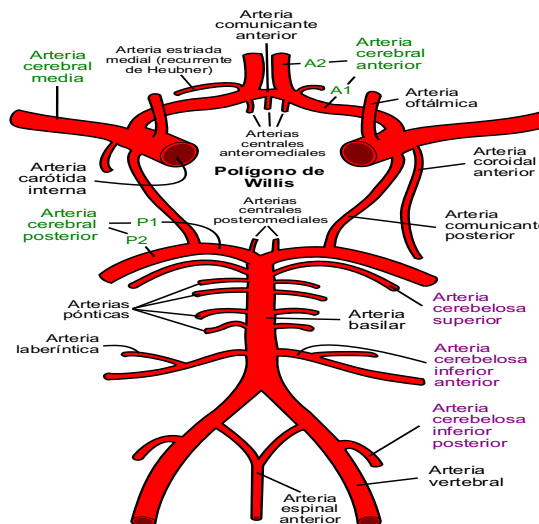


Figura 1.3. Círculo de Willis. De Ninovolador - Trabajo propio, basado en: Circle of Willis pt.svg de Rhcastilhos, Dominio público

La etiología más frecuente en la isquemia cerebral es la aparición de un trombo, lo que provoca daño en el tejido cerebral, por lo que a la hora de explicar este daño hay que tener en cuenta, por un lado, el producido por la trombogénesis y, por otro, el producido por la isquemia cerebral.

- **Trombogénesis:** durante la trombosis, el flujo sanguíneo cerebral sufre debido al estrechamiento que se produce en los vasos debido a la arteriosclerosis. De acuerdo

con los postulados de Virchow, la formación de un trombo involucra tres factores que se encuentran interrelacionados:

- Alteración de la pared del vaso (aterotrombótico, lacunar, embolia secundaria a prótesis valvular o infarto agudo de miocardio).
- Alteración del flujo sanguíneo (embolia secundaria a la fibrilación auricular o estenosis mitral).
- Alteración de la coagulabilidad de la sangre en lo que se conoce como estado de hipercoagulabilidad o protrombótico y es lo que va a definir la trombofilia.

Por tanto, la sangre entra en contacto con el colágeno subendotelial, lo que activa una serie de mecanismos como la formación de pseudópodos de las plaquetas y la adhesión de estas a la pared vascular. Estas plaquetas comienzan a liberar sustancias tales como ADP, serotonina, tromboxano A₂ (TxA₂), etc., que provoca la adhesión de otras plaquetas formando un agregado plaquetario, el cual se retrae y es consolidado a través de los factores de coagulación que producen una red de fibrina.

El colágeno también activa la síntesis de TxA₂ y prostaciclina, los cuales surgen a partir del ácido araquidónico y gracias a la acción de la enzima ciclooxigenasa.

Cabe señalar que no siempre la obstrucción de un vaso implica las mismas consecuencias, ya que influyen muchos factores como son la circulación colateral, la duración de la isquemia, el tamaño y localización del ictus.

Isquemia-reperfusion: en el accidente cerebrovascular, a nivel bioquímico, distinguimos tres fases: una primera fase de isquemia, una segunda fase de oxigenación y, por último, una tercera fase de reparación (Figura 1.4).

- Isquemia, en la que acontecen los siguientes fenómenos:
 - Hipoxia: Cuando tiene lugar un déficit de aporte de oxígeno en algún lugar del cerebro se va a desencadenar una serie de

mecanismos bioquímicos que, cuando persisten, producen un daño cerebral.

- Hipoglucemia, lo que se traduce en una disminución de la energía (disminución de ATP). La glucosa presente va a ser utilizada por la vía anaerobia (glucólisis anaerobia) produciendo acidosis intracelular. Además, como consecuencia de una disminución de la glucosa, hay un déficit de energía en forma de ATP, lo que hace que se desencadenen una serie de mecanismos bioquímicos que intentan contrarrestar la falta de oxígeno, como la liberación de aminoácidos excitadores como PKC, NMDA o glutamato que provocan un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa, enzima fundamental dada su participación en el estrés oxidativo, y la liberación masiva calcio, consecuencia de la alteración de las bombas $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$.
- Alteraciones del flujo sanguíneo cerebral: el cual va a depender del gradiente de presión de la perfusión sanguínea y de la resistencia vascular.

La fase de isquemia da lugar a un proceso de necrosis y apoptosis que desencadena la ruptura de la barrera hematoencefálica y la aparición de un edema o hemorragia.

- Reoxigenación: en esta fase tiene lugar la oxidación y formación de radicales libres de oxígeno (ROS) y radicales libres de nitrógeno (RNS), lo que se traduce en la producción y liberación de citoquinas, peroxidación lipídica, oxidación del ADN y la nitración de proteínas. Todo ello da lugar a una citotoxicidad e inflamación que contribuye a la necrosis y apoptosis, lo que conlleva la ruptura de la barrera hematoencefálica y la aparición de edema y hemorragia antes mencionada.
- Reparación: las especies reactivas de oxígeno son transformadas a factores transcripcionales, lo que se traduce en una proliferación y diferenciación, lo cual contribuye al remodelado y angiogénesis.

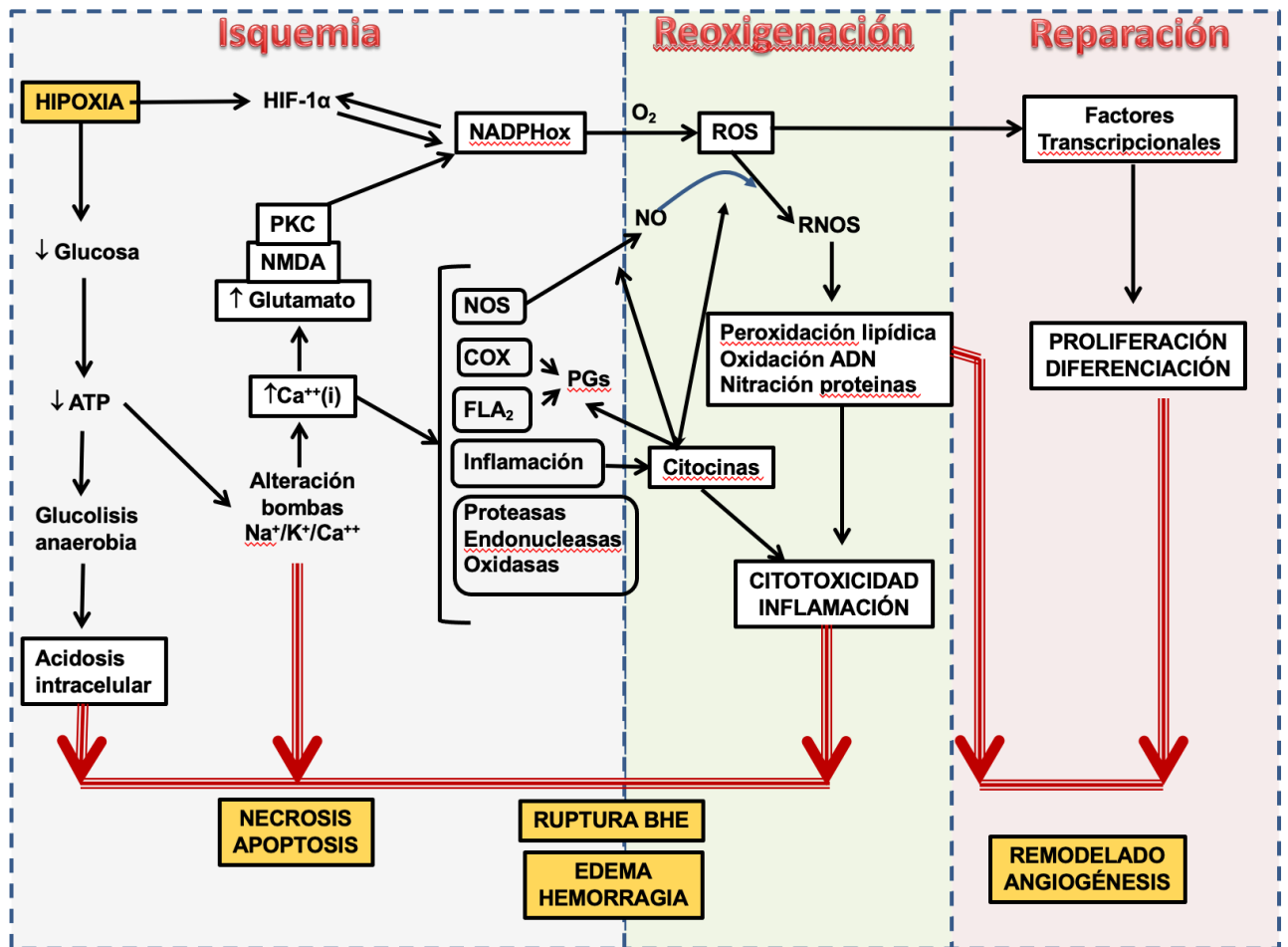


Figura 1.4. Fisiopatología de la isquemia/reoxigenación/reparación (Tesis Doctoral MI Ruiz Moreno)

1.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo celular es considerado uno de los mecanismos que puede aumentar el riesgo cerebrovascular a través de su implicación en la alteración del perfil lipídico o en la hipertensión, entre otros factores.

El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes, lo que hace que haya un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) que van a causar daño al organismo, aunque también estas sustancias pueden estar implicadas en procesos fisiológicos como la señalización celular, procesos inmunológicos o la inducción de la mitogénesis. Es, por tanto, el resultado del ataque de macromoléculas celulares a través de la peroxidación lipídica, la oxidación proteica y la alteración del ADN, lo que lleva a un daño celular tanto de su estructura como de su función (Nasrallah et al., 2020).

El estrés oxidativo tiene lugar tanto en el accidente cerebrovascular de tipo isquémico como en el de tipo hemorrágico. En el caso del accidente cerebrovascular de tipo isquémico, el estrés oxidativo parece jugar un papel importante favoreciendo la muerte de las “células isquémicas” a través de la formación de ROS/RNS a partir de diferentes vías de daño celular como puede ser la inhibición mitocondrial, sobrecarga de calcio o la propia inflamación (Tiwari et al., 2019). Durante la isquemia, las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) generan superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno, que va a servir de fuente de los radicales hidroxilos (OH^-). Estos radicales producen vasodilatación a través de la apertura de los canales de K^+ , alterando la reactividad vascular y la barrera hematoencefálica. Una vez producida la isquemia, se produce una pérdida de energía, lo que conduce a una disfunción mitocondrial y a la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y de oxígeno (ROS). Además, el agotamiento de la energía provoca la salida de glutamato al exterior de la célula, el desequilibrio iónico y la acumulación de iones de calcio intracelulares.

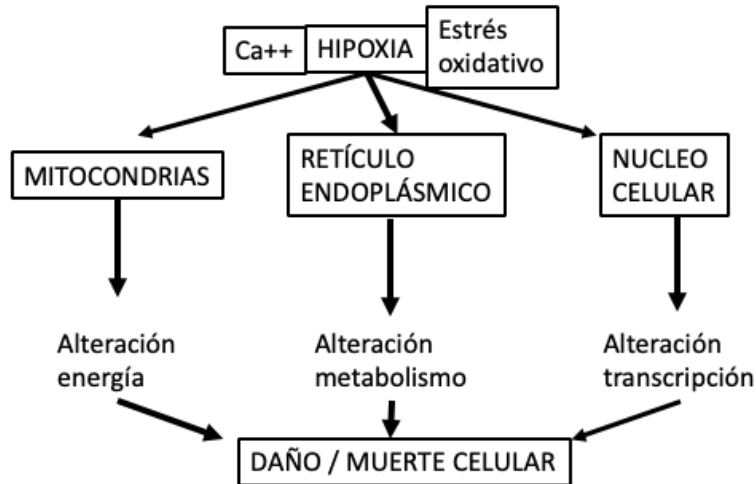


Figura 1.5. Principales vías asociadas a la muerte celular isquémica

Cuando tiene lugar un infarto cerebral de tipo isquémico, si el flujo sanguíneo no se reestablece en un periodo relativamente corto de tiempo, la penumbra isquémica pasa a perder todo el tejido cerebral viable, quedando en el mismo estado que el *core* del infarto. Sin embargo, la perfusión puede hacer que este tejido sea reoxigenado, aunque tiene algunas consecuencias negativas como son la aparición de numerosas reacciones de oxidación que tienen lugar en el citosol y/u otras organelas celulares que van a dar lugar a la aparición de radicales libres.

Cuando la isquemia tiene lugar, se produce un defecto de energía (ATP), ya que los sustratos que la producen no están disponibles (oxígeno y glucosa). Este defecto produce una despolarización de la membrana, debido a la escasa actividad de las bombas de iones dependientes de ATP como la Na^+/K^+ ATPasa. Esto provoca una entrada masiva de iones Ca^{+2} al interior de la célula gracias a los canales de calcio voltaje dependientes y la liberación descontrolada de aminoácidos excitatorios como el glutamato. El exceso de calcio intracelular va a dar lugar a la activación de enzimas calcio dependientes como son las proteasas, lipasas, nucleasas, protein-quinasas y la óxido nítrico sintasa (NOS). Entre estas enzimas, durante la isquemia y parte de la perfusión, la fosfolipasa A_2 (PLA_2) y la ciclooxigenasa, producen radicales libres de oxígeno (ROS), mientras que la óxido nítrico sintasa (NOS) produce óxido nítrico (NO). El óxido nítrico reacciona con el anión

superóxido dando lugar a peroxinitrito (ONOO⁻), el cual puede ser protonado formando ácido peroxinitroso, compuesto muy reactivo que puede ser perjudicial por sí mismo, o bien puede ser transformado a ion hidroxilo y otras especies reactivas de oxígeno. (Cherubini et al., 2005)

El cerebro contiene elevadas concentraciones de lípidos “peroxidables”, como son los ácidos grasos poliinsaturados, que representan una tercera parte de los ácidos grasos del cerebro, especialmente aquellos con doble enlace como son el ácido araquidónico (C20:4 n-6) y el ácido docosahexanoico (C22:6 n-3). La peroxidación lipídica da lugar a la producción de hidroperóxidos conjugados que, a su vez, van a descomponerse en varios aldehídos, como aldehído malónico (MDA, por sus siglas en inglés), 4-hidroxinonenal (HNE, por sus siglas en inglés) o en alcanos como pentano y etano. Tanto el aldehído malónico, el 4-hidroxinonenal y las sustancias reactivas del ácido barbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) han sido considerados marcadores de daño cerebral históricamente. De hecho, Gariballa et al. (2002) demostraron que los niveles de TBARS se encontraban significativamente más elevados en aquellos pacientes que sufrían un accidente cerebrovascular de tipo isquémico en comparación con los que no los sufrían.

1.3. DIETA MEDITERRÁNEA Y SU CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES NATURALES

Son muchos los estudios que han demostrado los beneficios que supone el consumo de una dieta mediterránea. La dieta mediterránea parece tener beneficios en la prevención y manejo de la obesidad, en la diabetes mellitus, especialmente la tipo 2, en la prevención del hígado graso no alcohólico, el síndrome metabólico, así como en la prevención de eventos cardiovasculares, neurovasculares y en la salud reproductiva, tanto del hombre como de la mujer. Estos beneficios parecen ser debidos a sus numerosos componentes con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Gantenbein et al., 2021). La dieta mediterránea es, fundamentalmente, una dieta rica en frutas, verduras, legumbres

y cereales, con un consumo moderado de pescado y productos lácteos y un bajo consumo de carne roja y vino tinto. Si se analiza más profundamente, se puede asumir como una dieta rica en hidratos de carbono, proteínas y fibra, y con bajo contenido en grasas. La principal fuente de grasa en la dieta mediterránea es el aceite de oliva, con un alto contenido en ácidos grasos insaturados (Gantenbein et al., 2021).



Figura 1.6. Beneficios de la dieta mediterránea (Adaptado de Gantenbein et al., 2021)

El aceite de oliva tiene grandes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Estas últimas son debidas a su alto contenido en polifenoles. Los polifenoles con compuestos orgánicos que pueden ser naturales, sintéticos o semisintéticos. La estructura molecular de los polifenoles consiste en, al menos, dos anillos aromáticos con un grupo hidroxilo y un enlace de carbono entre los dos anillos. Se pueden clasificar en:

- Flavonoides: en este grupo se incluyen los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanoles, antocianidinas y las dihidrochalconas.
- No flavonoides: en este grupo estarían incluidos el ácido fenólico, los estilbenos y lignanos.

Las principales fuentes de polifenoles son, además del aceite de oliva, las frutas, verduras, cereales, cacao o café. Su actividad biológica está muy estrechamente relacionada con sus propiedades antioxidantes; los polifenoles tienden a reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS) cuyo desequilibrio es el responsable del estrés oxidativo que tiene lugar durante un evento cardiovascular. Así mismo, los polifenoles también actúan modulando el sistema inmune influyendo en la proliferación y actividad de los leucocitos, estimulando la liberación de citoquinas y otros factores que participan en la defensa inmunológica (Gorzynik-Debicka et al., 2018).

La composición química del aceite de oliva va a variar en función del proceso de extracción que se haya llevado a cabo durante su obtención. Así mismo, este proceso de extracción va a depender de la manera en la que se molturan las aceitunas y de cómo se separa el aceite de oliva de la pulpa de la aceituna bajo presiones elevadas. Además, el aceite de oliva también puede ser sometido a extracción a baja temperatura o ser presurizado después de todo el proceso con agua caliente, lo que va a afectar a su composición final en polifenoles, así como a su color, aroma y contenido en ácidos grasos libres.

En nuestro medio se comercializan diferentes categorías de aceite de oliva (aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva y aceite de orujo de oliva), siendo el tipo de aceituna y su procesado lo que determina la categoría. Desde un punto de vista de calidad, nos centraremos en el consumo de aceite de oliva virgen extra, que es aquel aceite de oliva de categoría superior obtenido directamente de aceitunas y sólo mediante procedimientos “mecánicos”. El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es aquel que contiene el mayor contenido en polifenoles y puede llegar hasta los 500 mg/L (Gorzynik-Debicka et al., 2018).

Los componentes fenólicos, principales antioxidantes junto con los carotenos, están relacionados con las propiedades saludables del AOVE y están asociados, además, con la estabilidad (evitan el enranciamiento) y al sabor característico del propio aceite. El contenido de estos componentes en el AO varía dependiendo de la variedad de la aceituna, el clima, la maduración en la cosecha, el sistema de tratamiento utilizado (solo es aceite de oliva virgen extra el zumo de aceituna obtenido de una primera prensada en frío) y las condiciones de almacenamiento. Las concentraciones de estos compuestos varían entre



los frutos y aceites de las variedades *Arbequina*, *Cornicabra*, *Morisca*, *Picolimón*, *Chorrao de Montefrío*, *Picudo* y *Picual*, así como a tres índices de maduración diferentes (verde, envero y negra). El aceite obtenido al inicio de la campaña, aceituna más verde, contiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Otro aspecto interesante que influye en el contenido final de polifenoles del aceite de oliva es la filtración. El aceite de oliva que no ha sido sometido a un proceso de filtración va a ser aquel que preserve los polifenoles de mayor polaridad, que suelen desaparecer cuando el aceite de oliva es sometido a filtraciones con pequeñas cantidades de agua.

Por todo esto, la cantidad de polifenoles que hay en el aceite de oliva va a variar en función de diferentes factores y puede ir desde los 50 a los 1000 mg/kg. (Figura 1.7.).

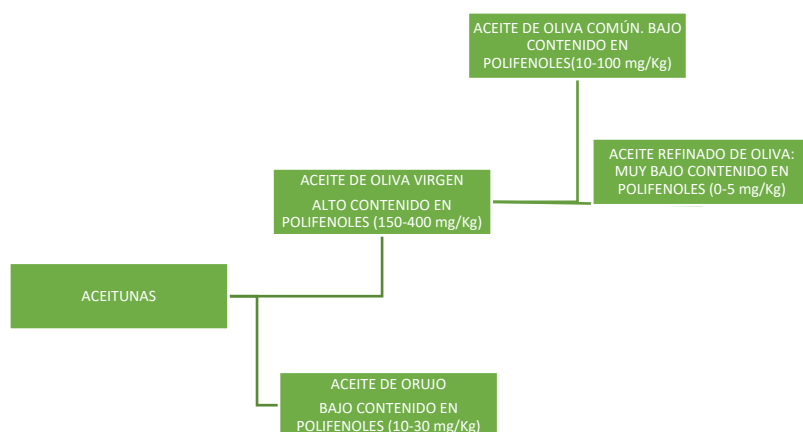


Figura 1.7. La concentración de polifenoles en los diferentes tipos de aceite de oliva en función del proceso de extracción que se haya llevado a cabo (Adaptado de Gorzynik-Debicka et al., 2018).

La composición del aceite de oliva es fundamentalmente a base de triacilgliceroles. Los triacilgliceroles son ésteres de glicerol que contienen diferentes ácidos grasos. El principal triacilglicerol que se encuentra en el aceite de oliva es el ácido oleico monoinsaturado. Además, también está compuesto por ácido palmítico, ácido linoleico, ácido esteárico y palmitoleico. Además de éstos, el aceite de oliva también contiene cantidades de fitosteroles, escualenos, tocoferoles, compuestos fenólicos y derivados del

ácido terpénico. Los compuestos fenólicos pueden aparecer en forma de ácidos fenólicos o alcoholes, oleuropeína y derivados, lignanos y flavonoides.

Los compuestos fenólicos en forma de alcoholes que se encuentran en el aceite de oliva son fundamentalmente glúcidos, como la oleuropeína, alcoholes y fenoles, entre los que se encuentran fundamentalmente el tirosol (3, 4-dihidroxifeniletanol: 3,4-DHPEA) e hidroxitirosol (p-hidroxifeniletanol: p-HPEA), además de flavonoides. Muchos estudios apoyan la idea de que el aceite de oliva virgen extra presenta concentraciones superiores de tres clases de compuestos fenólicos antioxidantes, como son los fenoles simples, secoiridoides y lignanos, y escualenos, en comparación con el aceite de oliva refinado y otros aceites vegetales.

Los compuestos fenólicos se pueden encontrar en todas las partes de la planta del aceite de oliva, pero tanto la naturaleza como la concentración de estos dependen enormemente de la planta que se esté analizando. En la variedad *Olea europea*, la oleuropeína, dimetiloleuropeína, ligustrósido y el oleósido representan los principales compuestos fenólicos.

En cuanto a su biodisponibilidad, el estudio de Vissers et al., en el año 2002, demostró que la absorción del hidroxitirosol y la oleuropeína administrada es de un 55 a un 60% en humanos.

1.3.1. HIDROXITIRO SOL

El hidroxitirosol es uno de los principales polifenoles que pueden encontrarse en la composición del aceite de oliva. Sus propiedades beneficiosas son fundamentalmente debidas a la capacidad que tiene esta molécula de eliminar radicales libres, así como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que hay en el organismo, actuando como antioxidante y disminuyendo el estrés oxidativo. Además, el hidroxitirosol estimula la biosíntesis mitocondrial, lo que parece tener un papel protector frente a la diabetes mellitus tipo 2 (Gorzynik-Debicka et al., 2018) y protege a la mitocondria frente a la reducción de la síntesis de ADN mitocondrial. Se puede encontrar dentro del aceite de

oliva en forma de hidroxitrisol, dentro del complejo oleuropeina o acetato de hidroxitirosol.

El hidroxitirosol parece poseer un amplio abanico de efectos biológicos beneficiosos como son:

- Efecto antiaterogénico y cardioprotector (Karković et al., 2001).
- Efecto antitumoral (Moral & Escrich, 2022).
- Efecto neuroprotector: parece ser debido a las alteraciones bioquímicas que tienen lugar durante el proceso de hipoxia-reoxigenación. El acúmulo de hidroxitirosol y sulfato de hidroxitirosol en el cerebro parecer mediar en su actividad neuroprotectora reduciendo el estrés oxidativo a nivel neuronal (Cabrerizo et al., 2013).
- Efectos protectores frente a la diabetes, la regulación lipídica y la obesidad (Binou et al., 2023).
- Efectos antibacterianos y antivirales (Bertelli et al., 2019).
- Otros efectos como protector ante enfermedades inflamatorias (Pojero et al., 2022).

Aunque ha sido ampliamente estudiado, el mecanismo exacto por el cual lleva a cabo la mayor parte de estas acciones no está del todo claro. En un principio, todas estas actividades biológicas que posee el hidroxitirosol estaban asociadas con su gran acción antioxidante; el hidroxitirosol actúa como “scavenger” de los radicales libres y como quelante de metales. La gran actividad antioxidante que posee el hidroxitirosol se atribuye a la presencia de o-dihidroxifenil, que parece actuar destruyendo la cadena donando un átomo de hidrógeno a radicales peróxido (ROO*). En este sentido, este radical ROO* es sustituido por el radical de la molécula de hidroxitirosol, que no presenta reactividad.

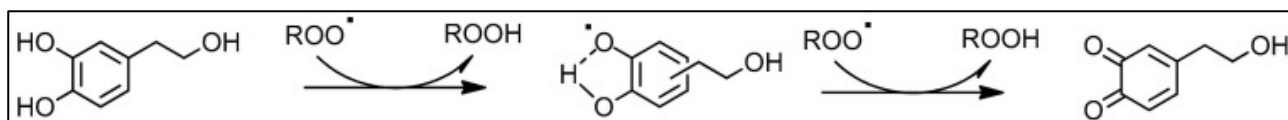


Figura 1.8. Mecanismo de "scavenger" del hidroxitirosol a los radicales libres. (Karković et al., 2001)

Además de este mecanismo antioxidante, el hidroxitirosol parece conferir una protección antioxidante adicional incrementando el sistema inmune endógeno en contra del estrés oxidativo, activando diferentes vías de señalización intracelular. Por otro lado, el hidroxitirosol parece interactuar con los microRNAs, lo que estará involucrado en sus diferentes actividades biológicas; el hidroxitirosol modula la expresión de diferentes microRNAs. Además, posee una gran actividad antiinflamatoria atenuando la actividad de agentes proinflamatorios como la óxido nítrico sintasa inducible, la ciclooxigenasa-2 (COX-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la expresión de la interleuquina 1 β .

La biodisponibilidad y excreción del hidroxitirosol fue propuesta por primera vez por Visioli et al. (2011). La baja biodisponibilidad que presenta la molécula junto con la poca o ninguna concentración de hidroxitirosol circulante es debida al metabolismo de fase I y fase II que tienen lugar en el intestino e hígado.

La molécula de hidroxitirosol tiene carácter polar, por lo que no es soluble en un medio lipídico, lo que le impide atravesar la bicapa a nivel intestinal. Es por ello por lo que se han aunado esfuerzos para conseguir el hidroxitirosol en una forma farmacológica lo más lipofílica posible.

El hidroxitirosol es normalmente absorbido a nivel intestinal a través de un mecanismo de difusión pasiva bidireccional con una eficiencia que oscila entre un 75 y un 100% (Nicou et al., 2022). El proceso de absorción dependerá de la manera que está administrado el hidroxitirosol.

El hidroxitirosol y sus metabolitos presenta una buena distribución en diferentes tejidos como el muscular, testicular, hepático y cerebral y se acumulan en riñón e hígado. Dado que el hidroxitirosol puede ser encontrado en el tejido cerebral (debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica) y su posible interacción con

sustancias dopaminérgicas, el hidroxitirosol es considerado un protector dopaminérgico neuronal.

En cuanto a su metabolismo, el primer paso tiene lugar en el interior de los eritrocitos. Las enzimas que participan en este primer paso se encuentran fundamentalmente en la pared intestinal y son la aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, ambas encontradas en el citosol celular. El hidroxitirosol se encuentra también de manera natural en el cerebro como un producto resultante del metabolismo de la dopamina y la tirosina. La desaminación de la dopamina mediada por la monoaminoxidasa (MAO) forma 3, 4- dihidroxifenilacetaldehído, un producto de degradación, tóxico e inestable que es oxidado rápidamente, a través de la enzima aldehído deshidrogenasa, al ácido 3, 4-dihidroxifenilacético.

En cuanto al segundo paso del metabolismo, las enzimas que participan son la sulfotransferasa, la uridín-5-difosfoglucuroniltransferasa y la orto-catecol-metiltransferasa. Todas ellas van a dar lugar a la mayor parte de los metabolitos detectables en muestras biológicas. Estos metabolitos son fundamentalmente el ácido homovanílico y el alcohol homovanil. Parece ser que, bajo condiciones alcalinas, el hidroxitirosol puede comportarse como sustrato de la enzima aciltransferasa, la cual cataliza la transferencia del grupo acetilo desde el acetil- CoA a hidroxitirosol formando el metabolito de acetato de hidroxitirosol. Este metabolito puede ser transformado a su forma sulfatada a través de una enzima sulfotransferasa (Karković et al., 2001). El metabolito N-acetil-5-S-cisteinil hidroxitirosol se forma a partir de la oxidación de hidroxitirosol a hidroxitirosol quinona. A continuación, tiene lugar una reacción con glutatión, produciendo el conjugado, el cual es transformado al metabolito final a través de las enzimas gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) y N-acetil-transferasa.

El sulfato de hidroxitirosol junto con el sulfato de 1-acetato-4-orto-sulfato de hidroxitirosol son los principales metabolitos detectados en el plasma humano después del consumo de hidroxitirosol o sus derivados en la dosis habitual asociada a la dieta (Galmés et al., 2021).

La excreción tiene lugar fundamentalmente a nivel renal y suele tener una duración de aproximadamente seis horas en humanos (Galmés et al., 2021). El hidroxitirosol se acumula en el riñón hasta su eliminación, lo que le permite ejercer un

efecto nefroprotector debido a sus propiedades antioxidantes. A nivel biliar, los metabolitos del hidroxitirosol son redirigidos desde el hígado de vuelta al duodeno, donde son desconjugados y reabsorbidos. Esta reabsorción a nivel enterohepático va a prolongar la presencia de hidroxitirosol y sus metabolitos en el organismo.

1.3.2. TIROSOL

El tirosol parece ser un potente antioxidante, pero no tanto por su actividad como por su capacidad de acúmulo intracelular. Es una molécula muy estable capaz de mantener su actividad biológica bajo condiciones extremas. En cuanto sus propiedades, el tirosol parece tener efectos beneficiosos sobre la hipertensión, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina por su efecto hipoglucemiante y obesidad a través de la regulación lipídica. Reduce la oxidación del colesterol HDL y mantiene sus propiedades fisicoquímicas, lo que mejora su funcionalidad, sobre todo la capacidad de promover el flujo de colesterol (Martins et al., 2022). Su actividad antiaterogénica parece ser debida a la inhibición de la síntesis de leucotrieno B₄, lo cual afecta a la función endotelial. En el caso del accidente cerebral, en el proceso de isquemia-reperfusión, el tirosol reduce la viscosidad sanguínea y la intensidad del estrés oxidativo en el tejido cerebral. Además, el tirosol (como el hidroxitirosol) posee actividad antibacteriana, especialmente frente a bacterias causantes de infecciones respiratorias e intestinales. Esta propiedad antibacteriana puede ser debida a la capacidad que tiene el tirosol de unirse e inhibir a ATP sintasa bacteriana. También parece tener actividad frente a la leishmania y al parásito de la malaria (Martins et al., 2022).

El tirosol también previene la osteopenia estimulando la formación ósea y tiene actividad antígeno tóxica, lo que puede prevenir la apoptosis en los queratinocitos.

El tirosol es un compuesto ampliamente distribuido por todo el organismo con una biodisponibilidad baja si se compara con sus metabolitos. Es rápidamente absorbido y eliminado a través del riñón ocho horas después de la administración oral. Los secoiridoides que contienen tirosol están sujetos a una hidrólisis tiempo dependiente en el estómago, debido a su pH ácido (Galmés et al., 2022).

En cuanto a su metabolismo, el tirosol endógeno se forma a partir de un mecanismo de oxidación de la tiramina, un compuesto monoaminado derivado de la descarboxilación del aminoácido tirosina a través de la tirosina descarboxilasa. La tiramina es desaminada a través de la monoaminoxidasa (MAO) dando lugar a un producto intermedio que es el 4-hidroxifenilacetaldehído, el cual puede ser oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa formando ácido 4-hidroxifenilacético o reducido por la enzima aldehído reductasa generando tirosol y éste puede reconvertirse a 4-hidroxifenilacetaldehído a través de la enzima aldehído deshidrogenasa.

A pesar de la baja concentración del tirosol y sus precursores en el aceite de oliva virgen comparada con la del hidroxitirosol, se ha demostrado que el tirosol es metabolizado a hidroxitirosol en los microsomas hepáticos por la acción de CYP2A6 y CYP2D6 (Galmés et al., 2022), por lo que el tirosol puede ser considerado un precursor del hidroxitirosol.

1.3.3. OLEUROPEÍNA

La oleuropeína forma parte del grupo de derivados de la cumarina. Se trata de un glucósido secoiridoide esterificado con un alcohol fenilpropanoide. Químicamente la oleuropeína consiste en la combinación de un éster del ácido elenólico y 3,4-dihidroxifeniletanol. La molécula de la oleuropeína se basa en tres subunidades estructurales: un polifenol, llamado 4-(2-hidroxietil)-benzeno-1,2-diol, que también es conocido con el nombre de hidroxitirosol y es su principal producto de degradación, un secoiridoide que recibe el nombre de ácido elenólico y un azúcar. Su estructura fue descrita entre los años 1958 y 1965 por Panizzi et al, pero fue unos años más tarde cuando se incluyó en el grupo de los secoiridoides, ya que esta clase de monoterpenoide no se constituyó hasta entonces (Figura 1.9.).

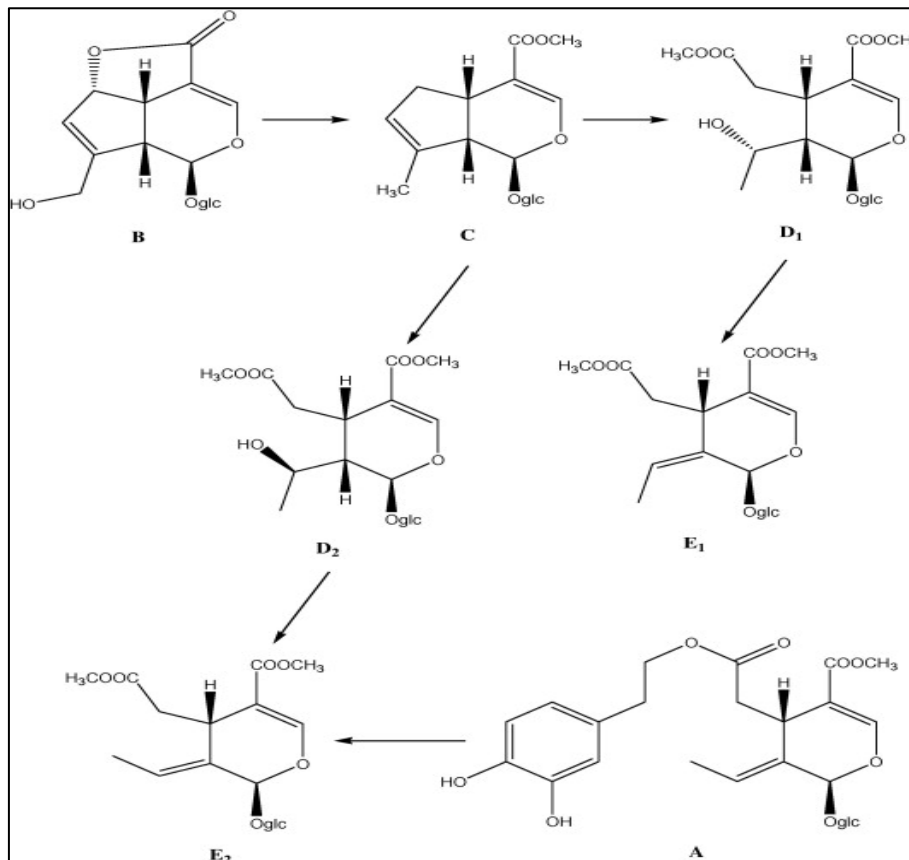


Figura 1.9. Configuración de la oleuropeína A. (Imagen obtenida de Omar et al., 2010)

La oleuropeína posee acciones beneficiosas para la salud humana como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiaterogénicas, antitumorales, antibacterianas y antifúngicas, además de inhibir la agregación plaquetaria. La oleuropeína es capaz de inhibir la oxidación macrofágica. Es el principal glucósido y compuesto bioactivo presente en el olivo (*Olea europea*) y es el responsable del sabor amargo de las aceitunas inmaduras y no procesadas (Omar et al., 2010).

Se trata del principal compuesto fenólico que se encuentra presente en las hojas del olivo (Nasrallah et al., 2020) y puede alcanzar concentraciones superiores a 140 mg/g de materia seca (Omar et al., 2010) en aceitunas jóvenes. Durante la maduración de la fruta, en este caso de la aceituna, o durante el procesamiento de ésta, una serie de reacciones químicas y enzimáticas tienen lugar, lo que se traduce en una reducción de la concentración de oleuropeína y un aumento de la concentración de hidroxitirosol, que es su principal producto de degradación.

Durante el desarrollo de la aceituna se pueden distinguir tres fases:

1. Fase de crecimiento, donde tiene lugar la acumulación de oleuropeína.
2. Fase de maduración verde, donde se produce un descenso de los niveles de clorofila y de oleuropeína.
3. Fase de maduración negra, caracterizada por la aparición de antocianinas y durante la cual los niveles de oleuropeína continúan descendiendo.

Por lo tanto, los niveles de oleuropeína alcanzan su máximo en los primeros estadios de la maduración de la aceituna.

Los estudios publicados por Tan et al. y Boccio et al. en el año 2003 demostraron que la oleuropeína es rápidamente absorbida cuando se administra vía oral y que alcanza su máxima concentración en el plasma dos horas después de haber sido administrada. Su principal metabolito es el hidroxitirosol.

De acuerdo con el estudio publicado por Nasrallah et al. (2020), la oleuropeína es reconocida como una de las moléculas bioactivas con varias propiedades, incluyendo la de antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica. Se ha demostrado que este compuesto puede reducir el daño miocárdico después de un infarto agudo de miocardio gracias a su actividad antioxidante, ya que es capaz de reducir los niveles circulantes de las especies reactivas de oxígeno, su actividad antiapoptótica y antiinflamatoria.

Otros estudios señalan a la oleuropeína como un compuesto capaz de proteger también la función intestinal y cerebral de la insuficiencia renal gracias a su capacidad de reducir la apoptosis celular. La neuroprotección de la oleuropeína estaría relacionada con su capacidad de reducir los niveles de caspasa-3 (Nasrallah et al., 2020).

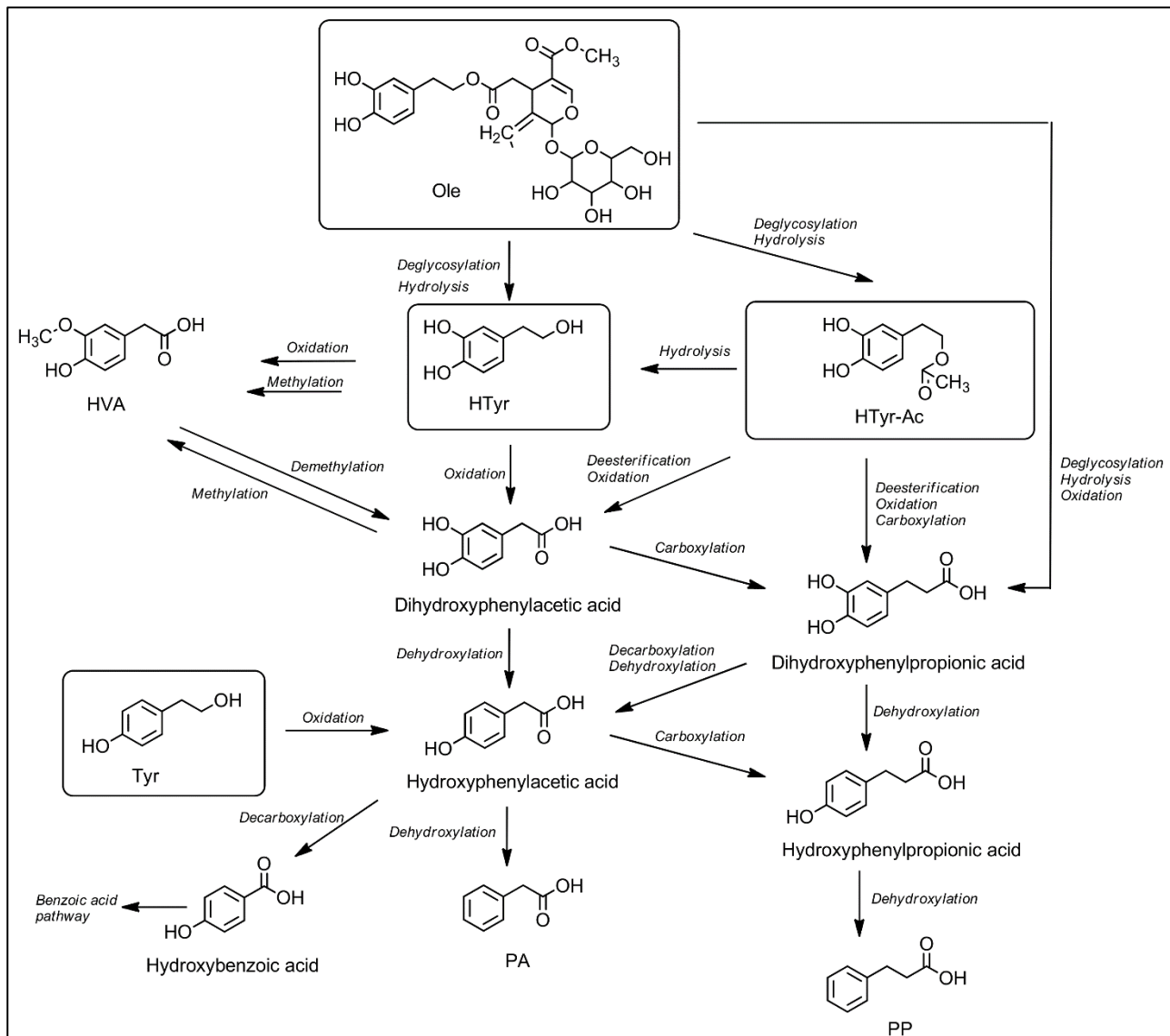


Figura 1.10. Metabolismo del hidroxitirosol (HTyr), tirosol (Tyr), acetato de hidroxitirosol (HTyr-Ac) y oleuropeína. Extraída de Karkovic A., et al. (2001)

1.3.4. OLEOCANTAL

Un compuesto fenólico presentes en el aceite de olive virgen es el (-)-descarboximetil ligustrósido aglicona, también denominado oleocantal. Se han demostrado las siguientes actividades biológicas para este compuesto: (a) efecto antiinflamatorio, debido a una inhibición de la ciclooxigenasa tipo 1 y 2 (García et al., 2016), a una inhibición de la expresión y liberación de TNF α e interleucinas 1 β y 6 (Iacono et al., 2010) y un freno en la producción de óxido nítrico en macrófagos

inducidos (Iacono et al., 2010); (b) efecto antiproliferativo en células cancerosas de mama, próstata y colon (Khanal et al., 2011; Li et al., 2009); (c) facilitación de la degradación y eliminación del β -amiloide en tejido cerebral (Scotece et al., 2012). En el aceite de oliva virgen, el contenido total de compuesto fenólicos oscila entre 100-350 mg/kg, dependiendo de la variedad de la aceituna de origen, cuantificándose la cantidad de oleocantal en un 10% del total de fenoles, es decir, 10-35 mg/kg de aceite (Bianchi et al., 1994).

3,4-DIHIIDROXIFENILGLICOL

Por último, 3,4-dihidroxifenilglicol (DPHG) es un compuesto fenólico simple, relacionado químicamente con el hidroxitirosol, que está presente en el alperujo derivado de las aceitunas (Rodríguez et al., 2007, 2009). Se encuentra también en el aceite de oliva virgen, si bien con una concentración aproximada de 3-4.5 mg/kg, es decir, en proporción 1/10 respecto al hidroxitirosol (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2011). Este compuesto ha demostrado un claro efecto antioxidante in vitro, incluso mayor que el de hidroxitirosol (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012). Asimismo, se ha demostrado un efecto antioxidante ex vivo en ratas deficientes de vitamina E (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012).

HIPÓTESIS

Una visión global de los conocimientos sobre dieta mediterránea y salud arroja una serie de enunciados perfectamente demostrados en multitud de estudios científicos y que podríamos resumirlos en los siguientes, siguiendo un orden bioquímico-funcional:

- ⇒ La adherencia a la dieta mediterránea se relaciona con una menor incidencia de diversas enfermedades: enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2, algunos tipos de enfermedad cancerosa, enfermedades neurodegenerativas, etc.
- ⇒ El uso de aceite de oliva virgen extra, como principal fuente de grasas en la dieta mediterránea, se relaciona con la mayor parte de las propiedades globales de la dieta mediterránea, aunque no en su totalidad, pero se le adjudica un peso específico muy elevado en sus beneficios.
- ⇒ Los compuestos químicos que componen el aceite de oliva virgen extra podrían ser responsables de los efectos de la administración de dicho aceite, si bien son los denominados compuestos menores, entre ellos los polifenoles, los que han demostrado un papel fundamental para explicar los efectos beneficiosos del aceite de oliva virgen extra.
- ⇒ Hidroxitirosol es el polifenol más abundante de los que forman parte de la composición del aceite de oliva virgen extra, de ahí que la mayor parte de los estudios se realizan con dicho compuesto. Los resultados obtenidos en trabajos científicos con este compuesto simulan los del aceite de oliva virgen extra, de ahí que se responsabilice en gran medida a hidroxitirosol de estos efectos.
- ⇒ Uno de los principales efectos demostrados para hidroxitirosol es la neuroprotección ante una agresión isquémica. En este terreno, un dato a tener en cuenta es que hidroxitirosol, administrado en dosis similares a las encontradas en el aceite de oliva virgen extra, no es capaz de explicar completamente el efecto neuroprotector del aceite.



⇒ Algunos estudios apuntan a la hipótesis de una posible sinergia entre el resto de los polifenoles presentes en el aceite de oliva virgen extra, como son el tirosol, oleocantal o el 3,4-dihidroxi-fenilglicol, con el hidroxitirosol.

Habida cuenta de la importancia de estos compuestos, utilizados como moléculas farmacológicas o como potenciales “suplementadoras” del ya de por sí beneficioso aceite de oliva virgen extra, nos pareció interesante analizar una posible sinergia en el efecto neuroprotector del hidroxitirosol con otros polifenoles. Así como, investigar el posible efecto beneficioso neuroprotector en situaciones en las que factores de riesgo conocidos, como es el caso de la diabetes mellitus, inciden en la génesis y evolución de las lesiones cerebrales producidas por eventos isquémicos.

2.OBJETIVOS



Teniendo en cuenta la hipótesis de trabajo planteada, nos planteamos el presente desarrollo experimental con los siguientes objetivos:

- Objetivo principal:
 - Evaluar el posible efecto sinérgico de algunos de los polifenoles presentes en el aceite de oliva virgen extra sobre la actividad neuroprotectora de hidroxitirosol.

- Objetivos secundarios:
 - Valorar la influencia que tirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol y oleocantal pudieran ejercer en el efecto neuroprotector de hidroxitirosol, en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación cerebral *in vitro*.
 - Valorar el efecto neuroprotector de la administración oral de 3,4-dihidroxifenilglicol y su posible sinergia con la administración de hidroxitirosol en un modelo experimental de diabetes mellitus.
 - Evaluar la participación del estrés oxidativo y nitrosativo en el efecto neuroprotector de estos compuestos polifenólicos.



3.MATERIAL Y MÉTODOS



4.1. MATERIAL

Se emplearon kits colorimétricos para la medición de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) y kits de enzimoimmunoensayo para la medición de la enzima 3-nitrotirosina, ambos proporcionados por Cell Biolabs Inc. (Bionova Científica S.L., Madrid, España). Para medir la enzima lactato deshidrogenasa se empleó un kit colorimétrico proporcionado por Roche Applied Science (Barcelona, España). Para la medición del tirosol y oleocantal se emplearon reactivos procedentes de Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO, Estados Unidos).

El kit de la capacidad antioxidante total fue suministrado por Cell Biolabs, Inc. (Arjons Drive, San Diego, CA, EE. UU.). Los kits de glutatión, actividad glutatión peroxidasa, 8-hidroxi 2 desoxiguanosina, se obtuvieron de Abcam plc (Cambridge, CB2 0AX, Reino Unido). Todos los demás reactivos fueron suministrados por Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO, EE. UU.).

El hidroxitirosol fue aislado a partir de un tratamiento hidrotermal que se aplicó a la fase líquida obtenida del alperujo a una temperatura de 160°C durante 60 minutos. El líquido fue extraído a través de cromatografía en dos fases. El rendimiento final alcanzó una pureza de 99.6%, referida a materia seca, usando el proceso descrito por Fernandez-Bolaños et al. (2002). Los fenoles fueron cuantificados usando un sistema de cromatografía líquida (Hewlett-Packard 1100) con un detector de luz ultravioleta-visible. Se empleó una columna analítica en la cromatografía: Mar Mediterráneo C18 (250 x 4.6 mm i.d. tamaño de partícula; 5 μ m) (Teknokroma, Barcelona, España). Esta columna fue usada a temperatura ambiente. El sistema cromatográfico fue equipado con válvulas de inyección Rheodyne (20 μ m de diámetro). La fase móvil consistía en ácido tricloroacético al 0.01% en agua y acetonitrilo, con el siguiente gradiente durante un tiempo de retención de la muestra de 55 minutos: 95% al comienzo, 75% a los 30 minutos, 50% a los 45 minutos, 0% a los 47 minutos, 75% a los 50 minutos y 95% a los 52 minutos. La cuantificación se llevó a cabo a una longitud de onda de 280 nm, utilizando de referencia las calibraciones realizadas utilizando materiales de referencia externos.

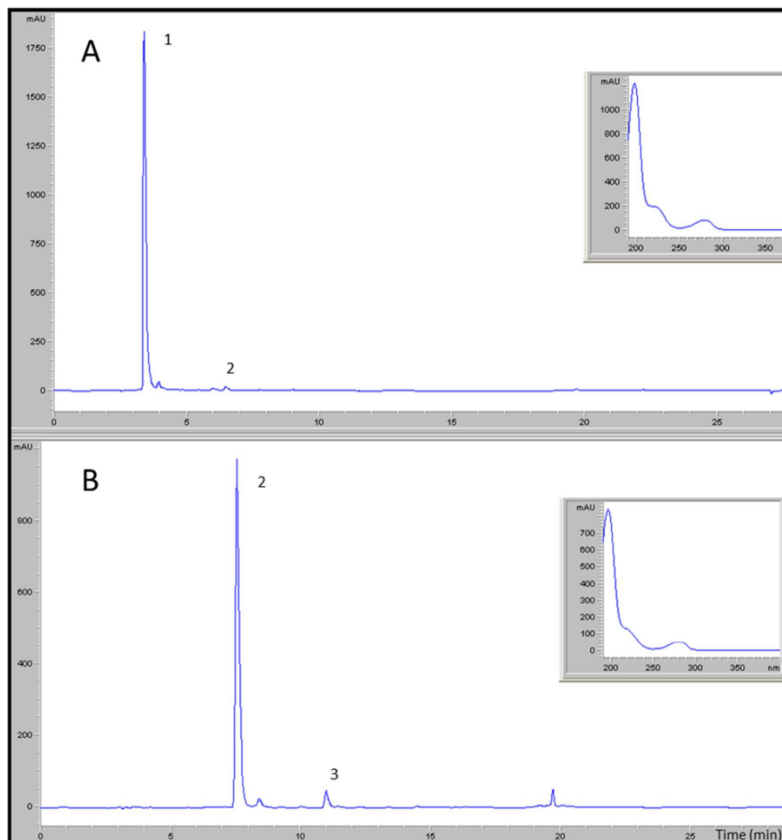


Figura 3.1. Cromatogramas a una longitud de onda de 280 nm del 3,4-dihidroxifenilglicol purificado (A) y del hidroxitirosol purificado (B) obtenidos del HPLC-DAD y su espectro de absorción UV-Vis. Los principales componentes detectados fueron (1) 3,4-dihidroxifenilglicol, (2) hidroxitirosol al 99.6% y (3) tirosol.

El 3,4-dihidroxifenilglicol fue obtenido del aceite de oliva como producto del sistema de extracción a dos fases. El método para la purificación del dihidroxifenilglicol fue descrito y patentado por Fernández-Bolaños et al. (2010) (WO2010070168A1). Este método está basado en un sistema de cromatografía física que permite la extracción de compuestos naturales prescindiendo de solventes orgánicos o reacciones químicas o enzimáticas, lo que permite obtener una pureza superior al 95% relativa a la materia seca.

La materia prima utilizada para la extracción de los fenoles más apolares fueron tanto los subproductos y productos intermedios en almazaras (alperujo de almazara y aceite de oliva lampante), la extracción se basó en: extracción con novedosos disolventes eutécticos naturales (García y col., 2015) en combinación con un rango de temperatura (50-150 °C). Se cuantificaron los derivados dialdehídicos de la aglicona de la oleuropeina

decarboximetilada (HT-EDA o Oleacein) y del ligustrósido (Ty-EDA o Oleocantal). Este último se utilizó para los estudios “in vitro”.

3.2. TIPO DE ESTUDIO

Se realizaron dos tipos de experimentos:

- Experimentos *in vitro*, en los que los compuestos de estudio se incubaron con cortes cerebrales de rata.
- Experimentos *ex vivo*, en los que los compuestos estudiados se administraron por vía oral a animales sometidos a un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1.

3.3. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas macho de dos meses de edad, de la cepa Wistar, con un peso comprendido entre 250-350g que permanecieron bajo condiciones estándar de laboratorio, con un ciclo alternante de luz/oscuridad de 12 h, temperatura ambiente de 22°C y con libre acceso a comida y agua.

Los animales fueron estabulados de acuerdo con la actual normativa española de uso, manejo y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (EDL2013/80847, BOE-A-2013-6271). Se siguieron las recomendaciones publicadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Publicación NIH N° 86-23, revisada en 1985). El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Málaga para el uso de animales (Ref. CEUMA31-2018-A) y la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía (Ref. 9/07/2019/124) (se pueden consultar en anexo III).

3.4. TEJIDO DE ESTUDIO Y PROCEDIMIENTO

En el estudio “*in vitro*”, el órgano objeto de estudio fue el cerebro. Una vez sacrificado los animales mediante decapitación con guillotina, habiendo sido previamente anestesiados con pentobarbital sódico, se procedió a la disección de la piel y el tejido muscular de la región occipital para facilitar el decalotaje. Se realizaron dos osteotomías longitudinales sobre los huesos temporales hasta el frontal, levantándose con cuidado la escama resultante. De esta forma el cerebro queda libre de la calota.

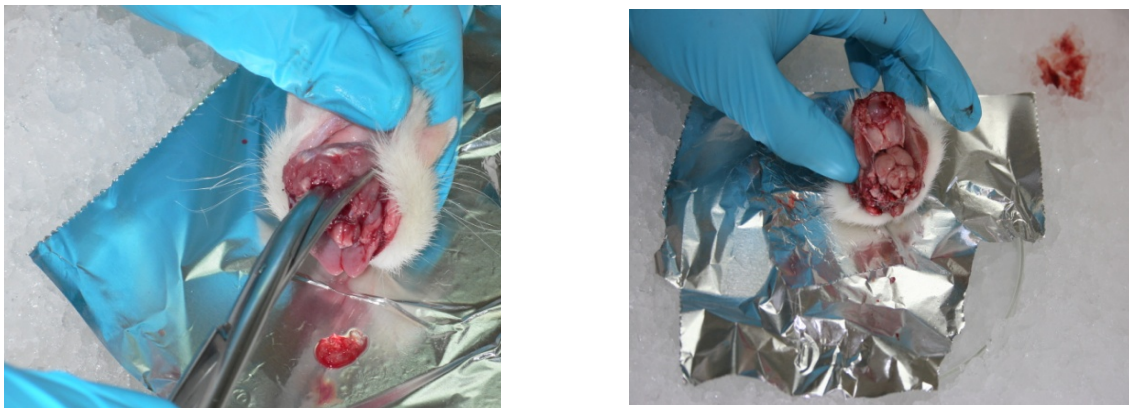


Figura 3.3. Imágenes del proceso de extracción del cerebro

MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN:

Este modelo experimental trata de reproducir, en condiciones *in vitro*, las distintas situaciones que suceden durante la isquemia-reperfusión en el proceso de ictus isquémico.

El tejido cerebral (a excepción del cerebelo y tronco del encéfalo) fue diseccionado transversalmente en cortes de 1mm aproximadamente con un vibratomo (Campden Instruments, San Francisco, California, Estados Unidos).

- Período A: Los cortes fueron sumergidos en un tampón cuya composición en mmol/L fue la siguiente: 100 NaCl, 0.05 KCl, 24 NaHCO₃, 0.55 KH₂PO₄, 0.005 CaCl₂, 2 MgSO₄, 9.8 glucosa y un pH de 7.4, con perfusión continua de una

mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ (Alphagaz MIX. Air Liquide. España). Este periodo tiene una duración de 30 minutos.

- Periodo B: Transcurridos estos 30 minutos, los cortes cerebrales se sumergieron en otro tampón cuya composición en mmol/L era igual que la utilizada en el paso anterior con la excepción de que no llevaba glucosa y se le había añadido 3 mmol/L de CaCl₂ y 0.001 mmol/L de MgSO₄. En este paso, el tampón contaba con una perfusión continua de una mezcla de 95% de N₂ y 5% de CO₂ (Alphagaz N₂. Air Liquide. España), lo que simulaba las condiciones de hipoxia. Este periodo cuenta con una duración de 20 minutos.
- Periodo C: A continuación, los cortes cerebrales fueron sumergidos en un tampón con glucosa y perfundidos con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ durante 120 minutos. Este paso corresponde a la reoxigenación.

El tampón empleado en cada una de las etapas es sometido, previamente a su uso, a una oxigenación o nitrogenación (según proceda) continua durante 45 minutos.

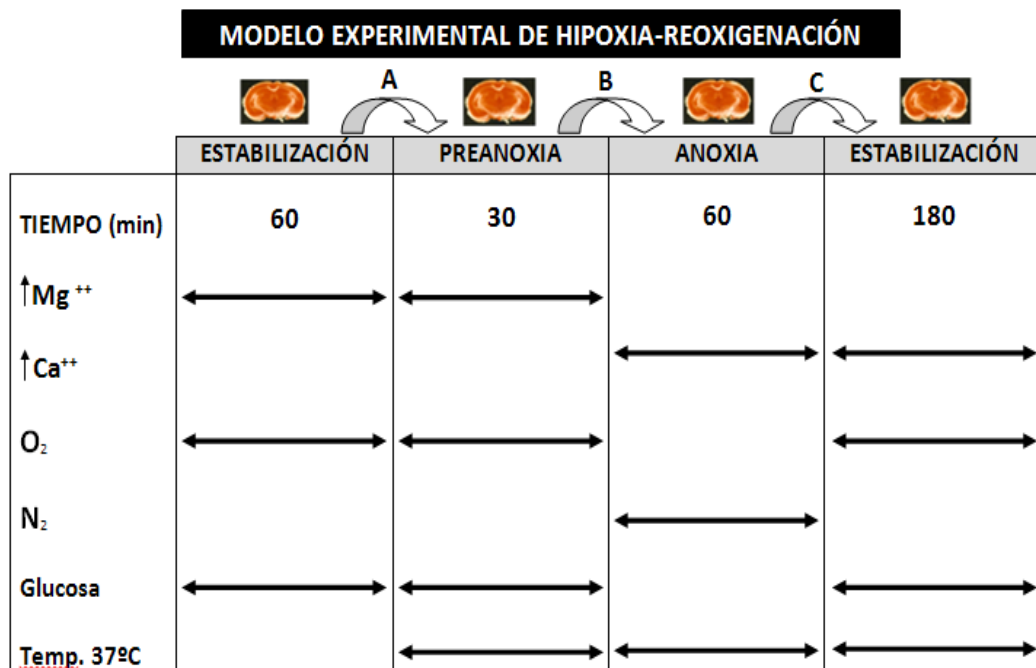


Figura 3.4. Esquema del modelo experimental de hipoxia-reoxigenación.

Las muestras cerebrales fueron analizadas antes del periodo de hipoxia (periodo B), tras 20 minutos de incubación en condiciones de hipoxia y tras 120 minutos de reoxigenación (periodo C). Posteriormente, estas muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a una temperatura de -80°C. Todas las variables analíticas fueron determinadas antes de los 7 días desde que las muestras fueron almacenadas.

INCUBACIÓN DE LOS POLIFENOLES

Cuatro de los principales polifenoles que componen el aceite de oliva virgen extra (AOVE) fueron utilizados: el hidroxitirosol, el tirosol, el 3,4-dihidroxifenilglicol y el oleocantal. El hidroxitirosol es considerado el componente principal del AOVE, mientras que el tirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol y oleocantal fueron evaluados como posibles modificadores de los efectos del hidroxitirosol.

Todos los compuestos fueron añadidos al comienzo del estudio (Periodo A) y se mantuvieron hasta que concluyó el período de reoxigenación (Periodo C). Las concentraciones de cada compuesto se eligieron de acuerdo con los rangos de concentración que hay descritos para el AOVE con bajo, medio y elevado contenido en polifenoles, así como teniendo en cuenta los efectos demostrados en algunos experimentos *in vitro* en cerebro de rata. En la tabla 4.2 se muestran los rangos de concentración de cada compuesto de acuerdo con la literatura consultada y las concentraciones exactas que fueron empleadas en el estudio (ver tabla 4.2 en apartado resultados).

MODELO EXPERIMENTAL EX VIVO DE DIABETES

La diabetes experimental fue inducida con estreptozocina (50 mg/kg vía intraperitoneal). La glucemia en ayunas fue medida utilizando un glucómetro FreeStyle (Laboratorios Abbot S.A., Madrid, España) utilizando sangre procedente de la vena safena. Se consideró que un animal padecía diabetes cuando su glucemia en ayunas era

superior a 200 mg/dL durante dos días consecutivos. Las ratas pertenecientes al grupo control sin diabetes inducida (grupo 1) recibieron una única inyección intravenosa con solución salina isotónica.

Durante el período de tratamiento, los animales con diabetes inducida fueron tratados con un análogo soluble de insulina basal de acción prolongada (Levemir®, Novo Nordisk España, Madrid, España) a una dosis de 4 UI/día por vía subcutánea, con el objeto de reducir la mortalidad debido a la hiperglucemia. Los animales del grupo control recibieron el mismo volumen de solución salina isotónica también por vía subcutánea.

Al final del segundo mes, los animales de todos los grupos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg vía intraperitoneal). Posteriormente, previa exanguinación, se aplicó procedimiento de punto final mediante guillotina. Tanto el cerebro como ambos globos oculares fueron extraídos. A partir de la sangre extraída, se obtuvieron muestras de suero para la posterior cuantificación de distintos parámetros analíticos y biomarcadores que serán descritos en el apartado de técnicas analíticas.

GRUPOS EXPERIMENTALES DE ANIMALES DIABÉTICOS

Los animales empleados para esta parte de estudio fueron distribuidos en siete grupos, con un total de diez ratas por grupo:

- Grupo 1: Ratas normoglucémicas.
- Grupo 2: Ratas diabéticas sin tratamiento, a excepción de la insulina.
- Grupo 3: Ratas diabéticas tratadas con hidroxitirosol (5 mg/kg/día vía oral)
- Grupo 4: Ratas diabéticas tratadas con 3,4-dihidroxifenilglicol (0.5 mg/kg/día vía oral).
- Grupo 5: Ratas diabéticas tratadas con 3,4-dihidroxifenilglicol (1 mg/kg/día vía oral).
- Grupo 6: Ratas diabéticas tratadas con hidroxitirosol más 3,4-dihidroxifenilglicol

(0.5 mg/kg/día vía oral).

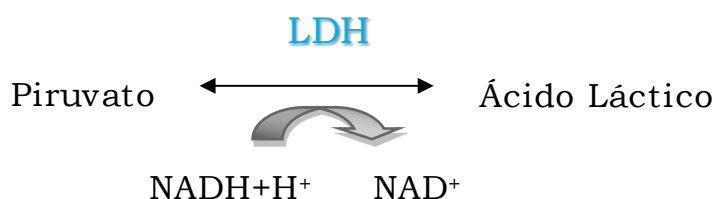
- Grupo 7: Ratas diabéticas tratadas con hidroxitirosol más 3,4-dihidroxifenilglicol (1 mg/kg/día vía oral).

Todas las dosis de los compuestos fenólicos fueron seleccionadas de acuerdo con las concentraciones descritas para el aceite de oliva virgen extra (Pedan et al., 2019). La proporción de 1/10 a 1/5 (3,4-dihidroxifenilglicol/hidroxitirosol) fue modificada en función del tipo de aceite de oliva virgen extra empleado y de los efectos descritos en algunos experimentos en ratas diabéticas y sanas (Reyes et al., 2017; Hernáez et al., 2021). El hidroxitirosol y el 3,4-dihidroxifenilglicol fueron administrados a través del agua de bebida, una vez al día durante siete días antes de que la diabetes fuese inducida y se continuó de manera diaria hasta la finalización del estudio (duración: 2 meses).

3.5. VARIABLES ANALÍTICAS

1. Lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato a lactato mediante el coenzima NADH y se utiliza como medida indirecta de muerte celular.



La actividad lactato deshidrogenasa (LDH) fue determinada en el tampón de incubación como una medida indirecta de muerte celular. La actividad enzimática se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En una microplaca con 96 pocillos se incubaron 100 μL de muestra con 100 μL del reactivo, el cual contiene cloruro de yodotetrazolio y lactato sódico. El blanco utilizado fue la mezcla del tampón sin muestra con el reactivo. La placa se incubó durante 30 minutos y, posteriormente, se añadieron 50 μL de la solución de parada. Se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 490 y 600 nm. Al valor

obtenido a la longitud de onda de 600 nm se le restó el obtenido a la longitud de onda de 490 nm y, a continuación, se restó el valor de la absorbancia obtenido para el blanco a todos los valores obtenidos.

2. Peroxidación lipídica

El tejido cerebral fue homogeneizado utilizando un tampón salino con una concentración de fosfato 50 mM y un pH de 7.0. (1/15 w/v). La mezcla resultante se centrifugó a 13000 revoluciones por minuto durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Se separó el sobrenadante y las alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta que fueron utilizadas para la medición de la peroxidación lipídica.

Las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs, por sus siglas en inglés) fueron determinadas como un índice de peroxidación lipídica, cuyo principal compuesto es el malondialdehído. Son un biomarcador de estrés oxidativo. El procedimiento de medida fue el siguiente: 100 µL de la muestra o concentraciones crecientes de malondialdehído fueron incubadas a temperatura ambiente durante cinco minutos. A continuación, se les añadió a cada una 250 µL de ácido tiobarbitúrico (5.2 mg/mL, pH 3.5, tamponado con hidróxido sódico). Todas las muestras fueron incubadas a 95°C durante 45 minutos y centrifugadas a 3000 revoluciones por minuto durante 15 minutos. La absorbancia del sobrenadante se midió a una longitud de onda de 532 nm en una placa formada por 96 pocillos. Se calculó la ecuación de la curva para el malondialdehído y los datos obtenidos para las muestras de tejido cerebral fueron interpolados.

3. 3-nitrotirosina

La nitración de proteínas es usada como índice de la producción de peroxinitritos, por ello a través de su expresión se puede valorar el efecto tóxico del óxido nítrico y es una medida del estrés nitrosativo. La producción de óxido nítrico se determinó a través de la medición de sus productos finales, nitritos y nitratos, en las muestras de sobrenadante. La cantidad de peroxinitritos formados se cuantificó a través de la concentración tisular de 3-nitrotirosina. Los cortes cerebrales fueron homogeneizados (1:10 peso/volumen) en un tampón 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ y digitonina al 0.01% (pH de 7.4). A continuación, las muestras fueron centrifugadas (5000 revoluciones por minuto

durante 10 minutos a una temperatura de 4°C). La concentración de 3-nitrotirosina fue determinada en el sobrenadante siguiendo las instrucciones del fabricante del kit del inmunoensayo enzimático de la siguiente manera: en una placa con 96 pocillos se incubaron 50 µL de muestra y concentraciones crecientes del estándar de 3-nitrotirosina o el tampón (para el caso del blanco) con 50 µL de la solución con anticuerpos anti-3-nitrotirosina durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa fue lavada con el tampón de lavado e incubada con 100 µL de una segunda solución de anticuerpos anti-3-nitrotirosina durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 100 µL del sustrato y la absorbancia fue determinada por espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm. Se calculó la ecuación de la curva para la 3-nitrotirosina y los datos obtenidos para las muestras de tejido cerebral fueron interpolados.

4. 8-hidroxi-2-desoxi-guanosina

Las muestras de tejido cerebral fueron homogeneizadas (1:15 peso/volumen) en un tampón salino con una concentración de fosfato 50 mM y pH de 7.0. A continuación fueron centrifugadas a 13000 revoluciones por minuto durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. La capa superior fue congelada a una temperatura de -80°C hasta que la concentración de 8-hidroxi-2-desoxi-guanosina fue determinada como un índice del daño producido en el ADN debido al estrés oxidativo. La determinación se llevó a cabo utilizando un kit de inmunoensayo enzimático y siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. Concentración de Glutati6n

Las muestras de tejido cerebral fueron homogeneizadas (1:25 peso/volumen) en un tamp6n salino con una concentraci6n de fosfato 50 mM y pH de 7.0 y una concentraci6n de 6cido salic6lico al 5%. Posteriormente, fueron centrifugadas a 8000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. La capa superior fue congelada a una temperatura de -80°C hasta que la concentraci6n de glutati6n fue determinada. Para ello, se utiliz6 un kit de ensayo colorim6trico usando como reactivo el 5,5'-ditio-bis-(6cido-2-nitrobenzoico) y la enzima glutati6n reductasa. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 412nm.

6. Actividad de la glutatión peroxidasa

Las muestras de tejido cerebral fueron homogeneizadas (1:25 peso/volumen) en un tampón salino con una concentración de fosfato 50 mM y pH de 7.0. Posteriormente, fueron centrifugadas a 10000 revoluciones por minuto durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. La capa superior fue congelada a una temperatura de -80°C hasta el momento en el que se determinó la actividad de la enzima glutatión peroxidasa. El kit de ensayo colorimétrico empleado se basa en la reducción del hidroperóxido de cumeno a través de la glutatión peroxidasa a la vez que se oxida el glutatión reducido a glutatión oxidado. Durante este proceso, el consumo de NADPH se monitoriza a una longitud de onda de 340 nm.

7. Capacidad antioxidante total

Las muestras de tejido cerebral fueron homogeneizadas (1:15 peso/volumen) en un tampón salino con una concentración de fosfato 50 mM y pH de 7.0. A continuación fueron centrifugadas a 10000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. La capa superior fue congelada a una temperatura de -80°C hasta el momento en el que determinó la capacidad antioxidante total. El ensayo empleado se basa en la reducción del cobre (II) a través de los antioxidantes. El ión de cobre (I) reacciona con un reactivo cromogénico de acoplamiento que da lugar a un producto coloreado con una absorbancia máxima a una longitud de onda de 490 nm.

8. Análisis de variables bioquímicas del perfil glucémico y lipídico

Todos los parámetros bioquímicos se analizaron con el autoanalizador Atellica®CH de Siemens Healthineers (Erlangen, Alemania).

9. Análisis morfométrico de la retina

Los globos oculares de los animales de experimentación fueron retirados y fijados en una solución de formaldehído durante 48 horas. A continuación, se llevó a cabo un protocolo de fijación e inclusión en parafina y se seccionaron utilizando un micrótopo rotatorio HM 325 (Leica Byosystems, 69226 Nußloch, Alemania). Las secciones se cortaron a un grosor de 7 µm empezando desde el área posterior al nivel del nervio óptico. Los estudios morfométricos se realizaron con imágenes tomadas utilizando un objetivo

de 40x. Tras desparafinar los cortes y teñirlos con una tinción de hematoxilina-eosina, los estudios cuantitativos de los cortes histológicos se llevaron a cabo en simple ciego por dos observadores independientes que determinaron el grosor existente entre las membranas interna y externa, lo que equivale al grosor de la retina. Las células de la capa ganglionar se contaron con un objetivo 40x tras la tinción, con un total de 10 cortes por rata a una distancia conocida desde el primer corte. Los resultados fueron informados como número de células contadas por 100 μm de la retina con el objetivo de estandarizar los datos de todas las muestras.

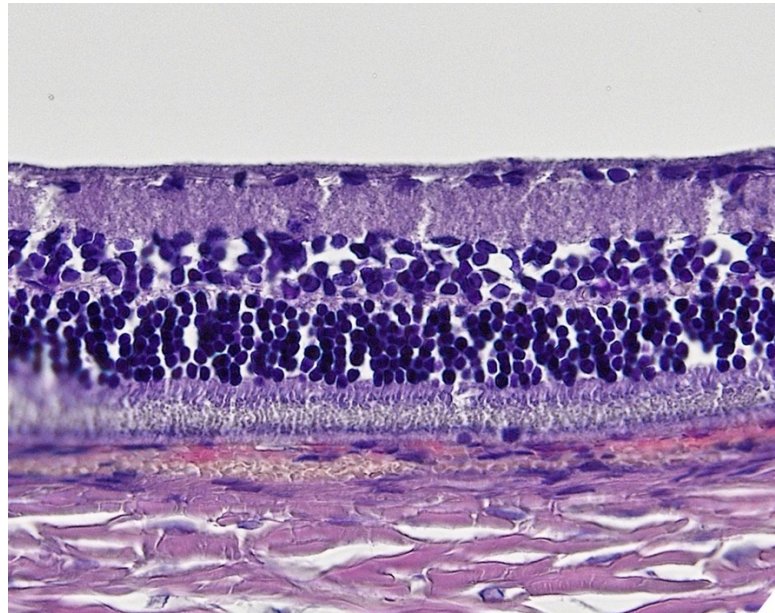


Figura 3.5. Ejemplo representativo de un corte de retina teñido con hematoxilina-eosina (20X)

3.6. MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos expresados en el texto, tablas y figuras representan la media \pm desviación estándar (DE) de los animales utilizados en los distintos grupos (n= 6). El análisis estadístico se llevó a cabo a través del SPSS (Social Program for Statistical Sciencies) (SPSS Co., Chicago, Il, Estados Unidos) versión 26.0. Las diferencias entre los distintos compuestos con respecto al grupo control, en relación con las distintas variables (control de ratas no diabéticas vs. Control en ratas diabéticas), se realizó utilizando el test de la T de student para muestras independientes. Por otro lado, se usó test de análisis de varianzas (ANOVA) para establecer las diferencias entre los grupos de tratamiento. Para establecer una posible relación entre variables se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson. En todos los casos, se ha asumido significación estadística con un valor de $p < 0,05$.



4. RESULTADOS



4.1. INTERACCIÓN IN VITRO ENTRE DISTINTOS POLIFENOLES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN CORTES CEREBRALES DE RATA SANA SOMETIDOS A UN PROCESO DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

En esta primera fase, se incubaron concentraciones crecientes de hidroxitirosol (HT) en ausencia o presencia de tres concentraciones de tirosol (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC), en muestras de cortes cerebrales de rata sana sometidos a un proceso de hipoxia-reoxigenación. Asimismo, se realizaron las curvas concentración-efecto completas de todos los compuestos utilizados.

4.1.1. EFECTO DEL MODELO EXPERIMENTAL SOBRE LAS VARIABLES DETERMINADAS

En primer lugar, se comprobó el efecto que este modelo experimental ejercía sobre los tres parámetros analizados: flujo de lactato deshidrogenasa (LDH) como índice indirecto de muerte celular, productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como representantes de la peroxidación lipídica y 3-nitrotirosina (3-Nty) como principal representante del estrés nitrosativo tisular.

Tabla 4.1: Efecto que el modelo experimental ejerce sobre las variables analizadas: LDH, TBARS y 3-Nitrotirosina.

	Pre-hipoxia	Post-reperfusion
LDH (OD ₄₉₂ -OD ₆₀₀ nm)	0.7 ± 0.1	3.2 ± 0.3*
TBARS (nmol/mg proteína)	0.8 ± 0.06	5.9 ± 0.6*
3-NTy (nmol/mg tejido)	0.3 ± 0.02	2.7 ± 0.2*

*p < 0.0001 respecto al valor pre-hipoxia

4.1.2. VALORACIÓN DEL EFECTO DE DISTINTAS COMBINACIONES DE POLIFENOLES, RESPECTO A HIDROXITIRO SOL, EN EL MODELO EXPERIMENTAL

La primera hipótesis planteada consistió en demostrar que, si bien hidroxitiro sol se considera el polifenol más abundante en el aceite de oliva virgen extra y quizás el máximo responsable del efecto antioxidante de dicho aceite, el resto de los polifenoles podrían participar en el mismo.

Para ello, utilizamos las concentraciones de los polifenoles descritas en aceites considerados de “bajo” (BP), “medio” (MP) o “alto” (AP) contenido polifenólico (Medina et al., 2006; Pedan et al., 2019) y comparamos el efecto de hidroxitiro sol frente a la combinación de todos los polifenoles en concentraciones dentro del rango de cada uno de los tres tipos de aceites. Estas concentraciones, expresadas en mg/kg, fueron las siguientes:

Tabla 4.2: Concentraciones de los distintos polifenoles en base a aceites considerados de "bajo", "medio" o "alto" contenido polifenólico (Medina et al., 2006; Pedan et al., 2019)

	HT	Ty	DHPG	OLC
AOVE-BP				
Rango	1.0 – 5.0	0.0 - 0.5	0.0 – 0.5	10 – 15
[incubación]	2.5	0.25	0.25	20
AOVE-MP				
Rango	10 - 50	0.5 – 1.1	1.0 – 5.0	100 – 200
[incubación]	30	0.8	0.3	150
AOVE-AP				
Rango	100 - 300	2.0 – 8.0	10 – 25	250 – 400
[incubación]	200	5.0	20	325

HT: hidroxitiro sol; Ty: tiro sol; DHPG: 3',4'-dihidroxifenilglicol; OLC: oleocantal.

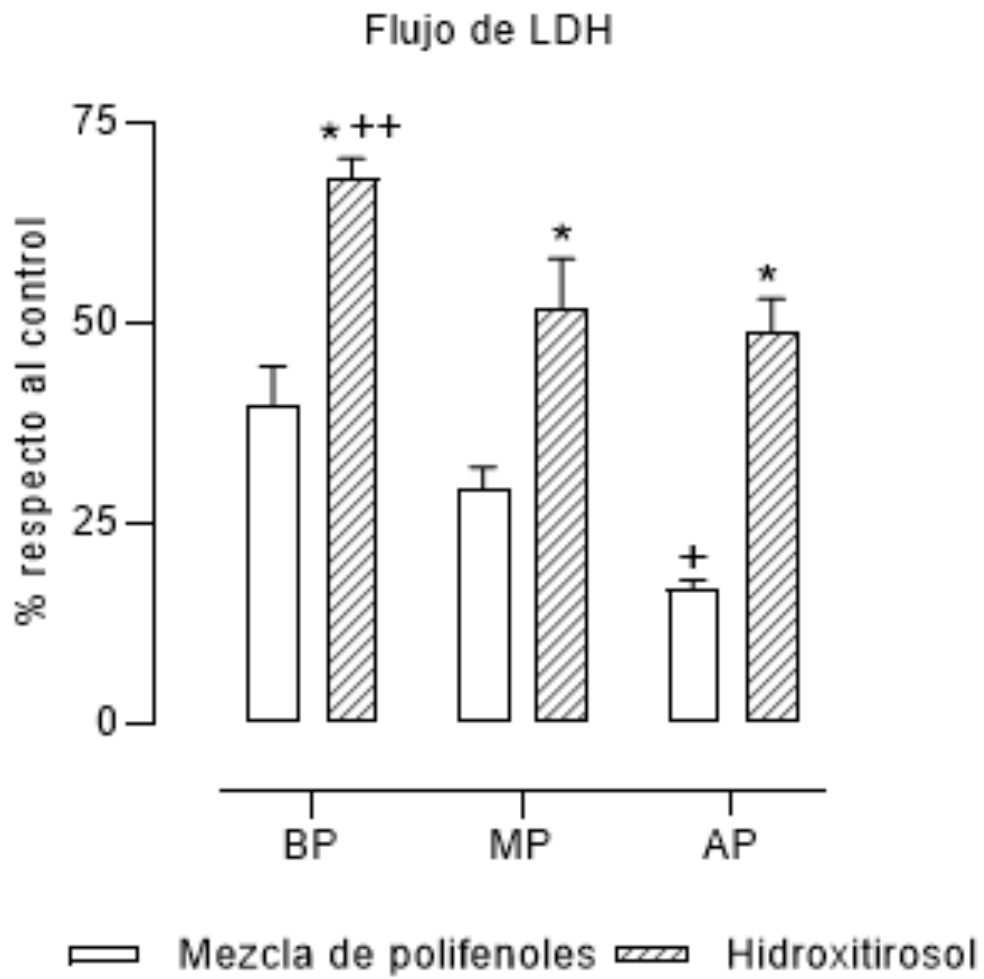
Los rangos se refieren a las concentraciones descritas en las citadas referencias; “incubación” se refiere a la concentración elegida para los experimentos.

En la siguiente tabla (Tabla 4.3.) y figura (Figura 4.1.) se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a la liberación tisular de **LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)** en el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales de ratas, tras incubar hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC), en las concentraciones elegidas para representar un aceite de oliva virgen extra (AOVE) con bajo (BP), medio (MP) o alto (AP) contenido en polifenoles.

Tabla 4.3: Valores medios de LDH en el modelo experimental tras incubar hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty), 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC) en las concentraciones elegidas para representar un AOVE con bajo, medio o alto contenido en polifenoles.

	% respecto al valor del grupo control		
	BP	MP	AP
Combinación polifenoles	39.96 \pm 4.65	29.49 \pm 2.56	16.98 \pm 0.99
Hidroxitirosol	68.05 \pm 2.51	52.22 \pm 6.08	49.37 \pm 4.56

Figura 4.1.



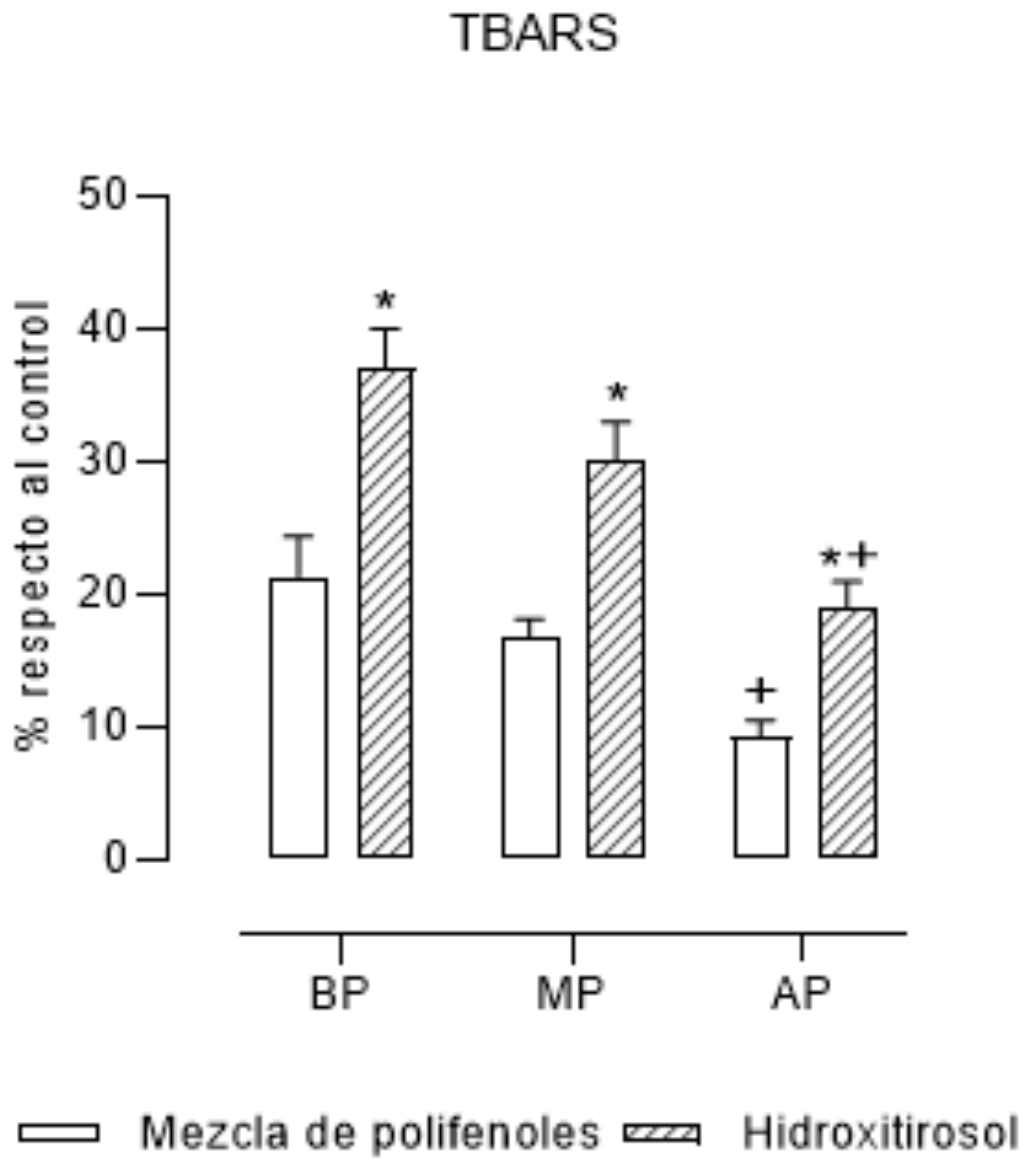
* $p < 0.0001$ respecto a la combinación de polifenoles. ++ $p < 0.05$ respecto a MP y AP

En la siguiente tabla (Tabla 4.4.) y figura (Figura 4.2.) se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a la **PRODUCCIÓN DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS (TBARS)** en el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales de ratas, tras incubar hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC), en las concentraciones elegidas para representar un aceite de oliva virgen extra (AOVE) con bajo (BP), medio (MP) o alto (AP) contenido en polifenoles.

Tabla 4.4: Valores medios de TBARS en el modelo experimental tras incubar hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty), 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC) en las concentraciones elegidas para representar un AOVE con bajo, medio o alto contenido en polifenoles.

	% respecto al valor del grupo control		
	BP	MP	AP
Combinación polifenoles	21.38 \pm 3.00	16.69 \pm 1.51	9.34 \pm 1.20
Hidroxitirosol	37.22 \pm 3.18	30.12 \pm 3.74	19.34 \pm 2.57

Figura 4.2.



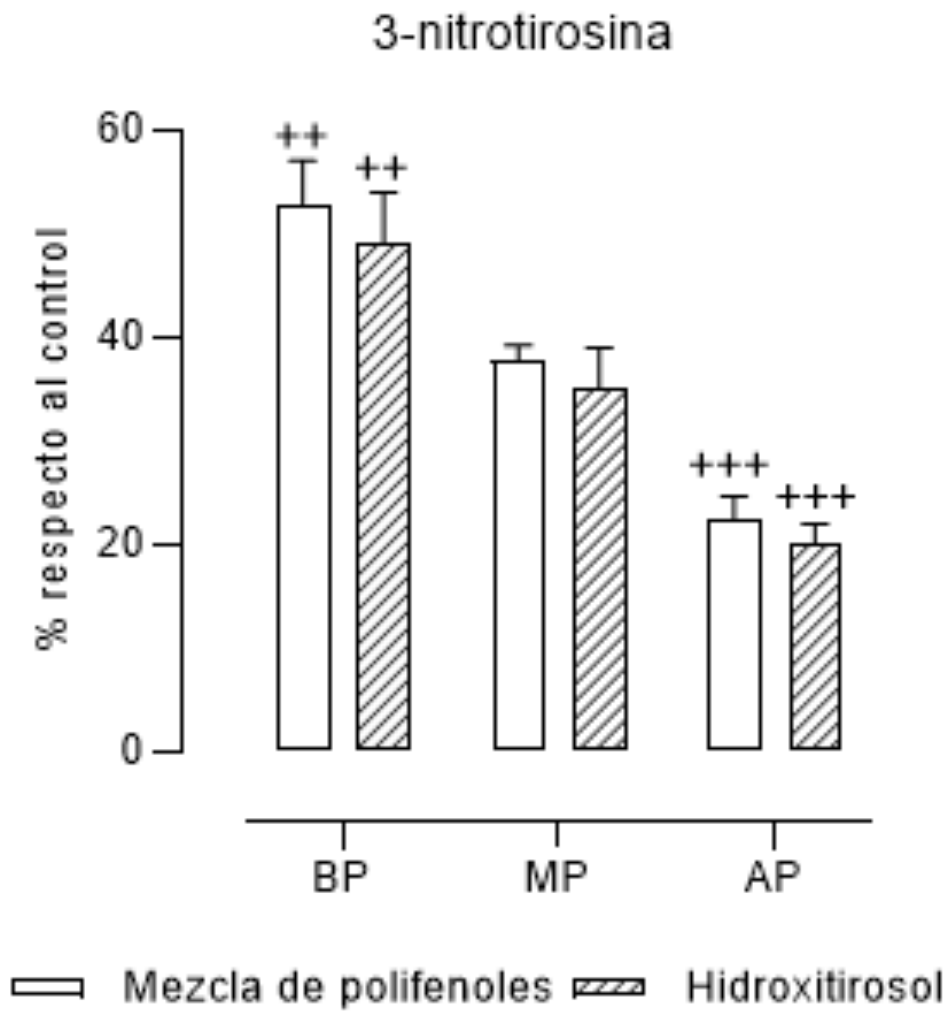
* $p < 0.0001$ respecto a la combinación de polifenoles. + $p < 0.05$ respecto a BP y MP

En la siguiente tabla (Tabla 4.5.) y figura (Figura 4.3.) se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a la **PRODUCCIÓN DE 3-NITROTIROSINA (3-NTy)** en el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales de ratas, tras incubar hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC), en las concentraciones elegidas para representar un aceite de oliva virgen extra (AOVE) con bajo (BP), medio (MP) o alto (AP) contenido en polifenoles.

Tabla 4.5: Valores medios de 3-NTy en el modelo experimental tras incubar hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty), 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC) en las concentraciones elegidas para representar un AOVE con bajo, medio o alto contenido en polifenoles.

	% respecto al valor del grupo control		
	BP	MP	AP
Combinación polifenoles	52.99 \pm 4.16	37.77 \pm 1.52	22.55 \pm 2.14
Hidroxitirosol	49.25 \pm 5.12	35.66 \pm 4.24	20.01 \pm 2.14

Figura 4.3.



⁺⁺p < 0.05 respecto a MP y AP, ⁺⁺⁺p < 0.05 respecto a MP

4.1.3. VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DE DISTINTOS POLIFENOLES EN LA ACCIÓN DE HIDROXITIROSO EN EL MODELO EXPERIMENTAL

En esta fase del estudio nos propusimos realizar curvas concentración-efecto de hidroxitiroso (HT), tiroso (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC), respecto al flujo de lactato deshidrogenasa (LDH) como índice indirecto de muerte celular, productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como representantes de la peroxidación lipídica y 3-nitrotiroso (3-Nty) como principal representante del estrés nitrosativo tisular.

En la Tabla 4.6. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) de la concentración de cada compuesto que inhibió un 50% la variable determinada (IC₅₀). En las Figuras 4.4. a 4.6. se representan gráficamente las curvas concentración-efecto correspondientes.

Tabla 4.6: Valores medios de la IC₅₀ de hidroxitiroso (HT), tiroso (Ty), 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC).

	IC ₅₀ (μM)		
	LDH	TBARS	3-Nty
Hidroxitiroso (HT)	81.1 \pm 4.7****	57.1 \pm 5.7**	64.4 \pm 5.8
Tiroso (Ty)	425 \pm 25.1	154 \pm 13.3***	68.9 \pm 4.4
DHPG	314 \pm 22.5	84.7 \pm 6.3	40.5 \pm 3.9*
Oleocantal (OLC)	78.9 \pm 5.8****	82.0 \pm 6.3	75.3 \pm 6.4

*p < 0.05 respecto a HT, Ty y OLC. **p < 0.01 respecto a Ty, DHPG y OLC. ***p < 0.001 respecto a HT, DHPG y OLC. ****p < 0.0001 respecto a Ty y DHPG.

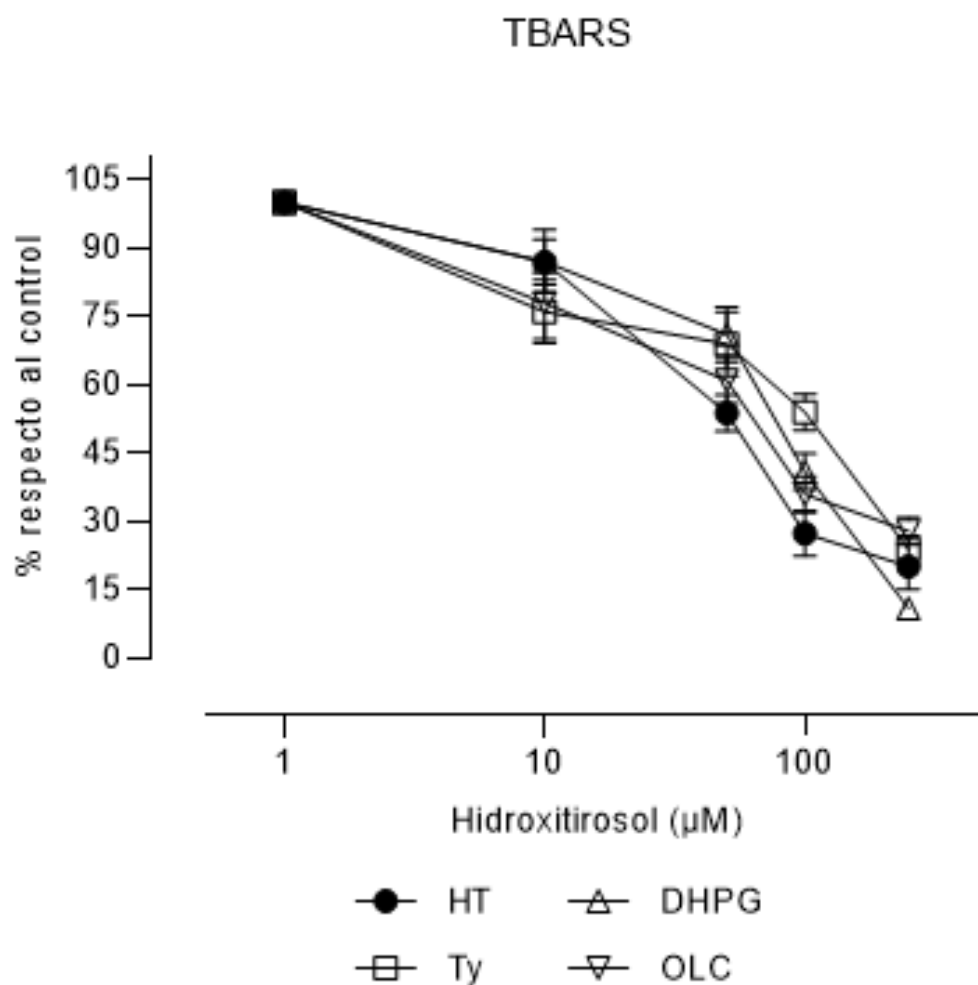


Figura 4.5. Curvas concentración-efecto de hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal, respecto a la producción de peróxidos lipídicos (TBARS) en el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales de rata.

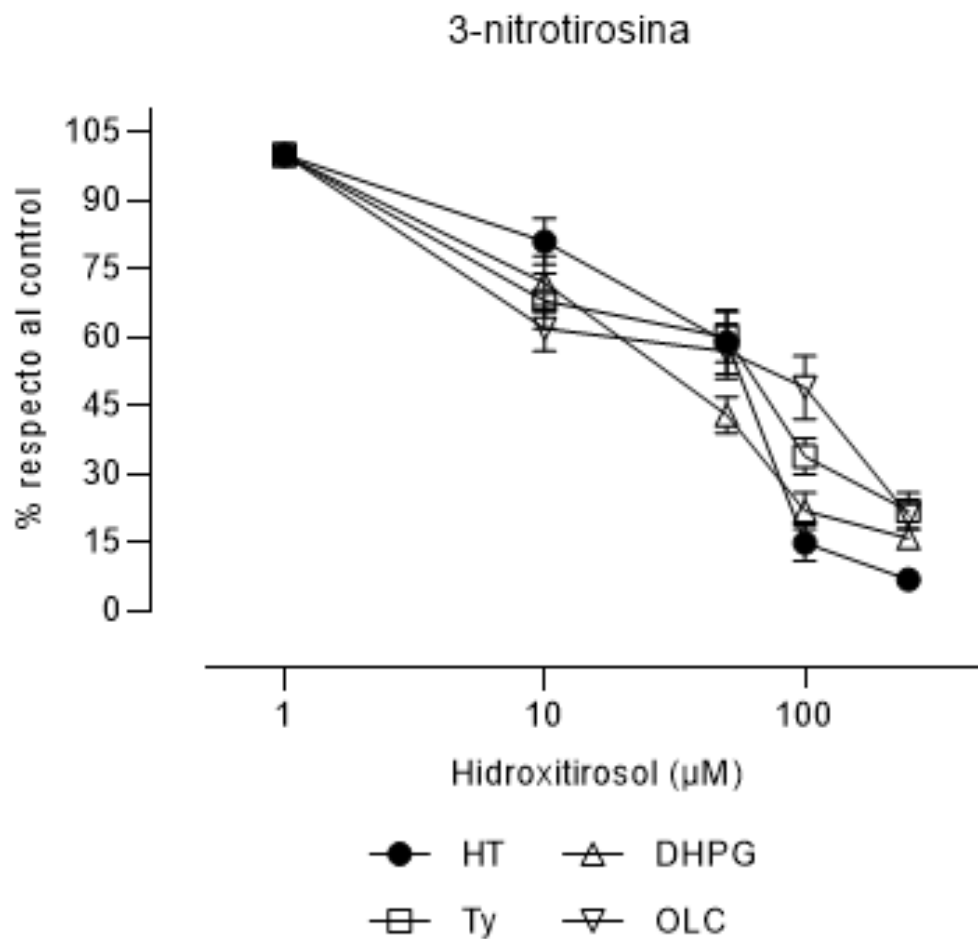


Figura 4.6. Curvas concentración-efecto de hidroxitirosol (HT), tirosol (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal, respecto a la producción de 3-nitrotirosina (3-NTy) en el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales de rata.

A continuación, se realizaron curvas concentración-efecto de hidroxitirosol (HT) en ausencia o presencia de tres concentraciones (10, 50 o 100 μM) de tirosol (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC), respecto al flujo de lactato deshidrogenasa (LDH) como índice indirecto de muerte celular, productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como representantes de la peroxidación lipídica y 3-nitrotirosina (3-Nty) como principal representante del estrés nitrosativo tisular.

En la Tabla 4.7. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) de la concentración de HT que inhibió un 50% la variable determinada (IC_{50}), en ausencia o presencia de las concentraciones de los polifenoles antes citados. En las Figuras 4.7. a 4.9. se representan gráficamente las curvas concentración-efecto correspondientes.

Tabla 4.7. Valores de la concentración de hidroxitirosol (HT) que redujo el 50% de la producción de LDH, TBARS y 3-NTy en ausencia o presencia de tirosol (Ty), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal (OLC)

	IC ₅₀ (μM)		
	LDH	TBARS	3-NTy
HT	81.1 ± 4.7	57.1 ± 5.7	64.4 ± 5.8
HT + Ty (10 μM)	185 ± 12.6*	51.3 ± 6.5	71.5 ± 5.7
HT + Ty (50 μM)	227 ± 8.2*	41.7 ± 3.9	57.6 ± 4.2
HT + Ty (100 μM)	125 ± 11.2*	91.4 ± 5.0*	84.2 ± 8.4
HT + DHPG (10 μM)	28.3 ± 3.4*	56.0 ± 5.2	27.7 ± 4.8*
HT + DHPG (50 μM)	85.9 ± 8.3	30.1 ± 3.8*	29.4 ± 4.7*
HT + DHPG (100 μM)	84.3 ± 8.2	49.8 ± 5.6*	32.9 ± 4.5*
HT + OLC (10 μM)	19.1 ± 2.6*	34.8 ± 2.9*	67.2 ± 7.1
HT + OLC (50 μM)	21.2 ± 1.8*	26.0 ± 2.8*	65.3 ± 6.6
HT + OLC (100 μM)	18.3 ± 1.1*	21.2 ± 2.7*	68.0 ± 5.7

*p < 0.005 respecto a HT.

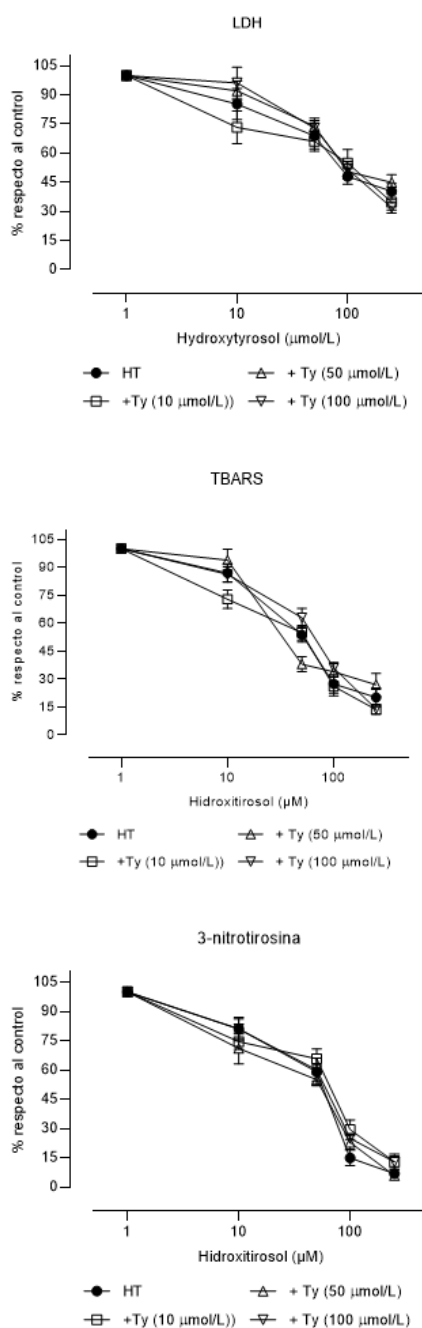


Figura 4.7. Curvas concentración-efecto de hidroxitirosol (HT) en ausencia o presencia de tres concentraciones (10, 50 o 100 μM) de tirosol (Ty) respecto al flujo de lactato deshidrogenasa (LDH) como índice indirecto de muerte celular, productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como representantes de la peroxidación lipídica y 3-nitrotirosina (3-Nty) como principal representante del estrés nitrosativo tisular.

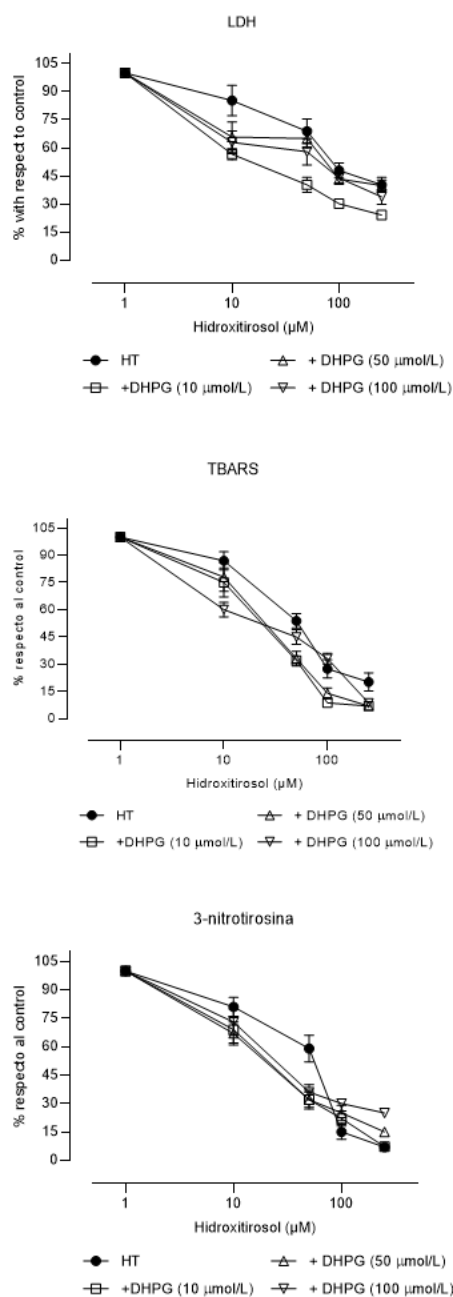


Figura 4.8. Curvas concentración-efecto de hidroxitirosol (HT) en ausencia o presencia de tres concentraciones (10, 50 o 100 μM) de 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG), respecto al flujo de lactato deshidrogenasa (LDH) como índice indirecto de muerte celular, productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como representantes de la peroxidación lipídica y 3-nitrotirosina (3-Nty) como principal representante del estrés nitrosativo tisular.

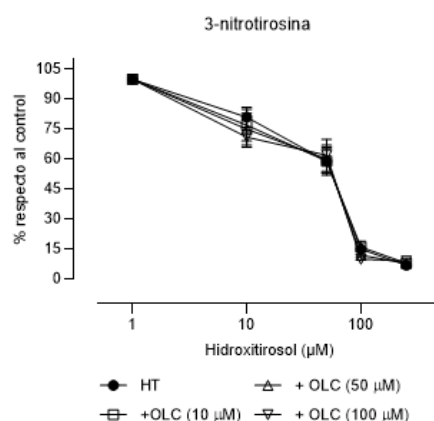
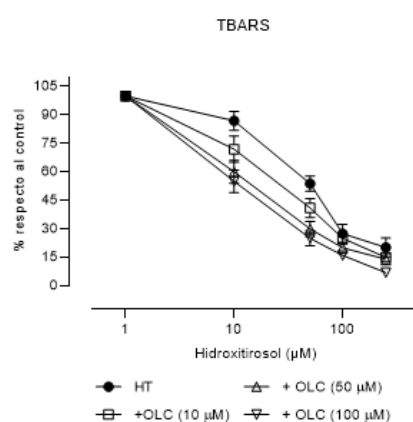
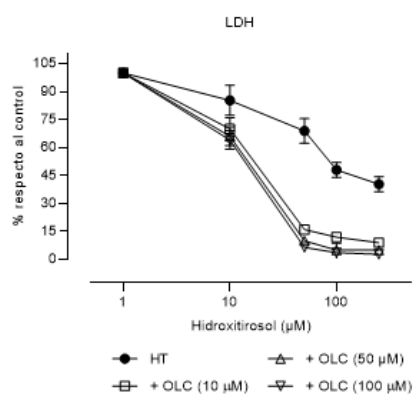


Figura 4.9. Curvas concentración-efecto de hidroxitirosol (HT) en ausencia o presencia de tres concentraciones (10, 50 o 100 μM) de oleocantal (OLC), respecto al flujo de lactato deshidrogenasa (LDH) como índice indirecto de muerte celular, productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como representantes de la peroxidación lipídica y 3-nitrotirosina (3-Nty) como principal representante del estrés nitrosativo tisular.

4.2. INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL Y 3',4'-DIHIDROXIFENILGLICOL, SOLOS O COMBINADOS, EN CORTES CEREBRALES DE RATA DIABÉTICAS SOMETIDOS A UN PROCESO DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

En la segunda parte del estudio, quisimos aunar tres aspectos importantes:

- Un modelo de daño en tejido cerebral que remedara los mecanismos de neurotoxicidad acaecidos en el ictus isquémico. Para ello elegimos el mismo modelo utilizado en la primera fase del estudio, la hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales de rata.
- Una situación fisiopatológica en cuya evolución y daños tisulares estuviese implicado el estrés oxidativo y/o nitrosativo. Para ello elegimos un modelo de diabetes mellitus experimental.
- Una asociación de polifenoles que hubiese aportado resultados positivos en la primera fase del estudio y que fuese posible su administración oral. En este caso, en la sección anterior de resultados, se concluyó que 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal eran los dos polifenoles que potenciaban el efecto neuroprotector y antioxidante de hidroxitirosol, no así el tirosol. La administración oral durante dos meses de oleocantal era incompatible con la disponibilidad y coste del producto así que decidimos utilizar la asociación HT + DHPG en las mismas proporciones (DHPG/HT) descritas en los principales aceites de oliva virgen extra, 1/5 a 1/10. Es por ello que administramos a los animales de experimentación 5 mg/kg/día p.o. de HT solo o combinado con 0.5 mg/kg/día (1/10) o con 1 mg/kg/día (1/5).

4.2.1. MODIFICACIONES DE LAS VARIABLES ANALIZADAS DEBIDAS A LA DIABETES MELLITUS

En la Tabla 4.8. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables zoométricas y de perfil glucémico y lipídico, determinadas en los animales diabéticos sin tratamiento, respecto a los controles sanos. En la Figura 4.10. se representan gráficamente estos resultados.

Tabla 4.8: Valores medios correspondientes a las variables zoométricas, de perfil glucémico y lipídico en los controles diabéticos con respecto a los controles sanos.

Variable	Controles sanos	Controles diabéticos
Peso corporal (g)	448 \pm 8.0	340 \pm 19.2*
Ingesta comida (g/día)	20.2 \pm 1.8	31.2 \pm 3.8*
Ingesta bebida (mL/día)	37.3 \pm 4.8	111 \pm 9.5*
Glucosa sanguínea (mg/dL)	98.3 \pm 4.8	387 \pm 11.2*
Colesterol total (mg/dL)	60.0 \pm 8.1	71.2 \pm 5.8
LDL colesterol (mg/dL)	22.2 \pm 5.0	31.1 \pm 6.7
HDL colesterol (mg/dL)	19.6 \pm 2,9	18.0 \pm 5.1
Triglicéridos (mg/dL)	71.4 \pm 8.1	110 \pm 12.8*

*p < 0.05 respecto al control sano

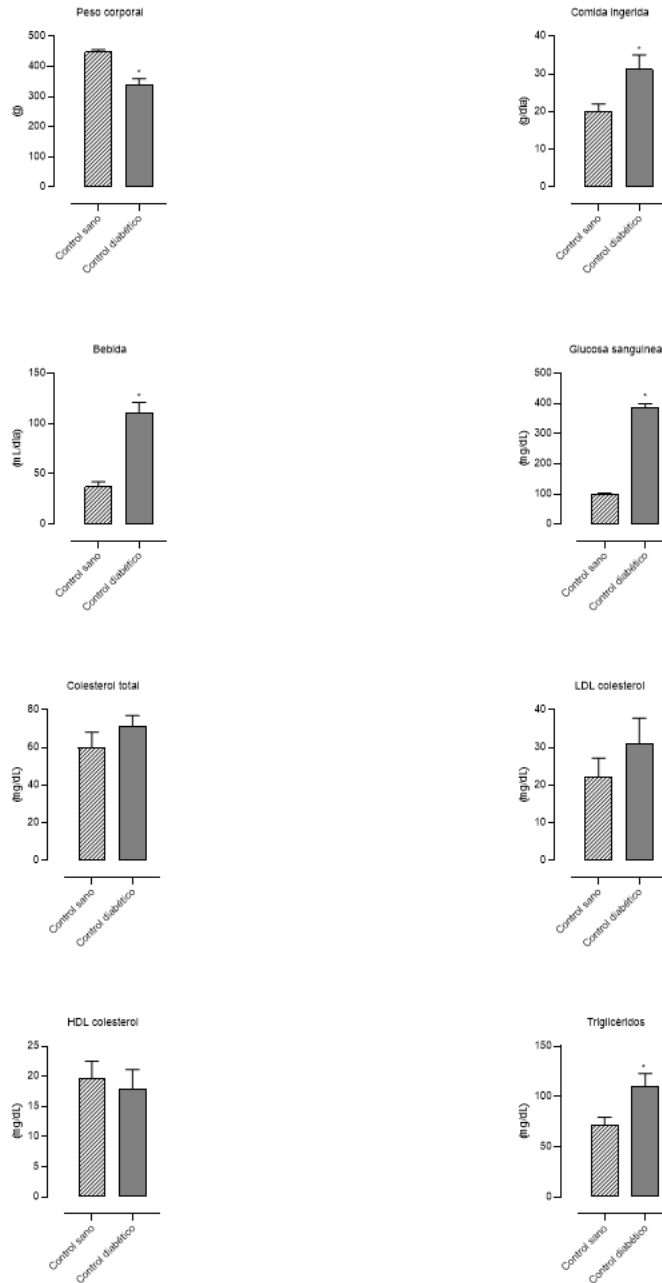


Figura 4.10. Valores de los parámetros zoométricos y de perfil glucémico y lipídico en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento. * $p < 0.05$ respecto al grupo control sano.

En la Tabla 4.9. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de estrés oxidativo y nitrosativo, determinadas tras la reoxigenación en cortes cerebrales de animales diabéticos sin tratamiento, respecto a los controles sanos. En la Figura 4.11. se representan gráficamente estos resultados.

Tabla 4.9: Valores medios de las variables de estrés oxidativo y nitrosativo en controles diabéticos con respecto a controles sanos.

Variable	Controles sanos	Controles diabéticos
TBARS (nmol/mL)	761 \pm 106	1746 \pm 274 *
8-OHdG (ng/mL)	188 \pm 18.7	577 \pm 33.8*
GSH (nmol/mL)	258 \pm 39.9	107 \pm 13.2*
GSHpx (nmol/min/mL)	60.8 \pm 8.9	87.3 \pm 3.4
TAC (U/mL)	745 \pm 22.9	506 \pm 52.5*
3-nitrotirosina (pg/mL)	105 \pm 10.2	226 \pm 22.4*

TBARS: productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico. 8-OHdG: 8-hidroxi-deoxi-guanosina. GSH: glutatión reducido. GSHpx: glutatión peroxidasa. TAC: capacidad antioxidante total.

*p < 0.05 respecto al control sano

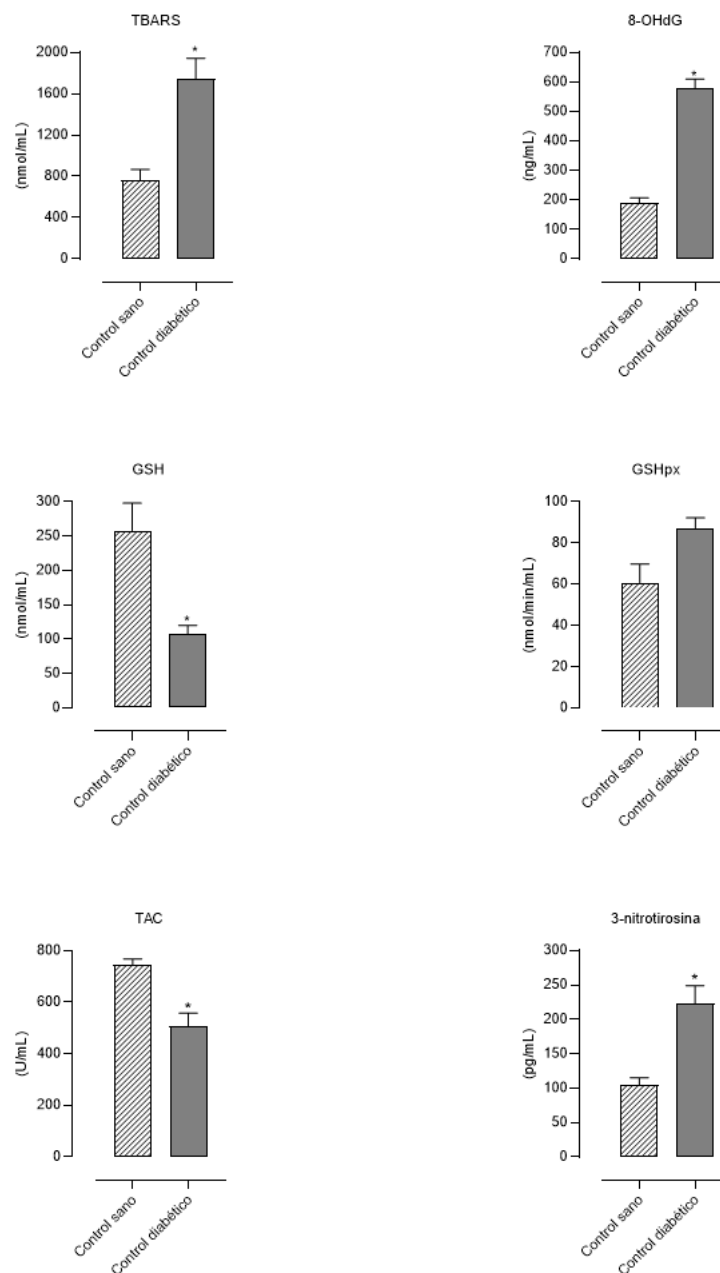


Figura 4.11. Valores de los parámetros de estrés oxidativo y nitrosativo determinadas tras la reoxigenación en cortes cerebrales en animales diabéticos sin tratamiento, respecto a los controles sanos. * $p < 0.05$ respecto al grupo control sano.

TBARS: productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico. 8-OHdG: 8-hidroxi-deoxi-guanosina. GSH: glutatión reducido. GSHpx: glutatión peroxidasa. TAC: capacidad antioxidante total.

En la Tabla 4.10. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de muerte celular (LDH), determinadas tras la reoxigenación en cortes cerebrales y morfometría retiniana, en animales diabéticos sin tratamiento, respecto a los controles sanos. En la Figura 4.12. se representan gráficamente estos resultados.

Tabla 4.10: Valores medios de LDH en controles diabéticos con respecto a controles sanos.

Variable	Controles sanos	Controles diabéticos
LDH (U/mL)	7.7 \pm 0.8	13.7 \pm 0.3*
Grosor retina (μm)	63.7 \pm 7.5	116 \pm 11.2*
Área celular (%)	58.7 \pm 2.0	39.1 \pm 2.4*
Área intersticial (%)	41.3 \pm 2.5	58.7 \pm 3.2*
Células ganglionares (n/100 μm)	8.7 \pm 1.0	3.0 \pm 0.3*

*p < 0.05 respecto al control sano

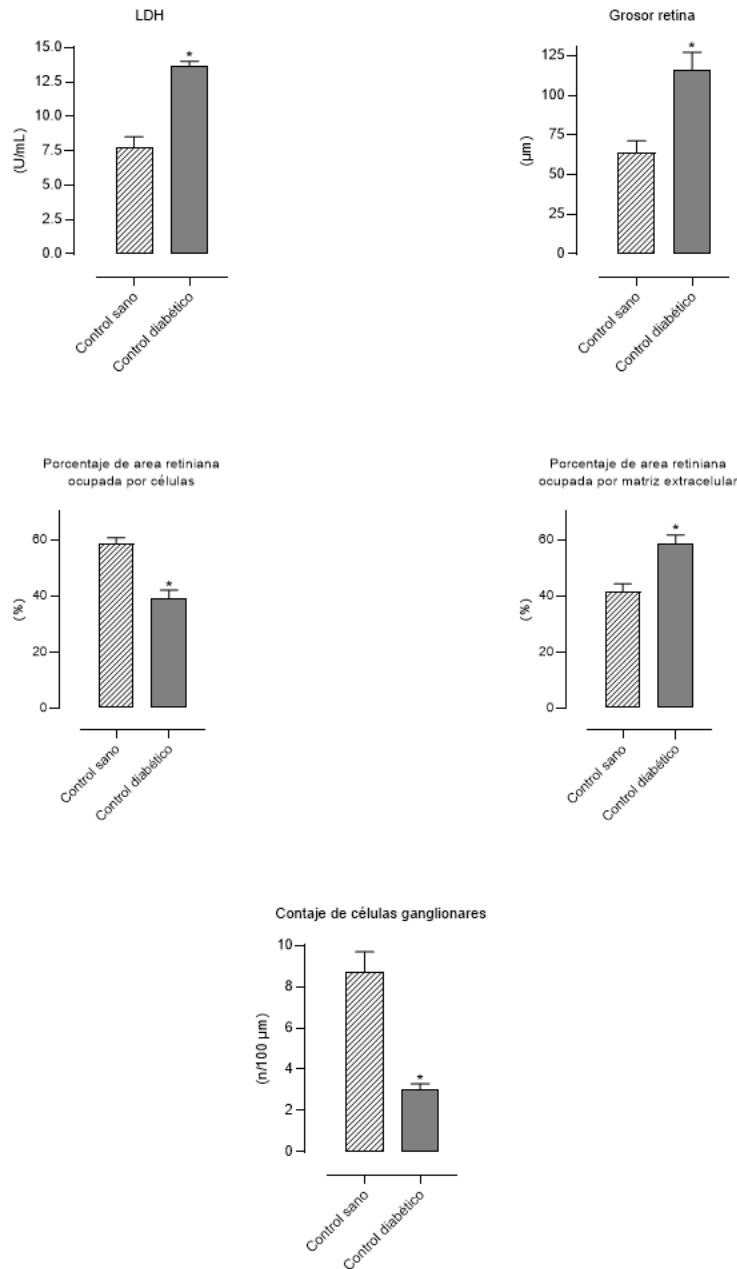


Figura 4.12. Valores de los parámetros de muerte celular (LDH) determinadas tras la reoxigenación en cortes cerebrales y morfometría retiniana, en animales diabéticos sin tratamiento, respecto a los controles sanos. * $p < 0.05$ respecto al grupo control sano.

4.2.2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIROSOLO (HT) Y 3',4'-DIHIDROXIFENILGLICOL (DHPG) SOBRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LOS ANIMALES CON DIABETES MELLITUS

En la Tabla 4.11. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables zoométricas y de perfil glucémico y lipídico, determinadas en los animales diabéticos. En la Figura 4.13. se representan gráficamente estos resultados.

En la Tabla 4.12. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de estrés oxidativo y nitrosativo, determinadas tras la reoxigenación en cortes cerebrales de animales diabéticos sin tratamiento, respecto a los controles sanos. En la Figura 4.14. se representan gráficamente estos resultados.

En la Tabla 4.13. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de muerte celular (LDH), determinadas tras la reoxigenación en cortes cerebrales y morfometría retiniana, en animales diabéticos sin tratamiento, respecto a los controles sanos. En la Figura 4.15. se representan gráficamente estos resultados.

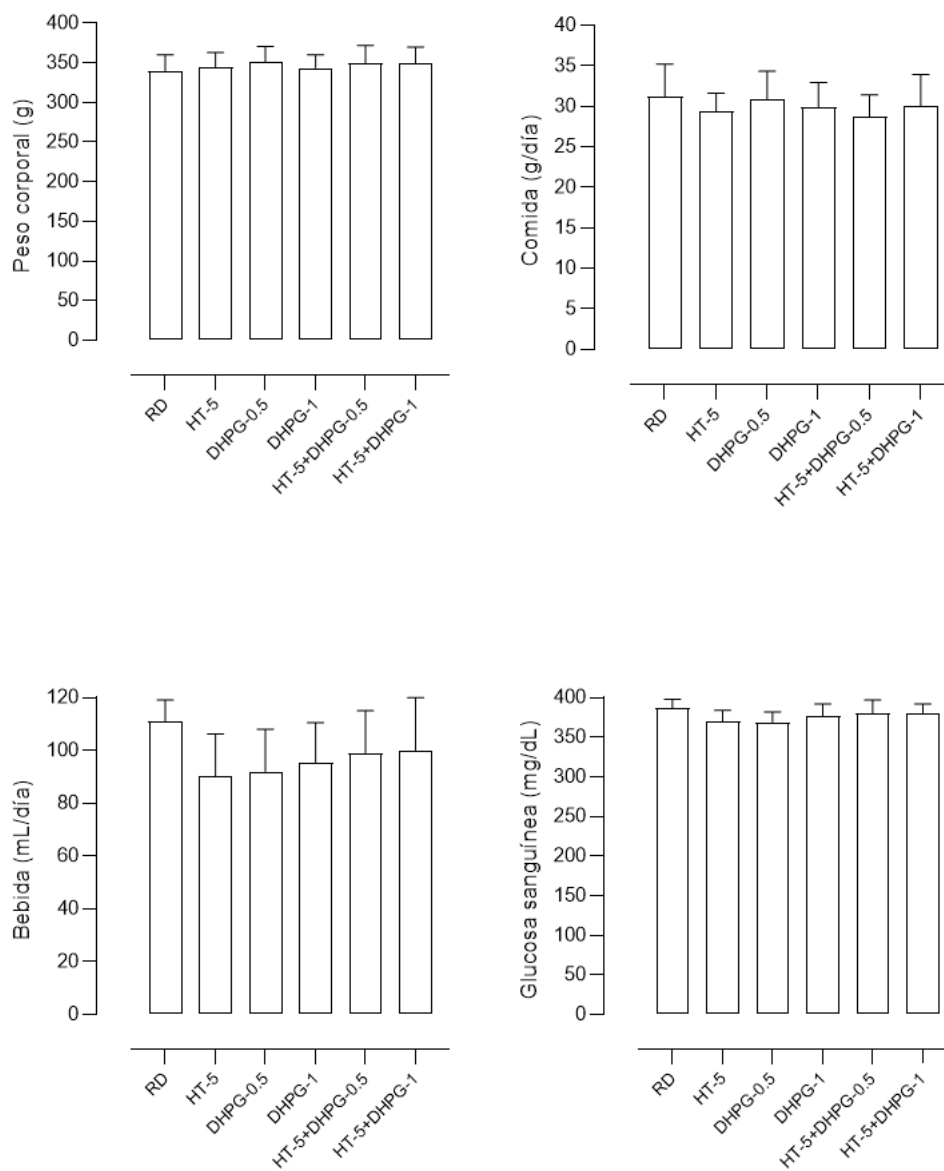
Tabla 4.11. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables zoométricas y de perfil glucémico y lipídico, determinadas en los animales diabéticos. En la Figura 4.13. se representan gráficamente estos resultados.

Variable	Controles	HT-5	DHPG-0.5	DHPG-1	HT+DHPG-0.5	HT+DHPG-1
Peso corporal (g)	340 \pm 19.2	345 \pm 17.9	351 \pm 20.0	344 \pm 15.7	350 \pm 22.3	349 \pm 21.4
Ingesta comida (g/día)	31.2 \pm 3.8	29.4 \pm 2.2	30.8 \pm 3.5	29.9 \pm 3.0	28.7 \pm 2.7	30.0 \pm 3.9
Ingesta bebida (mL/día)	111 \pm 9.5	90.2 \pm 15.8	92.1 \pm 16.0	95.5 \pm 14.2	99.1 \pm 16.3	100 \pm 19.3
Glucemia (mg/dL)	387 \pm 11.2	370 \pm 14.2	369 \pm 13.0	377 \pm 15.5	380 \pm 16.8	381 \pm 10.9
Colesterol total (mg/dL)	71.2 \pm 5.8	70.0 \pm 5.3	75.8 \pm 6.4	69.7 \pm 8.4	72.3 \pm 8.5	71.1 \pm 7.8
LDL colesterol (mg/dL)	31.1 \pm 6.7	29.8 \pm 8.1	30.5 \pm 7.0	30.6 \pm 7.4	28.9 \pm 8.2	28.3 \pm 5.9
HDL-colesterol (mg/dL)	18.0 \pm 5.1	27.6 \pm 6.4*	23.4 \pm 6.6	21.0 \pm 5.2	24.5 \pm 4.1	21.8 \pm 4.8
Triglicéridos (mg/dL)	110 \pm 12.8	108 \pm 11.4	106 \pm 12.7	110 \pm 14.9	84.4 \pm 8.5* ^a	104 \pm 9.8

HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

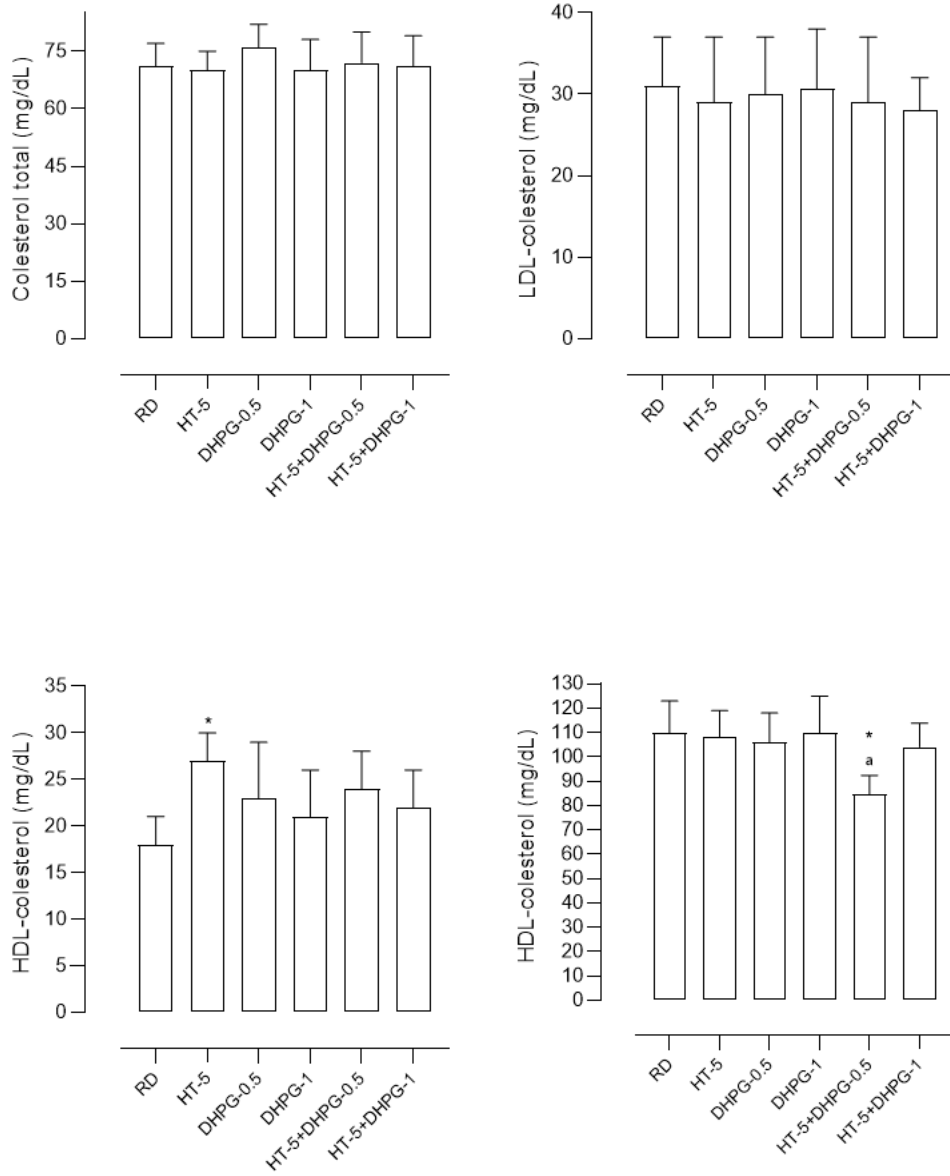
*p < 0.05 respecto al grupo control diabético. p < 0.05 respecto a HT-5, DHPG-0.5 y DHPG-1.

Figura 4.13.



HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

Figura 4.13. (cont.)



HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

*p < 0.05 respecto al control sano. ^ap < 0.05 respecto a HT-5, DHPG-0.5 y DHPG-1.

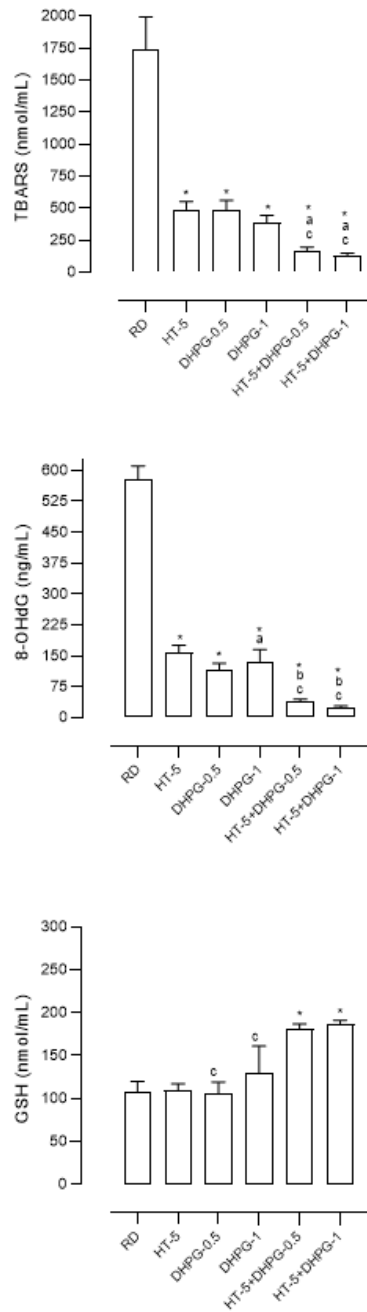
Tabla 4.12. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de estrés oxidativo y nitrosativo, determinadas tras la reoxigenación en cortes cerebrales de animales diabéticos. En la Figura 4.14. se representan gráficamente estos resultados.

Variable	Controles	HT-5	DHPG-0.5	DHPG-1	HT+DHPG-0.5	HT+DHPG-1
TBARS (nmol/mL)	1746 \pm 274	492 \pm 60.5*	484 \pm 77.8*	285 \pm 58.6*	165 \pm 33.1* ^{ac}	126 \pm 23.9* ^{ac}
8-OHdG (ng/mL)	577 \pm 33.8	158 \pm 17.7*	117 \pm 15.5*	137 \pm 28.9* ^a	38.3 \pm 6.3* ^{bc}	24.3 \pm 4.4* ^{bc}
GSH (nmol/mL)	107 \pm 13.2	110 \pm 7.4	106 \pm 13.2 ^c	129 \pm 32.2 ^c	181 \pm 6.0*	187 \pm 4.3*
GSHpx (nmol/min/mL)	87.3 \pm 3.4	78.1 \pm 6.4	85.0 \pm 3.8	72.5 \pm 2.4	70.8 \pm 4.1	74.5 \pm 2.8
TAC (U/mL)	506 \pm 52.5	732 \pm 25.5*	533 \pm 25.7	739 \pm 20.2*	752 \pm 24.4*	745 \pm 22.9*
3-nitrotirosina (pg/mL)	226 \pm 22.4	161 \pm 5.8	180 \pm 16.1	149 \pm 4.8*	154 \pm 8.8*	149 \pm 13.2*

HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

*p < 0.05 respecto al grupo control diabético. ^ap < 0.05 respecto a DHPG-0.5. ^bp 0.05 respecto a DHPG-0.5 y DHPG-1. ^cp < 0.05 respecto a HT-5.

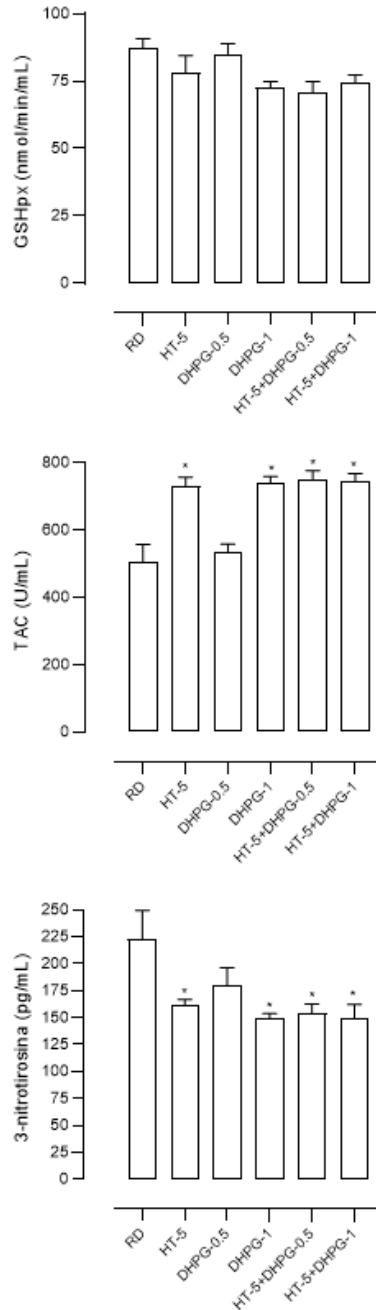
Figura 4.14.



HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

*p < 0.05 respecto al grupo control diabético. ^ap < 0.05 respecto a DHPG-0.5. ^bp 0.05 respecto a DHPG-0.5 y DHPG-1. ^cp < 0.05 respecto a HT-5.

Figura 4.14. (cont.)



HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

*p < 0.05 respecto al grupo control diabético. ^ap < 0.05 respecto a DHPG-0.5. ^bp 0.05 respecto a DHPG-0.5 y DHPG-1. ^cp < 0.05 respecto a HT-5.

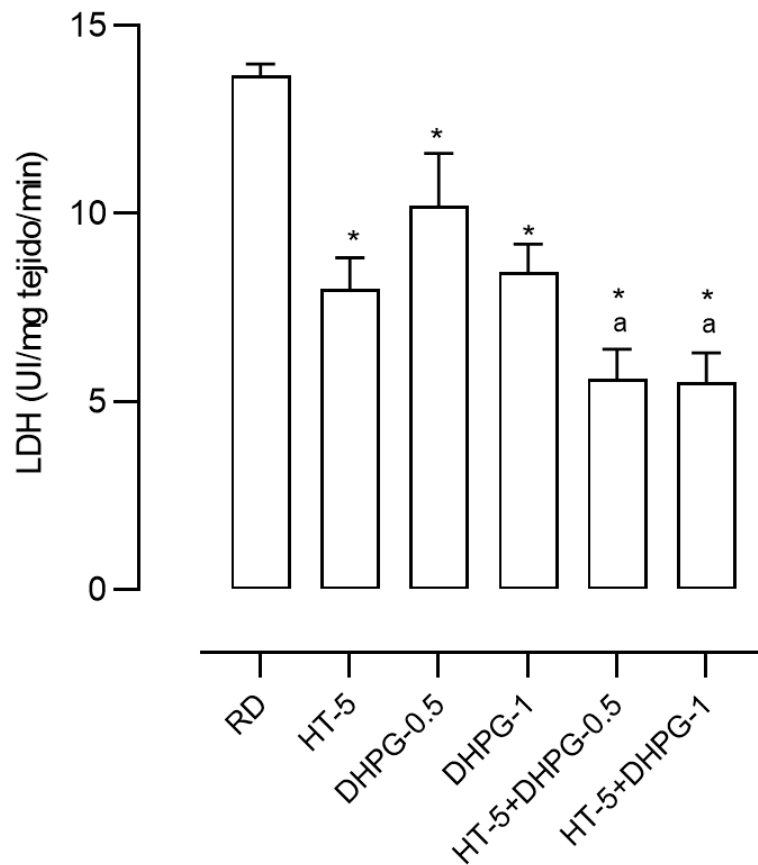
Tabla 4.13. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de muerte celular (LDH), determinadas tras la reoxigenación en cortes cerebrales y morfometría retiniana, en animales diabéticos. En la Figura 4.15. se representan gráficamente estos resultados.

Variable	Controles	HT-5	DHPG-0.5	DHPG-1	HT+DHPG-0.5	HT+DHPG-1
LDH (U/mL)	13.7 \pm 0.3	8.0 \pm 0.8*	10.2 \pm 1.4*	8.5 \pm 0.7*	5.6 \pm 0.8 ^a	5.5 \pm 0.8 ^a
Grosor retina (μ m)	116 \pm 11.2	86.5 \pm 2.4*	97.0 \pm 5.2*	88.1 \pm 3.7*	66.0 \pm 5.6 ^a	67.4 \pm 5.0 ^a
Área celular (%)	39.1 \pm 2.4	55.1 \pm 2.2*	49.9 \pm 1.6*	48.8 \pm 1.3 ^b	54.9 \pm 0.8*	58.4 \pm 1.2 ^a
Área intersticial (%)	58.7 \pm 3.2	44.2 \pm 2.0*	50.1 \pm 1.6*	51.2 \pm 1.3*	45.1 \pm 1.8*	41.6 \pm 1.2 ^a
Células ganglionares (n/100 μ m)	3.0 \pm 0.3	4.5 \pm 0.2 ^a	3.5 \pm 0.3	3.9 \pm 0.1	5.2 \pm 0.3 ^{ab}	5.9 \pm 0.4 ^{bc}

HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

*p < 0.05 respecto al grupo control diabético. ^ap < 0.05 respecto a DHPG-0.5 y DHPG-1. ^bp 0.05 respecto a HT-5. ^cp < 0.05 respecto a HT-5, DHPG.0.5 y DHPG-1.

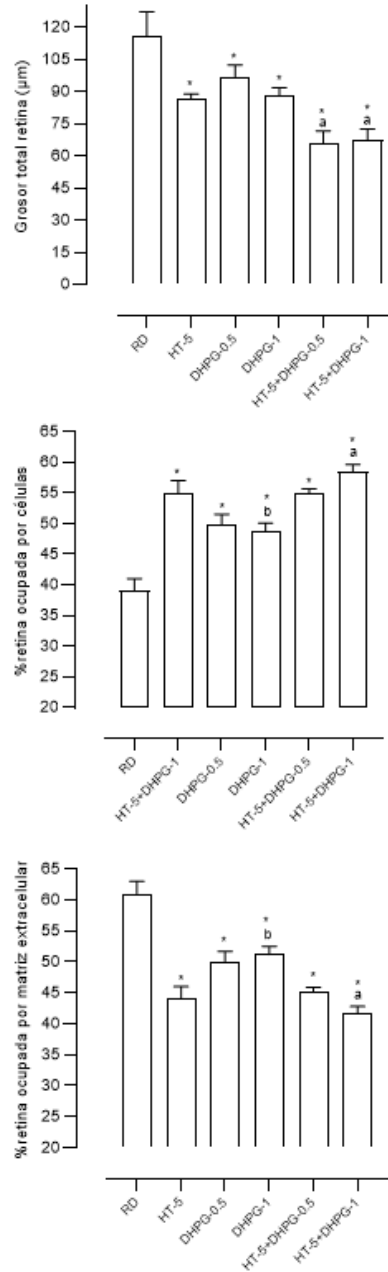
Figura 4.15.



HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

*p < 0.05 respecto al grupo control diabético. ^ap < 0.05 respecto a DHPG-0.5 y DHPG-1.

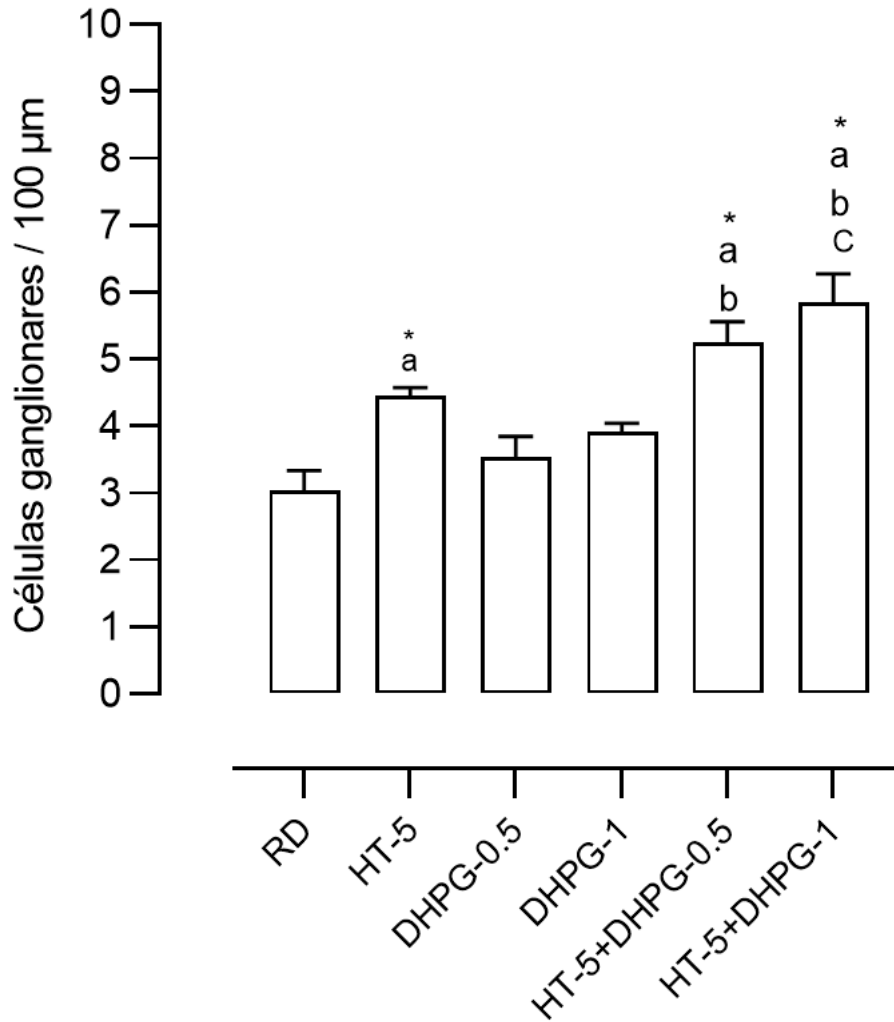
Figura 4.15. (cont.)



HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

*p < 0.05 respecto al grupo control diabético. ^ap < 0.05 respecto a DHPG-0.5 y DHPG-1. ^bp 0.05 respecto a HT-5.

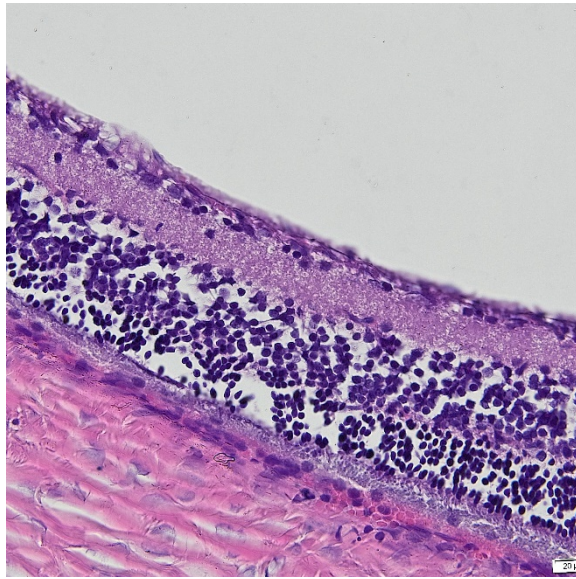
Figura 4.15. (cont.)



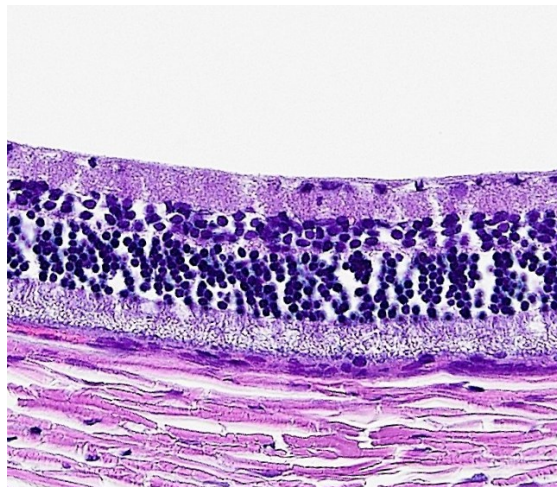
HT-5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día; DHPG-0,5= Glicol 0,5 mg/Kg/día; DHPG-1= Glicol 1 mg/Kg/día; HT+DHPG-0,5= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 0,5 mg/Kg/día; HT+DHPG-1= hidroxitirosol 5 mg/Kg/día + Glicol 1 mg/Kg/día

* $p < 0.05$ respecto al grupo control diabético. ^a $p < 0.05$ respecto a DHPG-0.5 y DHPG-1.

^b $p < 0.05$ respecto a HT-5. ^c $p < 0.05$ respecto a HT-5, DHPG.0.5 y DHPG-1.



Control sano



Control diabético

Figura 4.16. Ejemplos representativos de las retinas correspondientes a un animal sano y a un diabético sin tratamiento (Hematoxilina-eosina X20)

En la Tabla 4.14. se muestran los valores obtenidos tras la realización del test de correlación de Pearson, tomando como base dos parámetros de muerte celular: flujo de LDH en los cortes cerebrales sometidos a hipoxia-reoxigenación y porcentaje de celularidad retiniana.

Tabla 4.14: Valores obtenidos tras la realización del test de correlación de Pearson tomando como base el flujo de LDH y el porcentaje de celularidad retiniana.

Variable	LDH		% celularidad retiniana	
	Coef.	p	Coef.	p
TBARS	0.848	0.0001	-0.628	0.001
8-OHdG	0.917	0.0001	-0.755	0.0001
GHS	-0.450	0.018	0.580	0.002
GSHpx	0.591	0.002	-0.386	n.s.
TAC	-0.829	0.0001	0.609	0.001
3-NTy	0.730	0.0001	-0.615	0.001
LDH	-----	-----	-0.709	0.0001

n.s.: valor no significativo. Coef.: Coeficiente de Pearson; TBARS: productos de reacción con ácido tiobarbitúrico; 8-OHdG: 8-hidroxi-2-oxiguanosina; GSH: glutatión reducido; GSHpx: actividad glutatión peroxidasa; TAC: capacidad antioxidante total; 3-NTy: 3-nitrotirosina.



5. DISCUSIÓN



Los resultados obtenidos en el estudio *in vitro* muestran que los principales polifenoles del aceite de oliva virgen extra (AOVE) interaccionan entre ellos de manera positiva en tejido cerebral de rata, mostrando un efecto citoprotector, posiblemente a través de una interacción de sus efectos antioxidantes e inhibitorios de la producción de peroxinitritos.

Se eligió el modelo de hipoxia-reoxigenación usando cortes cerebrales de rata porque se ha demostrado que, en este modelo, tiene lugar una muerte celular acompañada de un aumento del estrés oxidativo y nitrosativo (González-Correa et al., 2006; Reyes JJ et al., 2017). Esto fue demostrado también en este estudio (véase apartado de resultados).

Es conocido que los polifenoles del aceite de oliva virgen extra, en especial el hidroxitirosol, ejercen efectos citoprotectores en varios tejidos y modelos experimentales (Cabrerizo et al., 2013; Echeverría et al., 2017; Pan et al., 2013; Tejada et al., 2017). Estos efectos son debidos a diversos mecanismos de acción, pero se asume que los efectos antioxidantes ya demostrados son la principal causa de estos efectos (Beccari et al., 2020). En el modelo experimental utilizado en este estudio, se ha confirmado la inhibición de la peroxidación lipídica en tejido cerebral por parte de hidroxitirosol, tirosol, oleocantal y 3,4-dihidroxifenilglicol (Tabla 4.6. y Figura 4.5.), presentando el siguiente orden creciente de potencia antiperoxidativa:

$$\text{Hidroxitirosol} > \text{Oleocantal} \geq 3,4\text{-dihidroxifenilglicol} > \text{Tirosol}$$

En cuanto al orden creciente del efecto inhibitorio en la producción del peroxinitrito (Tabla 4.6. y Figura 4.6.) fue el siguiente:

$$3,4\text{-Dihidroxifenilglicol} > \text{Hidroxitirosol} \geq \text{Tirosol} \geq \text{Oleocantal}$$

En primer lugar, quisimos verificar la hipótesis general del estudio: el efecto citoprotector del hidroxitirosol no puede explicar por sí solo el efecto citoprotector global del aceite de oliva virgen extra sin tener en cuenta la participación del resto de polifenoles. Para demostrar esa aseveración, incubamos los cuatro polifenoles en la misma proporción en la que se encuentran en el aceite de oliva virgen extra, simulando aceites de bajo, medio y elevado contenido en polifenoles, y comparamos sus efectos con los ejercidos por hidroxitirosol de manera independiente en la misma proporción. Pudimos observar que,

en todos los casos, el hidroxitirosol demostró un menor efecto citoprotector y antioxidante de manera independiente que la combinación de todos los polifenoles, incluido el hidroxitirosol en dicha mezcla, a excepción de la inhibición de la producción de peroxinitritos, en el que parece ser que el hidroxitirosol es el principal responsable. (Figura 4.3.). Además, se confirmó que la combinación de los distintos polifenoles explica mejor el efecto citoprotector del aceite de oliva virgen extra que el hidroxitirosol por sí solo (Figura 4.1.).

Los cuatro polifenoles demostraron ejercer un efecto citoprotector de manera independiente en este modelo experimental, aunque el hidroxitirosol y el oleocantal demostraron una mayor potencia en dicho efecto, si lo comparamos con el tirosol y el 3,4-dihidroxifenilglicol. Usando el mismo modelo, este efecto ya ha sido demostrado anteriormente para hidroxitirosol (Cabrerizo et al., 2013; Guerrero et al., 2012; González-Correa et al., 2006; Reyes JJ et al., 2017) y tirosol (De La Cruz et al., 2015; De La Cruz et al., 2015) incubando las mismas concentraciones que en el presente estudio. El oleocantal ha demostrado ejercer un efecto neuroprotector en células neuron-like-SH-SY5Y inducido con H₂O₂ en una proporción similar a la obtenida en nuestro estudio y con concentraciones similares (Giusti et al., 2018). Otro estudio demostró un efecto neuroprotector del oleocantal en modelo experimental de Alzheimer (Grewal et al., 2020) Revisando la literatura disponible, no encontramos estudios que demuestren un efecto neuroprotector del 3,4-dihidroxifenilglicol en el mismo rango cuantitativo que se encuentra en el aceite de oliva virgen extra.

Es indiscutible que el efecto antioxidante juega un papel fundamental en el perfil neuroprotector de los compuestos estudiados, pero existen otros mecanismos que posiblemente tengan un papel más o menos importante y más o menos relacionado con la inhibición del estrés oxidativo cerebral, como es un efecto antiinflamatorio (Bucciantini et al., 2021). Como se puede observar en la Tabla 4.6., a excepción del 3,4-dihidroxifenilglicol, existe una relación paralela entre los valores de la IC₅₀ para la inhibición de la peroxidación lipídica, la formación de peroxinitrito y producción de LDH.

Desde un punto de vista farmacológico, el 3,4-dihidroxifenilglicol y el oleocantal aumentan el efecto citoprotector del hidroxitirosol, mientras que el tirosol lo disminuye.

El tirosol ha demostrado ejercer un menor efecto citoprotector *in vitro* (De La Cruz et al., 2015), mientras que *ex vivo* se asemeja al del hidroxitirosol (De La Cruz et al., 2015). Una posible explicación es que, en condiciones *in vitro*, el tirosol actúa utilizando el mismo mecanismo de acción que el hidroxitirosol, pero con mucha menor potencia, lo que lo convertiría en un agonista parcial, lo que significa que se comporta como un compuesto con un efecto citoprotector débil cuando se usa de manera independiente y en un inhibidor del efecto del hidroxitirosol cuando evaluamos el efecto conjunto en el tejido cerebral. En estos casos, cuando elevadas concentraciones de un agonista parcial se incuban con un agonista, el primero pasa a comportarse como un antagonista. En los experimentos llevados a cabo en este estudio, se demostró que el tirosol tendía a inhibir los efectos del hidroxitirosol como antioxidante e inhibidor de la producción de peroxinitrito, especialmente a concentraciones elevadas, lo que podría explicar parcialmente la hipótesis antes planteada. Además, se ha descrito que, en experimentos *ex vivo*, parte del tirosol es transformado en hidroxitirosol en el hígado (Rodríguez-Morató et al., 2017), lo que podría también explicar el mayor efecto neuroprotector que presenta en este tipo de experimentos.

El 3,4-dihidroxifenilglicol aumenta el efecto citoprotector del hidroxitirosol, posiblemente debido a un aumento en su efecto en la producción de peroxinitrito, teniendo en cuenta que su efecto antioxidante sólo se ve aumentado con la concentración más baja (Tabla 4.7.). En el aceite de oliva virgen extra, la concentración de 3,4-dihidroxifenilglicol es aproximadamente el 10% de la concentración de hidroxitirosol (Fernández-Prior et al., 2020). Si extrapolamos los resultados del flujo de LDH con 100 μ M de hidroxitirosol y 10 μ M de 3,4-dihidroxifenilglicol, podemos observar que el hidroxitirosol reduce esta variable un 63%, 3,4-dihidroxifenilglicol un 9% y la combinación de ambos un 70%. Un efecto sinérgico entre ambos polifenoles se ha demostrado a nivel de la función plaquetaria y de la peroxidación lipídica *in vitro* (Rubio-Senent et al., 2015).

Respecto a oleocantal, hemos comprobado un efecto sinérgico sobre las acciones citoprotectoras y antioxidantes del hidroxitirosol, aunque el oleocantal no modificó el efecto del hidroxitirosol sobre la producción del peroxinitrito. Se ha demostrado que el oleocantal ejerce un efecto inhibitorio sobre la enzima ciclooxigenasa tipo 1 y 2 (COX-1 y COX-2) (Beauchamp et al., 2005) lo que podría, indirectamente, disminuir la

producción de peróxidos lipídicos y promover el efecto citoprotector del hidroxitirosol. Algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos tienen efectos similares, especialmente aquellos que inhiben ambos tipos de ciclooxigenasas o especialmente la ciclooxigenasa tipo 2 (López-Villodres et al., 2012).

A través de un análisis farmacológico, los resultados de este estudio demuestran que los polifenoles del aceite de oliva virgen extra 3,4-dihidroxifenilglicol y oleocantal incrementan el efecto citoprotector del hidroxitirosol, lo que no se había demostrado anteriormente. No obstante, este estudio presenta una limitación fundamental atendiendo a las concentraciones utilizadas. Nuestra intención fue evaluar la existencia de estas interacciones, pero sería necesario llevar a cabo los mismo experimentos usando las concentraciones a las que estos polifenoles se encuentran en el tejido cerebral tras la administración oral del aceite de oliva virgen extra con un alto contenido de polifenoles.

En el estudio *ex vivo* se pudo observar que el 3,4-dihidroxifenilglicol ejerce un efecto neuroprotector en un modelo experimental de diabetes tipo 1. Por otro lado, la asociación de 3,4-dihidroxifenilglicol e hidroxitirosol, en proporciones similares a las que podemos encontrar en el aceite de oliva virgen extra, puede incrementar el efecto de ambos polifenoles en comparación a su administración de manera independiente. Este efecto es principalmente debido a un efecto antioxidante y anti-estrés nitrosativo en tejido cerebral sometido al modelo de hipoxia-reoxigenación y a un descenso en el estrés nitrosativo a nivel de la retina (Tabla 4.14.).

En los experimentos *in vitro* de la primera parte de esta tesis, hemos demostrado que la incubación del hidroxitirosol junto con el 3,4-dihidroxifenilglicol mejoraba el efecto neuroprotector en el modelo de hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales de ratas normoglucémicas, relacionándose este efecto con una acción antioxidante e inhibidora del estrés nitrosativo. Una de las principales aportaciones de la segunda parte de este estudio es que analizamos la interacción entre ambos polifenoles en un modelo experimental de diabetes, en el que ya se conocía que se produce un aumento del estrés oxidativo y nitrosativo cerebral. Además, también observamos una gran sensibilidad del tejido cerebral al daño en el modelo de hipoxia-reoxigenación (González-Correa et al., 2006). En este mismo modelo, también se demostró un efecto neurotóxico en las células nerviosas de la retina, el cual también participará en el desarrollo de la retinopatía

diabética, así como en el daño vascular a largo plazo que se produce en la diabetes mellitus.

Resultados publicados previamente confirmaron los efectos antioxidantes y neuroprotectores del hidroxitirosol en el mismo modelo experimental de hipoxia reoxigenación (Reyes JJ et al., 2017; Cabrerizo et al., 2013). En estos estudios, la incubación de concentraciones crecientes de hidroxitirosol en cortes cerebrales de ratas sanas, la administración oral de hidroxitirosol también a ratas sanas (Cabrerizo et al., 2013) y su uso en un modelo *ex vivo* de diabetes tipo 1 experimental (Reyes JJ et al., 2017) ejerció un efecto neuroprotector (disminución del eflujo de LDH cerebral), junto a un efecto inhibitorio en la formación de peróxidos lipídicos (TBARS) y peroxinitritos (3-nitrotirosina) en tejido cerebral sometido al mismo modelo de hipoxia-reoxigenación. Estos resultados coinciden con aquellos que hemos obtenido en este mismo estudio. Igualmente, en experimentos *ex vivo* (Reyes JJ et al., 2017; Cabrerizo et al., 2013) se observó una débil influencia del hidroxitirosol en el sistema antioxidante endógeno del glutatión, como asimismo hemos observado en el presente trabajo.

Como se recogía en el apartado de resultados en relación con el planteamiento del estudio experimental *ex vivo*, la premisa previa para ese tipo de estudio era la siguiente:

Una asociación de polifenoles que aportase resultados positivos en la primera fase del estudio y que disponible para su administración oral. En este caso, se concluyó que 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) y oleocantal eran los dos polifenoles que potenciaban el efecto neuroprotector y antioxidante de hidroxitirosol, no así el tirosol. La administración oral durante dos meses de oleocantal se hacía incompatible con la disponibilidad y coste del producto, por lo que decidimos utilizar la asociación HT + DHPG. A continuación, se discuten el planteamiento realizado para la elección de dosis, los antecedentes sobre las propiedades de 3,4-dihidroxifenilglicol y los resultados de su asociación con hidroxitirosol.

La importancia del efecto antioxidante del hidroxitirosol en el efecto neuroprotector, como se puede observar en este estudio, fue previamente establecida en otros modelos experimentales. El uso del hidroxitirosol a una dosis de 5 mg/kg/día se basó en estudios anteriores usando este modelo experimental (Cabrerizo et al., 2013). La dosis del 3,4-dihidroxifenilglicol se eligió en base a la composición de los diferentes tipos

de aceite de oliva virgen extra en un ratio 3,4-dihidroxifenilglicol / hidroxitirosol entre 1/10 (5+0.5 mg/kg/día) y 1/5 (5+1 mg/kg/día) (Medina et al., 2006).

En cuanto a los resultados obtenidos con el 3,4-dihidroxifenilglicol, se había demostrado previamente que este compuesto presenta un efecto antioxidante en matrices hidrofílicas (Fernández-Prior et al., 2021), cultivos de monocitos THP-1 (Fernández-Prior et al., 2021) y microsomas hepáticos de ratas (Rubio-Senent et al., 2015) así como en los experimentos obtenidos en la primera parte de esta tesis. Asimismo, se ha demostrado previamente un efecto antiinflamatorio en monocitos THP-1 (Fernández-Prior et al., 2021). Nuestro estudio demuestra que el 3,4-dihidroxifenilglicol ejerce en tejido cerebral un efecto antioxidante tras su administración oral a animales diabéticos. Estos efectos están relacionados con los efectos neuroprotectores del 3,4-dihidroxifenilglicol demostrados en el modelo de hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales de rata, un efecto que ya hemos demostrado en los experimentos *in vitro* en animales normoglucémicos.

Cuando el hidroxitirosol y el 3,4-dihidroxifenilglicol se asociaron en la proporción en la que lo encontramos en los diferentes tipos de aceite de oliva virgen extra, los perfiles antioxidantes y neuroprotectores de ambos polifenoles se vieron mejorados. Este efecto sinérgico había sido previamente demostrado en estudios *in vitro* en la agregación plaquetaria (de Roos et al., 2011; Ayuso et al., 2017) y en cortes cerebrales de ratas normoglucémicas en la primera fase de nuestro estudio.

Una explicación a este efecto beneficioso, basado en asociar ambos polifenoles, podría venir dada a través de las correlaciones estadísticas que se pueden observar entre los dos parámetros más implicados en la muerte neuronal en este modelo experimental y la determinación de las variables bioquímicas relacionadas con el estrés nitrosativo y el oxidativo (Tabla 4.14.). Pudimos observar una clara relación entre los valores de LDH (marcador indirecto de muerte celular), el porcentaje de la retina ocupado por células y las variables relacionadas con el estrés nitrosativo y oxidativo. Este resultado establece la gran importancia de estos mecanismos de daño celular con la pérdida celular en el tejido nervioso de animales sometidos a este modelo experimental de diabetes. Dado que ambos polifenoles son claramente compuestos antioxidantes, podría ser que este efecto se viera involucrado en los mayores efectos neuroprotectores que ejercen ambos polifenoles de manera separada.

Previamente se han descrito efectos neuroprotectores de otros compuestos bioactivos en modelos experimentales relacionados con la isquemia, como flavonoides, vitaminas y otros polifenoles (Ayuso et al., 2017; Chen et al., 2020; Oh et al., 2016). La mayoría de estos modelos demostraron un efecto protector en el tejido cerebral para daño isquémico, tanto cuando los compuestos se administraron por vía intravenosa (fase aguda del modelo experimental de infarto cerebral) o por vía oral. Por un lado, los efectos de estos compuestos están relacionados con su capacidad para inhibir el estrés oxidativo, nitrosativo y la neuroinflamación; en cambio, los resultados finales podrían ser una combinación de las acciones a nivel vascular y del tejido nervioso por sí mismo. Además, la posibilidad de adaptar las dosis administradas del modelo experimental a humanos no fue investigada en la mayoría de los estudios previos. Este estudio, utilizando un modelo *in vitro* de hipoxia-reoxigenación en tejido cerebral, descartó los posibles efectos vasculares de los compuestos empleados, por lo que el efecto neuroprotector observado fue debido a una acción directa sobre el tejido nervioso. Estos resultados coinciden con la primera parte de este trabajo en lo relacionado con la importancia de inhibir el estrés oxidativo y nitrosativo en la neuroprotección ejercida por el hidroxitirosol y el 3,4-dihidroxifenilglicol.

La extrapolación de estos resultados a los humanos debería ser estudiada en estudios posteriores. La demostración de sinergia entre los polifenoles, permitirá obtener un aceite de oliva enriquecido, de menor coste y con mayor facilidad para ser incorporado a la dieta mediterránea, que ha demostrado su utilidad en la prevención de la isquemia cerebral.

Una limitación de esta parte del estudio es la relacionada con las dosis administradas de los compuestos. La mayor parte de los estudios en los que el aceite de oliva virgen extra fue administrado para analizar sus posibles efectos beneficiosos en la enfermedad cardiovascular recomendaron el uso de 40-50 mL de aceite de oliva virgen extra al día (Martínez-González et al., 2015), lo que supone una ingesta diaria de aproximadamente 1.5-2.0 mg al día de hidroxitirosol. En este estudio, se administraron 5 mg/kg/día porque, aunque no fue posible demostrar un efecto neuroprotector en ratas con dosis menores, un efecto en los biomarcadores cardíacos sí que fue demostrado con 0.5 y 1 mg/kg/día de hidroxitirosol por vía oral (Cabrerizo et al., 2013). Usando polifenoles como moléculas extraídas de los productos naturales que los contienen, su efecto

biológico es siempre observado a dosis más elevadas (proporcionalmente) que cuando están contenidos en el producto original. Un fenómeno similar ocurre en el caso del hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol, y los resultados obtenidos podrían servir como base para un posible enriquecimiento del aceite de oliva virgen con el objeto de incrementar sus efectos beneficiosos a nivel del tejido nervioso en la diabetes mellitus.

Otra limitación de este estudio es la falta de análisis de otros mecanismos que podrían participar en los efectos neuroprotectores del 3,4-dihidroxifenilglicol en la diabetes mellitus. Uno de nuestros futuros objetivos es estudiar estos efectos en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 para analizar cualquier posible influencia de ambos polifenoles en el metabolismo de la glucosa, lo que podría explicar posibles mecanismos adicionales subyacentes a esta asociación en diabetes, ya que estos efectos han sido previamente descritos para el hidroxitirosol y otros polifenoles naturales en modelos experimentales de diabetes mellitus tipo 2 (Ahangarpour et al., 2019).

Teniendo en cuenta los resultados arrojados en este estudio, los dos compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra empleados no modifican el perfil metabólico en el modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1, por lo tanto, su uso podría ser propuesto como un complemento al tratamiento principal (insulina, dieta, ejercicio físico) con el fin de prevenir la aparición y el desarrollo de neuropatía diabética. En la diabetes mellitus tipo 2, al menos el hidroxitirosol ha demostrado un posible efecto hipoglucémico, por lo que en este tipo de diabetes podría ser administrado, además de para prevenir alteraciones neuropáticas, como una ayuda al tratamiento del proceso metabólico por sí mismo.

6. CONCLUSIONES



Del análisis pormenorizado de los resultados obtenidos en el presente estudio, hemos extraído las siguientes conclusiones:

1. La incubación conjunta de concentraciones de hidroxitirosol, oleocantal, 3,4-dihidroxifenilglicol y tirosol, en la misma proporción de la que se encuentran en el aceite de oliva virgen extra, produjo efectos neuroprotectores y antioxidantes mayores que hidroxitirosol solo.
2. 3,4-dihidroxifenilglicol y oleocantal incrementaron el efecto neuroprotector y antioxidante de hidroxitirosol.
3. Hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol ejercieron un efecto neuroprotector en cortes cerebrales de rata y en las retinas de los animales diabéticos.
4. La administración de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol a animales sometidos a un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 ejerció un efecto neuroprotector sobre los cortes de cerebro sometidos a hipoxia-reoxigenación y sobre la retina. Su asociación con las mismas proporciones encontradas en el aceite de oliva virgen extra mejoró los efectos neuroprotectores y antioxidantes de ambos polifenoles.
5. La neuroprotección ejercida de ambos polifenoles, administrados solos o asociados, se correlacionó con la reducción del estrés oxidativo y nitrosativo.



7. BIBLIOGRAFÍA



Adams Jr HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke. 1993; 24: 35-41.

Ahangarpour A, Sayahi M, The antidiabetic, and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. Diabetes Metab. Syndr. 2019; 13: 854-857.

Ay H, Furie KL, Singhal A, Smith WS, Sorensen AG, Koroshetz WJ. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. Ann Neurol. 2005; 58(5): 688-697.

Ayuso MI, Gonzalo-Gobernado R, Montaner J. Neuroprotective diets for stroke. Neurochem. Int. 2017; 107: 4-10.

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. Nature. 2005; 437: 45-46.

Beccari T, Michelini S. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. J. Biotechnol. 2020; 309: 29-33.

Bertelli M, Kiani AK, Paolacci S, Manara E, Kurti D, Dhuli K, Bushati V, Miertus J, Pangallo D, Baglivo M, Beccari T, Michelini S. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. J Biotechnol. 2020; 309: 29-33.

Bianchi G, Pozzi N. 3,4-dihydroxyphenylglycol, a major C₆-C₂ phenolic in *Olea europea* fruits. Phytochemistry. 1994; 35(5): 1335-1337.

Binou P, Stergiou A, Kosta O, Tentolouris N, Karathanos VT. Positive contribution of hydroxytyrosol-enriched wheat bread to HbA_{1c} levels, lipid profile, markers of

inflammation and body weight in subjects with overweight/obesity and type 2 diabetes mellitus. *Eur J Nutr.* 2023. doi: 10.1007/s00394-023-03133-9.

Boccio P, DiDeo A, De Curtis A, Celli N, Iacoviello L, Rotilio D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. *J Chromatogr B.* 2003; 785:47–56.

Bucciantini M, Leri M, Nardiello P, Casamenti F, Stefani M. Olive polyphenols: Antioxidant and anti-inflammatory properties. *Antioxidants.* 2021; 10: 1044.

Cabrerizo S, De La Cruz JP, López-Villodres JA, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24: 2152-2157.

Chen H, He Y, Chen S, Qi S, Shen J. Therapeutic targets of oxidative/nitrosative stress and neuroinflammation in ischemic stroke: Applications for natural product efficacy with omics and systemic biology. *Pharmacol. Res.* 2020; 158: 104877.

Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39(7): 841-852.

De La Cruz JP, Ruiz Moreno MI, Guerrero A, López-Villodres JA, Reyes JJ, Espartero JL, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *J. Nutr. Biochem.* 2015; 26: 549-555.

De La Cruz JP, Ruiz Moreno MI, Guerrero A, López-Villodres JA, Reyes JJ, Benitez-Guerreo A, Espartero JL, González-Correa JA. Differences in the neuroprotective effect of orally administered virgin olive oil (*Olea europaea*) polyphenols tyrosol and hydroxytyrosol in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63: 5957-5963.

Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Hydroxytyrosol and cytoprotection: A projection for clinical interventions. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 930.

Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A. Production in large quantities of highly purified hidroxitirosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “Alperujo”. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 6804-6811.

Fernández-Prior A, Bermúdez-Oria A, Millán-Linares MDC, Fernández-Bolaños J, Espejo-Calvo JA, Rodríguez-Gutiérrez G. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Purified from Table Olive Effluents. *Foods.* 2021; 10: 227.

Fernández-Prior MA, Fatuarte JCP, Oria AB, Viera-Alcaide I, Fernández-Bolaños J, Rodríguez-Gutiérrez G. New liquid source of antioxidant phenolic compounds in the olive oil industry: Alperujo water. *Foods.* 2020; 9: 962.

Feske SK. Ischemic Stroke. *Am. J. Med.* 2021;134:1457-1464.

Galmés S, Reynés B, Palou M, Palou-March A, Palou A. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Main Olive Tree Phenols and Polyphenols: A Literature Review. *J Agric Food Chem.* 2021; 69: 5281-5296

García A, Rodríguez-Juan E, Rodríguez-Gutiérrez G, Ríos JJ, Fernández-Bolaños J. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food chemistry.* 2016; 197 (A): 554-561.

Gariballa SE, Hutchin TP, Sinclair AJ. Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke. *QJM.* 2002; 95(10): 685-690.

Gantenbein KV, Kanaka-Gantenbein C. Mediterranean Diet as an Antioxidant: The Impact on Metabolic Health and Overall Wellbeing. *Nutrients.* 2021; 13 (6): 1951.

Giusti L, Angeloni C, Barbalace MC, Lacerenza S, Ciregia F, Ronci M, Urbani A, Manera C, Digiacoio M, Macchia M et al. A proteomic approach to uncover neuroprotective mechanisms of oleocanthal against oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 2329.

González-Correa JA, Arrebola MM, Cansino AL, Muñoz-Marín J, Ruiz-Villafranca D, Guerrero A, Sánchez de la Cuesta F, De La Cruz JP. Effects of hypoxia reoxygenation in brain slices from rats with type 1-like diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2006; 22: 390-400.

Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(3): 686.

Guerrero A, De La Cruz JP, Muñoz-Marín J, López-Villodres JA, Madrona A, Espartero JL, González-Correa JA. Neuroprotective effect of alkyl hydroxytyrosyl ethers in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation model. *Food Chem.* 2012; 134: 2176-2183.

Hernández A, Jaramillo S, García-Borrego A, Espejo-Calvo JA, Covas MI, Blanchart G, de la Torre R, Carrasco-Pancorbo A, Mesa MD, Fernández-Prior MA, et al. From Green Technology to Functional Olive Oils: Assessing the Best Combination of Olive Tree-Related Extracts with Complementary Bioactivities. *Antioxidants.* 2021; 10: 202.

Iacono A, Gómez R, Sperry J, Conde J, Bianco G, Meli R, Gómez-Reino JJ, Smith III AB, Gualillo O. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis Rheum.* 2010; 62: 1675-1682.

Karković Marković A, Torić J, Barbarić M, Jakobušić Brala C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules.* 2019; 24(10): 2001.

Khanal P, Oh WK, Jeong Yun H, Namgoong GM, Ahn SG, Kwon SM, Choi HK, Seok Choi H. *p*-HPEA-EDA, a phenolic compound of virgin olive oil, activates AMP-activated protein kinase to inhibit carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2011; 32 (4): 545-553.

Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke. Present Status and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21, 7609.

Li W, Jeffrey B, Sperry B, Crowe A, Trojanowski JQ, Smith III AB, Lee VM. Inhibition of tau fibrillation by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau. *Neurochemistry*. 2009; 110 (4): 1339-1351.

López-Villodres JA, De La Cruz JP, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, González-Correa JA. Cytoprotective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in rat brain slices subjected to reoxygenation after oxygen-glucose deprivation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012; 45: 624-631.

Martín F, Tarducci ME, Tabares SM, Martí JJ, Sembaj A. Aplicación de los sistemas TOAST y CCS en el diagnóstico de accidente cerebrovascular isquémico. *Rev Neurol Neurocir Psiquiat.* 2019; 47 (1): 22-28.

Martins BT, Bronze MR, Ventura MR. Phenolic Compounds from Virgin Olive Oil: Approaches for Their Synthesis and Analogues. *J Agric Food Chem.* 2022; 70: 14109-14128.

Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E, Predimed Investigators. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2015; 58: 50-60.

Medina E, de Castro A, Romero C, Brenes M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 4954-4961.

Moral R, Escrich E. Influence of Olive Oil and Its Components on Breast Cancer: Molecular Mechanisms. *Molecules*. 2022; 27: 477.

Nasrallah H, Aissa I, Slim C, Boujbiha MA, Zaouali MA, Bejaoui M, Wilke V, Jannet HB, Mosbah H, Abdennebi HB. Effect of oleuropein on oxidative stress, inflammation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Life Sciences*. 2020; 255: 117833.

Nikou T, Sakavitsi ME, Kalampokis E, Halabalaki M. Metabolism and Bioavailability of Olive Bioactive Constituents Based on In Vitro, In Vivo and Human Studies. *Nutrients*. 2022; 14: 3773.

Oh, YS. Bioactive Compounds and Their Neuroprotective Effects in Diabetic Complications. *Nutrients*. 2016; 8: 472.

Omar SH. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm J*. 2010;18(3):111-121.

Pan S, Liu L, Pan H, Ma Y, Wang D, Kang K, Wang J, Sun B, Sun X, Jiang H. Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice. *Mol. Nutr. Food Res*. 2013; 57: 1218-1227.

Pedan V, Popp M, Rohn S, Nyfeler M, Bongartz A. Characterization of phenolic compounds and their contribution to sensory properties of olive oil. *Molecules*. 2019; 24: 2041.

Pojero F, Aiello A, Gervasi F, Caruso C, Ligotti ME, Calabrò A, Procopio A, Candore G, Accardi G, Allegra M. Effects of Oleuropein and Hydroxytyrosol on Inflammatory Mediators: Consequences on Inflammaging. *Int J Mol Sci*. 2022; 24:380.

Pradeep H, Diya J, Shashikumar S, Rajanikant G. Review paper Oxidative stress – assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol*. 2012; 50(3): 219-230.

Purroy F, Montalà N. Epidemiología del ictus en la última década: revisión sistemática. *Rev Neurol.* 2021; 73 (09): 321-336.

Reyes JJ, Villanueva B, López-Villodres JA, De La Cruz JP, Romero L, Rodríguez-Pérez MD, Rodríguez-Gutiérrez G, Fernández-Bolaños J, González-Correa JA. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol in experimental diabetes mellitus. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65: 4378-4383.

Rodríguez G, Lama A, Trujillo M, Espartero JL, Fernández-Bolaños J. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europea* fruit-mill waste: 3,4-dihydroxyphenylglycol. *Food Sci Technol.* 2009; 42(2): 483-490.

Rodríguez G, Rodríguez R, Fernández-Bolaños J, Guillén R, Jiménez A. Antioxidant activities of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol from olive oil waste. *Eur Food Res Technol.* 2007; 224: 733-742.

Rodríguez-Gutiérrez G, Duthie GG, Wood S, Morrice P, Nicol F, Reid M, Cantlay LL, Kelder T, Fernández-Bolaños J, de Roos B. Alperujo extract, hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin-E deficient rats—a proteomics and network analysis approach. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012; 56: 1137–1147

Rodríguez-Gutiérrez G, Wood S, Fernández-Bolaños Guzmán J, Duthie GG, de Roos B. Determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, hydroxytyrosol and tyrosol purified from olive oil by-products with HPLC in animal plasma and tissues. *Food Chem.* 2011; 126 (4): 1948-1952.

de Roos B, Zhang X, Rodríguez-Gutiérrez G, Wood S, Rucklidge GJ, Reid MD, Duncan GJ, Cantlay LL, Duthie GG, O'Kennedy N. Anti-platelet effects of olive oil extract: In vitro functional and proteomic studies. *Eur. J. Nutr.* 2011; 50: 553-562.

Rubio-Senent F, de Roos B, Duthie G, Fernández-Bolaños J, Rodríguez-Gutiérrez G. Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *Eur. J. Nutr.* 2015; 54: 1287-1295.

Satué, E, Vila-Corcoles, A, Ochoa-Gondar, O, Diego, C, Forcadell, M.J, Rodríguez-Blanco, T, Barnes, L, Jarrod, M. Incidence and risk conditions of ischemic stroke in older adults. *Acta Neurologica Scandinavica.* 2016; 134: 250 - 257.

Scotece M, Gómez R, Conde J, Lopez V., Gómez-Reino JJ, Lago F, Smith AB, Gualillo O. Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: Inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sci.* 2012; 91: 1229–1235

Tan HW, Tuck KL, Stupans I, Hayball PJ. Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B.* 2003; 785:187–191

Tejada S, Pinya S, Del Mar Bibiloni M, Tur JA, Pons A, Sureda A. Cardioprotective effects of the polyphenol hydroxytyrosol from olive oil. *Curr. Drug Targets.* 2017; 18: 1477-1486.

Tiwari SK, Mishra P, Rajavashisth T. Capítulo 2: Inflammation, Oxidative Stress and Cerebral Stroke: Basic Principles. En: *Advancement in the Patophysiology of Cerebral Stroke.* Patnaik R, Tripathi AK. 1ª Edición. 2019. Springer Singapore.

Vena AB, Cabré X, Pinol R, Molina J, Purroy F. Evaluación de la incidencia y tendencia de la enfermedad cerebrovascular en la región sanitaria de Lleida (España) en el periodo 2010-2014. *Neurología.* 2022; 37: 631-638.

Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247 (1):60-4.

Visioli F, Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des.* 2011; 17 (8):786-804.



ANEXOS



ANEXO 1

Financiación: este estudio ha sido financiado, en parte, por la Consejería de Salud. Junta de Andalucía, Proyectos de Investigación en Salud [Ministerio de Salud Regional. Junta de Andalucía, Proyectos de investigación en salud]. (PI-0129-2017).



ANEXO II

Los artículos publicados asociados a esta tesis doctoral han sido los siguientes:

1. De La Cruz Cortés JP, Pérez de Algaba I, Martín-Aurioles E, Arrebola MM, Ortega-Hombrados L, Rodríguez-Pérez MD, Fernández-Prior MÁ, Bermúdez-Oria A, Verdugo C, González-Correa JA. Extra Virgin Oil Polyphenols Improve the Protective Effects of Hydroxytyrosol in an In Vitro Model of Hypoxia-Reoxygenation of Rat Brain. *Brain Sciences*. 2021; 11(9):1133. <https://doi.org/10.3390/brainsci11091133>
2. Rodríguez-Pérez MD, Pérez de Algaba I, Martín-Aurioles E, Arrebola MM, Ortega-Hombrados L, Verdugo C, Fernández-Prior MÁ, Bermúdez-Oria A, De La Cruz JP, González-Correa JA. Neuroprotective Effect of 3',4'-Dihydroxyphenylglycol in Type-1-like Diabetic Rats—Influence of the Hydroxytyrosol/3',4'-dihydroxyphenylglycol Ratio. *Nutrients*. 2022; 14(6):1146. <https://doi.org/10.3390/nu14061146>



ANEXO III

Documento de aceptación del protocolo del estudio por el Comité de Experimentación de la Universidad de Málaga





INFORME Nº: 69
ANEXO VIII

INFORME DEL ORGANO HABILITADO (Art. 34 del RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia)

D. Ricardo González Carrascosa Latín, como Secretario del Órgano Habilitado Comité Ético de Experimentación Animal de Universidad de Málaga

DECLARA:

1. Que el siguiente proyecto (Título del proyecto):

Efecto sinérgico de compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la inflamación vascular en diabetes.

2. Que tiene una duración de:

3 Años

36 Meses

3. Que está realizado por (Datos del investigador principal o persona responsable):

Apellidos: González Correa

Nombre: Jose Antonio

Categoría (s) (según RD 1201/2005): B y C

Fecha acreditación: (26/07/2006)

Centro/Facultad/Empresa, Dpto, Dirección, Código Postal, Ciudad, Teléfono, Fax, E-Mail
Departamento Farmacología y Pediatría. Facultad de Medicina.

Bulevard Louis Pasteur, 32

29010 Málaga. MÁLAGA

Tel.: 952131569

Correo E.: correa@uma.es



INFORME N°: 69

4. Que ha sido evaluado con un nivel de detalle apropiado al tipo de proyecto y la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los siguientes requisitos de acuerdo al artículo 34 del RD 53/2013:

- a) Está justificado desde el punto de vista científico o educativo, o debe realizarse por imposición legal o reglamentaria;
- b) su finalidad justifica la utilización de animales; y
- c) está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible

5. Que ha sido revisado basándose en las reuniones internas desarrolladas por el Órgano Habilitado de Universidad de Málaga en las siguientes fechas:

Reunión 37ª del 12/05/2018

Acta N° 37 del 12/05/2018

Y

Reunión 40ª del 31/08/2018

Acta N° 40 del 31/08/2018

N° expediente 31-2018-A

6. Que el proceso de evaluación ha sido transparente, se ha realizado de modo imparcial, pudiendo integrar la opinión de partes independientes (según el apartado 3 del artículo 34 del RD 53/2013).
7. Que ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.
8. Que basándose en la documentación presentada por el investigador responsable se ha realizado la siguiente EVALUACIÓN:

Evaluación de su finalidad, de los beneficios científicos que se prevén alcanzar o de su valor docente

Favorable

Evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento

Favorable



INFORME Nº: 69

Evaluación y clasificación de sus procedimientos en función del grado de severidad:

Procedimiento nº 1: Modelo inducido de diabetes mediante inoculación de estreptozotocina y tratamiento con compuestos fenólicos de aceite de oliva.

Evaluación: **Favorable**

Clasificación: Moderado

Análisis de los daños y beneficios, para determinar si los daños, el sufrimiento, el dolor y la angustia que se les puedan causar a los animales están justificados por los resultados esperados, teniendo en cuenta consideraciones éticas y los beneficios que, en definitiva, pueda suponer el proyecto para los seres humanos, los animales o el medio ambiente:

Favorable

Examen de las situaciones y excepciones previstas en los artículos 6, 7, 9.1, 19, 20, 21, 22, 23, 25.3, 25.5, 26 y 29 del RD 53/2013:

Situaciones: La investigadora Ana Vázquez Pérez no posee la acreditación necesaria para realizar procedimientos de experimentación animal.

Excepciones: Colaborará en el procedimientos clasificados como leves, siempre bajo supervisión del Dr. José A. González Correa y M^a Dolores Rodríguez Pérez. Artículo 25.5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable. El periodo máximo hasta que consiga su acreditación es 6 meses.

Determinación de si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva y, en su caso, cuando debería realizarse

Motivación de la evaluación retrospectiva:

No procede

Resultado:

X No

Periodo de realización (en caso afirmativo): No procede

Documentación para realizar la evaluación retrospectiva (en caso afirmativo):

No procede



INFORME Nº: 69

CONFIRMO:

1. Que el proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.
2. Que el proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, por lo anteriormente expuesto, se clasifica como:

Proyecto Tipo II

3. Que la evaluación del proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, resulta ser:

FAVORABLE

OBSERVACIONES:

4. Que este documento tiene una vigencia máxima de 5 años.

Secretario Órgano Habilitado
Nombre: Ricardo González Carrascosa Latín
Fecha: 01/08/2018
Firma:

Presidente Órgano Habilitado
Nombre: Teodomiro López Navarrete
Fecha: 01/08/2018
Firma:



INFORME CEUMA Nº 460

ANEXO IX

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO (Art. 33 del RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia)

D. Ricardo González-Carrascosa Latín, como Secretario del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga,

DECLARA:

1. Que el siguiente proyecto (título del proyecto):

Efecto sinérgico de compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la inflamación vascular en diabetes.

Con el de expediente CEUMA Nº 31-2018-A.

Investigador responsable: D. Jose Antonio González Correa.

2. Que tiene una duración de (Indicar años y meses):

3 Años

36 Meses

3. Que se llevará a cabo por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 del RD 53/2013 bajo supervisión responsable.
4. Que se realiza en un centro usuario autorizado, salvo autorización del órgano competente.
5. Que se realizará de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.
6. Que se tomarán las medidas adecuadas para minimizar el sufrimiento animal una vez conseguida la finalidad de los procedimientos.
7. Que ha sido revisado de acuerdo a la normativa vigente.
8. Que el centro donde se lleva a cabo el proyecto posee programas de aclimatación y aprendizaje adecuados para los animales según los procedimientos y la duración del proyecto.



INFORME CEUMA Nº 460

9. Que ha sido revisado basándose en las reuniones internas desarrolladas por el CEEA de Universidad de Málaga en las siguientes fechas:

Reunión 37ª del 12/05/2018

Acta Nº 37 del 12/05/2018

Y

Reunión 40ª del 31/08/2018

Acta Nº 40 del 31/08/2018

10. Que basándose en las declaraciones anteriormente expuestas

CONFIRMO:



1. Que el proyecto sometido a este informe del CEEA, una vez examinada toda la documentación presentada, se clasifica como:

FAVORABLE

OBSERVACIONES:

El CEUMA emite este informe actuando como OEBA, lo que le infiere carácter del informe al que se refiere el artículo 33.1 del Real Decreto 53/2013, no tiene efecto como evaluación de órgano habilitado. No obstante es requisito previo para la autorización por parte del órgano competente.

Una vez instruido el procedimiento, y en base a lo dispuesto en el artículo 84 de la Ley 30/92, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y Procedimiento Administrativo Común, se le da audiencia para que en un plazo de 10 días, contados a partir de la recepción/publicación del presente informe, pueda formular alegaciones y presentar los documentos y justificaciones que estime pertinentes.

Secretario CEEA	Presidente CEEA
Nombre: Ricardo González-Carrascosa Latín	Nombre: Teodomiro López Navarrete
Fecha: 01/08/2018	Fecha: 01/08/2018
Firma: 	Firma:  





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Centro de Experimentación Animal
Universidad de Málaga

Estimado/a Investigador/a,

Le comunicamos que ha sido dado de alta el Procedimiento de Experimentación Animal cuyos datos a continuación se detallan:

TÍTULO: “Efecto sinérgico de compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la inflamación vascular en diabetes”

IP: José Antonio González Correa

CÓGIGO: 2019-0007

FECHA INICIO: 14/10/19

FECHA FINALIZACIÓN: 14/10/22

ANIMALES: 250 ratas

PROYECTO DE COBRO: 806/79.3588

Este Código de Procedimiento se utilizará tanto para la adquisición de animales y su seguimiento, como para la notificación de su sacrificio en el libro de registro de salida de animales. Estará relacionado con el Proyecto al que se le cargaran los gastos derivados del uso del Centro.

Toda la gestión relacionada con los animales, su adquisición, su distribución en jaulas y habitaciones, la participación de estos animales en diferentes procedimientos experimentales, la asignación del gasto generado por los mismos a diferentes proyectos o fuentes de financiación, su cría, etc. se gestionará con el **programa informático “AniBio”** desarrollado por la empresa “noraybio”.

Ricardo González Carrascosa
Responsable del Centro de Experimentación Animal
Universidad de Málaga

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM

AENOR



Facultad de Medicina
Avd. Louis Pasteur s/n Campus de Teatinos
29010. Tel.: 952 13 42 04
E-mail- estab@uma.es

JUNTA DE ANDALUCIA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y DESARROLLO SOSTENIBLE

Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera

S A L I D A	JUNTA DE ANDALUCIA C. AGRICUL., GANAD. PESCA Y D.S.
	201999900478818 - 15/07/2019
	Registro Auxiliar SV. SANIDAD ANIMAL
	SEVILLA

Fecha: 11/07/2019

Ref.: SSA/SIS/MD/jv

Asunto: Rem. Resolución
experimentación.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA
Att. de D. José Antonio González Correa
Bulevar Louis Pasteur 32
Campus de Teatinos
29071 MALAGA

Se adjunta resolución de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, por la que se autoriza a D. José Antonio González Correa, un proyecto de experimentación animal denominado: "Efecto sinérgico de compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la inflamación vascular en diabetes".

JEFE DEL SERVICIO DE SANIDAD ANIMAL.

Fdo: Manuel Fernández Morente.

Tabladilla, s/n
Teléfono 95 5032000
41071 - Sevilla

Código:640xu765PFIRMA0w8ampLg16+Nfz2D.

Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: <https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/>

FIRMADO POR	MANUEL FERNANDEZ MORENTE	FECHA	12/07/2019
ID. FIRMA	640xu765PFIRMA0w8ampLg16+Nfz2D	PÁGINA	1/1

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y GANADERA POR LA QUE SE AUTORIZAN A D. JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ CORREA UN PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Examinada la solicitud de autorización de D. José Antonio González Correa con D.N.I. _____, para la realización de un proyecto de experimentación animal, se han apreciado los siguientes

ANTECEDENTES DE HECHO

Primero. Con fecha 28 de junio de 2019, D. José Antonio González Correa, en sus condiciones de responsables del proyecto, presentaron solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación: "Efecto sinérgico de compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la inflamación vascular en diabetes".

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el informe del Comité Ético, resumen no técnico e informe de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo. La documentación aportada acredita que el interesado tiene la titulación y formación específica para desarrollar proyectos experimentales con animales y cuenta con la capacitación específica para ello.

Tercero. El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como centro usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número ES290670001512.

Cuarto. Con fecha 1 de agosto de 2018, el Comité de Ética del centro emiten un informe favorable, conforme al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Quinto. Con fecha 1 de agosto de 2018, Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Málaga órgano habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el procedimiento cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero. El artículo 3.2 del Decreto 133/2005, de 24 de Mayo, por el que se regula la distribución de las competencias establecidas en la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de protección de los animales, entre las Consejerías de Gobernación y de Agricultura y Pesca, dispone que corresponde a la segunda "la autorización previa de toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte, prevista en el artículo 7.2 de la Ley".

Por su parte, artículo 11 del Decreto 103/2019, de 21 de enero, por el que se establece la estructura orgánica de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible prevé:

"Corresponde a la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, además de las funciones establecidas en el artículo 30 de la Ley 9/2007, de 22 de octubre, las siguientes:

- i) La ordenación y fomento de la protección y del bienestar animal".

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Código:640xu691PFIRMA16P//EuaES+Qd6Kx.

Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: <https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/>

FIRMADO POR	MANUEL GOMEZ GALERA	FECHA	10/07/2019
ID. FIRMA	640xu691PFIRMA16P//EuaES+Qd6Kx	PÁGINA	1/3

Cuarto. El artículo 19.1 del Decreto 65/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales establece:

“Todos los establecimientos cuyo objeto sea la producción, comercialización o uso de animales con fines experimentales, científicos o educativos ubicados en la Comunidad Autónoma de Andalucía, previo al inicio de la actividad, de conformidad con lo establecido en el artículo 7 de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, deberán inscribirse en el Registro Único de Ganadería de Andalucía, en la sección de Explotaciones Ganaderas de Andalucía, de conformidad con el artículo 33 y deberán contar para su inscripción con la autorización prevista en el artículo 36.1 de la Ley 8/2003, de 24 de abril”.

Quinto. El proyecto para el que se solicita la autorización ha de ser considerado dentro del tipo II, puesto que implica procedimientos clasificados como moderado y no utiliza primates. Además, el centro donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización y la persona encargada de la realización del proyecto tiene capacitación para ello. A ello se une el carácter favorable de los informes emitidos al respecto, por lo que cumpliendo con los requisitos previstos ha de procederse a su autorización y no debe someterse a evaluación retrospectiva.

En consecuencia, de conformidad con los preceptos citados y demás de general aplicación,

RESUELVO

Primero. Autorizar a, D. José Antonio González Correa, el proyecto denominado: “Efecto sinérgico de compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre la inflamación vascular en diabetes”, con un periodo de 3 años y un máximo de 5 años.

Segundo. Asignar el número 9/07/2019/124, al proyecto a los efectos de cumplir con lo requerido en el art. 41.1 del RD 53/2013 de 1 de febrero y la Decisión 2012/707/UE, sobre la regulación y transmisión de información referente al uso de los animales.

Tercero. La persona responsable de este proyecto tiene la obligación de sustituir, reducir y perfeccionar los métodos a lo largo del curso del proyecto para asegurar que cualquier cambio en la disponibilidad de alternativas están debidamente considerado y utilizado tan pronto como sea posible.

Cuarto. Autorizar a D^a Ana Vázquez Pérez, a participar con anterioridad a finalizar su total capacitación en el proyecto bajo supervisión responsable, en actuaciones o procedimientos leve o sin recuperación por periodo no superior a seis meses.

Quinto. Ordenar la notificación de la presente Resolución a la persona interesada, con indicación de que contra la misma, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponer recurso de alzada ante la Sra. Consejera de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, en el plazo de un mes contado a partir del día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación del presente acto, de conformidad con lo establecido en el artículo 121 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.

EL DIRECTOR GENERAL.

Fdo.: Manuel Gómez Galera.

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Código:640xu691PFIRMA16P//EuaES+Qd6Kx.

Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: <https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/>

FIRMADO POR	MANUEL GOMEZ GALERA	FECHA	10/07/2019
ID. FIRMA	640xu691PFIRMA16P//EuaES+Qd6Kx	PÁGINA	3/3