



**Programa de Doctorado en CIENCIAS DE LA SALUD
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Málaga**

TESIS DOCTORAL

**Influencia de la composición de tres aceites de
oliva, obtenidos por diferente procesamiento de la
aceituna, sobre la prevención de la nefropatía y
retinopatía en un modelo experimental de
diabetes.**

Laura Osuna Esteban

Málaga, octubre 2024

DIRECTORES:

José Antonio González Correa y José Pedro de la Cruz Cortés

TUTOR:

Jesús Miranda Páez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Laura Osuna Esteban

 <https://orcid.org/0009-0002-6719-6362>

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





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



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

Dña LAURA OSUNA ESTEBAN

Estudiante del programa de doctorado en 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: INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DE TRES ACEITES DE OLIVA, OBTENIDOS POR DIFERENTE PROCESAMIENTO DE LA ACEITUNA, SOBRE LA PREVENCIÓN DE LA NEFROPATÍA Y RETINOPATÍA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES.

Realizada bajo la **tutorización** de JESÚS MIRANDA PÁEZ 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 02 de octubre de 2024

Fdo.: LAURA OSUNA ESTEBAN Doctorando/a	Fdo.: JESÚS MIRANDA PÁEZ Tutor/a
Fdo.: JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ CORREA Y JOSÉ PEDRO 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 y D. JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS,
Catedráticos de Farmacología, adscritos al Departamento de Farmacología y Pediatría
de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN:

Que Dña. LAURA OSUNA ESTEBAN ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra
dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral, titulada:
“INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DE TRES ACEITES, OBTENIDOS POR DIFERENTE
PROCESAMIENTO DE LA ACEITUNA, SOBRE LA PREVENCIÓN DE LA NEFROPATÍA Y
RETINOPATÍA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES”, que consideramos tiene
el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la
Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y que la publicación en coautoría que avala la presentación de esta tesis y cuya
referencia es: De La Cruz JP, Osuna-Esteban L, Rodríguez-Pérez MD, Ortega-Hombrados
L, Sánchez-Tévar AM, Martín-Aurioles E, Fernández-Prior MÁ, Pérez-Burillo S, Espejo-
Calvo JA, González-Correa JA. Effect of a Triterpenoid-Rich Olive Oil on Chronic Kidney
Disease in an Experimental Model of Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 2024 Aug
21;16(16):2794. Doi: 10.3390/nu16162794, no ha sido utilizada en tesis anteriores ni en
la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el
presente certificado en Málaga, a 02 de octubre de 2024.

José Antonio González Correa

(Director)

José Pedro de la Cruz Cortés

(Director)





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA. Departamento de Farmacología y Pediatría

D. JESÚS MIRANDA PÁEZ, Profesor Titular del Departamento de Psicobiología y **D. JESÚS MIRANDA PÁEZ**, Profesor Titular del Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que Dña. LAURA OSUNA ESTEBAN ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: "INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DE TRES ACEITES, OBTENIDOS POR DIFERENTE PROCESAMIENTO DE LA ACEITUNA, SOBRE LA PREVENCIÓN DE LA NEFROPATÍA Y RETINOPATÍA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES", que consideramos tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y que la publicación en coautoría que avala la presentación de esta tesis y cuya referencia es: De La Cruz JP, Osuna-Esteban L, Rodríguez-Pérez MD, Ortega-Hombrados L, Sánchez-Tévar AM, Martín-Aurioles E, Fernández-Prior MÁ, Pérez-Burillo S, Espejo-Calvo JA, González-Correa JA. Effect of a Triterpenoid-Rich Olive Oil on Chronic Kidney Disease in an Experimental Model of Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 2024 Aug 21;16(16):2794. doi: 10.3390/nu16162794, no ha sido utilizada en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Málaga, a 02 de OCTUBRE de 2024.

Jesús Miranda Páez

(Tutor)





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



“Los enigmas del universo se revelan lentamente a nuestra investigación. Hay preguntas a las que el hombre, hoy, no puede darnos respuesta, pero el trabajo científico es el único camino que nos puede conducir a un verdadero conocimiento de la realidad exterior a nosotros”

Sigmund Freud



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Cuando me pongo a pensar a quién debo agradecer el encontrarme en este preciso instante, un nombre prevalece por delante de todos los demás, el del Dr. José Antonio González Correa. Corría el 2015 cuando, en un caluroso verano de Madrid, tuve la suerte de coincidir por primera vez con él. La facilidad con la que ambos nos ensamblamos para trabajar en equipo fue estupenda y en ese momento fue cuando él me dijo que quería que investigara con él y su equipo y que hiciera con ellos el doctorado. Comenzó ahí un proceso de estudio que me llevaría, unos cuantos años después, a hacer de esa propuesta, una realidad. Gracias por tu amistad, tu cariño, tu apoyo y tu empuje.

Quisiera extender mi agradecimiento a D. José Pedro de la Cruz Cortés, mi otro director de tesis, por la inestimable ayuda en la confección de esta memoria y la disposición mostrada desde mi incorporación al Grupo de Investigación.

Asimismo, a D. Jesús Miranda, Tutor de la tesis doctoral, por la ayuda y facilidades brindadas a lo largo de todo mi periplo doctoral.

A las compañeras y compañeros del Departamento de Farmacología y Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, en especial a Lola Rodríguez, Laura Ortega, Ana María Sánchez y Cristina Verdugo. Sin su paciencia, su apoyo, sus conocimientos, trabajo y esfuerzo no estaría hoy aquí.

A mi familia, en particular a mis padres Damy y Checho, por su apoyo incondicional en todo lo que he hecho en mi vida, por creer siempre en mí, por su ejemplo de trabajo duro, sacrificio y fuerza de voluntad a lo largo de toda su vida. Espero poder parecerme a vosotros.

A mis compañeros tanto de la UME como del CIMA. Por ese apoyo y ayuda a lo largo de este proceso. No sólo escuchándome hablar del proyecto, sino también por su predisposición a ayudarme en todo lo que podían y, en especial, en la gestión del tiempo que éste requiere.

Y, por último, pero no por eso el menos importante, a Carlos. Por su amor, su apoyo, su confianza, su paciencia y, por todas esas horas que hemos sacrificado los dos por este proyecto. Te quiero.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Clasificación de la diabetes	2
1.2	Principales complicaciones de la diabetes	3
1.2.1	Complicaciones agudas.....	4
1.2.2	Complicaciones crónicas.....	7
1.3	Estrés oxidativo	18
1.3.1	Principales biomarcadores de estrés oxidativo.....	22
1.3.2	El estrés oxidativo y la hiperglucemia	23
1.4	Antioxidantes	24
1.4.1	Definición.....	24
1.4.2	Tipos de antioxidantes	25
1.5	El aceite de oliva y los fenoles	26
1.5.1	El aceite de oliva y la dieta mediterránea	26
1.5.2	Fenoles del aceite de oliva.....	28
1.5.3	Tipos de aceite de oliva según su producción y las diferencias en la concentración de fenoles.....	31
2	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
2.1	Justificación.....	37
2.2	Hipótesis	39
2.3	Objetivos	40
3	METODOLOGÍA.....	43
3.1	Diseño del estudio	43
3.2	Animal de experimentación.....	43
3.3	Grupos Experimentales.....	47
3.4	Inducción a la diabetes mellitus tipo 1	48
3.5	Compuestos del estudio	48

3.6	Obtención de muestras	55
3.7	Variables analizadas	56
3.7.1	Bioquímica sérica y urinaria	56
3.7.2	Estrés oxidativo y nitrosativo	56
3.7.3	Eicosanoides	57
3.7.4	Análisis morfométrico renal.....	57
3.7.5	Análisis morfométrico retiniano	58
3.8	Análisis estadístico	58
4	RESULTADOS	63
4.1	Resultados correspondientes al efecto del modelo experimental de diabetes mellitus en los distintos tipos de variables analizadas.....	64
4.1.1	Variables zoométricas (peso corporal, peso renal, comida y bebida ingerida).....	64
4.1.2	Glucosa, proteínas totales séricas, creatinina sérica y perfil hepático	66
4.1.3	Perfil lipídico	69
4.1.4	Estrés oxidativo sérico y en tejido renal (variables oxidativas y antioxidantes).....	71
4.1.5	Equilibrio prostanoide (tromboxano y prostaciclina urinarias).....	75
4.1.6	Variables de la función renal (bioquímicas y morfométricas glomerulares)	77
4.1.7	Variables morfométricas retinianas.....	81
4.2	Resultados correspondientes a las modificaciones de estas variables causadas por la administración de los tres aceites de estudio	84
4.2.1	Variables zoométricas (peso corporal, peso renal, comida y bebida ingerida).....	84
4.2.2	Glucosa, proteínas totales séricas, creatinina sérica y perfil hepático	86
4.2.3	Perfil lipídico	89
4.2.4	Estrés oxidativo sérico y en tejido renal (variables oxidativas y antioxidantes).....	91
4.2.5	Equilibrio prostanoide (tromboxano y prostaciclina urinarias).....	97
4.2.6	Variables de la función renal (bioquímicas y morfométricas glomerulares)	99
4.2.7	Variables morfométricas retinianas.....	104
4.3	Correlaciones entre las variables de función renal y el resto de variables bioquímicas	107

5	DISCUSIÓN	111
6	CONCLUSIONES.....	135
7	BIBLIOGRAFÍA.....	139
8	ANEXOS.....	159
8.1	ANEXO I: Autorización del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, en calidad de Órgano Habilitado para la realización de proyectos de investigación con animales.....	159
8.2	ANEXO II: Ayudas y subvenciones para la realización de proyectos que han permitido la realización de la presente Tesis Doctoral.	171
8.3	ANEXO III: Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral.	173



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1 INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, que acompaña al que la padece toda la vida y, conlleva un tratamiento intenso y riguroso. Estas características, unidas a muchas otras como son las limitaciones y las complicaciones que produce, hacen que, por su influencia sociofamiliar, se le considere como un ejemplo claro de enfermedad sociosanitaria.

En los últimos años los casos de diabetes mellitus han aumentado de forma significativa. Según el índice de la International Diabetes Federation (IDF) (1) en 2022, 125 millones de personas en todo el mundo padecían diabetes mellitus. La perspectiva es que esta cifra aumente a 643 millones en 2030 y a 783 millones en 2045. En Europa, 1 de cada 11 adultos (61 millones) tiene diabetes mellitus. Se calcula que el número de adultos con esta enfermedad podría alcanzar los 67 millones en 2030 y los 69 millones en 2045. Se gastaron más de 175.000 millones de euros en los problemas y tratamientos derivados de la diabetes mellitus. Así mismo, 1,1 millones de muertes estuvieron relacionadas con la diabetes mellitus tipo 1 en 2021.

En España, los datos del IDF muestran que 206.944 personas tienen diabetes mellitus tipo 1. De los cuales 17.245 tienen menos de 20 años, 119.883 están entre los 20 y los 59 años y, 69.651 son mayores de 60 años.

La diabetes mellitus comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten como característica común, la hiperglucemia. Existen varios tipos diferentes de diabetes mellitus según diferentes relaciones entre los factores genéticos y los ambientales. De acuerdo con la causa de la diabetes mellitus, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden ser deficiencia de la secreción de insulina, disminución de la utilización de glucosa o aumento de la producción de ésta.

1.1 Clasificación de la diabetes

Aunque la clasificación de la diabetes mellitus se realiza en base al proceso patógeno que acaba produciendo la hiperglucemia generando los tipos diabetes mellitus tipo 1 y diabetes mellitus tipo 2, cada vez hay un mayor conocimiento de la patogenia molecular y puede asociarse como un único defecto genético. Estas formas que podrían denominarse atípicas comparten características con la diabetes mellitus tipo 1, con la diabetes mellitus tipo 2 o con ambas (2).

Así, la clasificación quedaría de la siguiente manera (2):

- Diabetes tipo 1: se debe a una respuesta autoinmune contra las células β productoras de insulina de los islotes de Langerhans, lo que provoca una deficiencia de insulina.
- Diabetes tipo 2: se produce por un grupo heterogéneo de trastornos que se resumen en diferentes grados de resistencia a la insulina, una menor secreción de dicha hormona y una mayor producción de glucosa hepática.
- Diabetes gestacional: se produce por la resistencia a la insulina relacionada con las alteraciones metabólicas del embarazo que aumentan las necesidades de insulina. Suele producirse durante el segundo o el tercer trimestre del embarazo. Si se diagnostica durante el primer trimestre, la American Diabetes Association (ADA) recomienda que se clasifique como diabetes pregestacional preexistente más que como diabetes mellitus gestacional.
- Otros tipos específicos de diabetes (monogénicos o MODY)
 - Defectos genéticos del desarrollo o de la función de las células β caracterizados por mutaciones
 - Diabetes neonatal transitoria
 - Enfermedades del páncreas exocrino
 - Defectos genéticos en la acción de la insulina

- Endocrinopatías
- Glucocorticoides inducidos por fármacos o sustancias químicas
- Infecciones
- Formas infrecuentes de diabetes inmunitaria: síndrome del “hombre rígido”, anticuerpos contra el receptor de insulina
- Otros síndromes genéticos que a veces se asocian a diabetes

1.2 Principales complicaciones de la diabetes

Son muchas las complicaciones que se asocian a la diabetes mellitus y que, además, afectan a múltiples sistemas. Estas complicaciones influyen sobre la morbi-mortalidad de los que las padecen. Sin tener en cuenta las muertes asociadas a la Covid-19, unos 6,7 millones de adultos con edades comprendidas entre los 20 y los 79 años, fallecieron como consecuencia de la diabetes mellitus o sus complicaciones en el 2021 en todo el mundo, lo que significa un 12,2% de las causas de muerte totales en ese grupo de edad (3).

El infarto de miocardio fue la primera causa de muerte en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, lo que supone un 50-60%. Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 tienen un riesgo más elevado de muerte prematura que la población general. En los menores de 30 años esto se relaciona en gran medida con las complicaciones agudas de la diabetes (principalmente hipoglucemia y cetoacidosis diabética) (3).

Las complicaciones son bastante similares en la diabetes mellitus tipo 1 y la diabetes mellitus tipo 2. En primer lugar, podemos dividir las en dos grandes grupos que son las complicaciones agudas y las crónicas y, estas últimas en vasculares o no vasculares. Podemos verlo esquematizado en la Figura 1.1.

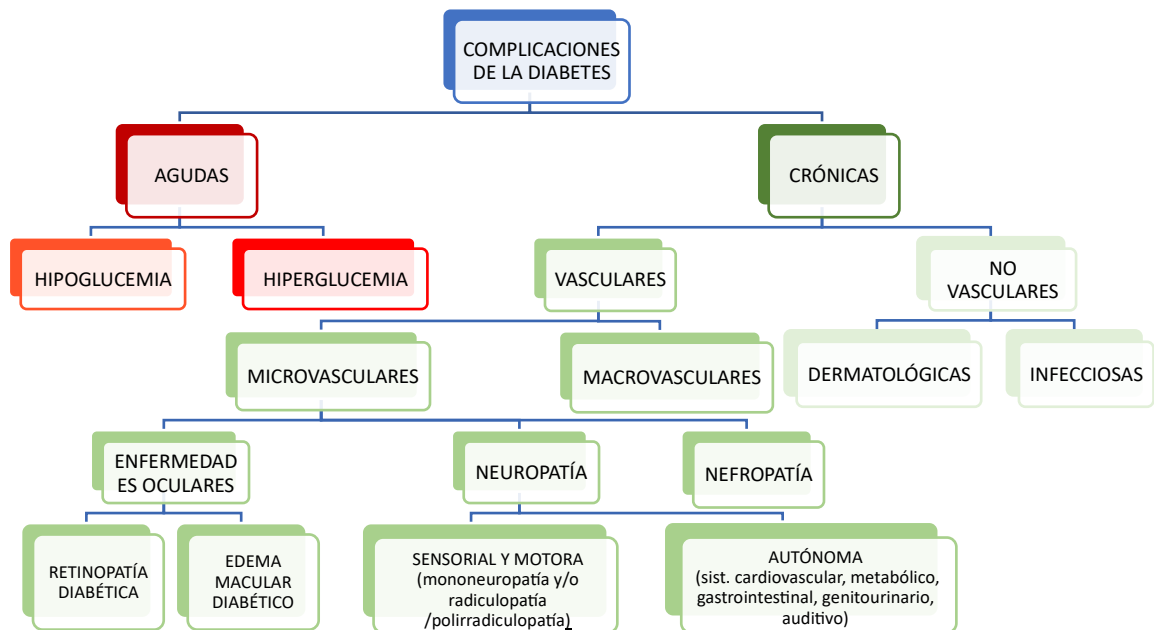


Figura 1.1. Complicaciones de la Diabetes (elaboración propia).

1.2.1 Complicaciones agudas

1.2.1.1 Hipoglucemia

Se denomina hipoglucemia a unos niveles de glucosa sérica inferiores a 70mg/dl acompañados o no de sintomatología. De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA) existen 3 tipos de hipoglucemia: nivel 1 con valores <70 mg/dl y \geq 54 mg/dl; nivel 2 valores inferiores a 54 mg/dl; y nivel 3 cuando el estado de conciencia de la persona se ve gravemente alterado y necesita ayuda para resolver la hipoglucemia. Las causas más frecuentes de la hipoglucemia se muestran en la figura 1.2.



Figura 1.2. Causas de la hipoglucemia (elaboración propia).

La hipoglucemia tiene múltiples implicaciones clínicas pues puede provocar accidentes, lesiones, deterioro cognitivo, eventos cerebrovasculares e incluso la muerte. Se ha visto tanto en estudio *in vitro* y en vivo, como en estudios experimentales, que hay múltiples mecanismos fisiopatológicos en los que la hipoglucemia, en pacientes diabéticos, tiene una implicación directa en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular pues provoca: cambios hemodinámicos, isquemia miocárdica, repolarización cardíaca anormal, arritmias cardíacas, tendencia trombótica, estrés oxidativo e inflamación (4).

Figura 1.3.

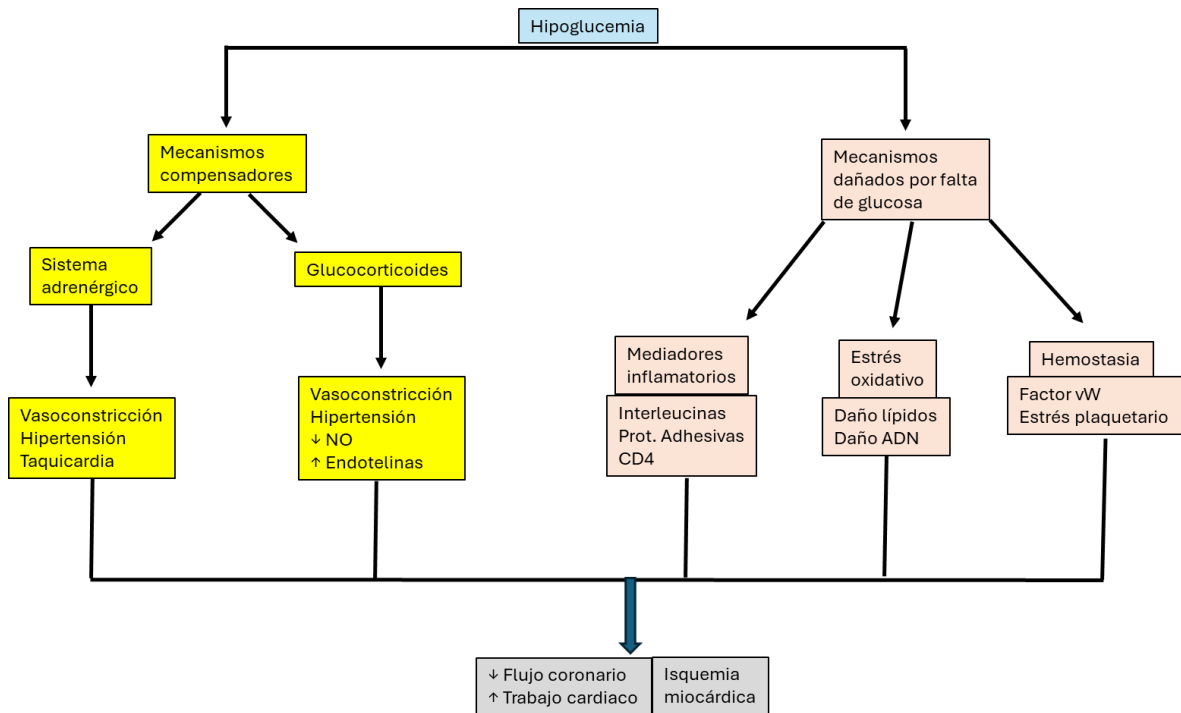


Figura 1.3. Posibles mecanismos fisiopatológicos que relacionan la hipoglucemia con los resultados cardiovasculares (elaboración propia).

1.2.1.2 Hiperglucemia

La hiperglucemia que produce las complicaciones agudas es la hiperglucemia severa, que se caracteriza por unos niveles de glucosa en sangre por encima de 200 mg/dl. Esto puede desembocar en un cuadro de cetoacidosis diabética o un síndrome hiperglucémico hiperosmolar o una mezcla de ambos. Las causas principales se muestran en la figura 1.4.

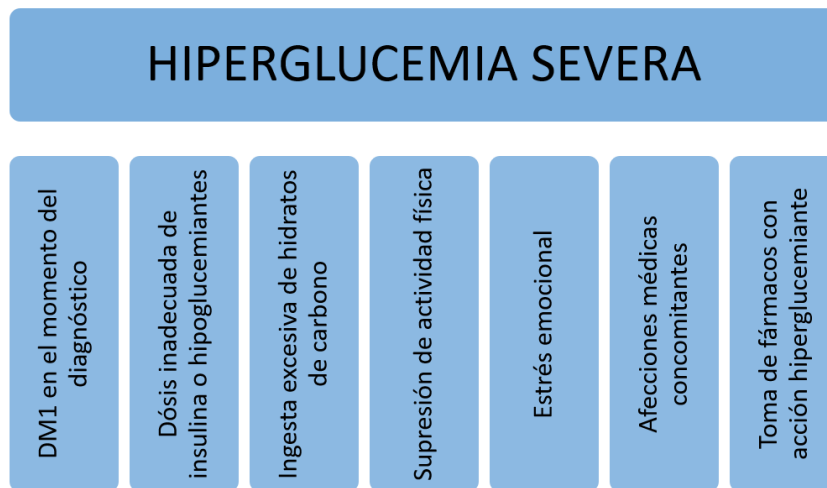


Figura 1.4. Causas de la hiperglucemia severa (elaboración propia).

La hiperglucemia severa puede derivar en cuadros graves de cetoacidosis diabética (tríada de hiperglucemia, acidosis metabólica y cetonemia) y síndrome hiperglucémico hiperosmolar (hiperglucemia grave, osmolalidad sérica alta, y deshidratación) ambas potencialmente mortales. Estas complicaciones generan una grave deshidratación a nivel de los tejidos por cambios en la presión osmótica que arrastran el agua intracelular al torrente sanguíneo llevando al organismo a una pérdida de conciencia y, en ausencia de insulina, a una acidosis tisular. Ambas requieren tratamiento inmediato con una agresiva y adecuada reposición hidroelectrolítica, así como con la administración de insulina intravenosa (i.v.) (5).

Así mismo, la hiperglucemia es la principal responsable de las complicaciones crónicas que se presentan en las personas con diabetes mellitus.

1.2.2 Complicaciones crónicas

Se dividen, principalmente, en vasculares, que implican diferente afectación de los vasos sanguíneos, y no vasculares (4). Aunque la hiperglucemia crónica es uno de los factores que más influye en la aparición de las complicaciones en los pacientes con diabetes mellitus, aún no son bien conocidos los mecanismos por los que las provoca. Si se consigue un diagnóstico precoz y un control enérgico de

la glucemia, la tensión arterial y los lípidos en sangre, pueden evitarse o reducirse las complicaciones consecuencia de la diabetes mellitus.

1.2.2.1 Complicaciones vasculares

Tanto en la macro como en la microangiopatía diabética, el estrés oxidativo tiene un papel fundamental en las primeras etapas ya que participa de forma directa en el desarrollo de la disfunción endotelial. Una cantidad elevada de glucosa en sangre mantenida en el tiempo origina productos finales de glicosilación avanzada que se unen a un receptor de la superficie celular mediante glicosilación no enzimática, provocando un entrecruzamiento de proteínas, arterosclerosis acelerada, disfunción glomerular y endotelial, así como alteraciones en la matriz extracelular (4).

1.2.2.1.1 Microvasculares

Son complicaciones específicas de la diabetes mellitus. Suelen aparecer 20 años después del diagnóstico. Aunque la fisiopatología es complicada, el estrés oxidativo secundario a la hiperglucemia constante, que dispara las diversas vías metabólicas (la vía de los polioles, la formación de productos finales de glicación avanzada, la activación de la diacilglicerol-proteína cinasa C (DAG-PKC) y la vía de la hexosamina), parece ser el factor principal. Estas rutas se activan cuando las vías normales del metabolismo de la glucosa se saturan.

a. Enfermedades oculares

Según la Sociedad española de retina y vítreo (SERV), la retinopatía diabética es una de las causas principales de ceguera evitable y discapacidad visual en la población en edad laboral y el edema macular diabético de la pérdida de agudeza visual.

La duración de la diabetes mellitus y, el grado de control de la glucemia y del resto de factores de riesgo, son los mejores predictores del desarrollo de retinopatía.

Según la clasificación internacional que proponen Wilkinson et al (6) se diferencia la retinopatía diabética y el edema macular diabético.

○ Retinopatía diabética

El daño vascular inicial, unido al engrosamiento de la membrana basal, lleva a la pérdida de células murales a nivel de los capilares lo que altera el funcionamiento de la barrera hematorretiniana interna. Esto se manifiesta con la aparición de microaneurismas, dilatación y arrosamiento venoso, que provocan cambios en el flujo vascular normal. Así mismo, se producen cambios estructurales, de fisiología y de adhesión en el vítreo como resultado de la glucosilación de las proteínas vítreas (7).

En la retinopatía diabética también existe un componente inflamatorio crónico mediada por citocinas proinflamatorias que estimulan la adhesión capilar y la leucostasis. Esto ocasiona oclusión vascular e hipoxia tisular. Esta última favorece la formación de nuevos vasos que se localizan cerca del nervio óptico o de la mácula y son tan frágiles que se rompen con facilidad; esto acaba provocando hemorragia vítrea, fibrosis y por último desprendimiento de la retina (7).

La retinopatía diabética se clasifica en dos etapas: no proliferativa y proliferativa. No todos los que sufran una desarrollarán la otra, pero, cuanto más grave sea la proliferativa, más posibilidades tendrán de desarrollar la no proliferativa.

- Proliferativa: Sus características principales son los microaneurismas vasculares retinianos, las hemorragias en forma de mancha y los algodonosos.
- No proliferativa: Suele comenzar de forma leve, aunque puede evolucionar a una forma más extensa que se manifiesta por

cambios en el calibre de las venas, anomalías microvasculares intrarretinianas y abundantes microaneurismas y hemorragias.

- Edema macular diabético

Puede presentarse en cualquier fase de la enfermedad, lo que hace que se deba analizar de forma diferente. El edema macular diabético muestra un engrosamiento retiniano puede acompañarse de exudados duros, que están formados por material lipídico y proteínico extravasado de los vasos de la retina y depositado en las capas externas de la retina o incluso en ocasiones en el espacio subretiniano (8).

b. Neuropatía

La neuropatía diabética es la complicación más frecuente de las personas con diabetes mellitus, tanto tipo 1 como tipo 2, aproximadamente el 50% de las personas con diabetes mellitus de larga evolución sufrirán algún tipo de neuropatía. Puede lesionar cualquier nervio del organismo y suele manifestarse de forma difusa o como mono o polirradiculopatía (4).

Al igual que en el resto de las complicaciones, el desarrollo de la neuropatía se relaciona con la duración de la diabetes mellitus y el adecuado control de la glucemia. Otros factores de riesgo son el Índice de Masa Corporal (IMC), el tabaquismo, episodios de cardiopatía, elevados niveles de triglicéridos en sangre e hipertensión. Esta patología se caracteriza por la pérdida tanto de fibras nerviosas mielinizadas como no mielinizadas. Por tanto, se necesita diagnóstico diferencial para descartar otras patologías similares como causas probables (4).

Podemos clasificar la neuropatía en sensorial y motora, y autónoma.

- Sensorial y motora (mononeuropatía y/o radiculopatía /polirradiculopatía):

La diabetes afecta con frecuencia al sistema nervioso periférico. Los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico se encuentran fuera de la barrera hematoencefálica. Son más vulnerables a las lesiones asociadas a la diabetes que las neuronas motoras. Las pequeñas neuronas no mielinizadas son neuronas sensoriales, la mayoría de las que componen el sistema nervioso periférico, transportan información nociceptiva, particularmente sobre el calor y el dolor. Debido a la falta de mielina la conducción es lenta y continua. Además, también transmiten información sobre la presión, el tacto y el frío. Las fibras totalmente mielinizadas de diferentes diámetros, denominadas fibras grandes, son responsables de la detección vibratoria y de posición. La mielina, que es producida por las células de Schwann, recubre los axones de estas fibras y forma los ganglios de Ranvier y los paranodos, que son necesarios para la conducción nerviosa rápida y las uniones estrechas (9).

La neuropatía diabética se caracteriza por la pérdida axonal de distal a proximal y los síntomas que la acompañan. Aunque la hiperglucemia es la causa principal de neuropatía diabética en la diabetes mellitus 1, la dislipidemia es la causa principal de neuropatía diabética en la diabetes mellitus 2.

La diabetes hace que el exceso de glucosa y los ácidos grasos libres se acumulen en las células de Schwann. La glucosa se mueve a través del transportador de glucosa 3 y se somete a glucólisis. La cantidad resultante de piruvato excede la capacidad de manejo metabólico del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), lo que conduce al metabolismo anaeróbico y a la acumulación de lactato. Este lactato es trasladado a los axones, produciéndose una disfunción mitocondrial y una degeneración axonal (9).

El aumento de la carga de sustrato de ácidos grasos saturados de cadena larga causado por la dislipidemia se asocia con un aumento de

la β -oxidación para formar acetil coenzima A. La acilcarnitina tóxica se acumula en el interior de las células de Schwann y se transporta a los axones cuando se supera la capacidad de oxidación del ciclo del TCA, lo que provoca, igualmente, una disfunción mitocondrial y la degeneración axonal (9).

Las fibras nerviosas pequeñas y grandes se quedan sin energía debido a la reducción de la función mitocondrial en el cuerpo celular, y los axones largos pierden su capacidad funcional y se produce la degeneración. Los axones más alejados del cuerpo celular se convierten en los más vulnerables debido a que cada vez menos mitocondrias funcionales viajan con éxito desde el cuerpo celular, hasta sus terminales más distales; a lo largo de toda la longitud axonal. Las fibras pequeñas que transmiten el dolor y la disestesia son especialmente vulnerables a la pérdida de energía. Las células de Schwann pueden proporcionar combustible utilizable, mitocondrias y protección contra sustancias tóxicas a los axones mielinizados, grandes demandantes de energía, pero las fibras pequeñas carecen de esta fuente de energía y protección. Esto podría hacer que las fibras pequeñas se degraden significativamente primero (9).

- La mononeuropatía (disfunción de nervios periféricos o craneales aislados) es menos común que la polineuropatía en la diabetes mellitus y se presenta con dolor y debilidad motora en la distribución de un solo nervio. Las mononeuropatías pueden ocurrir en sitios de atrapamiento, como el túnel carpiano, o ser no compresivas. Es muy común la implicación del tercer par craneal precedida por diplopía. En ocasiones se afectan otros pares craneales, como el IV, el VI o el VII (parálisis de Bell). Es probable que ocurran mononeuropatías periféricas o la implicación simultánea de más de un par (mononeuropatía múltiple) (4).

- La radiculopatía diabética es un síndrome caracterizado por dolor grave e incapacitante en la distribución de una o más raíces nerviosas, acompañado en ocasiones de debilidad motora. Afortunadamente, las polirradiculopatías diabéticas por lo general se limitan a sí mismas y remiten en un lapso de seis a 12 meses (4).
- Pero la forma más común de neuropatía diabética es la polineuropatía distal simétrica. Ocurre con mayor frecuencia con pérdida sensitiva distal y dolor. Entre los síntomas se incluyen entumecimiento, hormigueo, hipersensibilidad, hiperestesia, parestesia, disestesia y/o sensación de quemazón que comienzan en los pies y se va dispersando a medida que avanza de forma proximal. El dolor, generalmente, es más frecuente en los miembros inferiores y suele presentarse en reposo, agudizándose por la noche. Se han descrito formas tanto agudas como crónicas. La primera suele durar menos de 12 meses y se relaciona con el tratamiento. A medida que progresa la neuropatía diabética, el dolor comienza a remitir llegando incluso a desaparecer; no obstante, el déficit sensitivo se mantiene pudiendo aparecer, en este momento, defectos motores (4).

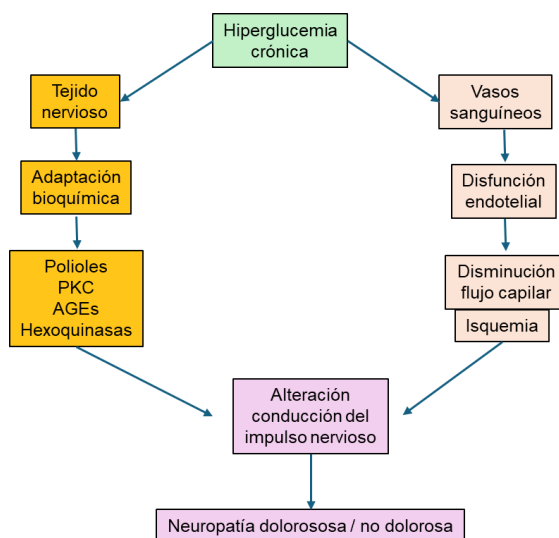


Figura 1.5. Fisiopatología de la neuropatía diabética dolorosa y no dolorosa (elaboración propia).

○ Autónoma:

En algunas personas con diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 se presentan alteraciones en los sistemas colinérgicos y noradrenérgicos de sistema nervioso autónomo, lo que ocasiona que algunos sistemas puedan verse afectados:

- Afectación sistema cardiovascular: disminución en la variabilidad de la frecuencia cardiaca, taquicardia en reposo e hipotensión ortostática se asocia con un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). La neuropatía autónoma se asocia no sólo a los síntomas anteriores, sino también a la predisposición a hipoglucemia grave y, ya hemos descrito lo que ésta puede provocar a nivel cardiovascular, como por ejemplo el aumento del QT. La unión de ambas se relaciona con algunos casos de muerte súbita en personas con diabetes mellitus (4).
- Afectación sistema metabólico: La neuropatía autónoma es capaz de reducir la liberación contrarreguladora de hormonas, sobre todo de las catecolaminas, lo cual provoca incapacidad para percibir la hipoglucemia de manera adecuada. Esto aumenta el riesgo de sufrir una hipoglucemia grave (4).
- Afectación sistema gastrointestinal: Los síntomas más frecuentes son la gastroparesia (a veces como anorexia, náusea, vómito, saciedad temprana y distensión abdominal) y las alteraciones de la motilidad del colon e intestino delgado (constipación o diarrea) (4).
- Afectación sistema genitourinario: incluyendo disfunción sexual femenina (disminución del deseo sexual, dispareunia y lubricación vaginal escasa) y cistopatía. Esta última comienza con una incapacidad para sentir una vejiga llena y para vaciarla por completo, lo que con la evolución del deterioro lleva a la

acumulación de residuos que provocan síntomas como tenesmo vesical, disminución de la frecuencia de vaciado, incontinencia e infecciones recurrentes de las vías urinarias (4).

- Afectación de la audición: Pueden verse afectados los nervios del oído interno lo que podría provocar una pérdida auditiva (4).
- La hiperhidrosis de las extremidades superiores y la anhidrosis de las piernas son resultado de la disfunción del sistema nervioso simpático. La anhidrosis de los pies genera sequedad de la piel con formación de fisuras, que incrementan el riesgo de desarrollar úlceras en los pies (4).

c. Nefropatía diabética

Aproximadamente el 30% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y el 40% de las personas con diabetes mellitus tipo 2 desarrollan algún tipo de enfermedad renal crónica (13). Se relaciona con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y tiene mal pronóstico aún con tratamiento de diálisis. Suele ir asociada a la retinopatía diabética (4).

Al igual que el resto de las complicaciones microvasculares, se relaciona con el mal control glucémico. De la misma forma, se sabe que el consumo de tabaco acelera el deterioro de la función renal.

En las etapas iniciales de la nefropatía diabética, se produce disfunción endotelial que hace que los vasos glomerulares sean más sensibles a los efectos vasoconstrictores y profibróticos de, por ejemplo, la angiotensina II. Esto desencadena un aumento de la presión arterial intraglomerular, del filtrado glomerular y, como consecuencia, la presencia de microalbuminuria. Uno de los mecanismos que produce mayor fallo a nivel glomerular es el estrés oxidativo que viene mediado por los altos niveles de glucosa mantenidos en el tiempo. Éste es uno de los responsables del aumento de la excreción de proteínas y la disminución de la filtración glomerular (10).

La enfermedad renal del paciente con diabetes hace referencia a la albuminuria y a la función de filtración glomerular reducida (< 60 mL/min/1,73 m²). Una vez que están instauradas los cambios patológicos son probablemente irreversibles. La nefropatía que se desarrolla en la diabetes mellitus tipo 2 difiere del tipo 1 en que cuando se diagnostica la primera, puede haber albuminuria, lo cual refleja su largo periodo asintomático; sin embargo, en la diabetes mellitus tipo 2 en ocasiones es secundaria a factores no relacionados con la enfermedad, tales como hipertensión, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedades prostáticas o infecciones (10).

1.2.2.1.2 Macrovasculares

No son exclusivas de los pacientes con diabetes mellitus. Aunque la incidencia se ve aumentada tanto en las personas con diabetes mellitus tipo 1 como con diabetes mellitus tipo 2. Los mecanismos de las complicaciones macrovasculares relacionadas con diabetes incluyen enfermedades cardiovasculares como las coronariopatías, la arteriopatía periférica y la enfermedad vascular cerebral y, se asocian con la hiperglucemia, la duración de la enfermedad, los factores de riesgo cardiovascular tradicionales (dislipidemia, hipertensión, obesidad, sedentarismo, tabaquismo) y la resistencia a la insulina y, a la alteración de los niveles de lípidos en sangre que ésta produce. En la diabetes mellitus tipo 2, la resistencia a la insulina está presente años antes del diagnóstico y se asocia con obesidad y acumulación ectópica de lípidos en músculo e hígado. De manera adicional, la insulina falla en suprimir apropiadamente la lipólisis del tejido adiposo, lo cual resulta en mayor suministro de ácidos grasos al hígado, músculo, células endoteliales y tejidos cardiacos, ocasionando acumulación hística de triglicéridos, diacilglicerol y ceramidas. Así, vemos, que la resistencia a la insulina está directamente involucrada en el desarrollo y perpetuación de la aterosclerosis (4,11).

Puede producirse antes de que se establezca el diagnóstico pues, en la diabetes mellitus tipo 2 el período asintomático puede ser largo. El Framingham Heart Study, mostró que en las personas con diabetes mellitus la incidencia era 5 veces superior en todas las complicaciones macrovasculares. Del mismo modo, el pronóstico de las personas con diabetes mellitus y alguna enfermedad cardiovascular resultó ser menos favorable que en las no diabéticas (4,11).

Otros factores de riesgo adicionales que son frecuentes en personas con diabetes incluyen la nefropatía diabética, función plaquetaria anormal, marcadores aumentados de inflamación y disfunción endotelial (4,11).

1.2.2.2 Complicaciones no vasculares

1.2.2.2.1 Dermatológicas

Generalmente se caracterizan por xerosis y prurito, cicatrización lenta y ulceraciones cutáneas. Algunas de las patologías dermatológicas asociadas con la diabetes mellitus son: la dermopatía diabética, enfermedades bullosas como la bullosa diabetorum, la necrobiosis lipóidica diabetorum, el vitíligo (más frecuente en personas con diabetes mellitus tipo 1), la acantosis nigricans (característica de resistencia grave a la insulina y diabetes concomitante), el granuloma anular local o generalizado, el liquen plano y la esclerodermia (que puede llevar al síndrome de movilidad articular limitada). También puede aparecer lipoatrofia en los lugares de inyección de la insulina (4).

1.2.2.2.2 Infecciosas

A causa de los problemas de vascularización y a las alteraciones en la inmunidad celular y la función fagocítica que provoca los niveles altos de glucemia mantenidos en el tiempo en las personas diabéticas, éstas son más propensas a infecciones más graves con mayor frecuencia que el resto de la población. La hiperglucemia promueve la colonización y proliferación de una

variedad de organismos (como *Candida* y otras especies de hongos). Aunque la mayor parte de las infecciones que sufren los diabéticos suelen ser comunes al resto de la población, hay algunas que se observan casi de manera exclusiva en ellos, por ejemplo, la mucormicosis rinocerebral, infecciones enfisematosas de la vesícula biliar y de las vías urinarias, y otitis externa invasiva o “maligna” (afecta al tejido blando que rodea el conducto auditivo externo y puede progresar con rapidez a osteomielitis y meningitis) (4).

1.3 Estrés oxidativo

Puesto que hemos explicado que el estrés oxidativo es uno de los factores más importantes en la fisiopatología de las complicaciones de la diabetes mellitus resulta necesario ahondar un poco más en el mismo.

El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre la producción de radicales libres y el sistema antioxidante encargado de neutralizarlos (12).

El oxígeno es el segundo componente en mayor cantidad en la atmósfera y, si bien es esencial para la vida, no sólo tiene efectos beneficiosos, también posee potenciales efectos nocivos relacionados con su estructura y su reactividad química (13). Cuando el oxígeno sufre cambios en su estructura da lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS) siendo las más importantes el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroperóxido ($HOO\bullet$) que es la forma protonada del oxígeno singlete (1O_2).

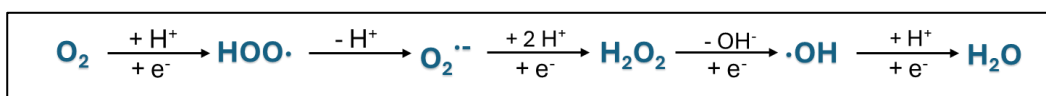


Figura 1.6. Esquema de reducción del oxígeno (elaboración propia).

Las ROS se consideran moléculas esenciales para el metabolismo celular y, por tanto, para el desarrollo normal de la célula pues participan en múltiples procesos: interpretación de señales celulares, expresión de genes y protección inmunológica, entre otros (13).

Si se produce un aumento descontrolado de la concentración de ROS, bien por sobre activación de las rutas que las generan o por inhibición de las rutas que controlan su consumo, llegaríamos a un estado de estrés oxidativo (13).

Para enumerar las rutas responsables de la generación de las ROS, vamos a dividir las en endógenas y exógenas como se muestra en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Rutas generación de ROS (elaboración propia).

ENDÓGENAS	EXÓGENAS
Fosforilación oxidativa mitocondrial a través de la citocromo oxidasa, en el proceso de respiración celular.	Metabolismo de compuestos ingeridos o administrados exógenamente
Células leucocitarias con fines de defensa antimicrobiana.	Contaminantes y tóxicos ambientales, metales pesados, disolventes y radiaciones.
Fibroblastos y monocitos, como moduladores de señales intracelulares	

Como hemos marcado al inicio del apartado, tan importante es la formación de la ROS como que éstas se mantengan en niveles de concentración normales. Los mecanismos que el cuerpo tiene para mantener dichos niveles son las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y los atrapadores de radicales libres (glutatión reducido, β -caroteno y vitamina C). Del mismo modo existen fuentes extrínsecas de antioxidantes contenidas en algunos alimentos como frutas, verduras, aceite de oliva, ricas, sobre todo, en fenoles, pero también en β -caroteno y vitamina C, que actúan previniendo la iniciación de las ROS, bloqueando su propagación y reparando los daños provocados por las ROS en el organismo (14).

Las ROS afectan a la homeostasis celular pues debido a sus características químicas atacan, preferiblemente, a moléculas que contienen en su estructura hidróxidos fenólicos, dobles enlaces C-C o anillos aromáticos. De esta forma, las bases nitrogenadas de las cadenas de ADN, los aminoácidos de las proteínas y los ácidos grasos de las membranas celulares son su blanco principal. Por ello, vamos a analizar

sus principales vías de actuación la peroxidación lipídica, la destrucción oxidativa de las proteínas y las mutaciones en el ADN (13).

- PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los lípidos son una parte fundamental de muchos componentes celulares, pero, sobre todo, de la membrana plasmática. La fluidez de ésta depende de la composición de la bicapa lipídica; a mayor número de dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), mayor fluidez. Pero, el problema es que, los AGPI son muy susceptibles a la peroxidación. Esta peroxidación tiene lugar en 3 etapas: iniciación, propagación y terminación (14).

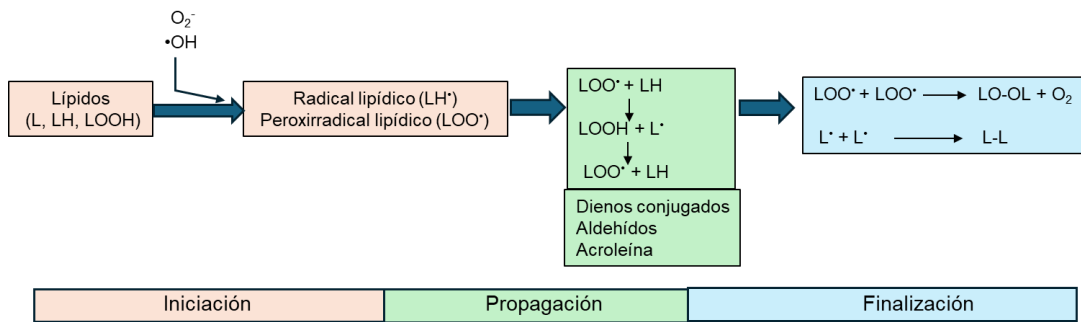


Figura 1.7. Fases de la peroxidación lipídica de un ácido graso poliinsaturado (AGPI) (elaboración propia).

En la tercera fase es donde se produce la reacción en cadena de los radicales libres al reaccionar unos AGPI con otros.

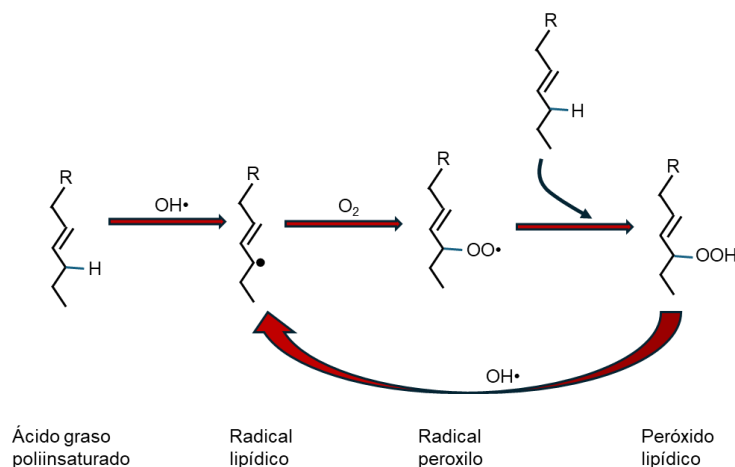


Figura 1.8. Representación gráfica del mecanismo por el cual un ácido graso reacciona con un radical hidroxilo ocasionando la peroxidación lipídica. (elaboración propia).

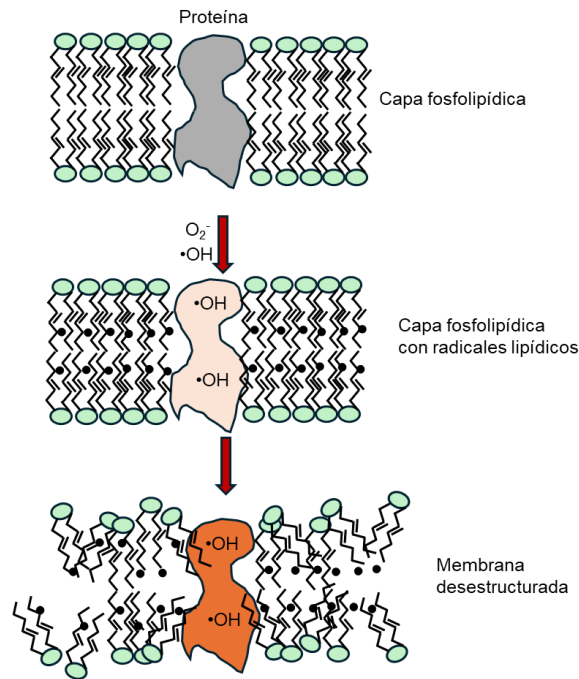


Figura 1.9. Representación de la destrucción oxidativa de la membrana celular debido al ataque de radicales hidroxilo (elaboración propia).

- **DESTRUCCIÓN OXIDATIVA DE LAS PROTEÍNAS**

Debido a la gran presencia que tienen las proteínas en las células, los tejidos y el plasma, son un objetivo accesible e importante para las ROS. La interacción de ambas genera la oxidación de las cadenas de aminoácidos. Los aminoácidos con un grupo TIOL y una cadena aromática (cisteína, tirosina, ...) son los que presentan una mayor sensibilidad (14).

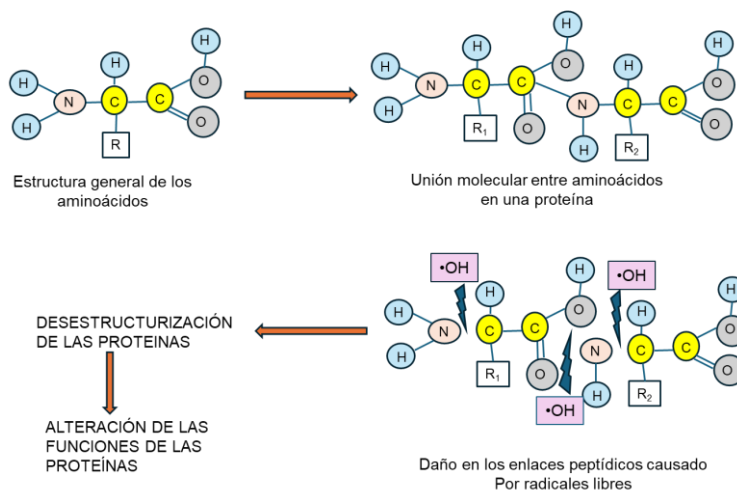


Figura 1.10. Representación de la destrucción oxidativa de una proteína globular a través de la generación de radicales en los aminoácidos (elaboración propia).

Las ROS pueden atacar a las proteínas de diferentes modos, los más frecuentes son la fragmentación de la proteína, la ruptura de los enlaces peptídicos, y las modificaciones aminoacídicas mediadas por radicales libres (13). Como consecuencia de la destrucción oxidativa de las proteínas, se producen radicales que, si inician una reacción en cadena o, se entrecruzan, terminan provocando una ruptura de la cadena y cambios en sus propiedades fisicoquímicas como son su solubilidad, integridad estructural y actividad enzimática, que les hace perder su función e incluso, ser más susceptibles a la degradación y eliminación. Se han observado niveles altos de productos derivados de esta destrucción oxidativa en diferentes enfermedades, como, por ejemplo, en la diabetes mellitus (14).

- MUTACIONES DEL ADN

Cuando las ROS interactúan con el ADN puede provocar desde la reticulación del ADN (al unirse el radical del ADN al aminoácido de las proteínas), la formación de azúcares, productos de modificación de base, roturas de cadenas tanto simples como dobles (debido a que los radicales hidroxilo que se generan, reaccionan con la fracción de azúcar del ADN provocando la ruptura). Las bases más sensibles dentro del ADN son la guanina, por su menor capacidad redox y su mayor sensibilidad a la oxidación (14).

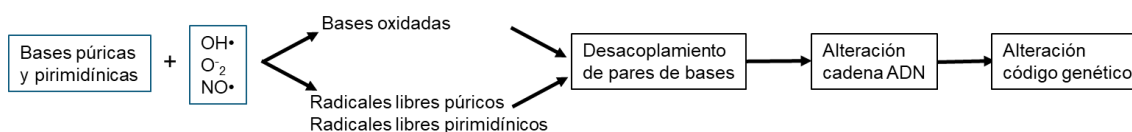


Figura 1.11. Mecanismo básico de daño de ADN causado por radicales libres (elaboración propia).

1.3.1 Principales biomarcadores de estrés oxidativo

Como la vida media de las ROS es muy corta, es extremadamente difícil y costoso calcular la concentración de estas, por lo que se utilizan los productos generados a partir del daño oxidativo de proteínas, lípidos y ADN como biomarcadores (14), por lo que, realmente, estaríamos midiendo es el daño

oxidativo en lugar del estrés oxidativo. Ghezzi (15) propone la clasificación de los biomarcadores en 4 tipos.

Tabla 1.2. Principales biomarcadores de estrés oxidativo (elaboración propia).

TIPO	BIOMARCADORES
Precusores	Actividad enzimática xantino oxidasa Actividad NADPH oxidasa
Radicales	Radicales libres in vivo Peróxido de oxígeno Aniones hidroxílicos Peroxinitritos
Estrés oxidativo	Peroxidación lipídica Carbonilos proteicos 3-Nitrotirosina Bases anómalas de ADN
Sistemas antioxidantes	Actividad superóxido dismutasa (SOD) Actividad catalasa (CAT) Glutati6n reducido (GSH) y oxidado (GSSG) Actividad glutati6n peroxidasa, reductasa y transferasa

1.3.2 El estrés oxidativo y la hiperglucemia

La glucosa se metaboliza especialmente mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. En ambas vías obtenemos como subproductos metab6licos el di6xido de carbono y las formas reducidas NADH (nicotinamida adenina dinucle6tido-reducida) y FADH₂ (flavina adenina dinucle6tido-reducida). Estas 6ltimas tienen un papel primordial en la donaci6n de electrones para generar el ATP (adenos6n trifosfato) y la reducci6n de ox6geno al radical super6xido. As6 se generan los radicales libres que, de forma general, son eliminado o neutralizados por los antioxidantes tanto end6genos como ex6genos. Siendo las concentraciones elevadas de glucosa en sangre, la caracter6stica distintiva de la diabetes mellitus, se generan exceso NADH y FADH₂, que generan el exceso de radicales super6xido y, por ende, generando un desequilibrio en los radicales libres y, desembocando en un estado de estr6s oxidativo. Al haber m6s glucosa disponible, aumenta su autooxidaci6n, afect6ndose la funci6n mitocondrial en relaci6n con la transferencia de electrones que conduce a una acumulaci6n de coenzima Q y 6sta a m6s formaci6n de radicales super6xido (16).

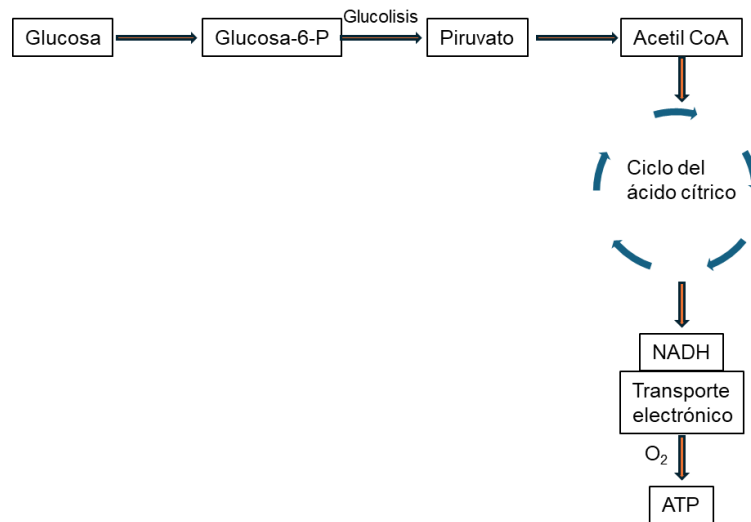


Figura 1.12. Esquema básico del metabolismo de la glucosa (elaboración propia).

En un estudio reciente en el que se estudió la relación entre los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo, de azúcar en sangre en ayunas, hemoglobina glicosilada (HbA1c) y el estado de las enzimas antioxidantes, los resultados mostraron evidencia de concentraciones significativamente más altas de glucemia y HbA1c en sujetos con diabetes mellitus. Esto es lo esperado, pero, además, se obtuvieron datos que mostraban una disminución en las enzimas antioxidantes en los sujetos con diabetes mellitus. Los niveles de biomarcadores de peroxidación lipídica y proteica se encontraban significativamente elevados (14).

1.4 Antioxidantes

1.4.1 Definición

Son compuestos capaces de retardar y/o eliminar las ROS. Sabiendo el daño que estas ROS pueden provocar en las biomacromoléculas no debemos olvidar la importancia de los antioxidantes. La función de estos es diferente dependiendo el radical que producen y la molécula que protegen: impidiendo la formación de ROS, induciendo vías de señalización o reparando el daño oxidativo.

Hay muchos antioxidantes que se obtienen de sustancias naturales que además de haber demostrado ser útiles en la lucha contra el estrés oxidativo y las enfermedades que éste puede producir también se utilizan como aditivos alimentarios y para la producción de nanopartículas.

1.4.2 Tipos de antioxidantes

Aunque algunos antioxidantes se sintetizan en nuestro organismo (endógenos enzimáticos y no enzimáticos), otros los obtenemos a través de la ingesta de determinados alimentos (exógenos). La biodisponibilidad de estos últimos varía mucho en función de la forma en que se procesen los alimentos que los contienen, la estructura de los antioxidantes, si son hidrófilos o lipófilos, su solubilidad y estabilidad, etc.

Tabla 1.3. Clasificación de los antioxidantes (elaboración propia).

Origen	Nombre	Mecanismo general
Endógenos	Superóxido dismutasa Catalasa Glutación peroxidasa	Enzimas antioxidantes
	Ácido alfa-lipoico Coenzima Q	Protege antioxidantes endógenos Protege metabolismo intracelular
	Glutamina Glicina Prolina	Facilitan síntesis de enzimas antioxidantes
	Ferritina Ceruloplasmina	Quelantes de hierro y cobre, que facilitan la formación de aniones hidroxílicos
Exógenos	Vitamina E Vitamina C Carotenoides Fenoles	Captador de radicales Inhibe peroxidación lipídica Modula oxido-reducciones Inhiben oxidaciones diversas Captan radicales libres Inhiben peroxidación lipídica Estimulan defensas antioxidantes

1.4.2.1 Fenoles

Son los antioxidantes exógenos de origen vegetal más abundantes. Se encuentran en variedad de frutas, verduras, cereales, etc., pero tienen como característica su mala y desigual absorción y su rápido metabolismo. Sus efectos van a depender de su estructura química, su biodisponibilidad y su metabolismo.

Los fenoles actúan secuestrando radicales libres, inhibiendo a las enzimas productoras de ROS (NOX e iNOS) y ayudando en la activación de las enzimas antioxidantes (OD, CAT y GPX) (17). Poseen efectos vasodilatadores, mejoran el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las proteínas. Así mismo, son capaces de regular los procesos de apoptosis del endotelio vascular (18).

Los principales grupos de fenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (18).

1.5 El aceite de oliva y los fenoles

1.5.1 El aceite de oliva y la dieta mediterránea

En los últimos años son muchos los estudios que se han llevado a cabo para analizar los efectos de la Dieta Mediterránea sobre diferentes patologías, como la enfermedad cardiovascular, los factores de riesgo de estas y, los mecanismos por los que lo hace.

La dieta mediterránea, que es ampliamente reconocida como un “modelo de dieta saludable”, contiene una gran variedad de cereales integrales y legumbres, verduras y frutas frescas, aceite de oliva virgen extra (AOVE), frutos secos y semillas, consumo moderado de carnes, pescados y productos lácteos y, cantidades moderadas de vino. Cabe destacar que el AOVE es rico en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), entre un 55 y un 83% del total de los ácidos grasos de su composición.

Entre los estudios mencionados fueron los PREDIMED los que aportaron gran variedad de pruebas que respaldan la eficacia de la dieta mediterránea. Los mecanismos moleculares que parecen favorecer estos resultados positivos a largo plazo son: acción hipolipemiante, así como la protección contra el estrés oxidativo, la inflamación y la agregación plaquetaria (19).

En un subestudio de PREDIMED realizado por Estruch en el que estudió los beneficios de la dieta mediterránea enriquecida con aceite de oliva y frutos secos, obtuvo resultados tales como la reducción de los niveles plasmáticos de proteína C y los niveles de las moléculas de adhesión celular vascular (VCAM 1) (20).

Vessby et al. en el estudio KANWU de 2001, estudiaron el efecto de dos dietas, una rica en ácidos grasos saturados y otra en AGMI, en sujetos sanos. Observaron efectos positivos de la dieta de AGMI en las funciones de las células B del páncreas y en la sensibilidad a la insulina (21).

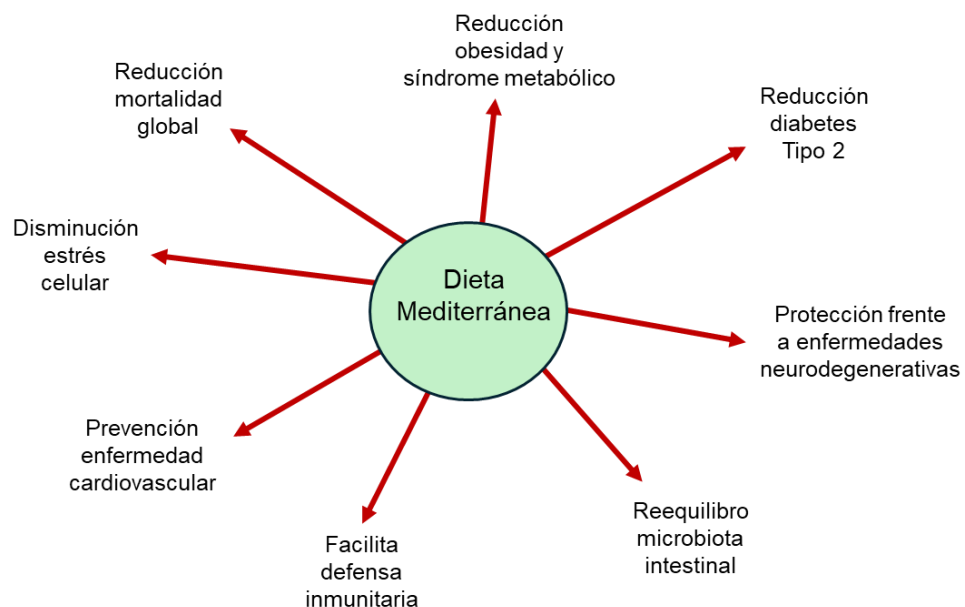


Figura 1.13. Efectos beneficiosos de la Dieta Mediterránea (elaboración propia).

1.5.2 Fenoles del aceite de oliva

Si bien hemos visto que hay estudios que analizan los efectos del aceite de oliva en conjunto, en los últimos años éstos se han ido centrando en las moléculas bioactivas que lo componen, aunque éstas representen sólo el 2% del peso total.

Los fenoles son moléculas presentes en el AOVE, la mayor parte de ellas liposolubles, fundamentalmente los derivados secoroideos. Pueden estar en forma libre, unidos o esterificados. Se han identificado más de 30 fenoles diferentes en el AOVE y, los clasificamos según su estructura química. (22)

- Los alcoholes fenólicos (o feniletanoideos): Tienen en su estructura un grupo hidroxilo unido a un grupo hidrocarbonado aromático. Los principales son el hidroxitirosol (HTyr), el tirosol (Tyr) y el oleocantal (Ole). Si bien el Htyr y el Tyr están presentes en el aceite de oliva fresco, su cantidad aumenta durante el proceso de almacenamiento debido a la hidrólisis de secoiridoides. En los alcoholes fenólicos están los fenoles más importantes y activos del aceite de oliva que son los más lipófilos, los derivados de la oleuropeína y del ligustrósido, como son entre otros la oleacina y el oleocantal o sus formas dialdehídicas. (22)
- Los flavonoides: Su estructura química son dos anillos de benceno unidos por tres cadenas lineales de carbono. A través de la glicosilación dan lugar a otros compuestos dentro de este grupo: flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanoles. (22)
- Los lignanos: Su característica principal es la condensación de aldehídos aromáticos. Se concentran en la pulpa de las aceitunas y en la porción leñosa de la semilla. (22)
- Los ácidos fenólicos: Dentro de estos existen los derivados del ácido hidroxibenzoico y los derivados del ácido hidroxicinámico. (22)
- Los hidroxiisocromanos: Estos compuestos se forman a partir de la reacción de HTyr con benzaldehído o con vainillina. (22)

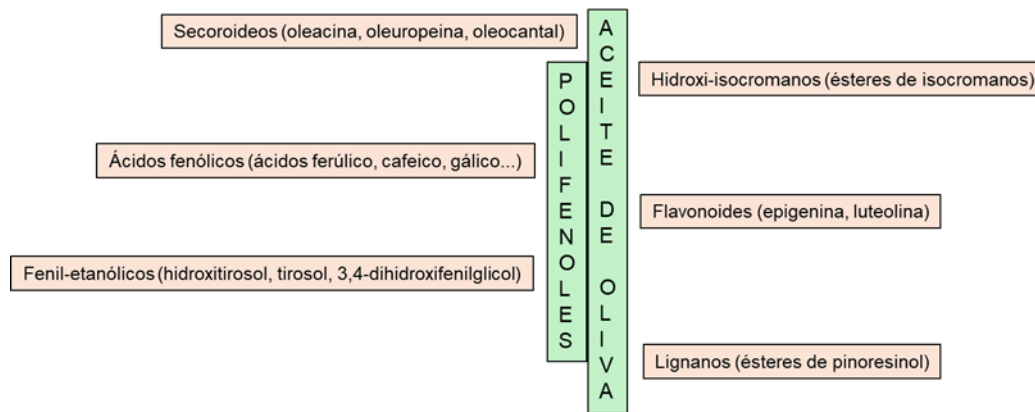
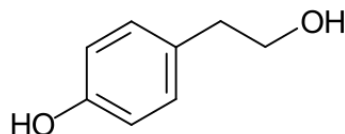


Figura 1.14. Principales fenoles del aceite de oliva virgen extra (elaboración propia).

Tanto la absorción como el metabolismo de los fenoles son complejos y dependen de múltiples variables como son las características fisicoquímicas, el grado de polimerización glicosilación, la solubilidad, etc., y puede sufrir variaciones que generen moléculas nuevas con diferente función y biodisponibilidad.

1.5.2.1 Tirosol



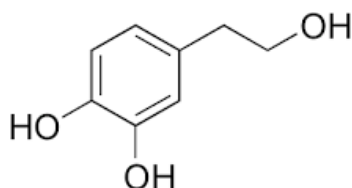
Podemos encontrar este compuesto fenólico biodisponible en humanos, aunque el consumo de aceite de oliva que hayan hecho sea moderado; tiene una vida media en el organismo de 2-4 horas. Sus metabolitos se encuentran en mayor concentración en el cuerpo que su forma libre. (22)

Puede generarse de forma endógena a través de la oxidación de la tiramina, que se produce tras la descarboxilación de la tirosina.

Durante la fase II del metabolismo del Tyr puede producirse el 4'-O-sulfato por sulfatación. Parece que este compuesto es beneficioso para el tejido hepático. (22)

El Tyr puede convertirse en HTyr en los microsomas hepáticos a través del citocromo P450.

1.5.2.2 Hidrotirosol



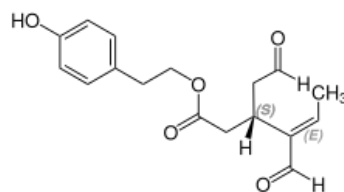
El HTyr y sus metabolitos se distribuyen por todo el organismo, aunque de mayor manera en músculos, testículos, hígado, riñones y cerebro. Como el HTyr atraviesa la barrera hematoencefálica se cree que ejerce un papel de protector neuronal. (22)

La fase I del metabolismo del HTyr se realiza mediante el alcohol citosólico no microsomal y las aldehído-deshidrogenasas (ADH y ALDH, respectivamente). En la fase II intervienen las sulfotransferasas (SULT), las uridinas 5'-difosfoglucuronosil transferasas (UGT), la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y las acetiltransferasas. (22)

Cuando la ingesta de HTyr es menor o igual a 1 mg/kg la vía metabólica principal es la de glucuronidación, pero, a medida que aumenta la dosis (100 mg/kg), es la sulfatación la vía predominante. (22)

La forma principal de eliminación del HTyr es la renal, y ésta es completa a las 6 horas.

1.5.2.3 Oleocantal



El metabolismo del Ole es menos conocido que el del HTyr y el Tyr; esto puede deberse a que su biodisponibilidad depende en gran medida de factores biológicos y técnicos. El Ole resiste los ácidos gástricos y permanece estable hasta 2-4 horas dentro del estómago. (22)

Hay estudios que postulan que la hidrólisis ácida genera un 33% de HTyr a partir de la cantidad inicial de Ole, así como que cuando el Ole es degradado en el intestino da lugar a HTyr. (22)

1.5.3 Tipos de aceite de oliva según su producción y las diferencias en la concentración de fenoles

El reglamento de la Unión Europea CEE N.º 2568/91 y su actualización 2019/1604, establecen las características químicas y sensoriales del aceite de oliva que permiten clasificarlo en diferentes categorías: aceite de oliva virgen (AOV), aceite de oliva virgen extra (AOVE) y aceite de oliva lampante (AOL).

El proceso de obtención del aceite de oliva comienza con la recolección de las aceitunas. Es importante el momento de recolección, preferiblemente entre finales de otoño y principios de invierno, antes de las primeras heladas. La razón es que en ese momento es cuando las aceitunas tienen el mayor nivel de ácidos grasos en la pulpa.

El método ideal de recolección es aquel que produce menos daño a la oliva y al olivo. De menor a mayor recomendación están el ordeño, la vibración con maquinaria y, el vareo.

Los frutos recolectados se criban y limpian y se llevan a las almazaras. Allí deben procesarse en las 24 horas siguientes a su recolección para evitar la pérdida de calidad y propiedades del aceite.

Ahora es el momento de la molienda o molturación. En los molinos se rompen los frutos para que puedan soltar el aceite de su interior. La pasta seguirá su camino ahora a las batidoras. Aquí se moverá la pasta continuamente de forma lenta, permitiendo la malaxación, la formación de gotas de aceite de mayor tamaño gracias a la agregación. Suele durar alrededor de 20 minutos. Suele añadirse agua caliente a los circuitos para calentar la pasta con el fin de facilitar la extracción de aceite disminuyendo la viscosidad de este. Si no se añade esta agua, hay que aumentar el tiempo de batido con la consecuente pérdida en la concentración de fenoles de aceite de oliva (23).

A continuación, entramos en la fase de la extracción. En ella separamos el aceite del resto de componentes contenidos en la pasta (agua, huesos, piel, ...). Puede hacerse por presión (aunque este método ya está en desuso) prensando la pasta, filtrándola y decantándola; o, por centrifugación. En esta última se centrifuga la pasta y será, la propia densidad de los compuestos la encargada de separar unos de otros. Puede hacerse en tres fases, obteniéndose aceite, alpechín y orujo; y en dos fases, aceite y alperujo (alpechín y orujo). Esta centrifugación bifásica elimina el uso de agua y el permite obtener un aceite de menor acidez y mayor contenido de antioxidantes (24).

El filtrado es sumamente importante pues evita la presencia de sólidos en suspensión a la vez que reduce la humedad. Esto último influye directamente en el aumento de la calidad de los aceites de oliva (24).

El diagrama de flujo de las distintas operaciones que se realizan en cada uno de los tres procesos de extracción de aceite de oliva se muestra en la figura 1.15.

Llega el momento del almacenamiento. Durante el mismo los compuestos fenólicos de aceite de oliva sufren diferentes modificaciones debido a que se producen reacciones oxidativas e hidrolíticas. Estudios como el de Kotsiu y Tasioula-

Magari mostraron que, si bien se observaba una disminución de los derivados secoiridoides, también encontraron un aumento en Tyr e HTyr (24).

Aunque hemos visto que el proceso de obtención del aceite de oliva influye en su composición, es igualmente importante lo que influye en la composición de los frutos del olivo, las aceitunas. Ésta, directamente relacionada con la concentración de fenoles, se ve influida por las características del suelo, las precipitaciones, la temperatura y la humedad. Así mismo, se ve afectada por el área geográfica y, no sólo por factores genéticos de las plantas.

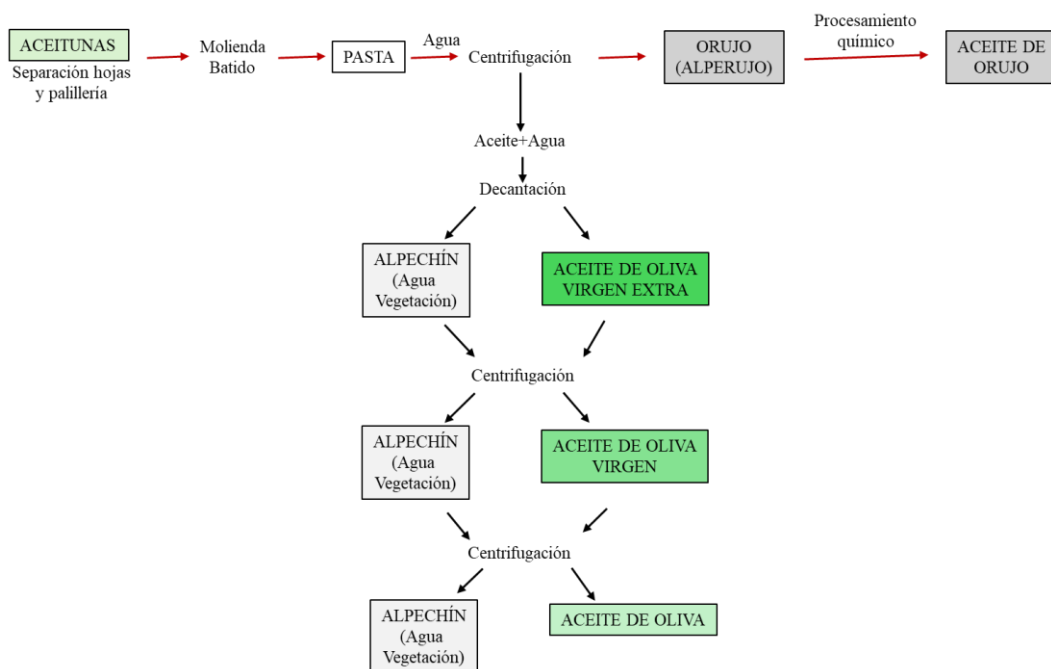


Figura 1.15. Representación esquemática de los procesos de obtención de los distintos subproductos de la aceituna (elaboración propia).

Algunos de los ingredientes añadidos van desde las hierbas aromáticas a las frutas y especias. Pueden agregarse en forma de infusión, de extractos de aceites esenciales (ambas después de la extracción) o, mediante la coextracción (se añaden estos componentes a la pasta de aceituna durante la molienda o antes de la malaxación) (24).

La otra opción se centra en los primeros pasos de la elaboración. Cuando se hace la limpieza y el cribado de las aceitunas, se separa tanto la piel como el hueso de lo que es la pulpa de la oliva. Se producirá la pasta sólo con la pulpa y

luego ésta puede deshidratarse o no, con el fin de desgrasarla antes de volver a extraer el aceite. Así conseguiremos una mayor concentración de fenoles. El proceso puede hacerse con o sin uso de pulsos eléctricos.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

El aceite de oliva es el principal producto obtenido de la aceituna y su producción y comercialización es el pilar del sector oleícola. La producción y calidad del aceite de oliva ha mejorado en las últimas décadas con el desarrollo de procedimientos de molturación de aceituna entera -con hueso- en centrifugadoras continuas (de dos y tres fases) que han sustituido al tradicional proceso de prensado (25).

El principal problema medioambiental y económico es la enorme cantidad de subproductos que se originan en la producción de aceite. Aproximadamente 5 kg de aceitunas generan 1 litro de aceite y más de 4 kg de subproductos, lo que supone millones de toneladas de residuos difíciles de almacenar y costosos de procesar o tratar para reducir su toxicidad (26).

Aunque el interés del sector agrario por reutilizar los residuos no utilizados en la producción de aceite de oliva virgen extra (AOVE) y aumentar la eficiencia del proceso de obtención del AOVE es importante, es necesario tener en cuenta que este aceite tiene una serie de beneficios demostrados para la salud, por lo que, si se modifican los procesos de extracción y manipulación de las aceitunas, es obligatorio comprobar que el resultado final conserva estas propiedades beneficiosas (27,28)

Está ampliamente demostrado que la incorporación de AOVE a la dieta, principalmente la de tipo mediterráneo, es un elemento clave para comprender los beneficios de este tipo de dieta (27,28).

Tanto experimentalmente como en humanos, se ha demostrado que el AOVE previene la aparición de eventos cardiovasculares, algunos tipos de cáncer e incluso el síndrome metabólico. Estos efectos del AOVE se han atribuido principalmente al contenido de compuestos polifenólicos, principalmente alcoholes (hidroxitirosol, tirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol) y triterpenoides (ácido oleanólico, ácido maslínico y ácido ursólico), entre otros (5,6). Se han realizado numerosos estudios sobre estos

compuestos y sus asociaciones, postulándose la posibilidad de una sinergia entre ellos (29–31).

Asimismo, el efecto de estos compuestos está relacionado con su efecto antioxidante y antiinflamatorio, derivando de éstos los efectos demostrados en diversos aspectos de la bioquímica y el funcionalismo celular (32).

Entre las complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus, se encuentra la nefropatía y la retinopatía. La enfermedad renal crónica es una de las complicaciones que aparecen en la evolución de la diabetes mellitus, especialmente cuando el control glucémico es inadecuado (33,34). Más del 25-40% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 padecen nefropatía tras 20-35 años de evolución de la enfermedad(35). Las principales características clínicas de la nefropatía diabética son el aumento de la excreción urinaria de albúmina (≥ 300 mg/día), la disminución de la tasa de filtración glomerular y el deterioro progresivo de la función renal que, en última instancia, conduce a la insuficiencia renal terminal (36). Las vías bioquímicas implicadas en el desarrollo de la nefropatía diabética son complejas e interactúan entre sí, pero se acepta que un elemento importante en la fisiopatología de esta complicación de la diabetes mellitus es la generación de radicales libres derivados del oxígeno (estrés oxidativo) y de óxido nítrico (estrés nitrosativo) (37). El estrés oxidativo y nitrosativo, inducido por la hiperglucemia mantenida, puede dañar directamente las células endoteliales, los podocitos y las células mesangiales (38); por otra parte, los radicales libres derivados del oxígeno activan vías bioquímicas inflamatorias, profibróticas y del factor de crecimiento intersticial (33), remodelando así la morfología y la función glomerulares; También estimulan la producción de mediadores vasoconstrictores, como el tromboxano A₂, y disminuyen la de mediadores vasodilatadores, como la prostaciclina (39).

Algunos estudios han puesto de manifiesto la relación existente entre nefropatía y retinopatía, en el sentido de que son complicaciones que evolucionan de forma paralela (40).

Nuestro grupo de investigación ha observado que algunos fenoles del AOVE disminuyen las complicaciones renales y retinianas de la diabetes mellitus tipo 1 en modelos experimentales con animales (10,41,42).

En un modelo experimental de diabetes mellitus en ratas, utilizado en el presente estudio, se ha confirmado el efecto nefroprotector del hidroxitirosol y del 3',4'-dihidroxifenilglicol (10,41), dos fenoles presentes en el AOVE. Recientemente se ha postulado que los triterpenos del AOVE pueden tener un efecto beneficioso sobre diversas afecciones cardiovasculares (43).

Basándose en la importancia del estrés oxidativo en la evolución de la nefropatía diabética, se ha postulado el uso de antioxidantes para prevenir la aparición y/o evolución de esta complicación, sin olvidar que el control glucémico es el principal elemento preventivo de las complicaciones de la diabetes mellitus (44–46). Nuestro grupo de investigación estableció que la reducción del estrés oxidativo y el incremento de la prostaciclina disminuían la progresión de la retinopatía en un modelo de diabetes mellitus experimental (42).

En definitiva, en los últimos años se ha estudiado el efecto de estos fenoles y su asociación en diversos aspectos de las complicaciones de la diabetes mellitus, como uno de los principales factores de riesgo cardiovascular (10,41,45,47,48), por lo que nos propusimos evaluar en este modelo experimental distintos aceites de oliva, en virtud del procesamiento de la aceituna: el aceite de semillas de olivo, el aceite de oliva procedente de aceitunas deshuesadas (muy similar al AOVE) y el aceite de oliva procedente de aceitunas deshuesadas y deshidratadas.

2.2 Hipótesis

La distinta composición en fenoles y triterpenos de aceites de oliva, obtenidos mediante diferente procesamiento de las aceitunas, condicionará su efecto sobre la posible prevención de las complicaciones renales y retinianas en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1.

2.3 Objetivos

Por todo el razonamiento anterior, nos planteamos el presente estudio con los siguientes objetivos:

Objetivo principal

Evaluar el posible efecto del aceite de semilla de aceituna y del aceite de oliva deshuesado y deshidratado, en comparación con el aceite de oliva virgen extra (aceite de aceituna deshuesada), sobre las complicaciones renales y retinianas en un modelo experimental de diabetes mellitus.

Objetivos secundarios

- Analizar el mecanismo de acción implicado en el posible efecto beneficioso de los distintos aceites sobre el daño renal y retiniano inducido por el modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1.
- Valorar la posible correlación entre parámetros bioquímicos de daño y las alteraciones a nivel histológico, tanto a nivel renal como retiniano.
- Analizar si la retinopatía se correlaciona con parámetros bioquímicos e histológicos de daño renal.
- Evaluar si la distinta composición de estos aceites podría explicar las posibles diferencias observadas sobre el efecto protector a nivel renal y retiniano.

METODOLOGÍA



3 METODOLOGÍA

Dentro de la línea de investigación traslacional sobre los fenoles del aceite de oliva, en estos últimos años, hemos investigado sobre los efectos de aceites de oliva obtenidos por procedimientos electroquímicos distintos a los convencionales. La idea es comprobar si los cambios en el procedimiento para obtener el aceite de oliva contribuyen a una composición distinta, cuyas propiedades pueden mejorar al aceite de oliva obtenido por métodos tradicionales.

3.1 Diseño del estudio

En este sentido, hemos diseñado un estudio preclínico “*ex vivo*”, basado en el modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1, descrito por nuestro grupo de investigación (41).

Este modelo experimental permite evaluar las complicaciones microvasculares de la diabetes, objeto del estudio.

Nos hemos centrado en las complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus tipo 1: nefropatía y retinopatía, dado que son complicaciones crónicas que deterioran la calidad de vida de nuestros pacientes.

3.2 Animal de experimentación

El estudio se realizó siguiendo las directrices de la Declaración de Helsinki, la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y fue aprobado por el Comité de Ética de la Experimentación de la Universidad de Málaga (Ref. CEUMA31-2018-A) y la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Junta de Andalucía (Ref. 9/07/2019/124). En todo momento, los animales se utilizaron de acuerdo con la legislación española vigente para el cuidado, uso y alojamiento de animales (EDL 2013/80847, BOE-A-2013-6271). Se siguieron las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH publicación nº 86-23, revisada en 1985), así como la Ley Española de Protección Animal, en su caso.

Se utilizaron un total de 50 ratas Wistar, adquiridas en el Centro de Experimentación Animal (CECA) de la Universidad de Málaga. El peso inicial de los animales fue de 200-220 g, y fueron alojados en el CECA durante un periodo de cuarentena de siete días. Transcurrido este tiempo, los animales fueron identificados y alojados individualmente durante toda la duración del estudio. El animal diabético debe mantener unas condiciones higiénicas y de alojamiento ideales para evitar cualquier problema o sufrimiento innecesario. Siempre se controló la ingesta de agua (sin restricciones) y de alimento (sin restricciones), para evaluar si se producían cambios en los hábitos alimentarios relacionados con el estado diabético o con la administración de los aceites objeto de estudio.

El número de animales incluidos en cada grupo de tratamiento fue calculado en base a las diferencias observadas a dos biomarcadores de daños renal: excreción urinaria de proteínas y volumen glomerular (parámetros bioquímico e histológico, respectivamente) Intentamos reducir en la medida de lo posible el número de animales utilizados por grupo de tratamiento, utilizando siempre el mínimo necesario. De hecho, el número de animales en nuestro estudio no es elevado comparado con otros estudios presentes en la bibliografía sobre Diabetes Mellitus en ratas. Se realizó el cálculo del tamaño muestral en base a una diferencia porcentual sobre los parámetros antes mencionados en animales diabéticos tratados frente a los no tratados, asimismo una reducción porcentual del 30% para ambos parámetros. Lo que supuso un número de animales por grupo=10 (incluyendo una tasa de reposición del 10%). Ningún animal falleció durante el experimento ni se le tuvo que aplicar criterio de punto final.

Las ratas Wistar son una de las especies más utilizadas en la investigación básica. Concretamente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado el mismo modelo experimental en otros proyectos.

La realización de un modelo experimental de diabetes permite la reproducción de la inflamación vascular y microangiopatía que se observa en pacientes con diabetes. Esto permite evaluar una serie de biomarcadores de daños vascular,

cerebral, renal y en retina, que posibilita la identificación de posibles dianas terapéuticas.

Todos los animales fueron tratados por personas con amplia experiencia en el tratamiento animal y con acreditación para el manejo de animales de experimentación, y se redujo en todo momento el sufrimiento que se pudiera generar por los procedimientos utilizados, minimizando el número de manipulación de los animales. Otras formas de minimizar el estrés animal fue favorecer el ambiente en que dichos procedimientos se llevaron a cabo. Los animales fueron tratados sobre manta térmica para mantener la temperatura corporal óptima, y se minimizaron los focos de ruido. Para manipular a los animales se utilizarán accesorios (zapatillas, cajas) para que se cobijaran en ellos y solo se manipularan cuando el procedimiento así lo requiera.

Además, de forma diaria se controló la comida y agua ingerida y se evalúa el aspecto del animal. Semanalmente se administró por vía s.c. una o más dosis de insulina (según control glucémico), en el caso de grupos de animales diabéticos.

Diariamente se comprobaron los siguientes signos y síntomas en el animal de experimentación:

- Presencia de disnea o hemorragia o estupor o caquexia fueron considerados criterios de punto final.
- Presencia de secreciones anormales o aumentadas (no=0 puntos; si=1 punto); actitud de aislamiento o agresividad frente a congéneres y/o investigador (no=0 puntos; si=1 punto); diarrea (no=0 puntos; si=1 punto). En caso de alcanzar 2 puntos, se habría aplicado el criterio de punto final.
- En caso de hiperglucemias continuadas durante 3 días consecutivos, se habría aplicado criterio de punto final, según recoge las buenas prácticas veterinarias.

Para la administración del tratamiento hemos optado por la canulación orogástrica.

Además, para la medición de la glucemia rasurábamos un área pequeña del pelo de la extremidad inferior del animal para asegurar la obtención de la gota de sangre. También usamos material para reducir el estrés del animal (enriquecimiento) como zapatillas, tubos de cartón..., considerados lugares de cobijo.

No pudimos prescindir de la jaula metabólica puesto que necesitábamos una muestra de orina de 24 h.

Tras finalizar el periodo de tratamiento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico, tras asegurar que el animal no reacciona a estímulos externos procedimos a la exanguinación y extracción de los órganos objeto del estudio. Posteriormente y por tratarse de un procedimiento de sin recuperación, los animales fueron decapitados con guillotina, como establecen los protocolos de actuación en este tipo de experimentación.



Figura 3.1. Rata cepa Wistar macho del CECA.



Figura 3.2. Sala Centro de Experimentación del CECA de la UMA.

3.3 Grupos Experimentales

Los animales del estudio se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales (10 ratas/grupo):

- Ratas sanas no diabéticas (NDR). Sirvieron de control para las variables determinadas en condiciones normoglucémicas. Los procedimientos de administración de cualquier tipo de sustancia difirieron de los demás grupos únicamente en que en este caso se administró solución salina fisiológica como placebo.
- Ratas diabéticas de control (RD). A estos animales se les indujo una diabetes experimental (véase más adelante), no se les administró ninguno de los aceites del estudio, sólo insulina, con el objetivo de reducir la mortalidad debida a una hiperglucemia excesivamente elevada.
- Ratas diabéticas tratadas. Una vez comprobada la presencia de diabetes en cada animal, se les administraron los aceites objeto de estudio:
 - *Aceite de aceituna deshuesada (AD, equivalente a un AOVE)*, a una dosis de 0,5 mL/kg/día, mediante canulación orogástrica, durante dos meses.

- *Aceite de semillas de oliva (AS)*, a una dosis de 0,5 mL/kg/día, mediante canulación orogástrica, durante dos meses.
- *Aceite de oliva deshuesado y deshidratado (ADD)*, a una dosis de 0,5 mL/kg/día, por canulación orogástrica, durante dos meses.

Cada uno de los aceites se administró una vez al día, siempre a la misma hora, durante 2 meses, incluyendo el día de finalización del seguimiento y recogida de las muestras biológicas.

La dosis administrada de los aceites se eligió basándose en la utilizada en estudios en humanos con AOVE (40-50 mL/día), es decir, aproximadamente 0,5 mL/kg/día en personas de 75-80 kg de peso corporal (27,49).

3.4 Inducción a la diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus se indujo mediante la administración de estreptozotocina (40 mg/kg) en una única dosis intraperitoneal. La estreptozotocina es un antibiótico que provoca la destrucción de las células β en los islotes pancreáticos y se utiliza experimentalmente para producir un modelo de diabetes mellitus tipo 1 (50). Un animal se clasificó como diabético si su glucemia, medida con un medidor de glucosa FreeStyle (Laboratorios Abbot S.A., Madrid, España) utilizando sangre obtenida de la punción en la extremidad inferior del animal, era de 200 mg/dL durante dos días consecutivos. Para reducir la mortalidad de los animales diabéticos debida a niveles de glucosa en sangre demasiado elevados, se administraron por vía subcutánea de 4 a 6 UI/día de un análogo de insulina de acción prolongada (Levemir®, Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca).

3.5 Compuestos del estudio

Se utilizaron tres tipos de aceite, todos ellos procedentes de aceituna de la variedad Picual, obtenidos y procesados en la empresa Emilio Vallejo S.A. (Torredonjimeno, Jaén, España). El procedimiento seguido desde la recolección de las aceitunas fue el siguiente (Figura 3.3):

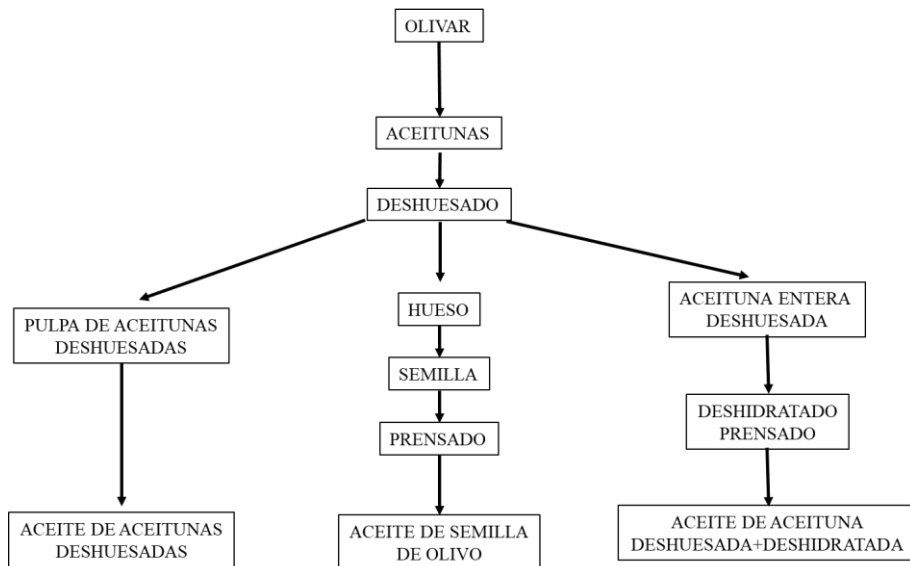


Figura 3.3. Esquema básico de los procedimientos para la obtención de los tres tipos de aceites (elaboración propia).

- Aceite de aceituna deshuesada (AD)

Se ha obtenido a partir de aceitunas de la variedad Picual que fueron deshuesadas, y posteriormente sometidas a un método de procesado mediante el sistema de extracción en frío en dos etapas. El proceso incluye separación de hojas y palos, molturación, batido, prensado de la pasta obtenida, lavado con agua, decantación y obtención del aceite de oliva final. Este procedimiento se llevó a cabo en la empresa Emilio Vallejo S.A. (Torredonjimeno, Jaén).

- Aceite de semilla de aceituna (AS)

Se obtuvo mediante extracción mecánica por prensado en frío tras la fragmentación y secado de las semillas de hueso de aceituna y la fase de secado, tal como se describe en la patente 2389816 (51). A continuación se describe brevemente, en una primera etapa se clasifican las aceitunas enteras por tamaño, en una segunda etapa se llevan a una deshuesadora que parte el hueso sin dañarlos, en una tercera etapa se llevan a un separador de clasificación que separa las pepitas o granos de la cáscara, en una cuarta fase, pasan por un clasificador de visión artificial que descarta todas las pepitas

defectuosas, en una quinta fase, las pepitas se someten a un secado suave para dejarlas con la humedad necesaria para su posterior procesado, en una sexta fase, se someten a un prensado en frío en una prensa continua, en una séptima fase, se filtra el aceite obtenido. Este procedimiento se llevó a cabo en la empresa Acer Camprestres S.L. (Castillo de Locubin, Jaén, España).

- Aceite de oliva deshuesado y deshidratado (ADD)

Para obtener este aceite, las aceitunas se limpian, se deshuesan y, a continuación, se deshidratan a una temperatura no superior a 40°C. Finalmente, la pulpa deshidratada se centrifuga en continuo para obtener el aceite final. El procedimiento está descrito por Olmo-García et al. (52). El proceso comprende las siguientes etapas (a) obtención de la pulpa de aceituna; b) deshidratación de la pulpa de aceituna, obteniéndose pulpa de aceituna deshidratada; c) molturación de la pulpa de aceituna deshidratada, obteniéndose polvo de aceituna deshidratado seco; d) obtención de aceite de oliva a partir del polvo de aceituna deshidratado seco. Este procedimiento se llevó a cabo en la empresa Acer Camprestres S.L. (Castillo de Locubin, Jaén, España).

La tabla 3.1 (a y b) muestra la composición de los tres tipos de aceites administrados a los animales de experimentación.

La composición en ácidos grasos del aceite se analizó mediante extracción simultánea del aceite y metilación de los ácidos grasos de los aceites extraídos. Se utilizó una cromatografía de gases (método isocrático) y líquidos (GLC) PerkinElmer Clarus 600 GC (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EE. UU.). La CGL estaba equipada con una columna capilar BPX70 de 30 m × 0,25 mm de diámetro interno × 0,25 µm de espesor de película (SGE Analytical Science Pty, Ltd., Ringwood, Australia). El inyector dividido y el detector de ionización de llama se mantuvieron a 300 °C y se utilizó hidrógeno como gas portador (0,8 ml/min).

La determinación de alcoholes alifáticos, esteroides y dialcoholes triterpénicos (eritrodiol y uvaol) se realizó siguiendo el Reglamento europeo EEC/2568/91 para

aceite de oliva y aceite de orujo (53). La solución se inyectó en un sistema de cromatografía de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado con un detector FID. La columna analítica fue una columna HP-5 (5%-fenilo, 95%-dimetilpolisiloxano) (30 m x 0,32 mm de diámetro interno, 0,25 μm de espesor de película).

La concentración de ácidos triterpénicos se determinó por el procedimiento descrito por Pérez-Camino y Cert. (54), utilizando el mismo equipo de GC mencionado anteriormente.

Los tocoferoles se evaluaron mediante el método 2.432 de la IUPAC (55) Las composiciones de ceras y escualenos se determinaron según el Reglamento Europeo EEC/183/9323 (56) mediante separación en una columna cromatográfica de gel de sílice 60 (70-230 mesh ASTM) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las concentraciones de compuestos polares se determinaron según Márquez-Ruiz et al. (57). La solución final se inyectó en un sistema HPLC Hewlett-Packard serie 1050 equipado con un detector de índice de refracción (LaChrom L-7490 Merck). Se utilizó una columna de gel PL de 100 Å (5 μm) (Agilent).

La determinación de la acidez libre y del índice de peróxido (PV) se llevó a cabo según los métodos oficiales descritos en el Reglamento de la Comunidad Europea EEC/2568/91.21 Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido oleico. El índice de peróxidos se expresó en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite (mEq O₂/kg aceite).

a. Fenoles:

Las muestras de aceite se extrajeron siguiendo el método de Vázquez-Roncero et al. (1973) (58), en el que se pesaron 10 g de aceite en un matraz y se disolvieron en 50 mL de hexano. Se realizaron tres extracciones líquido-líquido utilizando 20 mL de una mezcla de metanol: agua (60:40 (v/v)). Posteriormente, cada mezcla se homogeneizó utilizando un mezclador digital Ultra Turrax IKA T25 durante 60 segundos a 1000 rpm. A continuación, las dos fases formadas se separaron por centrifugación durante 20 minutos a

21°C y 3779 x g en una centrífuga Sorvall RT 6000 D. Finalmente, cada fracción se fusionó y se concentró para secar al vacío a 40°C y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

b. Análisis de compuestos fenólicos totales e individuales

El contenido en compuestos fenólicos totales se determinó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Obied et al. (2007) (59). Las medidas finales se expresaron como gramos de equivalentes de ácido gálico por kilogramo de muestra.

Los compuestos fenólicos individuales se determinaron mediante una metodología previamente optimizada y validada utilizando un sistema HPLC 1100 de Hewlett-Packard acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (DAD). Brevemente, la separación de los compuestos fenólicos se realizó en una columna Teknokroma Tracer Extrasil OSD2 (5 µm, 25 mm x 0,46 mm x 2,1). El volumen de inyección fue de 20 µl con automuestreador Agilent serie 1100, y el caudal se fijó en 1 mL/min. La separación se logró utilizando el disolvente A (agua Milli-Q, pH 2,5 ajustado con 20 mM de TFA) y el disolvente B (acetonitrilo). El gradiente de elución se programó como sigue: 0-3 min, 0% B; 3-16 min, 0-12% B; 16-16,5 min, 12-16% B; 16,5-21min, 16% B; 21-25 min, 16-20% B; 25-30 min, 20% B; 30-31 min, 20-100% B; 31-34 min, 100% B; 34-39 min, 0% B. Los compuestos fenólicos individuales se identificaron comparando sus tiempos de retención y espectros UV/Vis con los de patrones comerciales a 240, 280 o 340 nm de longitud de onda.

c. Compuestos estándar

Para este trabajo, el 3,4-dihidroxifenilglicol se obtuvo de Sigma-Aldrich (Deisenhofer, Alemania). El tirosol se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza) y el hidroxitirosol se obtuvo de Ex-trasynthese (Lyon Nord, Geney, Francia). El ácido gálico, el ácido trifluoroacético, la antrona, la glucosa, el reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, el ácido vanílico, el ligstrósido y la oleuropeína se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El acetonitrilo (grado

HPLC), el hexano y el ácido sulfúrico (H₂SO₄) se adquirieron a Panreac Química S.A. (Barcelona, España). El agua ultrapura se obtuvo utilizando un sistema de agua Milli-Q (Millipore, Milford, MA, EE. UU.).

Tabla 3.1 (a). Composición de los tres tipos de aceites.

Parámetro	Aceite de semilla (AS)	Aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD)	Aceite de aceituna deshuesada (AD)
Acidez (%)	28.42 ± 1.21	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Peróxidos (mEqO ₂ /kg)	4.02 ± 0.70	10.22 ± 1.12	9.05 ± 0.01
K270	1.42 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01
K232	2.58 ± 0.04	1.55 ± 0.03	1.74 ± 0.03
Delta K	0.02 ± 0.00	<0.01	<0.01
Etil esterres (mg/kg)	3897 ± 27	12 ± 2	14 ± 2
Ethil palmitato (mg/Kg)	432 ± 6	4 ± 0	6 ± 1
Ethyl oleato (mg/kg)	3852 ± 11	6 ± 1	7 ± 1
Waxes (mg/kg)	289 ± 4	45 ± 2	32 ± 1
Ácidos grasos			
Mirístico (%)	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Palmítico (%)	10.20 ± 1.02	12.92 ± 1.11	11.58 ± 0.79
Palmitoleico (%)	0.26 ± 0.01	1.22 ± 0.04	1.1 ± 0.05
Margárico (%)	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Margaroleico (%)	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Esteárico (%)	3.20 ± 0.40	2.48 ± 0.71	2.95 ± 0.55
Oleico (%)	72.45 ± 2.32	78.05 ± 3.54	77.59 ± 2.98
Linoleico (%)	15.07 ± 2.18	4.01 ± 0.55	4.52 ± 0.72
Linolénico (%)	0.17 ± 0.02	1.02 ± 0.04	0.91 ± 0.03
Aráquico (%)	0.49 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.32 ± 0.01
Eicosanoico (%)	0.68 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Benénico (%)	0.35 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Lignocérico (%)	0.22 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.00

Tabla 3.1 (b). Composición de los tres tipos de aceites.

Parámetro	Aceite de semilla (AS)	Aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD)	Aceite de aceituna deshuesada (AD)
Esteroles			
Esteroles totales (mg/kg)	3548 ± 23	1428 ± 18	1227 ± 12
Colesterol (%)	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Brassicasterol (%)	<0.1	<0.1 ±	<0.1
Estigmasterol (%)	4.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.9 ± 0.0
B-Sitosterol (%)	1.7 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0
D7-estigmastenol (%)	92.0 ± 4.1	96.4 ± 3.2	93.2 ± 3.0
Eritrodiol+Uvaol (%)	1.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0
Ácidos triterpénicos totales (mg/Kg)	1.1 ± 0.0	3.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0
Oleanólico (mg/kg)	97.82 ± 6.32	845.21 ± 16.80	122.1 ± 5.07
Maslínico (mg/Kg)	33.52 ± 2.20	261.04 ± 10.84	37.59 ± 2.12
Ursólico (mg/kg)	62.3 ± 1.95	574.72 ± 14.01	80.53 ± 2.30
Pigmentos de clorofila (mg/Kg)	2.01 ± 0.02	9.45 ± 0.10	4.02 ± 0.09
Pigmentos de Carotenoides (mg/Kg)	12.1 ± 0.70	32.84 ± 1.02	31.66 ± 1.58
Escualeno (mg/100g)	8.57 ± 0.12	7.44 ± 0.23	8.95 ± 0.17
Tocoferoles (mg/Kg)	23.12 ± 1.60	594.32 ± 24.51	388.05 ± 32.87
Esteroles totales (mg/kg)	22.6 ± 0.80	421.16 ± 12.75	388.04 ± 14.60
Fenoles			
Fenoles totales (ppm)	480.16 ± 17.65	752.15 ± 23.15	722.61 ± 20.07
3,4-dihidroxifenilglicol	0.12 ± 0.01	1.32 ± 0.02	1.17 ± 0.02
Hidroxitirosol (HT)	21.17 ± 0.38	12.14 ± 0.44	8.01 ± 0.22
Tirosol	17.20 ± 1.02	12.07 ± 1.33	4.52 ± 1.74
Ácido vanílico	5.17 ± 0.40	0	0
HT acetato	0	14.15 ± 0.55	0
Nuzenida	32.14 ± 2.16	7.12 ± 0.75	0
Derivados de oleuropeina 1	32.18 ± 1.89	0	0
Derivados de oleuropeina 2	29.35 ± 1.10	28.74 ± 2.21	52.94 ± 4.50
Derivados ligustrósidos	0	57.09 ± 3.18	62.15 ± 2.33
Sum	137.58 ± 4.65	132.63 ± 7.52	128.91 ± 8.45
Potencial de HT (ppm)	52.15	33.05	27.60
% aproximado del potencial de HT	0.0052	0.0033	0.0028

3.6 Obtención de muestras

El día 58 del periodo de seguimiento, los animales se colocaron en jaulas metabólicas individuales (Tecniplast S.p.A., Buguggiate, Italia) durante 24 h, recogiendo orina durante este periodo. Las muestras se centrifugaron a 3500 x g durante 10 min a 4°C, dividiendo la muestra en alícuotas y congelándolas a -80°C.

El día 60 de seguimiento, tras un periodo de ayuno de 12 h, se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.) y se extrajo sangre de la bifurcación de las arterias ilíacas. Posteriormente, se perfundió una solución salina isotónica a 37°C. Los animales fueron decapitados y se obtuvieron las siguientes muestras biológicas:

- Se obtuvo suero de sangre no anticoagulada tras centrifugación y separación de las alícuotas, que se congelaron a -80 °C.
- Tejido renal. Se procesó el riñón derecho para su posterior análisis histológico, y el riñón izquierdo para la determinación de variables bioquímicas. A partir del riñón izquierdo, se aisló la corteza renal y se homogeneizó en solución salina tamponada con fosfato 50 mM, pH 7,0 (1/15 p/v), y luego se centrifugó a 13.000xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se dividió en dos partes. El sobrenadante se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C.
- Se enuclearon ambos ojos y se sumergieron en suero fisiológico hasta su procesamiento que se efectuó en las dos horas siguientes (ver más adelante).
- Orina de 24 horas como se ha descrito anteriormente.



Figura 3.4. Jaula metabólica modular de Tecniplast.

3.7 Variables analizadas

Reactivos utilizados: Kits colorimétricos: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidad antioxidante total (TAC) (Cell Biolabs Inc., Bionova Científica S.L., Madrid, España) y glutatión reducido (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Kits de inmunoensayo enzimático: 3-nitrotirosina, 8-iso-prostaglandina F2 α (8-isoprostano), 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (Cell Biolabs Inc., Bionova Científica S.L., Madrid, España), 11-dehidro-tromboxano B2 y 6-ceto-prostaglandina F1 α (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EE. UU.). El resto de los reactivos utilizados se obtuvieron de Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO, EE. UU.).

3.7.1 Bioquímica sérica y urinaria

Los parámetros bioquímicos, que constituyeron los perfiles renales y las concentraciones de glucosa, se analizaron con el autoanalizador Atellica[®] CH de Siemens Healthineers (Erlangen, Alemania).

El aclaramiento de creatinina (mL/min/kg de peso corporal) se calculó utilizando la fórmula descrita por Giribabu (66), de la siguiente manera: creatinina en orina (mg/dL) \times volumen de orina (mL)/creatinina sérica (mg/dL) \times 1000/ peso corporal (g) \times 1/1440.

3.7.2 Estrés oxidativo y nitrosativo

Como índice de la concentración de peróxido lipídico en suero y tejido renal, se cuantificó la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, ya que el malondialdehído es el principal producto de esta reacción. Se determinó la concentración urinaria de 8-isoprostano para la cuantificación global del estrés oxidativo (67). Como índice del daño del ADN inducido por el estrés oxidativo, se cuantificó la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. La defensa antioxidante se midió mediante las concentraciones séricas y renales de glutatión, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y la capacidad antioxidante total. Como índice del estrés nitrosativo (formación de peroxinitrito), se midieron las concentraciones de 3-nitrotirosina en suero y

tejido renal. Todos estos parámetros se midieron según el protocolo del fabricante.

3.7.3 Eicosanoides

La producción de tromboxano y prostaciclina se cuantificó mediante la determinación de las concentraciones urinarias de sus principales metabolitos 11-dehidrotromboxano B2 y 6-keto-prostaglandina F1 α , respectivamente, según el protocolo del fabricante.

3.7.4 Análisis morfométrico renal

El riñón se fijó en formol al 10%, obteniéndose secciones de 5 μm , y se teñió con hematoxilina y eosina y ácido periódico de Schiff (PAS), según los métodos rutinarios de laboratorio. Las secciones teñidas se analizaron con un sistema de análisis de imágenes (Olympus BX-UCB, con software VS-ASW FL, Hamburgo, Alemania). Para realizar el análisis cuantitativo se utilizó el programa QuPach-0 y el programa FIJI ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). El volumen glomerular (VG) se calculó según Lane et al. (60).

$$VG = 3/2 (AG) \times \beta/d$$

Donde AG es el área glomerular, β es un coeficiente adimensional de forma ($\beta = 1,0$ para esferas perfectas) y d es un coeficiente de distribución de tamaño que ajusta las variaciones en el tamaño glomerular.

Para calcular la tasa de glomeruloesclerosis (GMR), se utilizaron secciones teñidas con PAS (50 glomérulos/sección). Tras evaluar el área de cada glomérulo, se cuantificó la superficie PAS-positiva mediante análisis de imagen utilizando la fórmula:

$$GR = [\text{PAS (+) A } (\mu\text{m}^2) / \text{AG } (\mu\text{m}^2)] \times 100$$

Donde GR es el porcentaje de área glomerular con superficie teñida con PAS (+); PAS (+) A: área ocupada con material en un glomérulo; AG: área de un glomérulo.

3.7.5 Análisis morfométrico retiniano

Tras extraer los globos oculares y limpiarlos con solución salina, se fijaron en una solución de formaldehído al 10% durante 48 h agitándolos suavemente a temperatura ambiente. A continuación, se fijaron e incluyeron en parafina según un protocolo convencional y se seccionaron con un micrótopo rotatorio HM 325 (Leica Biosystems, Nussloch GmbH, Alemania). Las secciones se cortaron con un grosor de 7 μm comenzando por la zona posterior a nivel del nervio óptico. Los estudios morfométricos se realizaron en imágenes de 40 \times . Tras la desparafinación y la tinción con hematoxilina-eosina, dos observadores independientes realizaron estudios cuantitativos de los cortes histológicos a ciegas para registrar los siguientes parámetros: (1) Grosor entre la membrana limitante interna y externa, equivalente al grosor de la retina; (2) Grosor de la capa nuclear externa (ONL), es decir, (3) Grosor de la capa plexiforme externa (OPL); (4) Grosor de la capa nuclear interna (INL), es decir, el grosor de la capa nuclear interna o granular; (5) Grosor de la capa plexiforme interna (IPL). Las células de la capa ganglionar se contaron en micrografías de 40x después de la tinción, en un total de 10 secciones por rata a una distancia conocida de la primera sección. Los resultados se presentan como recuentos de células por segmento de 100 μm de longitud retiniana para estandarizar los datos de todas las muestras. (42,61)

3.8 Análisis estadístico

Análisis univariante: los datos del texto, tablas y figuras representan la media \pm desviación estándar de 10 animales por grupo experimental. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico para ciencias sociales versión 29.0 (SPSS Co., Chicago, IL, USA) con licencia del Servicio Central de Informática de la Universidad de Málaga. Como variables de resultado se eligieron aquellas relacionadas con el daño a nivel renal y retiniano, tanto a nivel bioquímico como morfológico. Si bien, a nivel retiniano, solo se consideraron parámetros histológicos. Como variables independientes, desde el punto de vista de la comparación, se

incluyeron los diferentes grupos experimentales, tanto controles de la enfermedad, como grupos de animales tratados con los diferentes aceites.

Análisis bivariante: se realizó mediante ANOVA con una posterior transformación de Bonferroni para evaluar las diferencias entre los grupos de tratamiento. Se utilizó la prueba t de Student para datos no apareados para establecer la diferencia entre las variables analizadas en el grupo control no diabético frente al grupo control diabético. La correlación bioquímica-morfológica se estableció mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson. Se consideró significación estadística un valor p inferior a 0,05.



RESULTADOS



4 RESULTADOS

En este apartado expondremos los resultados obtenidos en este estudio, atendiendo a los siguientes apartados:

- 4.1. Resultados correspondientes al efecto del modelo experimental de diabetes mellitus en los distintos tipos de variables analizadas.
 - 4.1.1. Variables zoométricas (peso corporal, peso renal, comida y bebida ingerida)
 - 4.1.2. Glucosa, proteínas totales séricas, creatinina sérica y perfil hepático
 - 4.1.3. Perfil lipídico
 - 4.1.4. Estrés oxidativo sérico y en tejido renal (variables oxidativas y antioxidantes)
 - 4.1.5. Equilibrio prostanoide (tromboxano y prostaciclina urinarias)
 - 4.1.6. Variables de función renal (bioquímicas y morfométricas glomerulares)
 - 4.1.7. Variables morfométricas retinianas
- 4.2. Resultados correspondientes a las modificaciones de estas variables causadas por la administración de los tres aceites de estudio
 - 4.2.1. Variables zoométricas (peso corporal, peso renal, comida y bebida ingerida)
 - 4.2.2. Glucosa, proteínas totales séricas, creatinina sérica y perfil hepático
 - 4.2.3. Perfil lipídico
 - 4.2.4. Estrés oxidativo sérico y en tejido renal (variables oxidativas y antioxidantes)
 - 4.2.5. Equilibrio prostanoide (tromboxano y prostaciclina urinarias)
 - 4.2.6. Variables de función renal (bioquímicas y morfométricas glomerulares)
 - 4.2.7. Variables morfométricas retinianas
- 4.3. Correlaciones entre las variables de función renal y el resto de variables bioquímicas

4.1 Resultados correspondientes al efecto del modelo experimental de diabetes mellitus en los distintos tipos de variables analizadas

4.1.1 Variables zoométricas (peso corporal, peso renal, comida y bebida ingerida)

La Tabla 4.1. y la Figura 4.1. muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables zoométricas principales en el grupo de animales sanos, normoglucémicos, y en aquellos sometidos al modelo experimental de diabetes mellitus y que sirvieron de controles no tratados con los aceites de estudio.

Tabla 4.1. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a los parámetros zoométricos de los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD).

Variable	CND	CD
Peso corporal (g)	505 \pm 8.0	381 \pm 19.2*
% peso riñón respecto a peso corporal	0.6 \pm 0.1	1.0 \pm 0.07*
Comida ingerida (g/día)	21.4 \pm 2.3	32.4 \pm 5.1*
Bebida ingerida (mL/día)	43.4 \pm 16.6	145 \pm 27.6*

*p < 0.05 respecto a CND

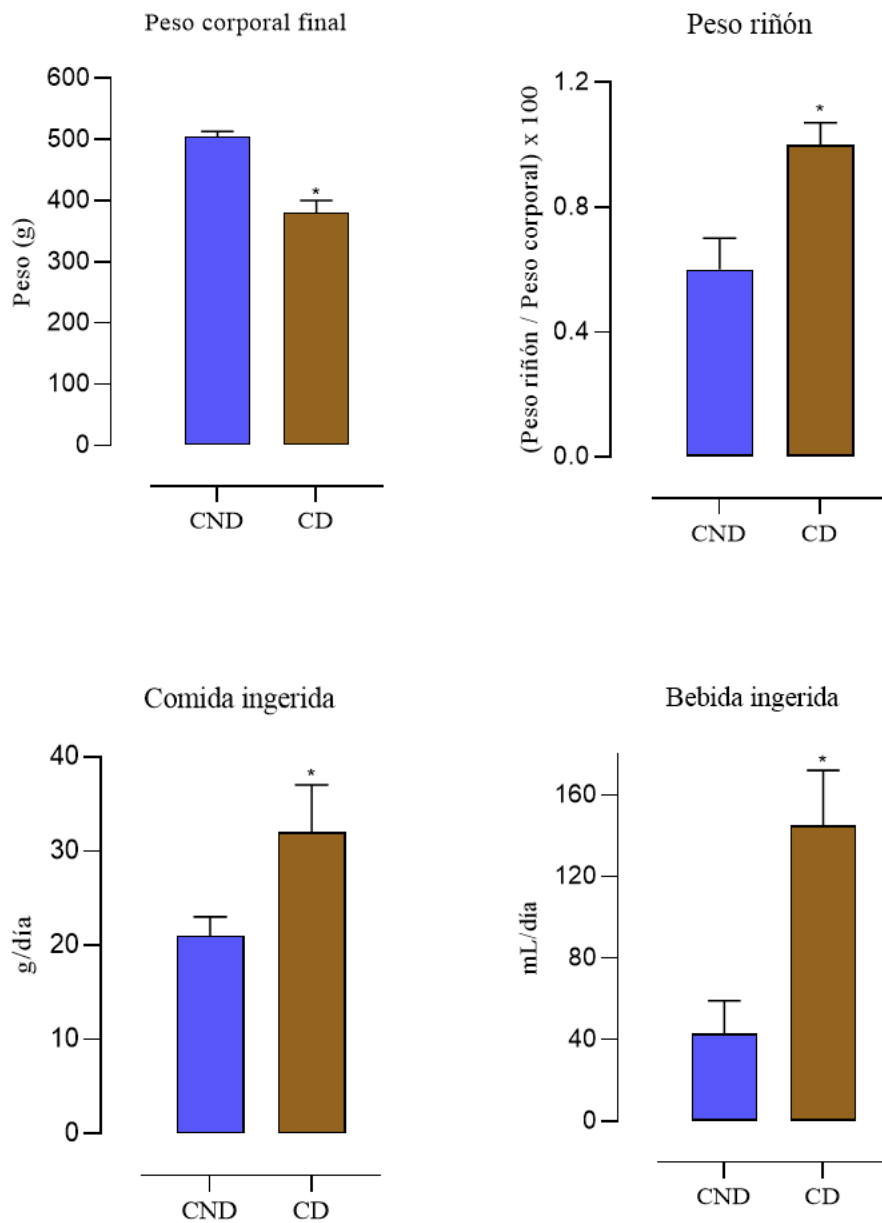


Figura 4.1. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a los parámetros zométricos de los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

4.1.2 Glucosa, proteínas totales séricas, creatinina sérica y perfil hepático

La Tabla 4.2. y las Figuras 4.2. y 4.3., muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables bioquímicas séricas de glucosa, creatinina y proteínas totales, así como aquellas referentes al perfil hepático sérico, en el grupo de animales sanos, normoglucémicos, y en aquellos sometidos al modelo experimental de diabetes mellitus y que sirvieron de controles no tratados con los aceites de estudio.

Tabla 4.2. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables analíticas séricas generales de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD).

Variable	CND	CD
Glucosa (mg/dL)	98.8 \pm 6.0	531 \pm 10.1*
Creatinina (mg/dL)	0.3 \pm 0.01	0.8 \pm 0.03*
Proteínas (g/dL)	6.3 \pm 0.1	6.1 \pm 0.3
AST (U/L)	94.9 \pm 4.9	127 \pm 11.8*
ALT (U/L)	55.7 \pm 10.6	98.8 \pm 3.8
GGT (U/L)	1.1 \pm 0.1	2.9 \pm 0.3*
Fosfatasa alcalina (U/L)	82.0 \pm 9.5	323 \pm 6.9*

*p < 0.05 respecto a CND

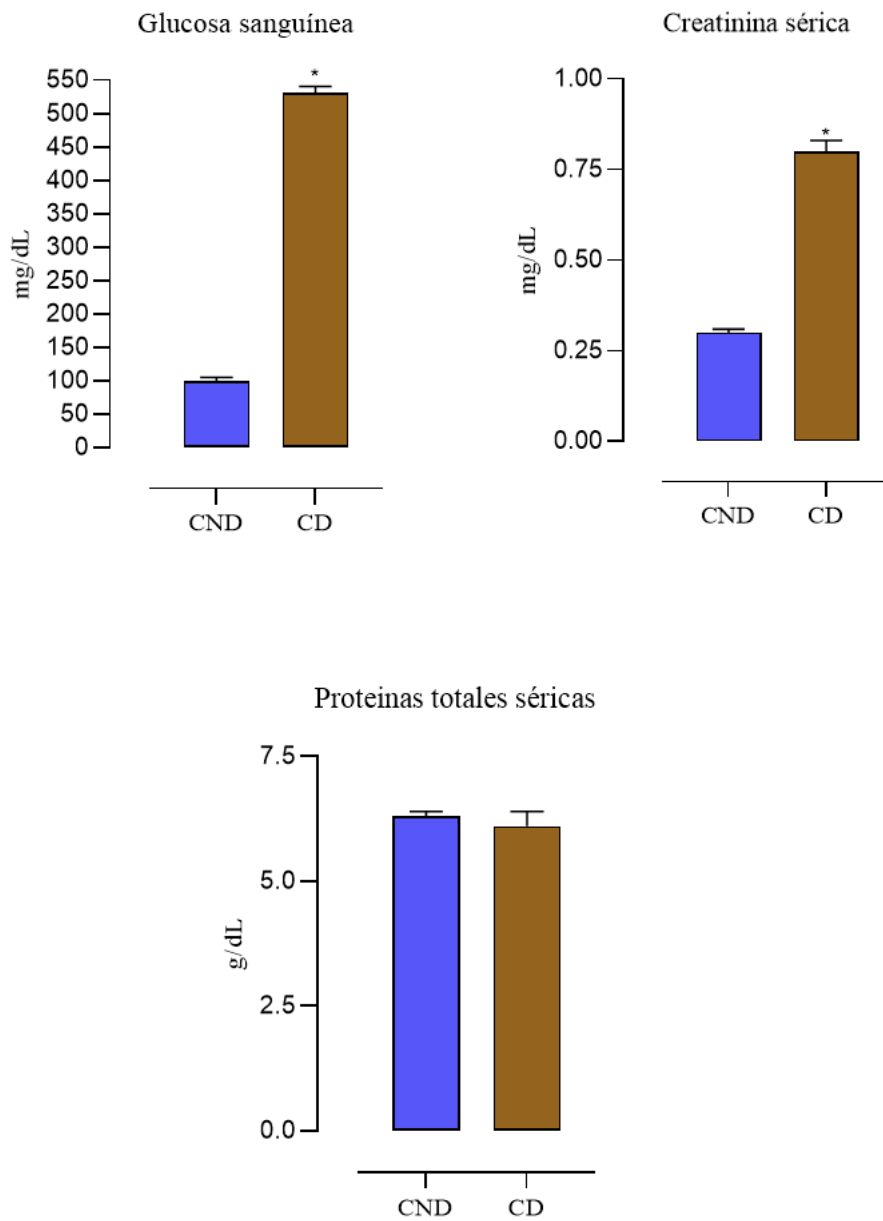


Figura 4.2. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables analíticas séricas generales de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

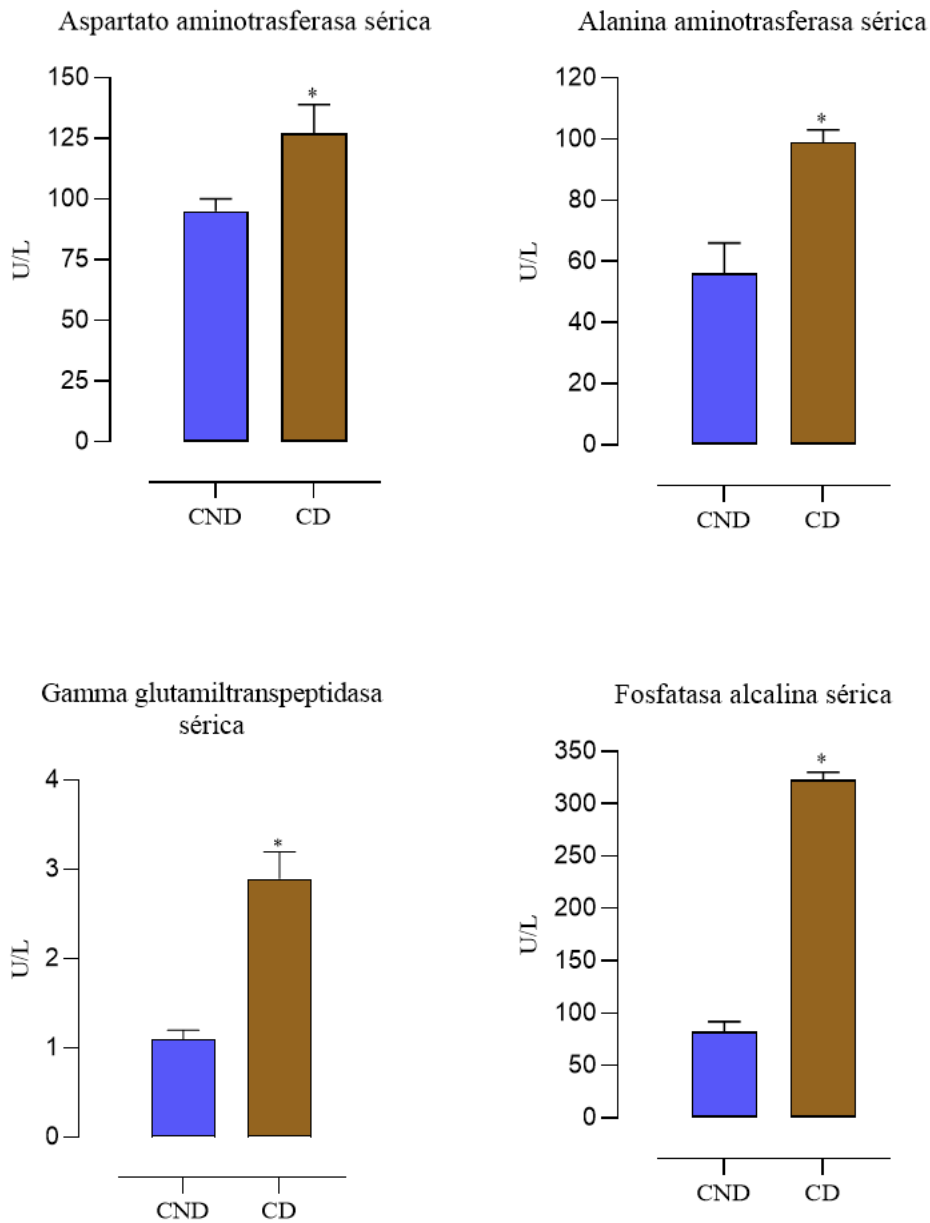


Figura 4.3. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables analíticas séricas del perfil hepático, de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

4.1.3 Perfil lipídico

La Tabla 4.3. y la Figura 4.4., muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables bioquímicas séricas que definen el perfil lipídico, en el grupo de animales sanos, normoglucémicos, y en aquellos sometidos al modelo experimental de diabetes mellitus y que sirvieron de controles no tratados con los aceites de estudio.

Tabla 4.3. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes al perfil lipídico de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD).

Variable	CND	CD
Colesterol total (mg/dL)	53.4 \pm 3.5	86.5 \pm 4.0*
LDL colesterol (mg/dL)	21.4 \pm 1.4	44.8 \pm 4.7*
HDL colesterol (mg/dL)	18.6 \pm 1.5	15.3 \pm 0.8*
Triglicéridos (mg/dL)	56.7 \pm 7.7	149 \pm 7.9*

*p < 0.05 respecto a CND

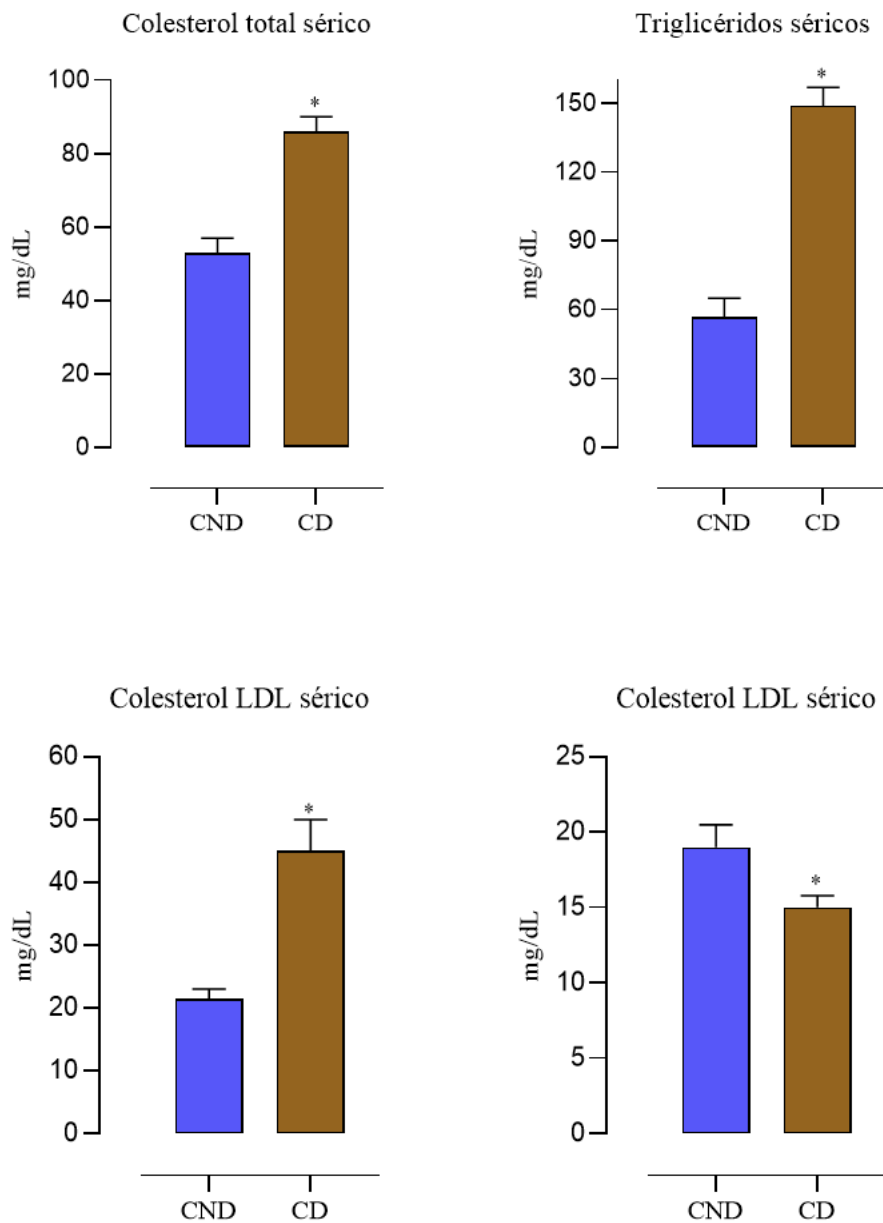


Figura 4.4. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables analíticas séricas del perfil lipídico, de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

4.1.4 Estrés oxidativo sérico y en tejido renal (variables oxidativas y antioxidantes)

Las Tablas 4.4 y 4.5. y las Figuras 4.5. a 4.8, muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables oxidativas y antioxidantes de estrés oxidativo y nitrosativo, en suero sanguíneo y en tejido renal, en el grupo de animales sanos, normoglucémicos, y en aquellos sometidos al modelo experimental de diabetes mellitus y que sirvieron de controles no tratados con los aceites de estudio.

Tabla 4.4. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de estrés oxidativo y nitrosativo séricos de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD).

Variable	CND	CD
TBARS (nmol/mL)	4.6 \pm 0.9	10.1 \pm 0.6*
8-OH-dG (ng/mL)	17.7 \pm 0.5	28.9 \pm 1.8*
8-isoprostanos (ng/mg creat.) \ddagger	7.4 \pm 0.5	53.9 \pm 0.7*
3-nitrotirosina (pg/mL)	16.2 \pm 1.1	73.3 \pm 2.1*
TAC (U/mL)	19.6 \pm 0.6	14.6 \pm 0.8*
GSH (nmol/mL)	139 \pm 8.6	90.2 \pm 0.9*
GSHpx (nmol/min/mL)	30.7 \pm 1.2	8.1 \pm 0.7*

\ddagger Determinación urinaria. * $p < 0.05$ respecto a CND.

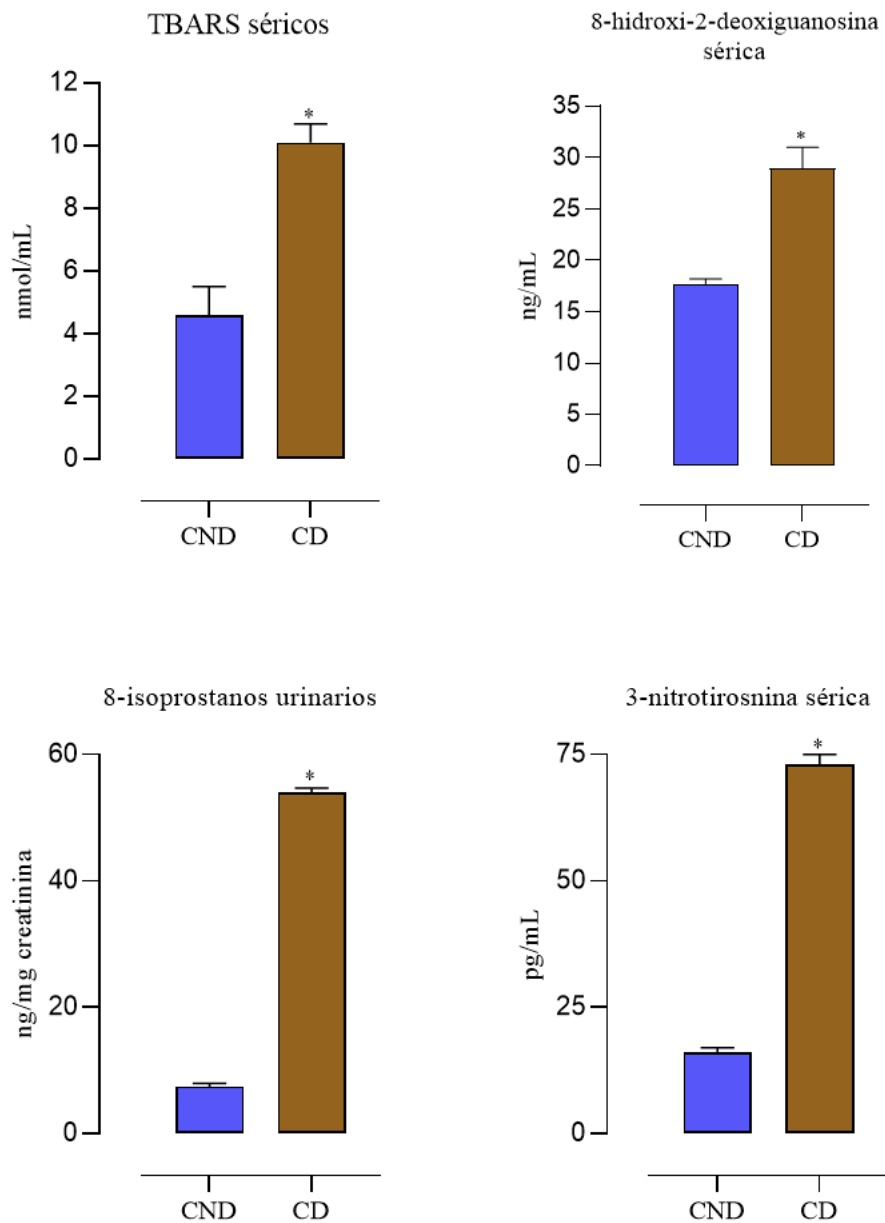


Figura 4.5. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables oxidativas de estrés oxidativo y nitrosativo séricas, de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

Las Tablas 4.4 y 4.5. y las Figuras 4.5. a 4.8, muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables oxidativas y antioxidantes de estrés oxidativo y nitrosativo, en suero sanguíneo y en tejido renal, en el grupo de animales sanos, normoglucémicos, y en aquellos sometidos al modelo experimental de diabetes mellitus y que sirvieron de controles no tratados con los aceites de estudio.

Tabla 4.4. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de estrés oxidativo y nitrosativo séricos de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD).

Variable	CND	CD
TBARS (nmol/mL)	4.6 \pm 0.9	10.1 \pm 0.6*
8-OH-dG (ng/mL)	17.7 \pm 0.5	28.9 \pm 1.8*
8-isoprostanos (ng/mg creat.) [‡]	7.4 \pm 0.5	53.9 \pm 0.7*
3-nitrotirosina (pg/mL)	16.2 \pm 1.1	73.3 \pm 2.1*
TAC (U/mL)	19.6 \pm 0.6	14.6 \pm 0.8*
GSH (nmol/mL)	139 \pm 8.6	90.2 \pm 0.9*
GSHpx (nmol/min/mL)	30.7 \pm 1.2	8.1 \pm 0.7*

[‡]Determinación urinaria. *p < 0.05 respecto a CND.

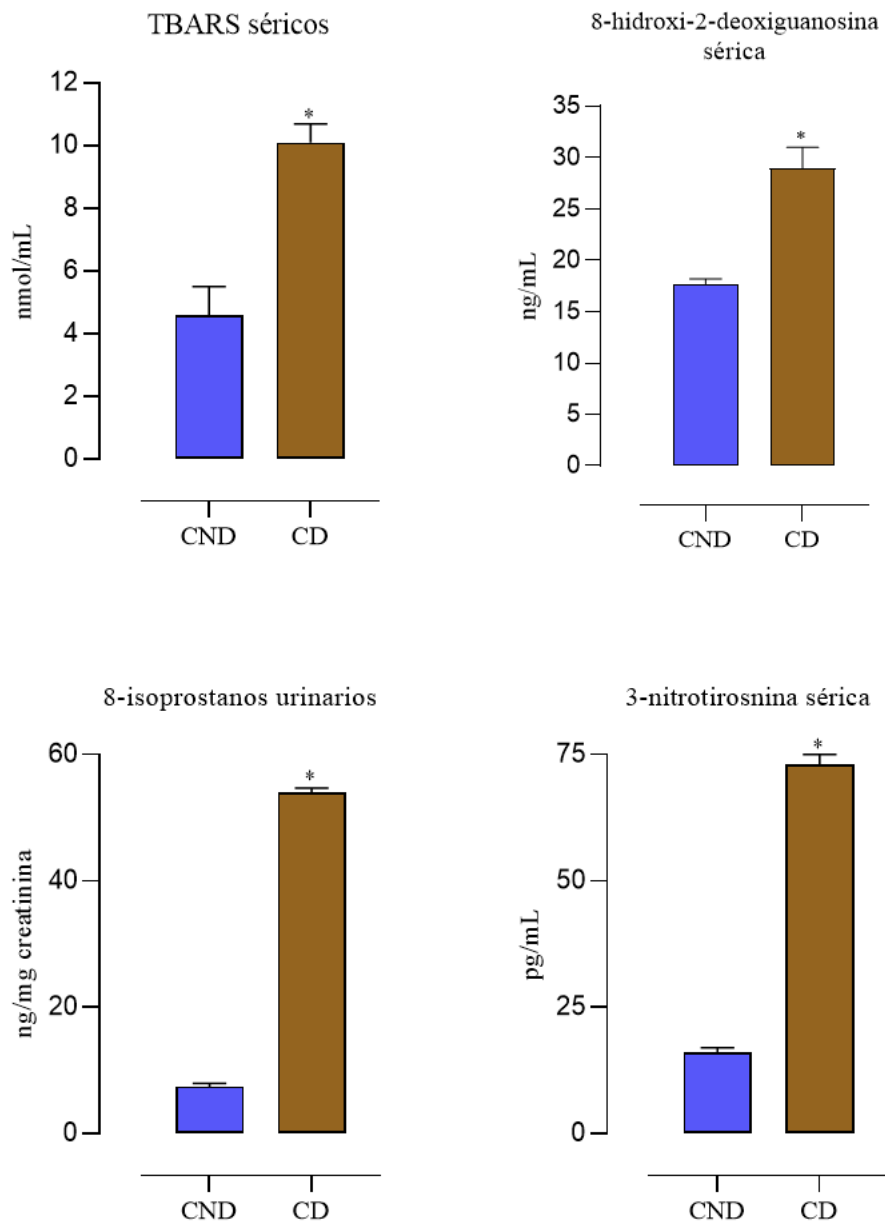


Figura 4.5. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables oxidativas de estrés oxidativo y nitrosativo séricas, de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

4.1.5 Equilibrio prostanoide (tromboxano y prostaciclina urinarias)

La Tabla 4.6. y la Figura 4.9, muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables que definen el equilibrio prostanoide tromboxano/prostaciclina, a través de sus metabolitos estables urinarios 11-dinor-tromboxano B₂/6-keto-PGF_{1 α} , del grupo de animales sanos, normoglucémicos, y en aquellos sometidos al modelo experimental de diabetes mellitus y que sirvieron de controles no tratados con los aceites de estudio.

Tabla 4.6. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables relacionadas con el equilibrio prostanoide de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD).

Variable	CND	CD
11-dinor-tromboxano B ₂ (pg/mg creat.)	4.7 \pm 1.0	13.2 \pm 0.6*
6-keto-PGF _{1α} (pg/mg creat.)	19.5 \pm 0.3	7.5 \pm 0.6*

*p < 0.05 respecto a CND

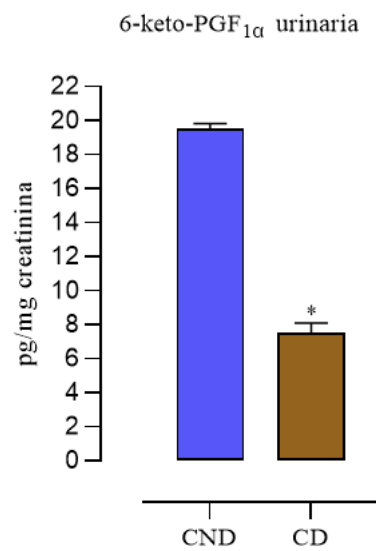
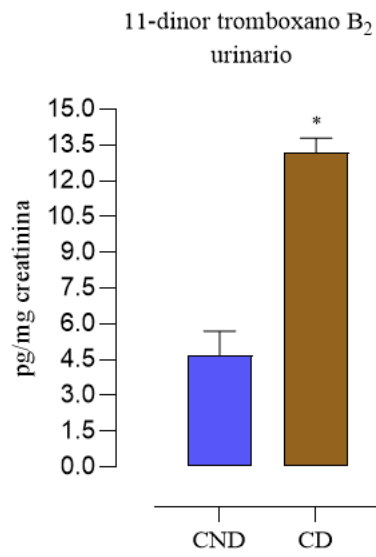


Figura 4.9. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables que definen el equilibrio prostanoide tromboxano/prostaciclina, de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

4.1.6 Variables de la función renal (bioquímicas y morfométricas glomerulares)

La Tabla 4.7. y las Figuras 4.10 y 4.11., muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables que definen el funcionalismo renal, así como los principales datos morfométricos en los glomérulos renales, del grupo de animales sanos, normoglucémicos, y en aquellos sometidos al modelo experimental de diabetes mellitus y que sirvieron de controles no tratados con los aceites de estudio. En la Figura 4.12. se muestran ejemplos representativos de muestras histológicas en las que se ha realizado el análisis morfométrico.

Tabla 4.7. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de función y morfología renal de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD).

Variable	CND	CD
Proteínas urinarias (mg/L)	14.8 \pm 1.2	101 \pm 10.3*
Creatinina urinaria (mg/dL)	114 \pm 8.3	66.3 \pm 3.5*
Glucosuria (g/L)	0.0 \pm 0.0	7.3 \pm 0.7*
Cociente proteinuria/creatinina (mg/g)	269 \pm 39.5	1560 \pm 228*
Aclaramiento de creatinina (mL/min/kg peso corporal)	1.5 \pm 0.09	0.7 \pm 0.03*
Volumen glomerular ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	4616 \pm 71.5	9515 \pm 443*
Índice de glomeruloesclerosis (%área PAS+ respecto al área glomerular total)	0.2 \pm 0.05	2.2 \pm 0.3*

*p < 0.05 respecto a CND

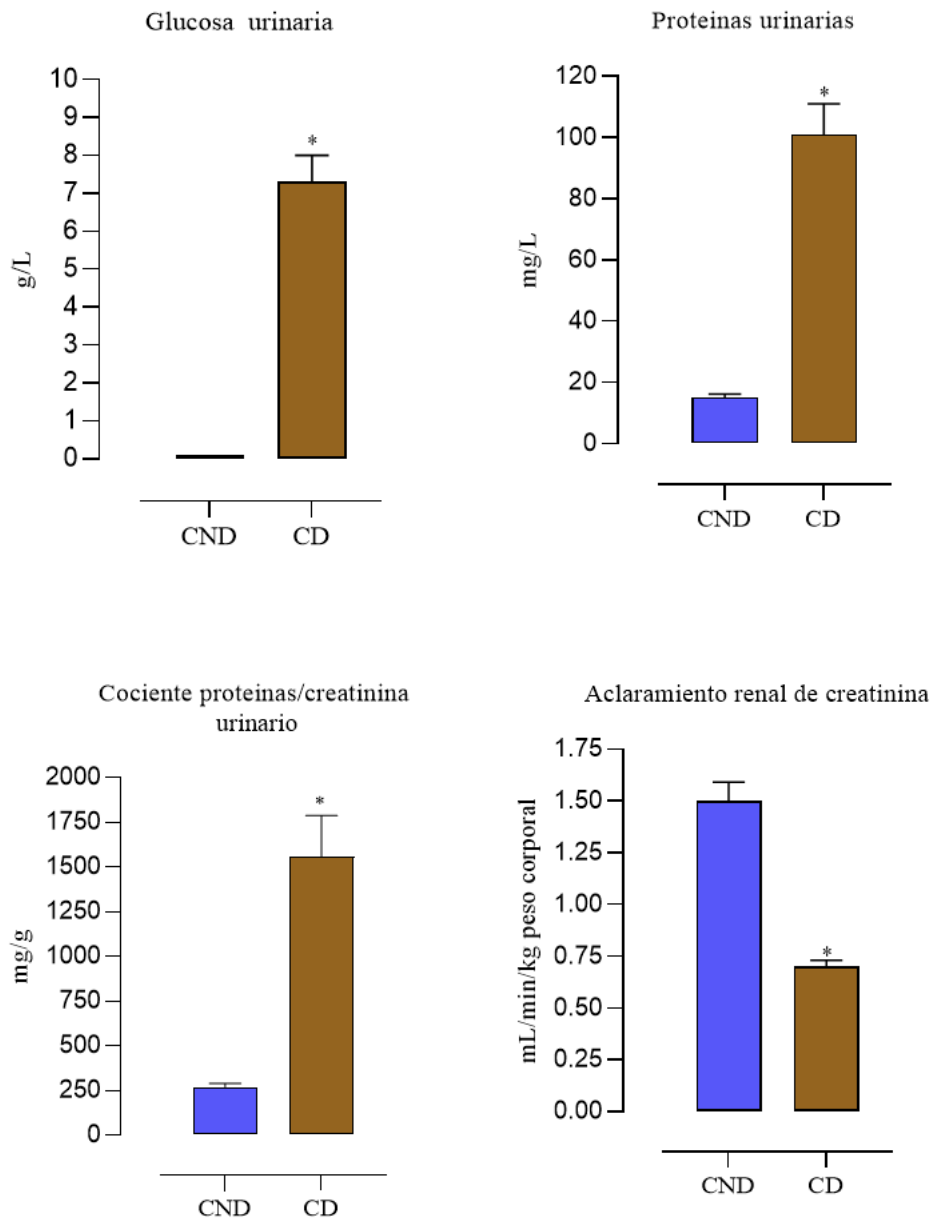


Figura 4.10. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables que definen el funcionalismo glomerular renal, de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

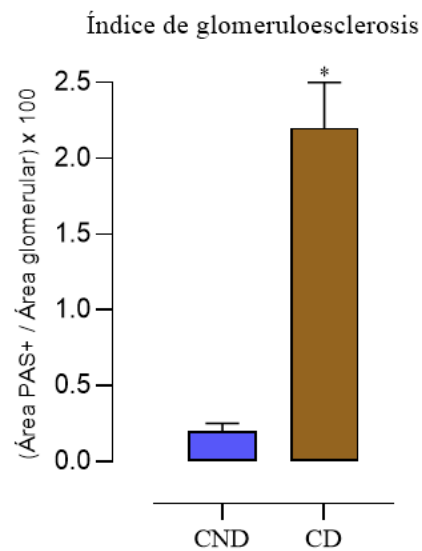
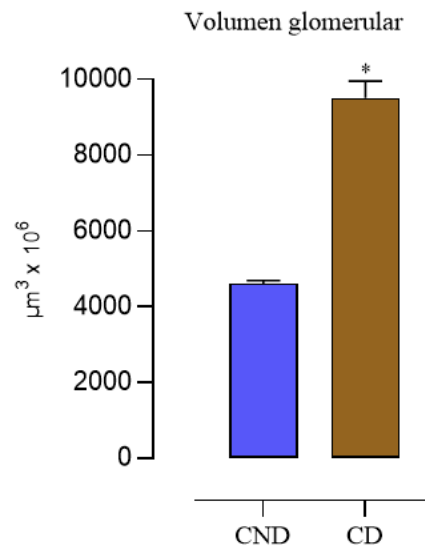
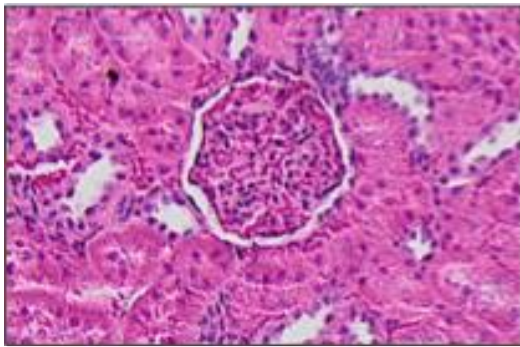
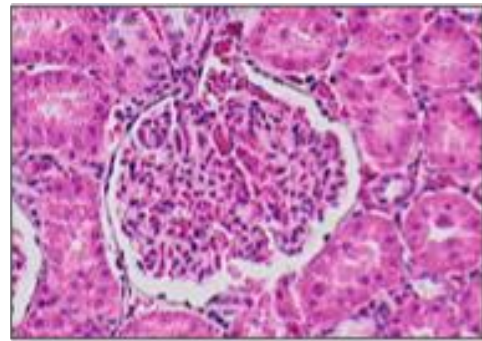


Figura 4.11. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las determinaciones morfométricas de los glomérulos renales, de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.



CND



CD

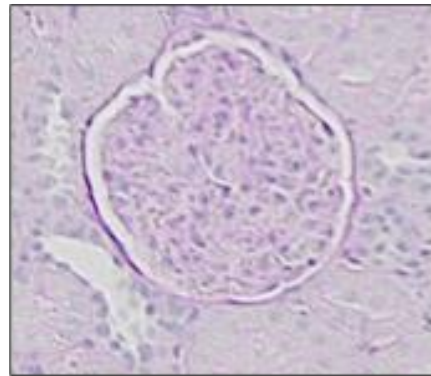
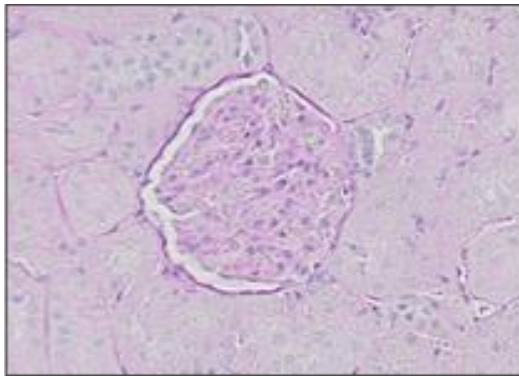


Figura 4.12. Imágenes representativas de glomérulos procedentes de ratas controles no diabéticas (CND) y controles diabéticas (CD). Imágenes superiores: hematoxilina-eosina. Imágenes inferiores: PAS (Periodic Acid-Schiff).

4.1.7 Variables morfométricas retinianas

La Tabla 4.8. y la Figura 4.13., muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las determinaciones morfométricas en las muestras de retina del grupo de animales sanos, normoglucémicos, y en aquellos sometidos al modelo experimental de diabetes mellitus y que sirvieron de controles no tratados con los aceites de estudio. En la Figura 4.14. se muestran ejemplos representativos de muestras histológicas en las que se ha realizado el análisis morfométrico.

Tabla 4.8. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables morfométricas retinianas de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD).

Variable	CND	CD
Grosor retiniano (μm)	74.9 \pm 3.4	143 \pm 1.7*
Porcentaje de retina ocupada por células	67.8 \pm 3.9	35.9 \pm 1.5*
Porcentaje de retina ocupada por matriz extracelular	32.2 \pm 3.9	64.1 \pm 1.5*
Células ganglionares (n/100 μm)	10.9 \pm 0.9	2.5 \pm 0.3*

*p < 0.05 respecto a CND

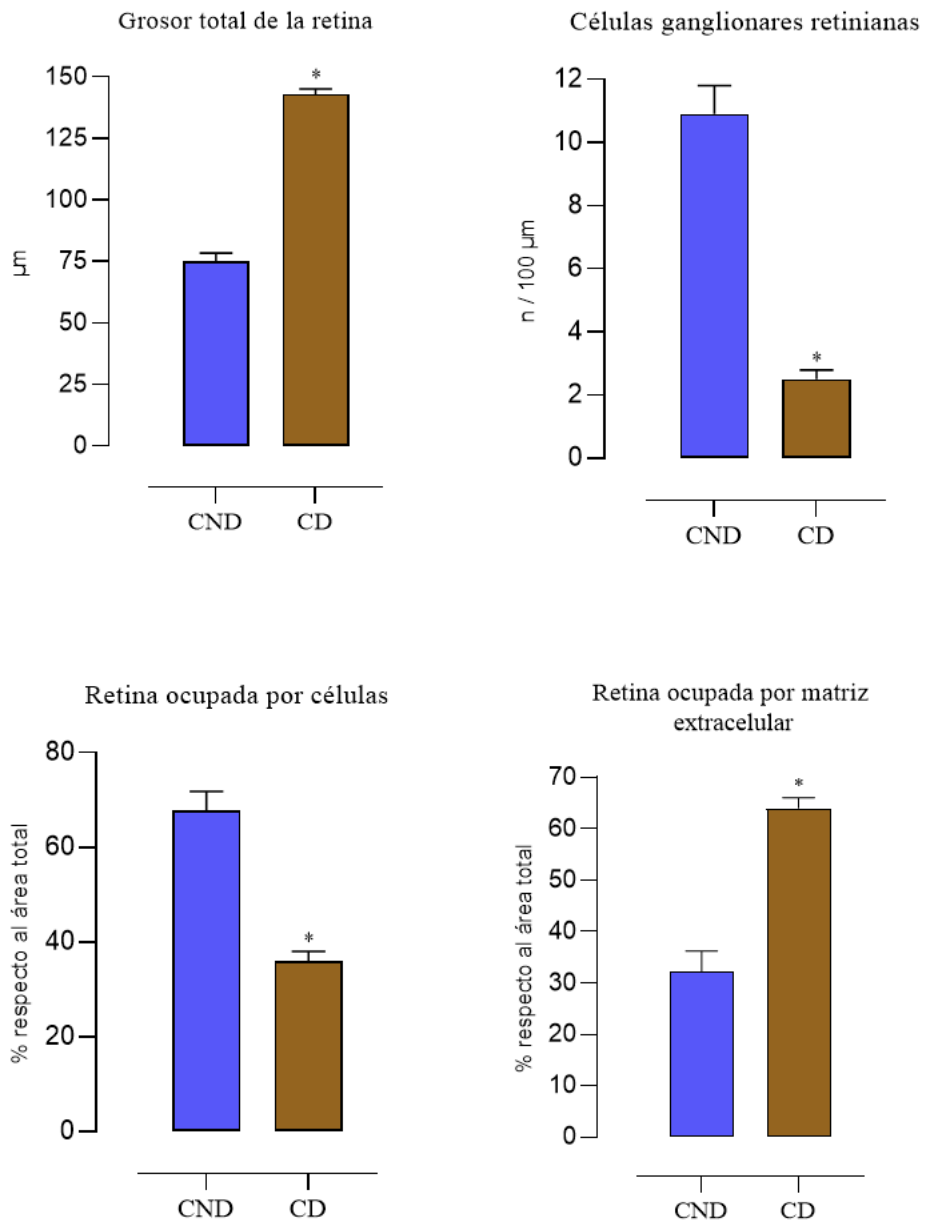
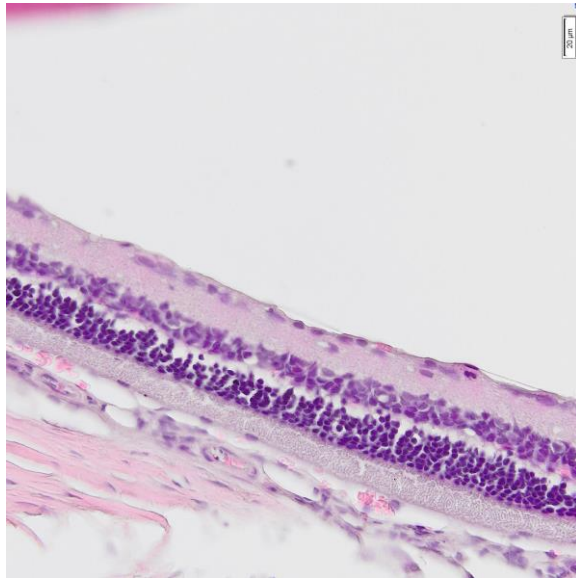
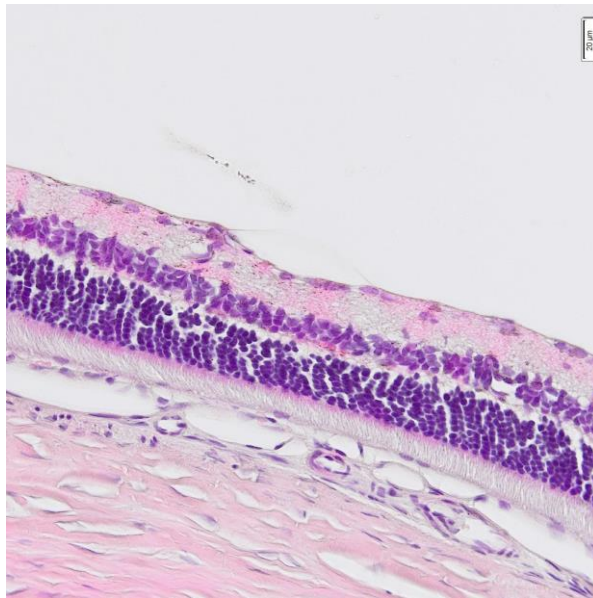


Figura 4.13. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las determinaciones morfométricas de las muestras de retina de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.



CND



CD

Figura 4.14. Imágenes representativas de retinas procedentes de ratas controles no diabéticas (CND) y controles diabéticas (CD). Tinción: hematoxilina-eosina (X20).

4.2 Resultados correspondientes a las modificaciones de estas variables causadas por la administración de los tres aceites de estudio

4.2.1 Variables zoométricas (peso corporal, peso renal, comida y bebida ingerida)

La Tabla 4.9. y la Figura 4.15. muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables zoométricas principales en el grupo de animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg p.o. de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semillas de aceituna (AS) o aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

Tabla 4.9. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a los parámetros zoométricos de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CD	AD	AS	ADD
Peso corporal (g)	381 \pm 19.2	419 \pm 35.1 ^{*a}	353 \pm 8.5	377 \pm 33.1
% peso riñón respecto a peso corporal	1.0 \pm 0.07	0.8 \pm 0.06 [*]	0.8 \pm 0.08 [*]	0.8 \pm 0.05 [*]
Comida ingerida (g/día)	32.4 \pm 5.1	23.9 \pm 3.3 [*]	25.1 \pm 0.9 [*]	27.2 \pm 5.2 [*]
Bebida ingerida (mL/día)	145 \pm 27.6	90.6 \pm 25.5 [*]	84.5 \pm 21.8	90.6 \pm 17.1 [*]

*p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS

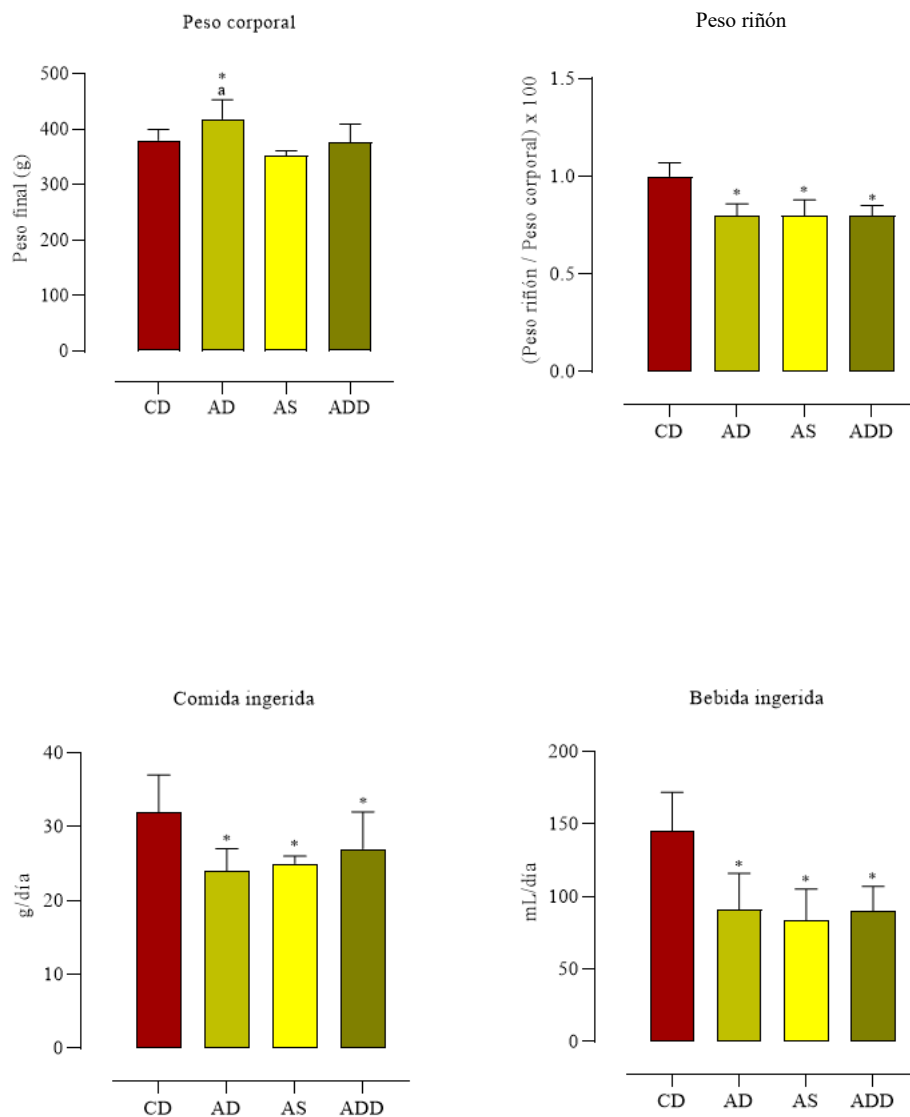


Figura 4.15. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a los parámetros zoométricos de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). *p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS.

4.2.2 Glucosa, proteínas totales séricas, creatinina sérica y perfil hepático

La Tabla 4.10. y las Figuras 4.16. y 4.17., muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables bioquímicas séricas de glucosa, creatinina y proteínas totales, así como aquellas referentes al perfil hepático sérico, en el grupo de animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg p.o. de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semillas de aceituna (AS) o aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

Tabla 4.10. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables analíticas séricas generales de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CD	AD	AS	ADD
Glucosa (mg/dL)	531 \pm 10.1	508 \pm 13.1*	507 \pm 53.3	435 \pm 9.9*a
Creatinina (mg/dL)	0.8 \pm 0.03	0.7 \pm 0.07*	0.7 \pm 0.08*	0.6 \pm 0.03*
Proteínas (g/dL)	6.1 \pm 0.3	6.2 \pm 0.3	5.6 \pm 0.3	5.8 \pm 0.2
AST (U/L)	127 \pm 11.8	67.2 \pm 21.3*	82.2 \pm 10.6*	59.8 \pm 10.2*a
ALT (U/L)	98.8 \pm 3.8	91.9 \pm 5.9*	86.7 \pm 5.9*	71.4 \pm 3.6*a
GGT (U/L)	2.9 \pm 0.3	1.4 \pm 0.5*	1.4 \pm 0.5*	1.1 \pm 0.06*a
Fosfatasa alcalina (U/L)	323 \pm 6.9	285 \pm 22.8*	273 \pm 12.0*	255 \pm 9.7*a

*p < 0.05 respecto a CD. ^ap < 0.05 respecto a AS y AD

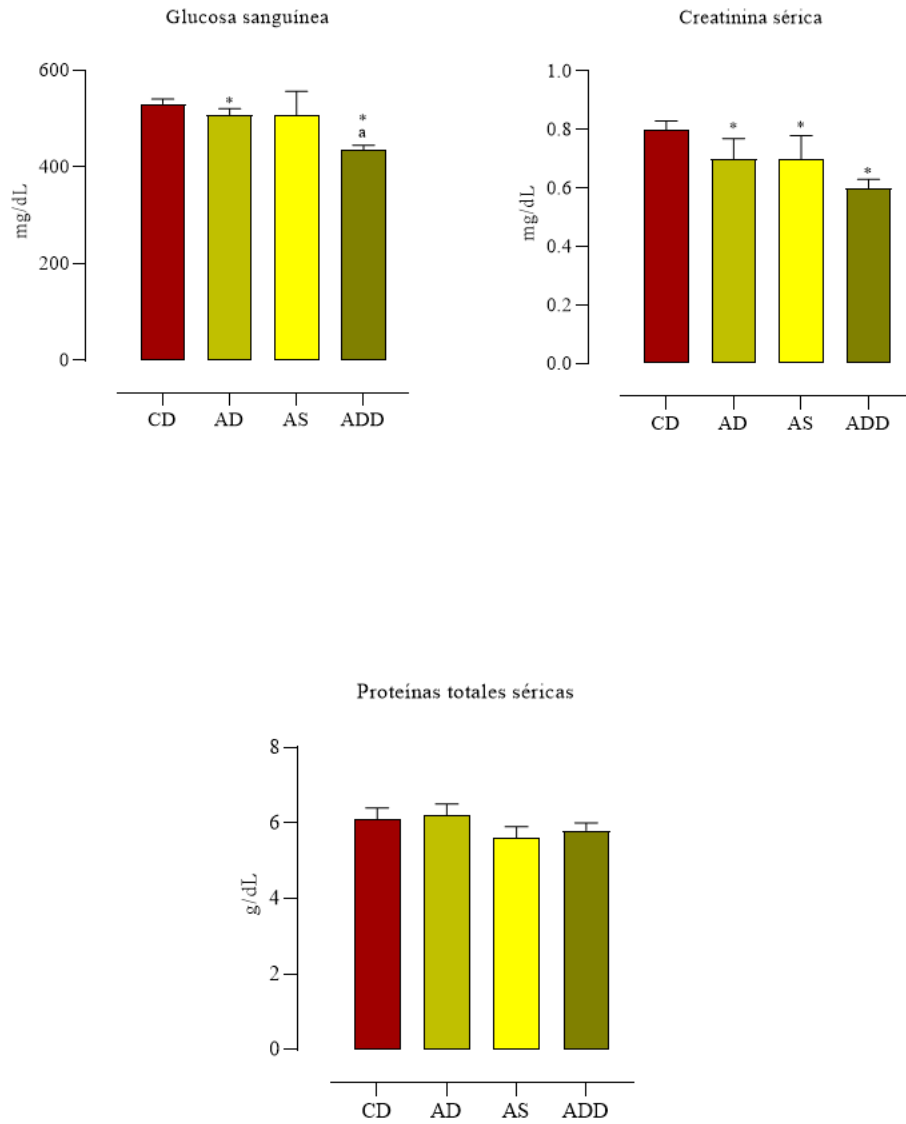


Figura 4.16. Valores medios correspondientes a las variables analíticas séricas generales de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

*p < 0.05 respecto a CD. ^ap < 0.05 respecto a AS y AD

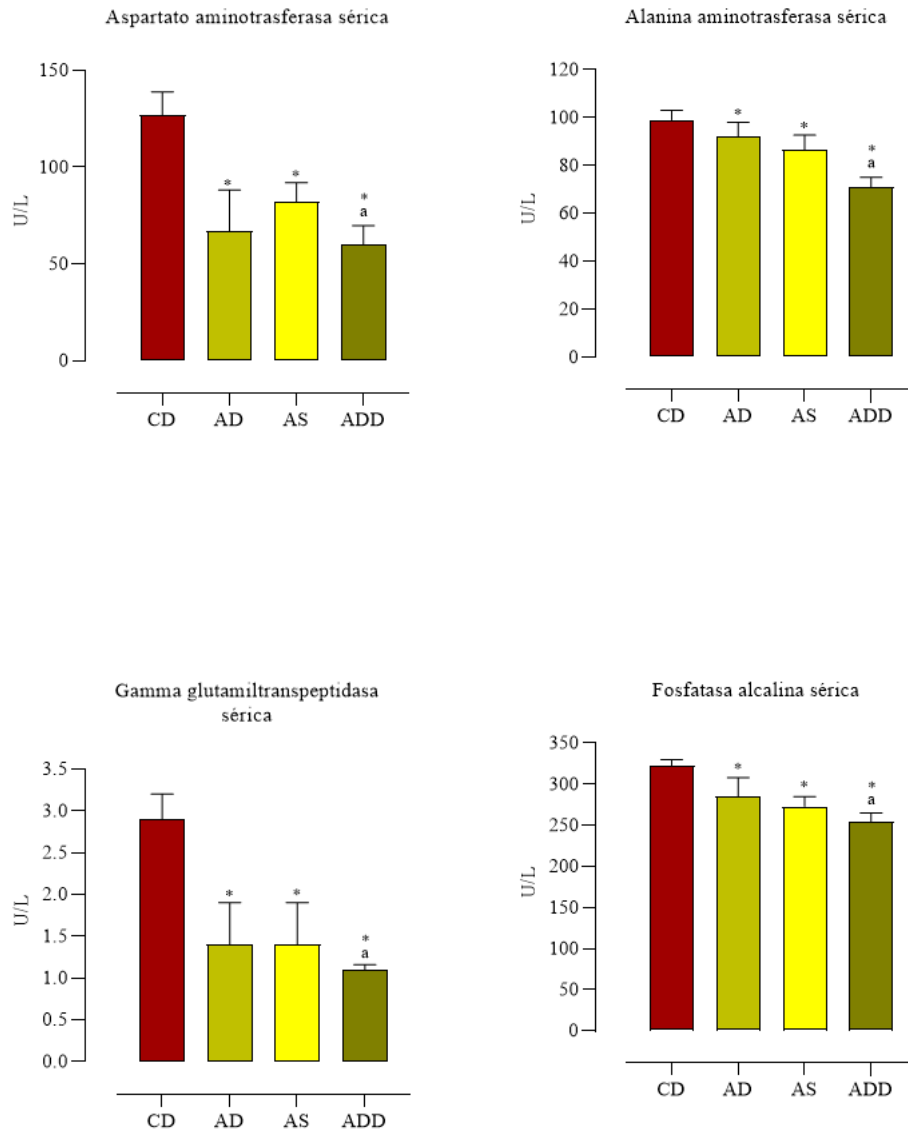


Figura 4.17. Valores medios correspondientes al perfil hepático de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). *p < 0.05 respecto a CD. ªp < 0.05 respecto a AS y AD.

4.2.3 Perfil lipídico

La Tabla 4.11. y la Figura 4.18., muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables bioquímicas séricas que definen el perfil lipídico, en el grupo de animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg p.o. de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semillas de aceituna (AS) o aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

Tabla 4.11. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes al perfil lipídico de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CD	AD	AS	ADD
Colesterol total (mg/dL)	86.5 \pm 4.0	70.6 \pm 2.1 ^{*b}	82.0 \pm 2.9 [*]	63.2 \pm 3.7 ^{*a}
LDL colesterol (mg/dL)	44.8 \pm 4.7	26.7 \pm 5.1 [*]	27.2 \pm 2.6 [*]	17.3 \pm 2.7 ^{*a}
HDL colesterol (mg/dL)	15.3 \pm 0.8	28.0 \pm 3.4 [*]	29.1 \pm 1.9 [*]	32.2 \pm 1.4 [*]
Triglicéridos (mg/dL)	149 \pm 7.9	106 \pm 3.5 [*]	115 \pm 6.4 [*]	85.6 \pm 5.1 ^{*a}

*p < 0.05 respecto a CD. ^ap < 0.05 respecto a AS y AD. ^bp < 0.05 respecto a AS

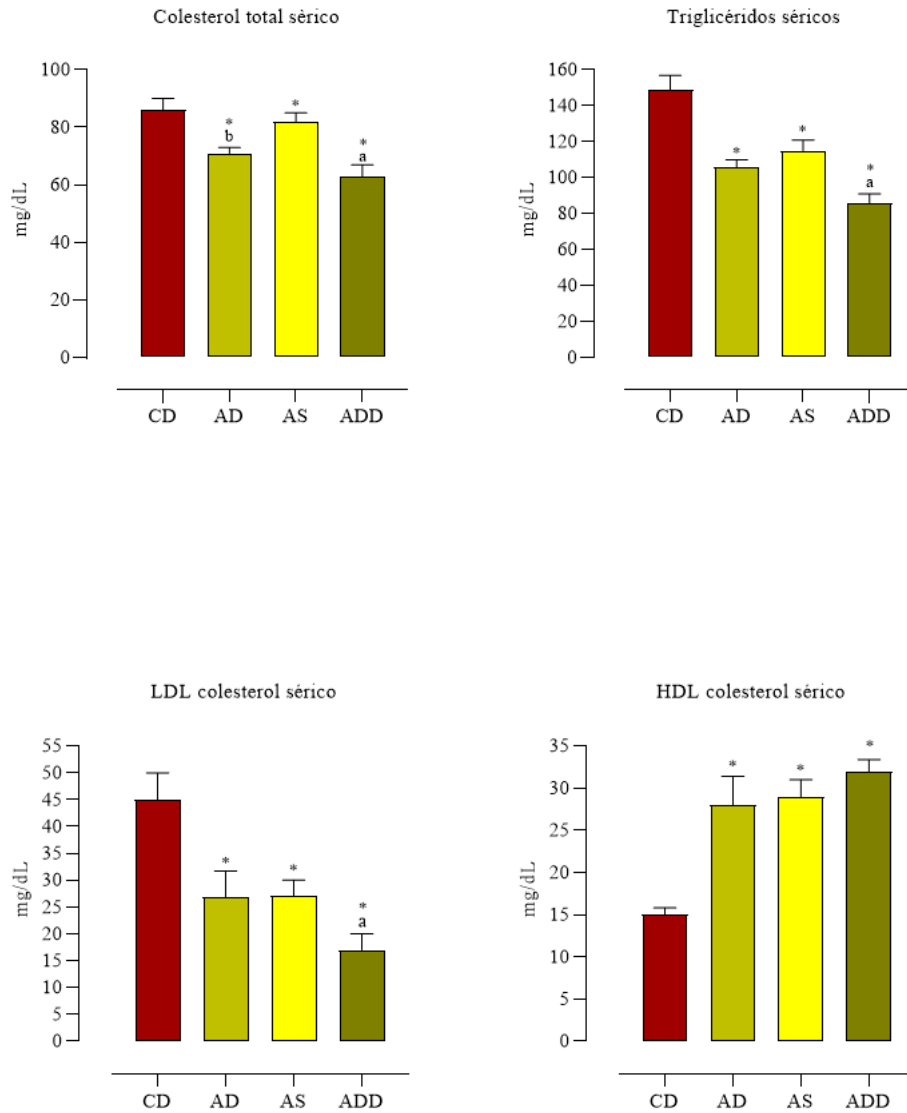


Figura 4.18. Valores medios correspondientes al perfil lipídico de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS.

4.2.4 Estrés oxidativo sérico y en tejido renal (variables oxidativas y antioxidantes)

Las Tablas 4.12. y 4.13. y las Figuras 4.19. a 4.22, muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables que definen el estrés oxidativo (variables oxidativas y antioxidantes), en el grupo de animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg p.o. de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semillas de aceituna (AS) o aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

Tabla 4.12. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de estrés oxidativo y nitrosativo séricos de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CD	AD	AS	ADD
TBARS (nmol/mL)	10.1 \pm 0.6	4.2 \pm 1.1 ^{*b}	5.7 \pm 0.5 [*]	1.7 \pm 0.2 ^{*a}
8-OH-dG (ng/mL)	28.9 \pm 1.8	4.5 \pm 0.1 ^{*b}	7.6 \pm 0.1 [*]	1.5 \pm 0.2 ^{*a}
8-isoprostanos (ng/mg creat.) [‡]	53.9 \pm 0.7	16.4 \pm 0.6 ^{*b}	17.6 \pm 0.5 [*]	14.6 \pm 0.5 ^{*a}
3-nitrotirosina (pg/mL)	73.3 \pm 2.1	49.1 \pm 1.4 [*]	49.5 \pm 0.9 [*]	42.8 \pm 1.4 ^{*a}
TAC (U/mL)	14.6 \pm 0.8	17.3 \pm 1.0 ^{*b}	16.2 \pm 0.4 [*]	18.7 \pm 0.6 ^{*a}
GSH (nmol/mL)	90.2 \pm 0.9	106 \pm 3.5 [*]	104 \pm 2.8 [*]	139 \pm 1.1 ^{*a}
GSHpx (nmol/min/mL)	8.1 \pm 0.7	18.6 \pm 0.9 ^{*b}	15.8 \pm 1.1 [*]	27.7 \pm 2.4 ^{*a}

*p < 0.05 respecto a CD. ^ap < 0.05 respecto a AS y AD. ^bp < 0.05 respecto a AS

[‡]Determinación urinaria

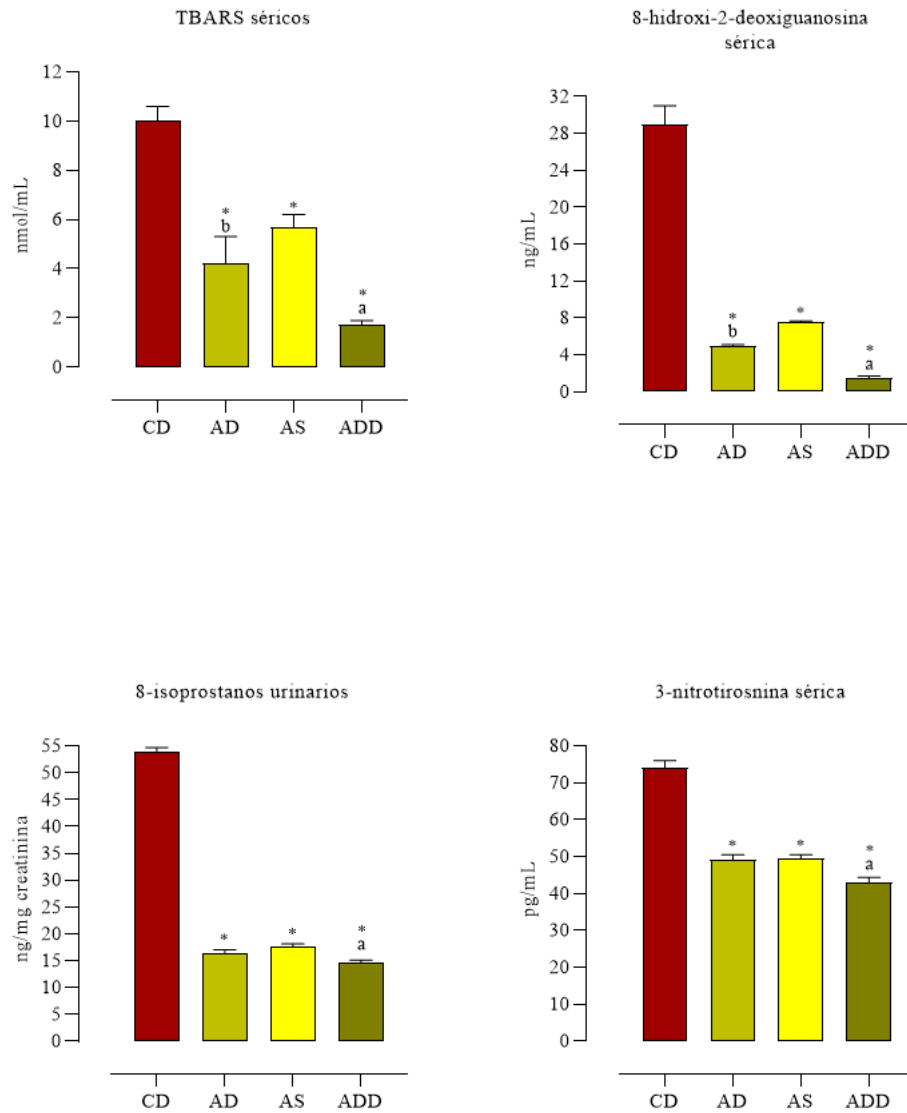


Figura 4.19. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables oxidativas de estrés oxidativo y nitrosativo séricos de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS.

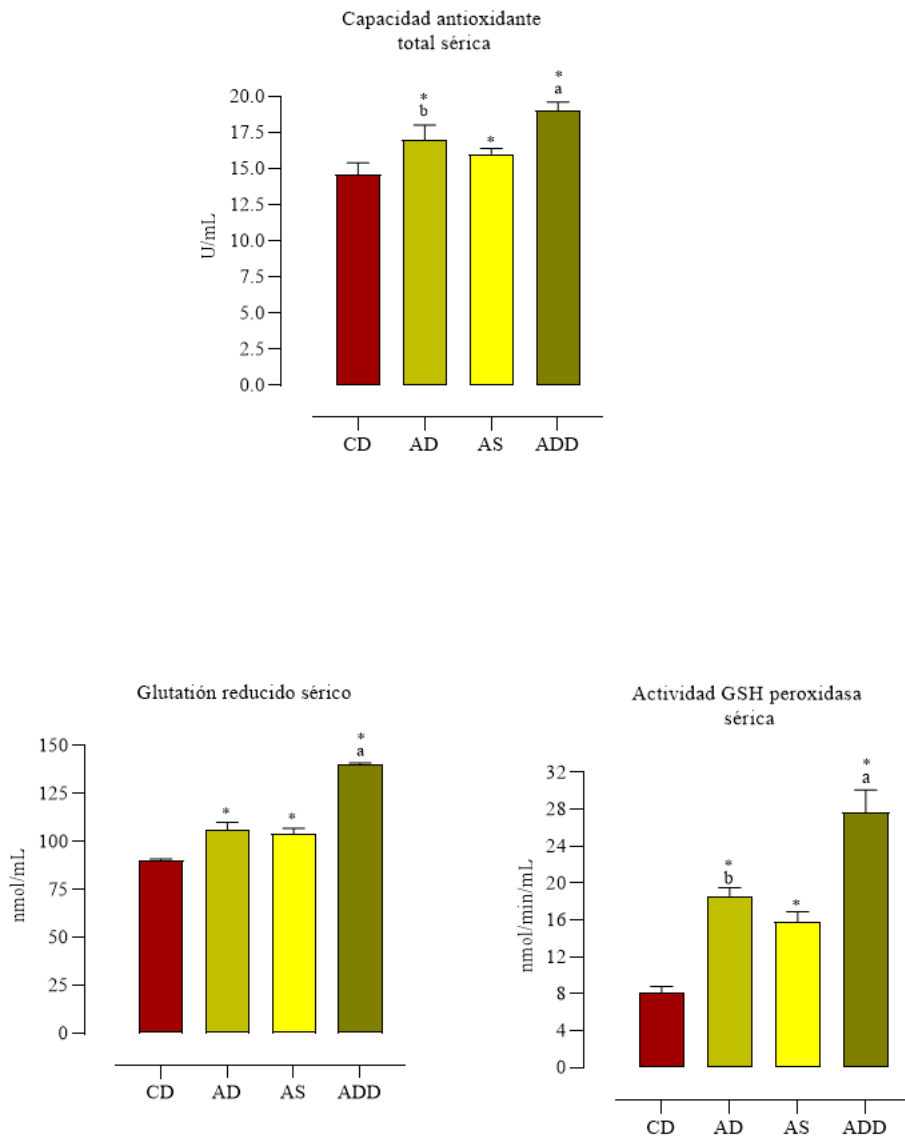


Figura 4.20. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables antioxidantes de estrés oxidativo y nitrosativo séricos de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS.

Tabla 4.13. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de estrés oxidativo y nitrosativo en tejido renal de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CD	AD	AS	ADD
TBARS (nmol/mg prot.)	24.0 \pm 0.8	15.8 \pm 0.1 ^{*b}	19.6 \pm 0.9 [*]	14.3 \pm 0.07 ^{*a}
8-OH-dG (ng/0.1 g tejido)	13.8 \pm 0.7	9.7 \pm 0.05 ^{*b}	11.2 \pm 0.9 [*]	8.3 \pm 0.3 ^{*a}
3-nitrotirosina (pg/0.1 g tejido)	131 \pm 6.9	74.1 \pm 1.6 ^{*b}	87.4 \pm 4.6 [*]	59.7 \pm 4.1 ^{*a}
TAC (U/0.1 g tejido)	35.7 \pm 3.2	83.4 \pm 1.5 [*]	75.0 \pm 4.1 [*]	97.7 \pm 3.0 [*]
GSH (nmol/0.1 g tejido)	129 \pm 13.6	187 \pm 3.1 ^{*b}	159 \pm 6.4 [*]	291 \pm 7.1 ^{*a}
GSHpx (nmol/min/0.1 g tejido)	59.0 \pm 2.1	89.8 \pm 3.3 ^{*b}	70.7 \pm 2.8	98.1 \pm 1.5 ^{*a}

*p < 0.05 respecto a CD. ^ap < 0.05 respecto a AS y AD. ^bp < 0.05 respecto a AS

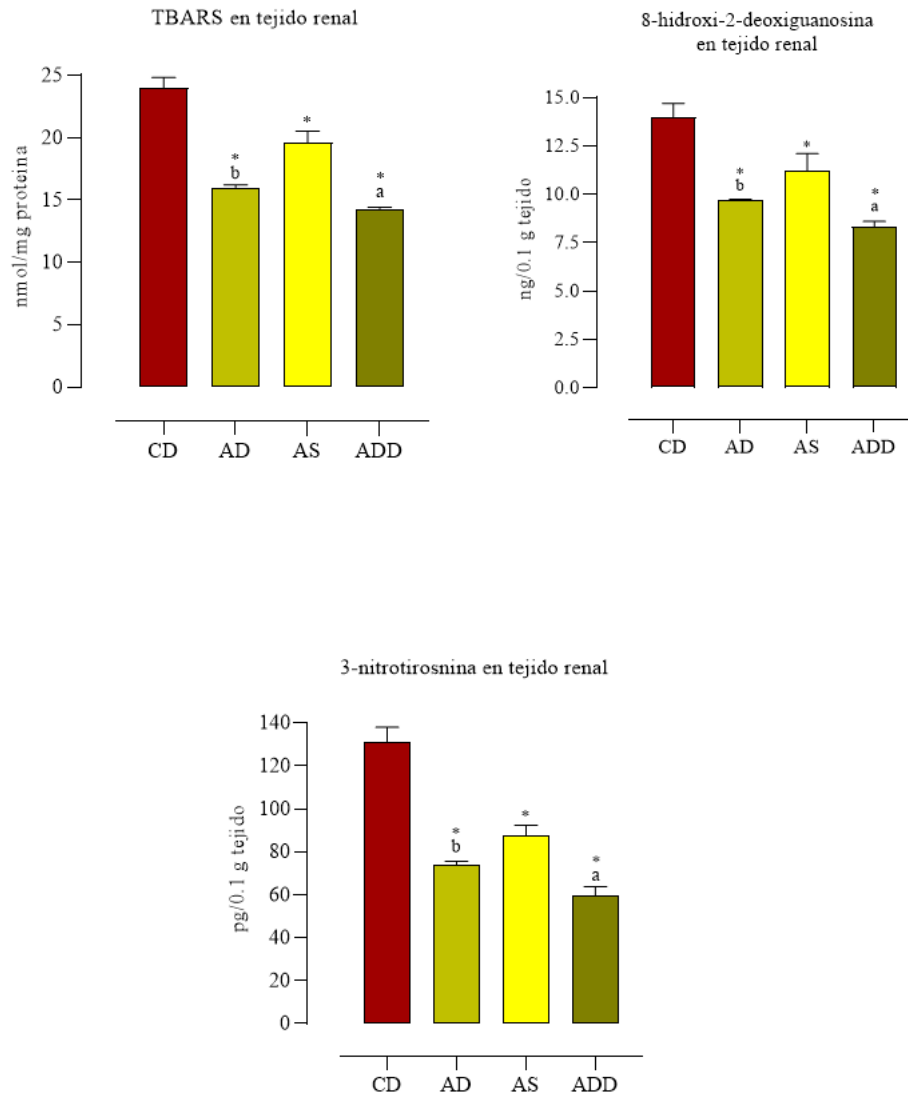


Figura 4.21. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables oxidativas de estrés oxidativo y nitrosativo en tejido renal de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS.

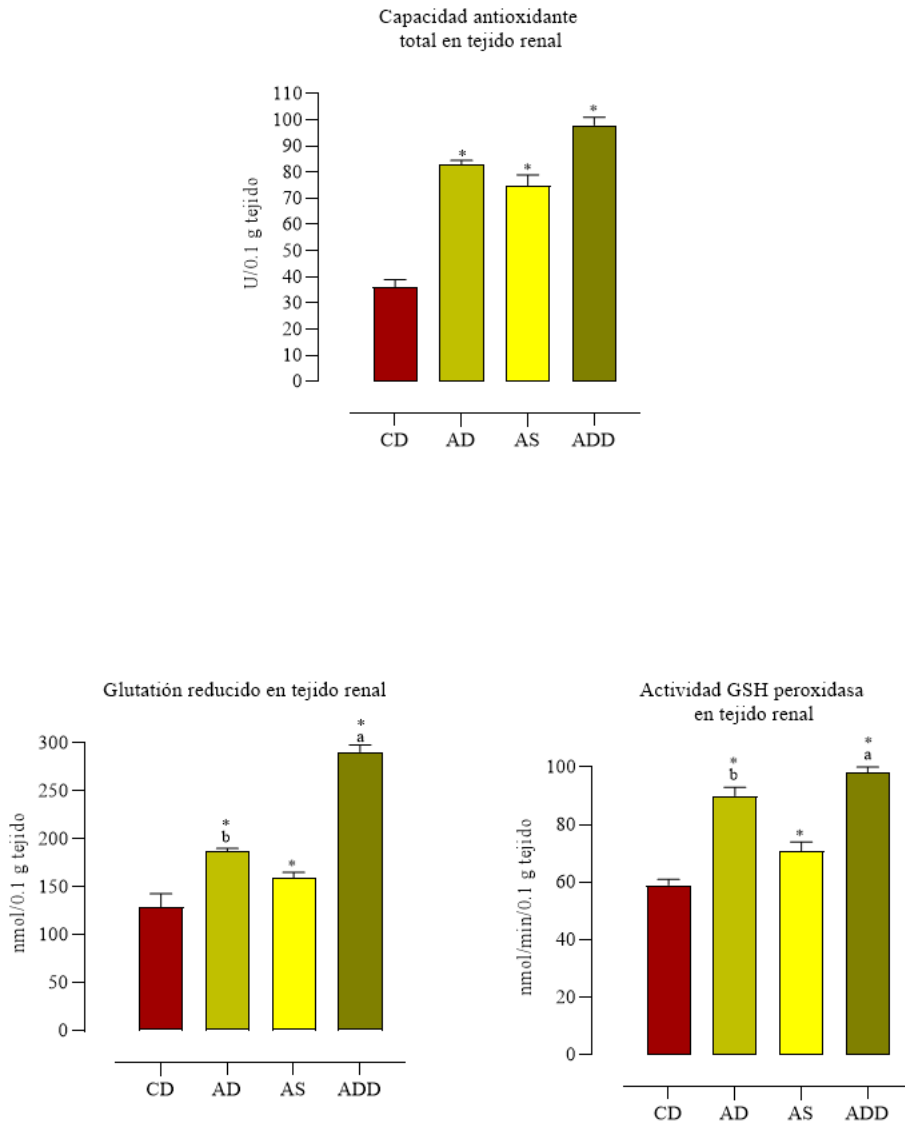


Figura 4.22. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables antioxidantes de estrés oxidativo y nitrosativo en tejido renal de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS.

4.2.5 Equilibrio prostanoides (tromboxano y prostaciclina urinarias)

La Tabla 4.14. y la Figura 4.23., muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las variables que definen el equilibrio prostanoides tromboxano/prostaciclina, a través de sus metabolitos estables urinarios 11-dinor-tromboxano B₂/6-keto-PGF_{1 α} , en el grupo de animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg p.o. de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semillas de aceituna (AS) o aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

Tabla 4.14. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables relacionadas con el equilibrio prostanoides de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CD	AD	AS	ADD
11-dinor-Tromboxano B ₂ (pg/mg creat.)	13.2 \pm 0.6	8.8 \pm 0.06 ^{*b}	10.8 \pm 0.6	5.1 \pm 0.4 ^{*a}
6-keto-PGF _{1α} (pg/mg creat.)	7.5 \pm 0.6	13.2 \pm 0.4 ^{*b}	10.5 \pm 0.5	17.7 \pm 0.7 ^{*a}

*p < 0.05 respecto a CD. ^ap < 0.05 respecto a AS y AD. ^bp < 0.05 respecto a AS

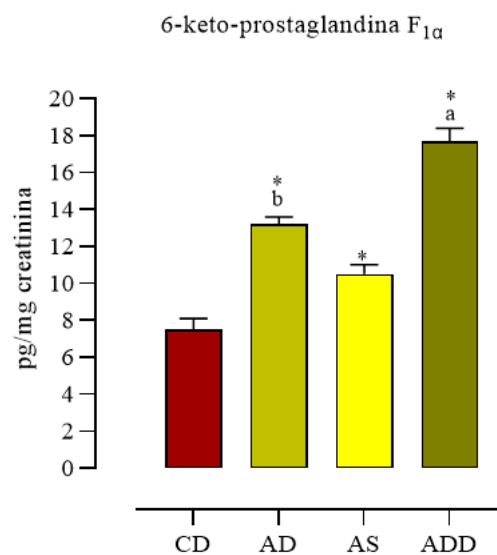
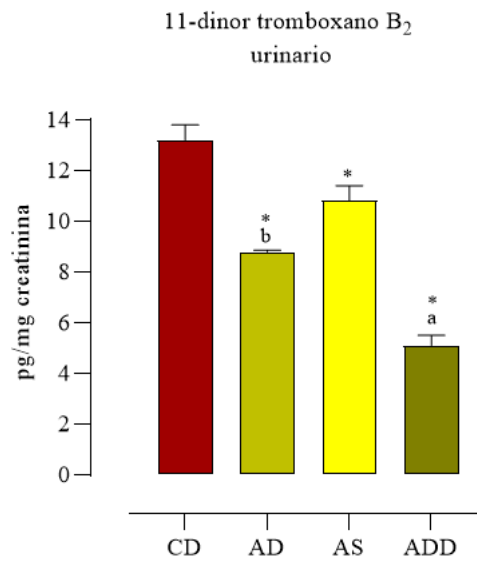


Figura 4.23. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables relacionadas con el equilibrio prostanoide de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS.

4.2.6 Variables de la función renal (bioquímicas y morfométricas glomerulares)

La Tabla 4.15. y las Figuras 4.24 y 4.25., muestran los valores medios referidos a las variables que definen el funcionalismo renal, así como los principales datos morfométricos en los glomérulos renales del grupo de animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). En la Figura 4.26. se muestran algunos ejemplos histológicos de estos grupos.

Tabla 4.15. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de función y morfología renal de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CD	AD	AS	ADD
Proteínas urinarias (mg/L)	101 \pm 10.3	56.5 \pm 5.7*	58.5 \pm 5.2*	18.5 \pm 1.7* ^a
Creatinina urinaria (mg/dL)	66.3 \pm 3.5	78.1 \pm 5.6*	74.5 \pm 2.6*	85.1 \pm 4.2* ^b
Glucosuria (g/L)	7.3 \pm 0.7	6.2 \pm 0.6*	4.7 \pm 0.2* ^c	3.7 \pm 0.4* ^a
Cociente proteinuria/creatinina (mg/g)	1560 \pm 228	580 \pm 31.0* ^b	737 \pm 14.1*	375 \pm 38.9* ^a
Aclaramiento de creatinina (mL/min/kg peso corporal)	0.7 \pm 0.03	0.8 \pm 0.01* ^b	0.7 \pm 0.03	0.9 \pm 0.01* ^a
Volumen glomerular ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	9515 \pm 443	6560 \pm 550*	7096 \pm 298*	5694 \pm 86.6* ^a
Índice de glomeruloesclerosis (%área PAS+ respecto al área glomerular total)	2.2 \pm 0.3	0.8 \pm 0.02* ^b	1.0 \pm 0.02*	0.7 \pm 0.02* ^a

*p < 0.05 respecto a CD. ^ap < 0.05 respecto a AS y AD. ^bp < 0.05 respecto a AS. ^cp < 0.05 respecto a AD

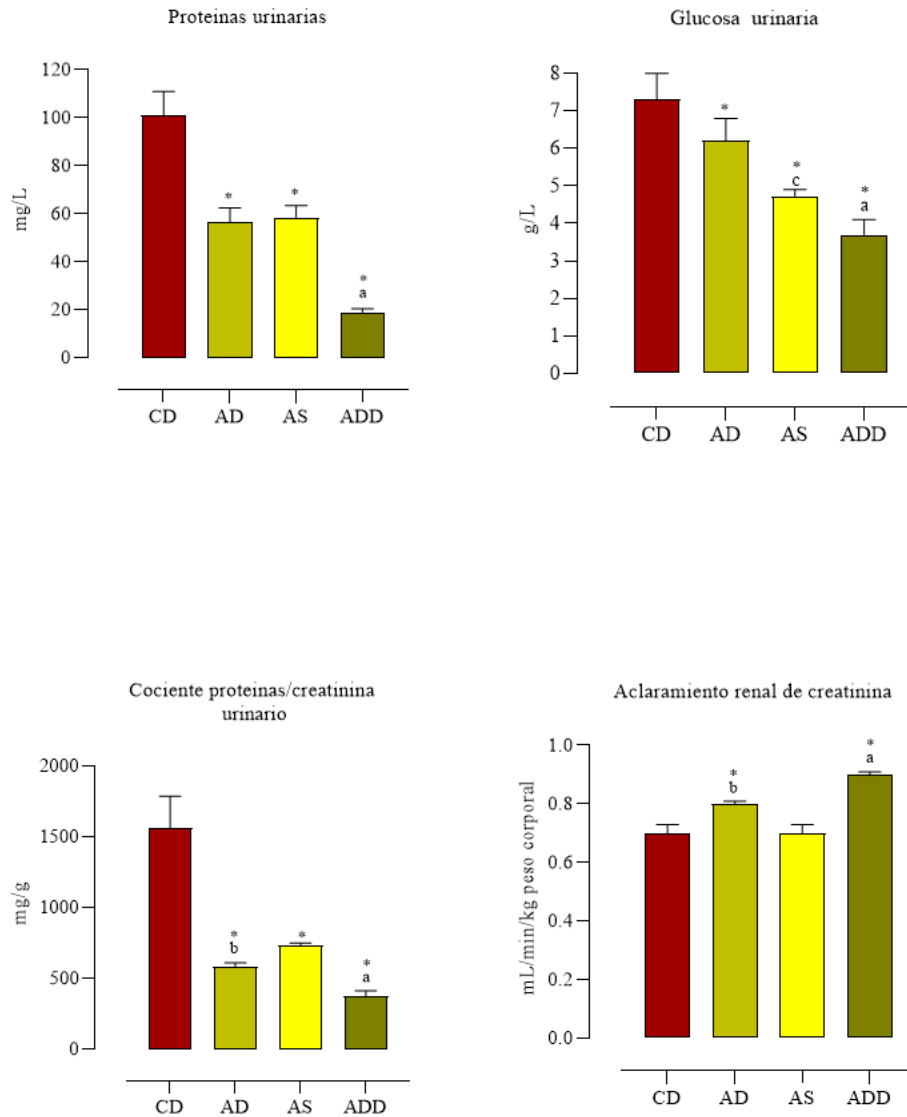


Figura 4.24. Valores medios correspondientes a las variables de función renal de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS. ^c $p < 0.05$ respecto a AD.

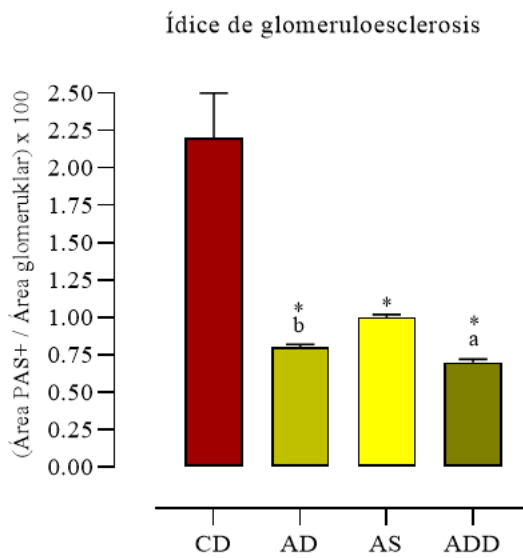
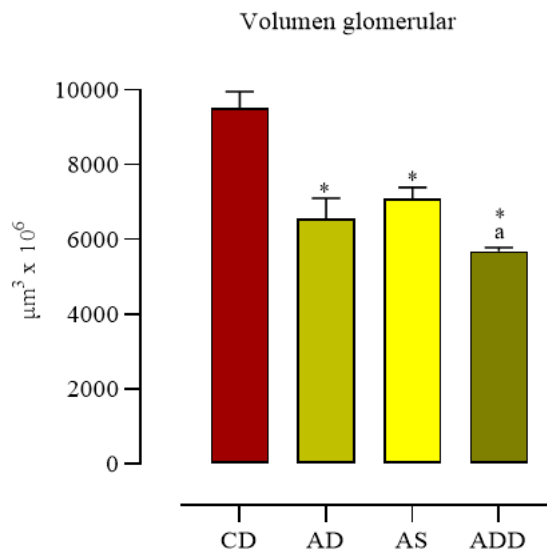
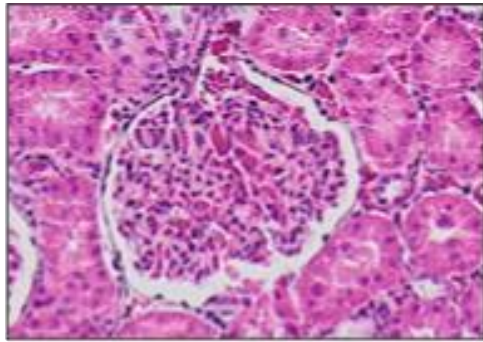
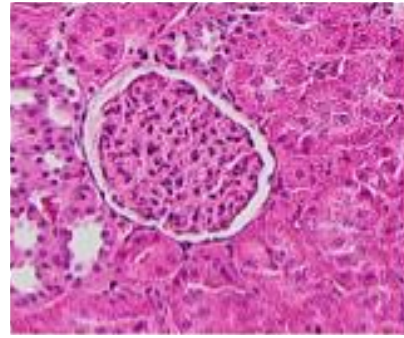


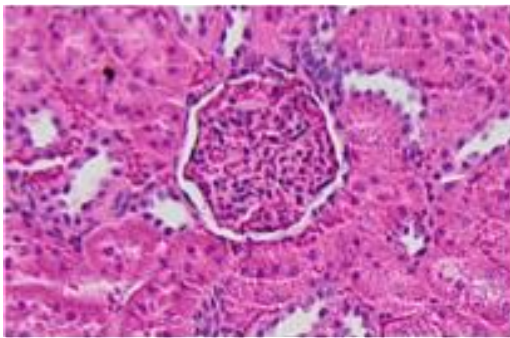
Figura 4.25. Valores medios correspondientes a las variables de morfología glomerular de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS. ^c $p < 0.05$ respecto a AD.



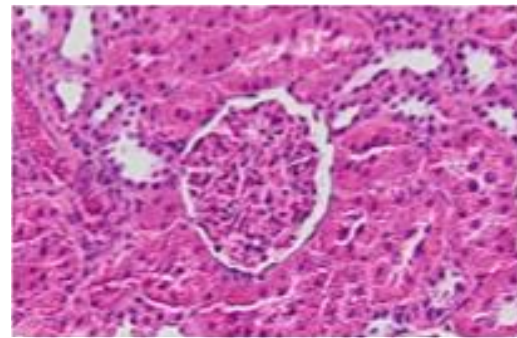
CD



AD

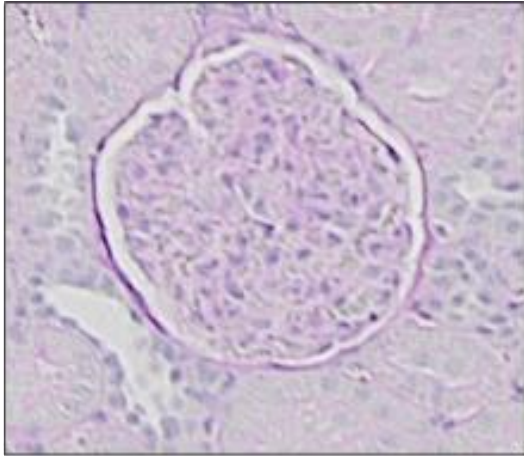


AS

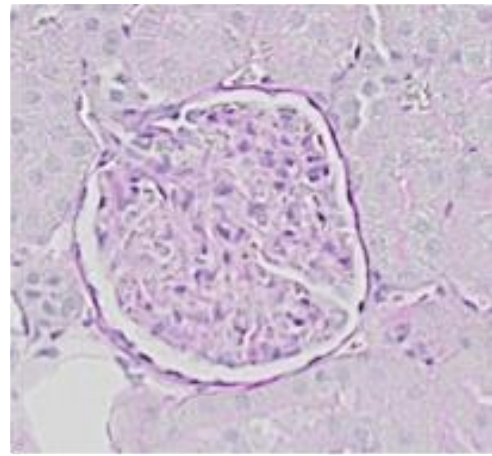


ADD

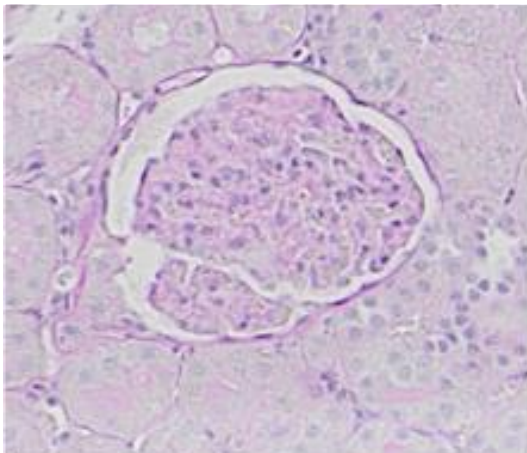
Figura 4.26. Imágenes representativas de glomérulos procedentes de ratas controles diabéticas (CD) y CD tratadas con aceite de aceituna deshuesada (AD), aceite de semilla de aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). Hematoxilina-eosina.



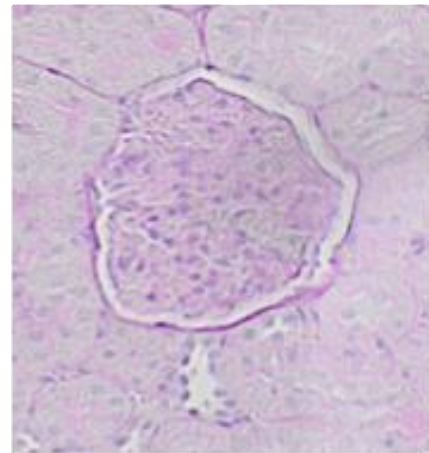
CD



AD



AS



ADD

Figura 4.27. (cont.). Imágenes representativas de glomérulos procedentes de ratas controles diabéticas (CD) y CD tratadas con aceite de aceituna deshuesada (AD), aceite de semilla de aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Tinción PAS.

4.2.7 Variables morfométricas retinianas

La Tabla 4.16. y la Figura 4.27., muestran los valores medios (media \pm desviación estándar, n= 10 animales por grupo) referidos a las determinaciones morfométricas en las muestras de retina de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). En la Figura 4.28. se muestran ejemplos representativos de muestras histológicas en las que se ha realizado el análisis morfométrico.

Tabla 4.16. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables morfométricas retinianas de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CD	AD	AS	ADD
Grosor retiniano (μm)	143 \pm 1.7	94.5 \pm 0.5 ^{*b}	100 \pm 1.2 [*]	89.1 \pm 1.7 ^{*a}
Porcentaje de retina ocupada por células	35.9 \pm 1.5	46.3 \pm 2.3 ^{*b}	48.8 \pm 0.7 [*]	61.6 \pm 1.7 ^{*a}
Porcentaje de retina ocupada por matriz extracelular	64.1 \pm 1.5	46.3 \pm 2.6 ^{*b}	51.2 \pm 0.7 [*]	38.4 \pm 1.7 ^{*a}
Células ganglionares (n/100 μm)	2.5 \pm 0.3	3.9 \pm 0.05 ^{*b}	3.1 \pm 0.04 [*]	5.1 \pm 0.2 ^{*a}

*p < 0.05 respecto a CD. ^ap < 0.05 respecto a AS y AD. ^bp < 0.05 respecto a AS

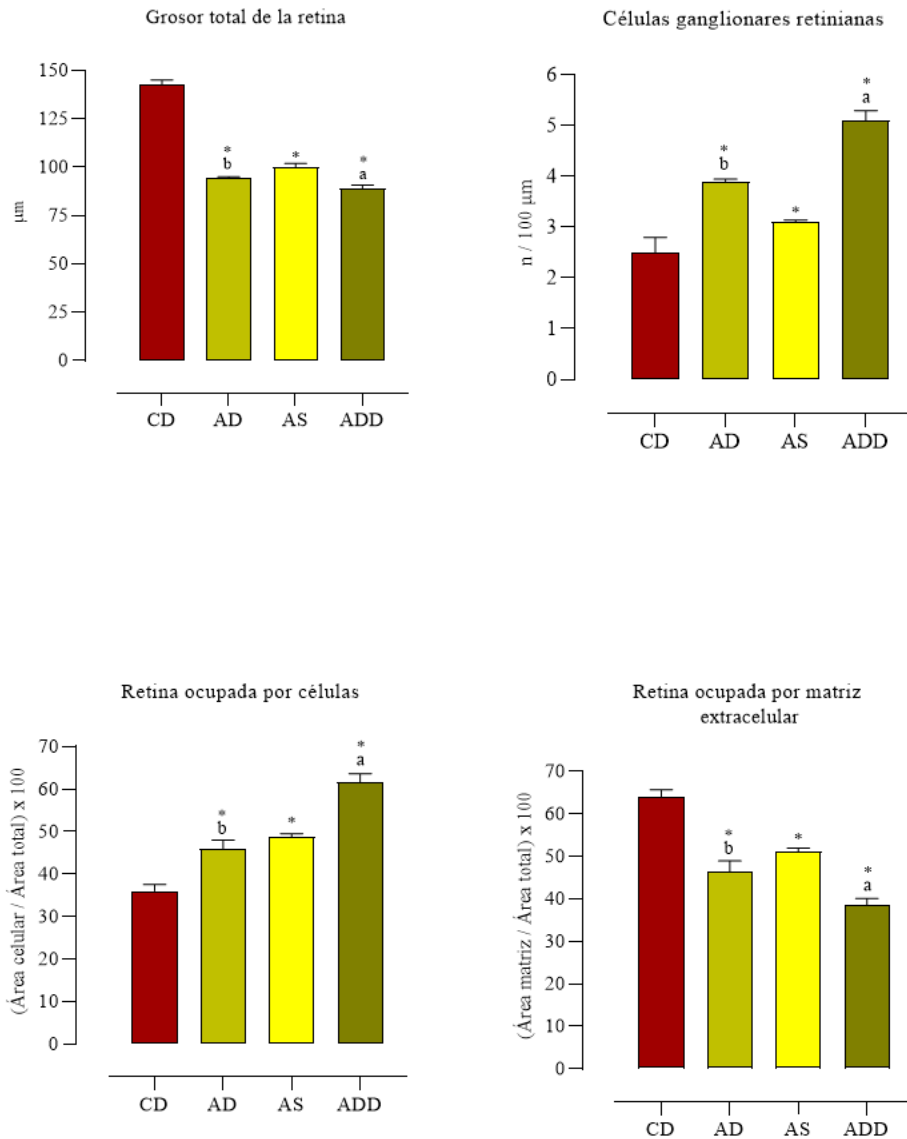
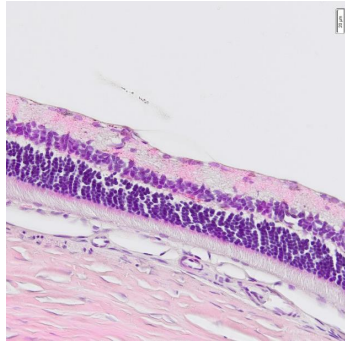
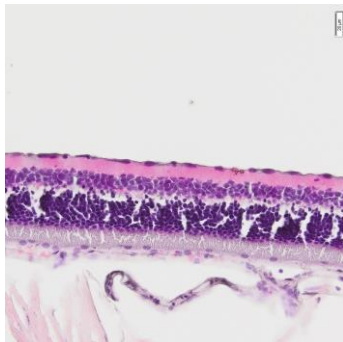


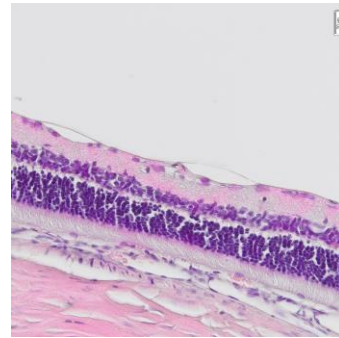
Figura 4.27. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables morfométricas retinianas de los animales controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CD. ^a $p < 0.05$ respecto a AS y AD. ^b $p < 0.05$ respecto a AS.



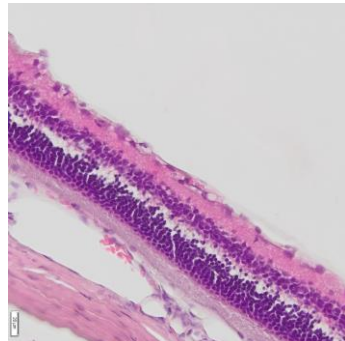
CD



AD



AS



ADD

Figura 4.28. Imágenes representativas de retinas procedentes de ratas controles diabéticas (CD) y CD tratadas con aceite de aceituna deshuesada (AD), aceite de semilla de aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). Hematoxilina-eosina (X20).

4.3 Correlaciones entre las variables de función renal y el resto de variables bioquímicas

En la Tabla 4.17. se muestran los coeficientes de correlación de Pearson, que indican la posibilidad de correlaciones entre varias variables, correspondientes a la comparación de variables de función renal (cociente proteínas/creatinina urinaria, aclaramiento renal de creatinina, volumen glomerular e índice de glomeruloesclerosis) y las distintas variables bioquímicas determinadas (estrés oxidativo y nitrosativo sistémico y renal y producción de prostanoides). En todos los casos se muestra el coeficiente de correlación de Pearson y su grado de significancia estadística.

Tabla 4.17. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables de función renal y variables bioquímicas analizadas.

	Prot/Creat	ClCreat	Vol Glomerular	Glomeruloesclerosis
Prot/Creat		-0.946*	0.898*	0.968*
ClCreat	-0.946*		-0.798**	-0.942*
Vol Glom.	0.898*	-0.798**		0.879*
Glomeruloescler .	0.968*	-0.942*	0.879*	
TBARS (s)	0.932*	-0.881*	0.903*	0.918*
8-OH-dG (s)	0.973*	-0.958*	0.855*	0.984*
3-Nty (s)	0.877*	-0.768***	0.861*	0.832*
8-isoprostanos	0.929*	-0.852*	0.864*	0.924*
TAC (s)	-0.873*	0.807**	-0.839*	-0.827*
GSH (s)	-0.891*	0.805**	-0.785**	-0.875*
GSHpx (s)	-0.917*	0.840*	-0.835*	-0.935*
TBARS (r)	0.916*	-0.969*	0.815*	0.946*
8-OH-dG (r)	0.937*	-0.917*	0.769*****	0.915*
3-Nty (r)	0.952*	-0.918*	0.871*	0.948*
TAC (r)	-0.950*	0.896*	-0.862*	-0.936*
GSH (r)	-0.945*	0.872*	-0.869*	-0.934*
GSHpx (r)	-0.910*	0.947*	-0.744*****	-0.935*
TxB ₂	0.971*	-0.885*	0.881*	0.965*
PGI ₂	-0.967*	0.939*	-0.850*	-0.963*

*p < 0.001, **p < 0.002. ***p < 0.004, ****p < 0.003, *****p < 0.006

3-NTy: 3-nitrotirosina. 8-OH-dG: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. ClCreat: aclaramiento renal de creatinina. GSH: glutatión reducido. GSHpx: actividad glutatión-peroxidasa. PGI₂: 6-keto-PGF_{1α} en orina. Prot/Creat: cociente proteínas/creatinina en orina. TAC: Capacidad antioxidante total. TBARS: productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico. TxB₂: 11-dinor-Tromboxano B₂ en orina. Vol Glomerular: volumen glomerular. (s): suero. (r): riñón.

En la Tabla 4.18. se muestran los coeficientes de correlación de Pearson, que indican la posibilidad de correlaciones entre varias variables, correspondientes a la comparación de variables morfológicas retinianas (grosor de la retina, porcentaje de retina ocupada por células o por matriz extracelular y contaje de células ganglionares) y las distintas variables bioquímicas determinadas (estrés oxidativo y nitrosativo sistémico y renal y producción de prostanoïdes). En todos los casos se muestra el coeficiente de correlación de Pearson y su grado de significancia estadística.

Tabla 4.18. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables retinianas y variables bioquímicas analizadas.

	Grosor retina	% células	% matriz	Células ganglionares
Grosor retina		-0.937*	0.935*	-0.982*
% células	-0.935*		-0.999*	0.955*
% matriz	0.935*	-0.999*		-0.955*
C. ganglionares	-0.982*	0.955*	-0.955*	
Prot/Creat	0.962*	-0.946*	0.946*	-0.989*
ClCreat	-0.905*	0.878*	-0.878*	0.941*
Vol Glom.	0.867*	-0.882*	0.882*	-0.877*
Glomeruloescler.	0.963*	-0.920*	0.920*	-0.978*
TBARS (s)	0.895*	-0.960*	0.960*	-0.929*
8-OH-dG (s)	0.972*	-0.949*	0.949*	-0.985*
3-Nty (s)	0.823*	-0.838*	0.838*	-0.861*
8-isoprostanos	0.944*	-0.901*	0.901*	-0.942*
TAC (s)	-0.870*	0.872*	-0.872*	0.853*
GSH (s)	-0.846*	0.885*	-0.855*	0.906*
GSHpx (s)	-0.883*	0.868*	-0.868*	0.922*
TxB ₂	0.967*	-0.956*	0.956*	-0.986*
PGI ₂	-0.923*	0.966*	-0.965*	0.971*

*p < 0.001

3-NTy: 3-nitrotirosina. 8-OH-dG: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. ClCreat: aclaramiento renal de creatinina. GSH: glutatión reducido. GSHpx: actividad glutatión-peroxidasa. PGI₂: 6-keto-PGF_{1α} en orina. Prot/Creat: cociente proteínas/creatinina en orina. TAC: Capacidad antioxidante total. TBARS: productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico. TxB₂: 11-dinor-Tromboxano B₂ en orina. Vol Glomerular: volumen glomerular. (s): suero.

DISCUSIÓN



5 DISCUSIÓN

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio hemos de realizarlo bajo el prisma que reúne varios aspectos relacionados entre sí:

- El aprovechamiento de la industria olivarera, teniendo en cuenta que, una vez demostrado que la incorporación del AOVE en la dieta diaria es beneficiosa para la salud, sería útil aprovechar todas las posibilidades que las aceitunas pueden dar en la obtención de aceites, debido a la alta cantidad de productos de desechos que se generan en la producción de AOVE.
- La obtención de aceites derivados de las aceitunas, que puedan aportar bioquímicamente aspectos diferenciales al clásico AOVE, manteniendo, por supuesto, aquellos elementos constitucionales que ya han demostrado un efecto beneficioso en distintas situaciones nosológicas.
- Un intento de que la mejora bioquímica de estos aceites pueda conllevar un mayor efecto preventivo de ciertas enfermedades y sus complicaciones, como es el caso de la diabetes mellitus y sus complicaciones microvasculares.

Teniendo en cuenta estas premisas, abordaremos el análisis de los resultados obtenidos, en primer lugar, centrándonos en la nefropatía diabética y posteriormente en la retinopatía.

Está ampliamente reconocida la importancia del estrés oxidativo en la fisiopatología del daño renal en la diabetes mellitus, tanto en la tipo 1 como en la tipo 2 (37,62). Los efectos del estrés oxidativo no solo se centran en un daño directo sobre el tejido renal, fundamentalmente glomerular (38), sino que afecta a algunas vías extrarrenales que inciden asimismo sobre la producción y desarrollo de la nefropatía (39,63). Es por ello por lo que analizaremos los resultados obtenidos atendiendo a estas vías de daño renal, las cuales resumimos en la Figura 5.1.

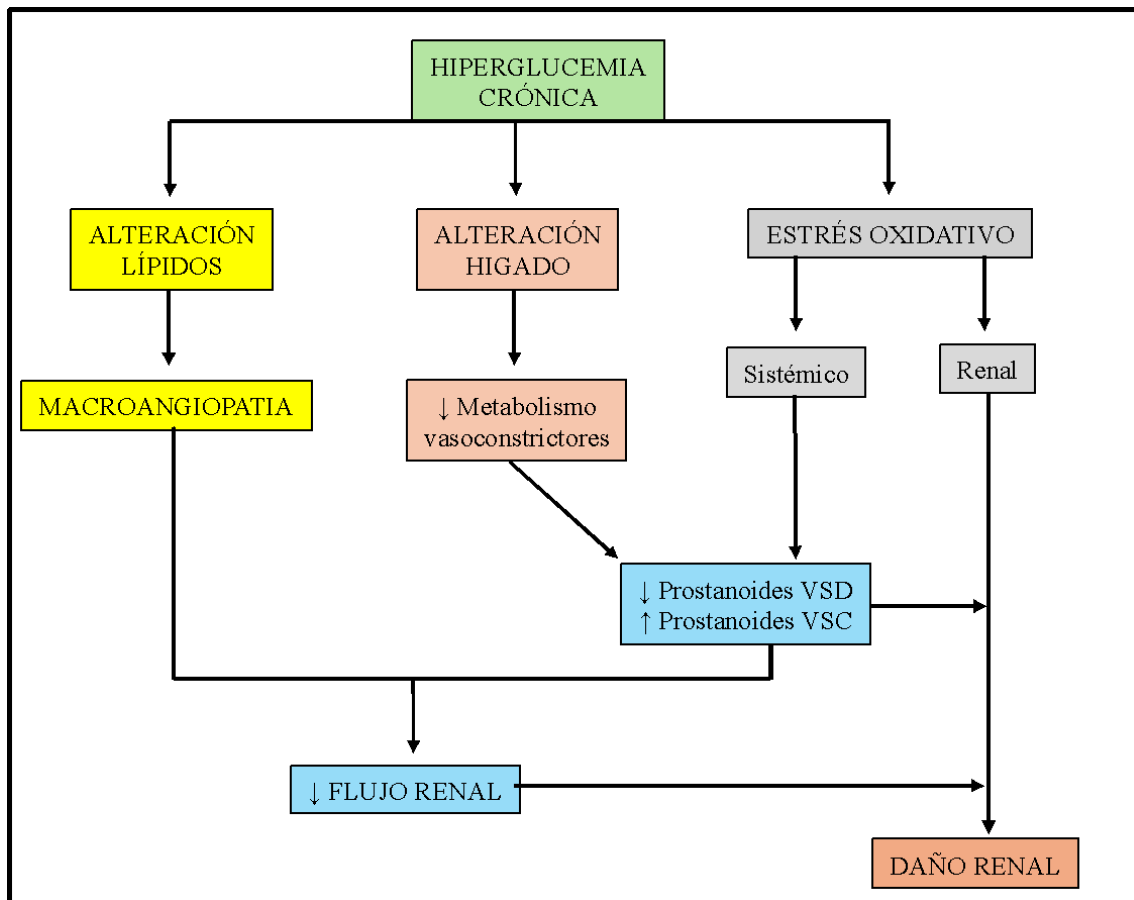


Figura 5.1. Esquema básico de daño glomerular en la diabetes mellitus (elaboración propia).

Mecanismos implicados en la nefropatía diabética debida al modelo experimental

En el modelo experimental utilizado en este estudio hemos confirmado que se alteran significativamente todas las vías implicadas en la fisiopatología de la nefropatía diabética, tanto a nivel sistémico como en tejido renal.

Además de un claro estado hiperglucémico, se afectan vías sistémicas que podrían repercutir en el daño renal causado por la diabetes:

- Perfil lipídico. Se aprecia un estado de hiperlipemia evidente, caracterizado por un incremento en los niveles de colesterol total y su fracción LDL y de los triglicéridos, así como un descenso de la fracción HDL de colesterol (Tabla 4.3.). Este perfil, muy frecuente en la diabetes humana, implica una base bioquímica

evidente en la génesis de la macroangiopatía diabética, además de otros factores como el estrés oxidativo, la inflamación arterial y la trombogénesis (64). Tal y como se muestra en el esquema anterior (Figura 5.1.), este mecanismo es clave para explicar un descenso del flujo sanguíneo renal y por ende, una falta de aporte sanguíneo al riñón.

- Perfil hepático. En los animales diabéticos controles se detectó un incremento global de las enzimas hepáticas, signo de una alteración hepática general (Tabla 4.2.): los niveles sanguíneos de aspartato-aminotransferasa, alanina-aminotransferasa, gamma-glutamyl-transpeptidasa y fosfatasa alcalina, fueron estadísticamente superiores a los que mostraron los animales controles sanos. Estas modificaciones se han descrito con mayor intensidad en la diabetes mellitus tipo 2, si bien también se relacionan con la tipo 1, siempre en relación con un estado de estrés oxidativo e inflamación del tejido hepático(65), lo cual es común a diversos órganos en la evolución del proceso metabólico. Es interesante el hecho de que esta alteración hepática puede conllevar una alteración en el metabolismo hepático que, en el caso de los mediadores vasoconstrictores, podría agravar el proceso de isquemia renal debida a la macroangiopatía diabética (66).
- Estrés oxidativo y nitrosativo. Ya se ha comentado en la introducción de este trabajo la importancia fundamental del estrés oxidativo y nitrosativo en la génesis y evolución de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus, participando en las primeras fases del proceso vascular y en el desarrollo posterior de las complicaciones (67). En el modelo experimental utilizado en este estudio se observó un incremento de las variables oxidativas y un descenso de los mecanismos antioxidantes generales (Tabla 4.4.), lo que puede influir en la génesis y evolución de la vasculopatía en este modelo de diabetes mellitus, hecho que corrobora los hallazgos realizados en estudios previos de nuestro grupo (68), demostrándose una relación entre el estrés oxidativo y un desbalance en el equilibrio tromboxano/prostaciclina, incrementándose la producción del prostanoide vasoconstrictor y disminuyendo la del vasodilatador. Por otra parte, en el caso que nos ocupa en este trabajo, la nefropatía diabética, se observó el mismo patrón de comportamiento que a nivel sérico, es decir, un

claro estrés oxidativo y nitrosativo en tejido renal (Tabla 4.5.). El estrés oxidativo puede producir daños en el tejido renal de forma directa e indirecta; la reactividad de los radicales libres con las distintas moléculas (lípidos, proteínas, ADN, etc.) puede alterar la estructura y función de los glomérulos renales(69); por otra parte, los radicales libres inducen los procesos de inflamación tisular, agravando aún más el daño de los primeros (69); por último, ya hemos comentado que los radicales libres incrementan la producción de tromboxano y reducen la vida media de la prostaciclina, lo cual induce un estado vasoconstrictor evidente.

- Disbalance de prostanoides. El incremento en la producción de tromboxano y la disminución en la vida media de la prostaciclina (Tabla 4.6.), es la base de dos hechos fundamentales en el desarrollo de la nefropatía diabética: un predominio del tono vasoconstrictor y una tendencia protrombótica evidente, ambos hechos conducen a una disminución del flujo renal y un mayor daño de la función glomerular (70).
- Función y morfología renal. Todas las variables que definen el estado de función renal se encuentran alteradas en el modelo experimental de diabetes utilizado en este estudio (Tabla 4.7.): incremento de proteinuria, volumen glomerular y glomeruloesclerosis, así como una disminución de la creatinina urinaria y de aclaramiento de esta. Estos datos son un índice claro de una función renal dañada, hecho que corrobora los hallazgos previos en este mismo modelo experimental (10,41) y en la clínica humana (37).

Por lo tanto, el modelo experimental de diabetes mellitus utilizado en este estudio muestra alteraciones en las principales vías reconocidas de daño renal como complicación crónica de la diabetes, así como un claro escenario de nefropatía diabética. En la Figura 5.2. se muestran los porcentajes de cambio de cada vía modificada en los animales diabéticos, respecto a los animales controles sanos, a fin de ver en su conjunto estas alteraciones antes comentadas.

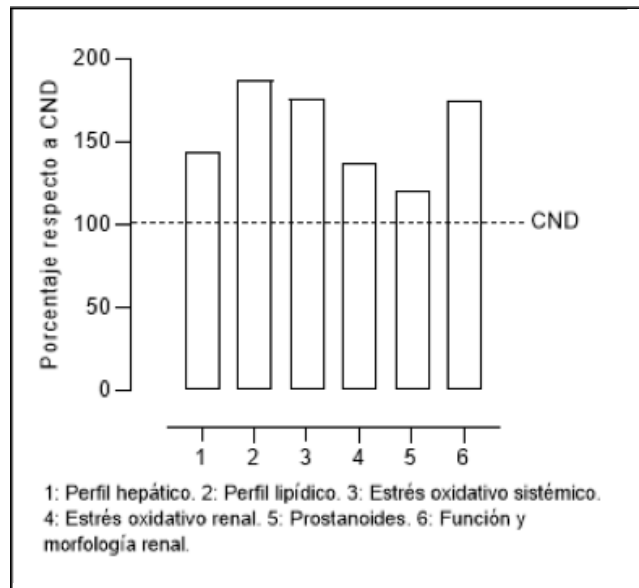


Figura 5.2. Porcentajes medios de cambio de los distintos grupos de variables de los animales diabéticos (CD) respecto a los controles sanos (CND).

Modificaciones en la nefropatía diabética debido a la administración de los aceites de estudio

En términos generales, la administración de cualquiera de los tres aceites estudiados produce cambios en casi todas las variables analizadas en los animales diabéticos, centrándonos fundamentalmente en la aparición y desarrollo de la nefropatía diabética. A pesar de ser un cálculo muy aproximando y con intención puramente didáctica, podemos ver en la siguiente figura (Figura 5.3.) la media de los porcentajes de cambio en los animales diabéticos tratados respecto a los diabéticos controles.

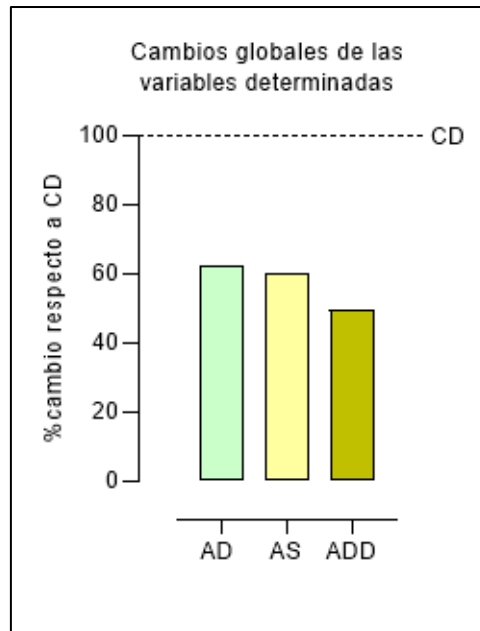


Figura 5.3. Porcentaje global de cambio, respecto a los animales diabéticos controles (CD), de las variables analizadas, tras tratamiento con aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla de aceituna (AS) y aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

El conjunto de variables que intervienen en la fisiopatología de la nefropatía diabética es modificado en un 40-55% respecto a los animales diabéticos no tratados. Es decir, independientemente del procedimiento de extracción del aceite, el efecto beneficioso en esta complicación de la diabetes mellitus es evidente. No obstante, es necesario analizar estos resultados atendiendo a los distintos tipos de variables y a las diferencias entre los tres tipos de aceites.

En primer lugar, no encontramos estudios en la bibliografía con los que comparar los obtenidos en el presente trabajo, ya que, si bien existe una amplia colección de estudios con AOVE, estos se podrían aproximar a los resultados obtenidos con el aceite de aceitunas deshuesadas, pero no con los otros dos. Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran por primera vez en la literatura científica los efectos del aceite de semilla de aceituna y el aceite de aceituna deshuesada y deshidratada en la prevención de la nefropatía diabética experimental.

En la Figura 5.4. se muestran los porcentajes de cambio, respecto a los animales diabéticos no tratados, de los principales bloques conceptuales de variables, producidos

por la administración de los tres tipos de aceites. Destacamos dos hechos que se repiten en todos los casos:

- Los tres tipos de aceites tienden a frenar los cambios en las vías fisiopatológicas descritas para explicar la nefropatía diabética, así como aquellas variables que determinan un daño funcional y morfológico renal en los animales diabéticos.
- En todos los casos, el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas presentó un mayor efecto que los otros dos tipos de aceites, pudiéndose establecer, desde un punto de vista didáctico, un orden relativo de potencia de efectos:

$$ADD > AD \geq AS$$

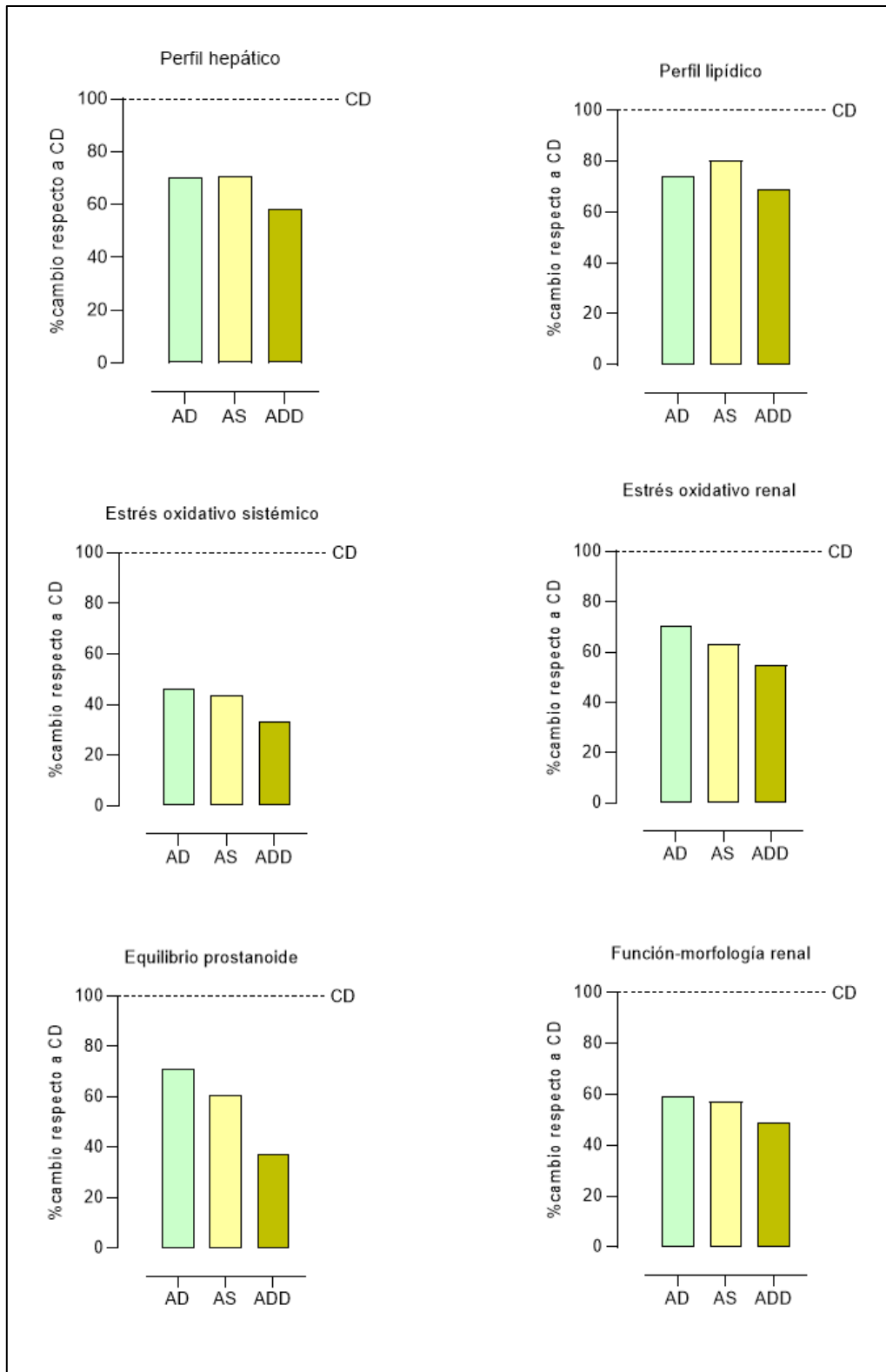


Figura 5.4. Porcentaje global de cambio, respecto a los animales diabéticos controles (CD), de las variables analizadas, tras tratamiento con aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla de aceituna (AS) y aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

Una primera cuestión para plantear es si estos aceites ejercen sus efectos directamente sobre las vías de daño renal en la diabetes o reducen los niveles de hiperglucemia y, de forma indirecta, es este efecto el que palía las consecuencias de unas cifras altas de glucosa en sangre de forma crónica. En el modelo experimental utilizado en este estudio, similar al tipo 1 en el ser humano, la administración de aceite de aceitunas deshuesadas o el aceite de semilla de aceituna, no reducen significativamente las cifras de glucosa en sangre, tan solo se observa este descenso en los animales diabéticos tratados con aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (Figura 5.5.).

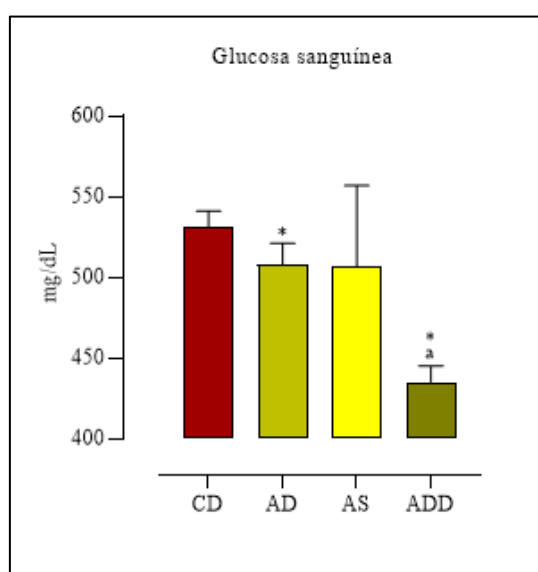


Figura 5.5. Niveles de glucosa en sangre en los animales diabéticos controles (CD) y tras tratamiento con aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla de aceituna (AS) y aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

En trabajos anteriores de nuestro grupo, se demostró que la administración de AOVE a animales sometidos a este mismo modelo experimental, no modificó la hiperglucemia tras el tratamiento (71). En estudios en humanos, se ha demostrado un mejor control de la glucemia en pacientes diabéticos tipo 2 a los que se administra AOVE, determinado por una menor necesidad de uso de antidiabéticos orales (72). En pacientes con diabetes tipo 1 solo se ha descrito un efecto de AOVE sobre la hiperglucemia postprandial (73). Respecto al efecto observado con el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas no tenemos datos en la literatura con los que

comparar los nuestros, si bien debemos indicar que, aunque la reducción de la glucemia es estadísticamente significativa, los valores absolutos en este grupo de animales es 435 ± 9.9 mg/dL, cifras claramente patológicas, por lo que no podríamos explicar el efecto de este aceite sobre el resto de las variables por una reducción clara de las cifras de glucemia. Por lo tanto, los efectos observados con los tres tipos de aceites hay que adjudicarlos a una interferencia directa de los componentes de estos aceites con las vías bioquímicas que participan en la génesis y evolución de la nefropatía diabética.

En el desarrollo de la nefropatía diabética podemos distinguir una serie de factores sistémicos extrarrenales, relacionados fundamentalmente con la vasculopatía diabética, y otros intrínsecos del propio tejido renal (Figura 5.1.). Pues bien, ya hemos comentado anteriormente que los tres tipos de aceites modifican todos esos factores:

- El perfil lipídico, claramente afectado por la diabetes, es modificado por estos aceites, disminuyendo los niveles de colesterol total, LDL colesterol y triglicéridos, incrementando los de HDL colesterol. Si tenemos en cuenta la importancia de ambas fracciones de colesterol y de los triglicéridos, tanto en la evolución de la diabetes como en la enfermedad coronaria crónica en estos pacientes (74,75), es interesante valorar el cociente LDL/HDL y triglicéridos/HDL colesterol, los cuales se modifican de la siguiente manera:

	CND	CD	AD	AS	ADD
LDL / HDL	1.15	2.92	0.95	0.93	0.63
TGC / HDL	3.04	9.73	3.78	3.95	2.31

Por lo tanto, uno de los principales factores que se involucran en la génesis y evolución de la macroangiopatía diabética es reducido por la administración de estos aceites, predominando, como ya hemos comentado anteriormente, el efecto del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas.

El perfil hepático, alterado en los animales controles diabéticos, también es modificado por la administración de los tres aceites, reduciéndose los niveles

de transaminasas y de fosfatasa alcalina. Como ya comentamos con anterioridad, el daño hepático en la diabetes mellitus se relaciona en gran medida con un estrés oxidativo e inflamatorio en el hígado (65). Como analizaremos posteriormente, los tres aceites presentan un claro efecto antioxidante, lo cual podría mejorar el daño tisular que el estrés oxidativo produjese en el hígado.

En este sentido, se ha demostrado que la administración de un AOVE con un alto contenido en fenoles reduce los biomarcadores de daño hepático en un modelo de diabetes tipo 2 (76), explicando dicho efecto por su capacidad antioxidante, lo cual mejoraría el metabolismo glucídico hepático y por ende, el estado proinflamatorio tisular. Asimismo, en un modelo de diabetes tipo 1, se ha demostrado que la administración preventiva de AOVE mejora el patrón bioquímico y morfológico hepático, alterado por la diabetes, adjudicando este efecto a la inducción por parte del AOVE de mediadores antiinflamatorios tisulares endógenos (77).

Esta mejoría del perfil hepático dañado en el modelo de diabetes utilizado podría mejorar las funciones de este órgano, favoreciendo el metabolismo de compuestos vasoconstrictores y procoagulantes, por lo que podría disminuir la influencia de estos sobre la disminución de flujo sanguíneo renal.

Como compuestos antioxidantes que son estos aceites, las variables de estrés oxidativo también se reducen ostensiblemente en los animales diabéticos tratados, predominando el efecto, como en los otros apartados, del aceite de aceituna deshuesada y deshidratada. Las modificaciones observadas siempre van en el mismo sentido: reducción de las variables que indican un proceso oxidativo y freno de la disminución de los mecanismos antioxidantes endógenos. El estrés oxidativo constituye un punto clave en la fisiopatología de la vasculopatía en general y de la vasculopatía diabética en particular, siendo uno de los primeros eventos bioquímicos que acontecen debido a un estado de hiperglucemia mantenida, así como interacciona con otras vías de daño vascular

y tisular, incrementando la intensidad de estos y, a su vez, recibiendo de ellos un estímulo recíproco (14,78).

El efecto antioxidante del AOVE está demostrado ampliamente, en modelos experimentales (79) y en seres humanos (49,80); este efecto antioxidante es señalado como la explicación fundamental del efecto beneficioso del AOVE en la prevención de la enfermedad cardiovascular (27,28,72). Los derivados de la aceituna utilizados en el presente estudio también muestran un claro efecto antioxidante, lo cual creemos de vital importancia en la regulación de los mecanismos de daño vascular y tisular.

Un caso especial se refiere al estrés oxidativo renal, motivo central de nuestro estudio. Al igual que en la fisiopatología de la vasculopatía diabética, en el tejido renal se ha comprobado un papel central al estrés oxidativo, ya que produce un daño directo, común a todos los radicales libres, y activa vías inflamatorias y proliferativas que dañan las diversas estructuras renales, sobre todo la morfología y función glomerular (81). Se ha demostrado que AOVE disminuye la disfunción endotelial en la diabetes y por ende, el daño vascular isquémico que pudiera ejercer sobre el riñón (82), pero también se ha demostrado que protege la función renal al inhibir el estrés oxidativo del tejido renal (47).

Por lo tanto, una reducción del estrés oxidativo a nivel vascular y renal debe hacernos pensar en un efecto protector renal en los animales diabéticos.

- Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la modificación en los prostanoides que tienen que ver con los vasos sanguíneos, como son el tromboxano (vasoconstrictor y agregante plaquetario) y la prostaciclina (vasodilatadora y antiagregante plaquetario). Los radicales libres tienen a incrementar el primero y degradar a la segunda, por lo que favorecen un estado vasoconstrictor e isquémico (83). Este mismo esquema es el que muestran los animales diabéticos controles (Tabla 4.6.). Los aceites utilizados mejoran el equilibrio prostaciclina/tromboxano, ya que frenan

la producción del prostanoide vasoconstrictor y disminuyen la reducción del vasodilatador, en la siguiente proporción:

	CND	CD	AD	AS	ADD
PGI / Tx	4.14	0.56	1.50	0.97	3.47

Al igual que en el resto de las determinaciones, el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas muestra un mayor efecto que los otros dos. En todo caso, la administración de estos aceites puede disminuir el riesgo isquémico renal en los animales diabético.

- Todos estos cambios de las vías de daño renal en la diabetes mellitus conducen a un estado de protección de la función y morfología renal tras la administración de los aceites de estudio. En la enfermedad renal crónica, de origen diabético o no, los niveles séricos de creatinina es un parámetro de uso muy común en clínica humana, aunque no sea el único ni el más robusto, pero sirve de una primera aproximación al pronóstico de la nefropatía (84), así como los niveles urinarios de micro o macroalbuminuria, los cuales constituyen un buen signo de la evolución del fallo en el filtrado glomerular (85). Estas alteraciones bioquímicas, junto al aclaramiento de creatinina, son consecuencias de las alteraciones morfológicas glomerulares en la diabetes mellitus, fundamentalmente una proliferación de las células mesangiales, engrosamiento de la membrana basal y esclerosis glomerular (37).

Pues bien, todos estos parámetros son modificados por los aceites utilizados (Tablas 4.10 y 4.15), postulándose a priori un efecto nefroprotector desde un punto de vista analítico. Pero al observar los parámetros morfológicos, confirmamos esta hipótesis, ya que los tratamientos mejoran las alteraciones glomerulares en los animales diabéticos tratados con los aceites y, como en casos anteriores, el aceite

de aceitunas deshuesadas y deshidratadas muestra un efecto mayor que los otros dos.

Respecto al AOVE, aceite de referencia de los utilizados en este estudio, se ha demostrado que su administración mejora los biomarcadores sanguíneos y urinarios relacionados con la enfermedad renal crónica, en relación, sobre todo, con su efecto antioxidante (48). Igualmente se observó en pacientes renales a los que se administró 40 mL/día de AOVE durante nueve semanas (47). No encontramos en la literatura datos con los tres aceites utilizados en nuestro estudio.

- Un aspecto importante a destacar es la relación existente entre las modificaciones renales observadas y los parámetros bioquímicos analizados. En efecto, pudimos corroborar que las variables de función y morfología renal se correlacionan (test de Pearson mayor de 0.7) con los parámetros analizados, fundamentalmente con el estrés oxidativo y nitrosativo, así como con el equilibrio prostanoide tromboxano/prostaciclina (Tabla 4.14); asimismo, las variables morfológicas (volumen glomerular e índice de glomeruloesclerosis) se correlacionan directamente con la analítica sérica y urinaria, es decir, la excreción de proteínas por orina está directamente relacionada con los daños morfológicos observados.

Por lo tanto, se confirma que la modificación del estrés oxidativo, tanto general como en el propio tejido renal, puede modular el proceso de daño renal como complicación de la diabetes mellitus con cifras elevadas crónicamente de glucosa, tal y como se ha postulado por otros autores (86–89).

En todo caso, la administración de los tres tipos de aceites utilizados en este estudio cumple esta relación entre sus efectos antioxidantes y su repercusión sobre la producción de prostanoideos en la diabetes mellitus experimental, y su efecto nefroprotector, presentando un mayor efecto el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas.

Modificaciones en las retinas de los animales diabéticos controles y tras tratamiento con los aceites de estudio

Una hiperglucemia crónica produce una microangiopatía retiniana y esta induce daño en el tejido neuronal retiniano, pero esta hiperglucemia también daña directamente el tejido nervioso y hay que recordar que la retina es un complejo vasculonervioso. La cuestión es si el daño vascular es anterior en el tiempo al neuronal o son simultáneos (90,91). Tal es la importancia del daño directo de la hiperglucemia sobre las células nerviosas retinianas, que algunos autores consideran la retinopatía diabética como un proceso neurodegenerativo en la evolución de la diabetes mellitus (92). Estos resultados coinciden con los ya aportados por otros grupos en la literatura, utilizando el mismo modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 (92).

En cuanto al grosor de la retina este valor aumenta en los animales diabéticos (Tabla 4.8.), lo que no coincide con los trabajos mencionados anteriormente. Se ha descrito que en este modelo experimental se produce un aumento de la permeabilidad de la barrera hemato-retiniana, produciéndose lo que en el humano se corresponde con edemas retinianos (93). Esta hipótesis puede confirmarse indirectamente por el hecho de que el área retiniana ocupada por matriz extracelular es mayor en los animales diabéticos que en los normoglucémicos (Tabla 4.8.), pudiendo explicar el mayor grosor total de las retinas de estos animales.

Respecto a la disminución del número de células ganglionares, es la evidencia más clara de la neurotoxicidad retiniana de la diabetes mellitus experimental, coincidiendo además con los estudios publicados (92,94). En este mismo modelo experimental de diabetes se ha demostrado que el tejido cerebral es más sensible al daño neuronal producido por isquemia-reperfusión en comparación con animales normoglucémicos (95,96).

En términos generales, tomando en conjunto todas las variables retinianas determinadas, podemos aseverar que en los animales diabéticos controles se produce un daño general de un 21.7% respecto a los valores en los animales controles sanos (Figura 5.6.)

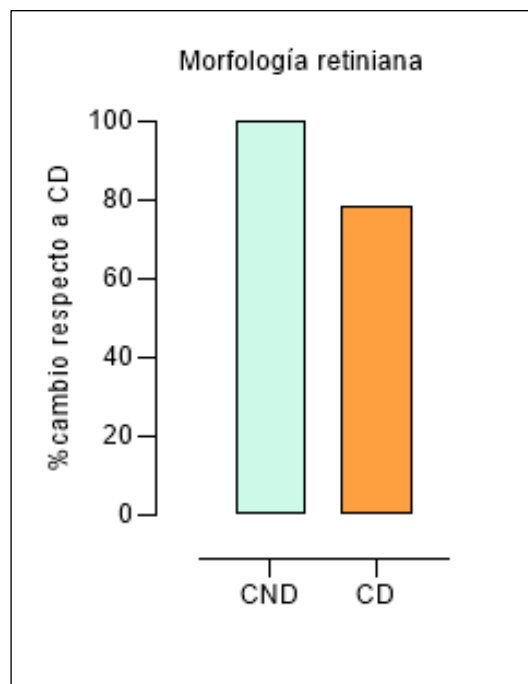


Figura 5.6. Porcentajes medios de cambio de las variables retinianas de los animales diabéticos (CD) respecto a los controles sanos (CND).

La administración de los tres tipos de aceites produjo cambios en las alteraciones retinianas originadas en el modelo experimental de diabetes, en el siguiente sentido, respecto a los animales diabéticos controles:

- Reducción del grosor global retiniano.
- Incremento de la celularidad retiniana.
- Disminución del área de matriz extracelular.
- Incremento del número de células ganglionares.

En términos generales, podemos decir que estos aceites presentan un efecto neuroprotector retiniano, aún sin descartar un posible efecto a nivel de la vascularización de la retina. Al igual que en la nefropatía diabética experimental, el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas presentó un mayor efecto que los otros dos aceites estudiados.

En el mismo modelo experimental utilizado en este estudio se demostró que la administración de AOVE a los animales diabéticos mejoró el déficit de vascularización

retiniana (71). En estudios en humanos, se ha demostrado que la implementación de la dieta con AOVE mejoró algunos biomarcadores retinianos, tanto vasculares como proliferativos y de neuroprotección (97–99), llegándose a postular que la dieta mediterránea enriquecida con AOVE puede ser un factor muy importante para prevenir la retinopatía diabética (100).

Los aceites estudiados en este trabajo redujeron las alteraciones retinianas observadas en los animales controles diabéticos en un 19.6% con aceite de aceitunas deshuesadas, 21.5% con aceite de semilla de aceitunas y 50.4% con aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (Figura 5.7.). Es decir:

$$ADD > AS \geq AD$$

Al intentar relacionar los cambios retinianos con las variables bioquímicas estudiadas, se apreciaron correlaciones significativas (coeficientes de Pearson mayores de 0.7) con todas estas variables, es decir, el efecto antioxidante, así como la influencia sobre el equilibrio tromboxano/prostaciclina, de estos aceites está directamente relacionado con las modificaciones retinianas producidas por la diabetes experimental (Tabla 4.18.). Esta relación con el equilibrio prostanoide se describió previamente por nuestro grupo de trabajo (42), volviendo a corroborar la interacción entre alteraciones vasculares y de tejido nervioso que acontece en la diabetes mellitus, independientemente del orden temporal en el que estas alteraciones se produzcan.

En el análisis de estas correlaciones encontramos otro dato de sumo interés: las modificaciones retinianas producidas por la diabetes se correlacionaron con todos los parámetros de daño renal, es decir, existe un paralelismo directo entre nefropatía y retinopatía en este modelo experimental de diabetes mellitus (Tabla 4.18.). Es decir, en la diabetes experimental, el daño microangiopático acontece en su conjunto en todo el organismo, afectando simultáneamente a varios órganos; el que predomine una u otra alteración podría deberse a factores genéticos o a predisposición fisiológica y/o bioquímica de unos órganos para ser dañados por la hiperglucemia crónica.

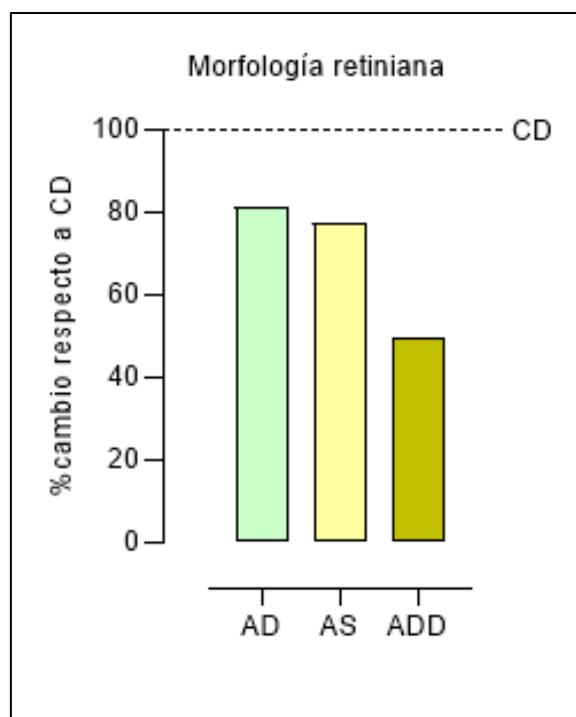


Figura 5.7. Porcentaje global de cambio, respecto a los animales diabéticos controles (CD), de las variables retinianas, tras tratamiento con aceite de aceitunas deshuesadas (AD), aceite de semilla de aceituna (AS) y aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD).

Algunos autores postulan sobre este aspecto de las complicaciones de la diabetes mellitus, que siendo los mecanismos bioquímicos que acontecen en la aparición de las distintas vasculopatías (macro y microangiopáticas) los mismos, pueden afectar al mismo tiempo a varios órganos y, siendo de importancia el papel del estrés oxidativo en todos ellos, podría ser una explicación a este fenómeno simultáneo (101).

Análisis interpretativo del mayor efecto del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas en el modelo de diabetes experimental

Ya hemos comentado con anterioridad que el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (ADD) muestra un efecto superior al de semillas de aceitunas (AS) y al de aceitunas deshuesadas (AD). Analizaremos qué componentes químicos destacan en ADD, respecto a los otros dos, que pudieran explicar estas diferencias.

Básicamente se acepta que los efectos beneficiosos del AOVE en su vertiente antiinflamatoria, anti-isquémica y de citoprotección, se centran en tres componentes químicos (102–104): ácidos grasos monoinsaturados (fundamentalmente el ácido

oleico), compuestos polifenólicos (hidroxitirosol, oleuropeina, oleocantal, tirosol, etc.) y derivados triterpénicos (ácido maslínico, ácido oleanólico y ácido ursólico). Otros compuestos del AOVE pueden mostrar algunos efectos, si bien en menor intensidad, así como podríamos pensar en un posible efecto sinérgico entre ellos. En los aceites utilizados, estos compuestos se encuentran en la siguiente cantidad (datos extraídos de la Tabla 3.1.):

	AD	AS	ADD
Ácidos grasos (%)			
Monoinsaturados	78.98	73.56	79.53
Poliinsaturados	5.43	5.24	5.03
Saturados	15.19	5.03	16.06
Fenoles (mg/kg)	722	490	752
Triterpenos (mg/kg)	122	97.83	844

Podemos destacar dos hechos fundamentales:

- El menor contenido de ácidos grasos saturados en AS (los ácidos grasos saturados se relacionan con vías de daño tisular), así como un menor contenido en fenoles totales (estos se relacionan con la mayor parte de los efectos beneficiosos del AOVE), lo cual podría compensarse en el resultado final obtenido.
- El marcado mayor contenido de derivados triterpénicos en ADD respecto a AD y AS, cifrándose entre 7-9 veces superior.

El efecto antioxidante del AOVE se centra fundamentalmente en sus componentes polifenólicos y triterpénicos, por lo cual podemos decir que, a igualdad relativa de fenoles en los tres tipos de aceites utilizados, destaca el alto contenido en derivados triterpénicos en ADD. A continuación, analizaremos brevemente qué se conoce sobre los efectos de fenoles y triterpenos en los mecanismos estudiados en nuestro estudio.

Se han publicado diversos estudios que demuestran un efecto de determinados antioxidantes naturales en la prevención de la enfermedad renal crónica,

fundamentalmente los fenoles dietéticos. Algunos fenoles han mostrado un efecto protector renal en modelos experimentales de isquemia-reperfusión renal, en relación con sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios, tal es el caso del resveratrol, ácido gálico, epigallocatequina-3-galato, ácido elágico, curcumina, entre otros. Algunos fenoles han mostrado un efecto protector en modelos de nefropatía diabética, como el resveratrol (105), polidatina, cianidina 3-glucósido, epicatequina, oligonol, entre otros (106).

Respecto a los fenoles del aceite de oliva virgen extra, como parte de la dieta de tipo mediterráneo, se ha demostrado que la oleuropeína, así como el hidroxitirosol y el 3',4'-dihidroxifenilglicol tienen un efecto nefroprotector en el mismo modelo experimental utilizado en este estudio, siempre en relación con su capacidad antioxidante (10,41,107).

Otros compuestos presentes en el aceite de oliva virgen extra son los derivados triterpénicos, como el ácido oleanólico y el ácido maslínico, ambos con un importante efecto antioxidante y nefroprotector en modelos de diabetes mellitus experimental, probablemente a través de la activación de la vía NRF2 (108).

No podemos descartar la idea de que, en el aceite de oliva virgen extra, que están presentes todos estos fenoles, puedan ejercer un efecto sinérgico entre ellos, como se ha demostrado para el hidroxitirosol y el 3',4'-dihidroxifenilglicol a nivel de biomarcadores cardiovasculares y neuroprotección en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 (29,30), y en la agregación plaquetaria (109). Por este motivo, para estudiar el posible efecto de los compuestos triterpénicos en la dieta, es necesario considerar el efecto de los otros fenoles presentes en el aceite de oliva virgen extra, por lo que hemos utilizado un aceite de oliva con el mismo contenido total en fenoles alcohólicos, cuyo efecto nefroprotector ha sido demostrado, pero con un alto contenido en derivados triterpénicos.

En primer lugar, cabe señalar que existen efectos sobre biomarcadores no renales en el modelo experimental de diabetes, que pueden influir en el desarrollo de la nefropatía diabética, como el estado de hiperlipemia o el estrés oxidativo sistémico; en ambos casos, ADD mostró un mayor efecto que AD y AS. Es decir, aunque los fenoles

alcohólicos ejercen un efecto beneficioso a este nivel, la presencia de derivados triterpénicos potencia este efecto. Los estudios sobre el efecto hipolipidémico del hidroxitirosol se refieren a modelos de diabetes mellitus tipo 2 (110), mientras que los realizados con ácido oleanólico muestran un efecto hipolipidémico en modelos de diabetes mellitus tipo 1 (111), como hemos demostrado en este estudio.

En cuanto al efecto antioxidante, se sabe que los fenoles alcohólicos, como el hidroxitirosol, tienen un claro efecto antioxidante en modelos de diabetes mellitus y en diversos órganos, como el cerebro y el riñón, así como a nivel sistémico en el suero sanguíneo (41,68). En cuanto a los derivados triterpénicos, un estudio realizado en voluntarios sanos a los que se administró un aceite de oliva virgen extra enriquecido con ácido oleanólico y maslínico muestra un mayor efecto sobre la eliminación urinaria de 8-isoprostanos y 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, en comparación con un aceite de oliva virgen extra con menor contenido en derivados triterpénicos (112). Este estudio coincide con los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental de diabetes mellitus en lo que respecta al efecto antioxidante. El efecto antioxidante del ácido oleanólico (113,114) y del ácido maslínico (115,116) se ha relacionado con un efecto antiinflamatorio y citoprotector a nivel cerebral y cardíaco.

Además, también se observó un desequilibrio en la proporción de los prostanoides tromboxano y prostaciclina, a favor del compuesto vasoconstrictor, hecho que también pudiera participar en el desarrollo de la nefropatía diabética. La administración de AD disminuyó la excreción urinaria del metabolito tromboxano y redujo la inhibición de la producción de prostaciclina, siendo este efecto mayor en el aceite rico en triterpenos (ADD). El hidroxitirosol ha mostrado un efecto inhibitor sobre la ciclooxigenasa, reduciendo así la producción plaquetaria y renal de tromboxano, y su efecto antioxidante disminuye la degradación de la prostaciclina por los radicales libres (68). En cuanto a los derivados triterpénicos, se ha demostrado que el ácido oleanólico induce la producción de prostaciclina en cultivos de fibras musculares lisas vasculares, en relación con un mecanismo relacionado con la ciclooxigenasa de tipo 2 (117), y el ácido maslínico inhibe la agregación plaquetaria inducida por el tromboxano plaquetario (118).

Por lo tanto, podemos asegurar que los efectos observados con los tres tipos de aceites pueden depender cualitativamente de una suma de los mecanismos ejercidos por los fenoles más los de los triterpenos, si bien cuantitativamente esta suma es predominante para ADD por el alto contenido en derivados triterpénicos:

$$\text{Efectos AD} = \text{Fenoles} + \text{Triterpenos}$$

$$\text{Efectos AS} = \text{Fenoles} + \text{Triterpenos}$$

$$\text{Efectos ADD} = \text{Fenoles} + \text{Triterpenos}$$

Como vía futura de investigación, a la vista de los resultados obtenidos en este estudio, proponemos la planificación de experimentos que valoren la posible interacción entre estos compuestos, en la misma proporción que están en los tres tipos de aceites estudiados, a nivel de las vías bioquímicas de daño tisular en la diabetes mellitus y en los mecanismos de daño en las diversas complicaciones macro y microangiopáticas de la diabetes, tanto la tipo 1 como la 2.

CONCLUSIONES



6 CONCLUSIONES

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

1. La administración de aceite de aceitunas deshuesadas, aceite de semilla de aceitunas o aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas, en un modelo experimental de diabetes mellitus similar a la tipo 1 en humanos, muestran un efecto nefroprotector y retinoprotector.
2. Los tres tipos de aceites reducen el estrés oxidativo y nitrosativo, sistémico y en tejido renal, así como el desequilibrio tromboxano/prostaciclina, correlacionándose significativamente con la mejoría de las variables de función y morfología renal en los animales diabéticos.
3. Las modificaciones en las variables morfométricas en tejido retiniano de los animales diabéticos se correlacionan significativamente con las modificaciones del estrés oxidativo y nitrosativo, sistémico y en tejido renal, así como con las variaciones en el desequilibrio tromboxano/prostaciclina.
4. Existe una correlación entre las variables morfométricas en tejido retiniano de los animales diabéticos y las modificaciones de función y morfología renal.
5. El aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas produjo un efecto mayor que los otros dos tipos de aceites, en todas las vías bioquímicas y de daño tisular analizadas, pudiéndose ser debido a su alto contenido en derivados triterpénicos.



BIBLIOGRAFÍA



7 BIBLIOGRAFÍA

1. Aschner P, Basit A, Fawwad A, Guariguata L, James S, Karuranga S, et al. IDF Atlas Reports. International Diabetes Federation. 2022;102(2):147–8.
2. Powers AC, Niswender KD, Evans C. CAPÍTULO 403 : Diabetes mellitus : diagnóstico , clasificación y fisiopatología. In: Loscalzo J, Kasper D, Longo D, Fauci A, Hauser S, Jameson J, editors. Harrison Principios de Medicina Interna, 21e. 21st ed. McGraw-Hill Education; 2022. p. 4480.
3. Carretero A, E. , Ávila L L. Guía Clínica Diabetes mellitus [Internet]. Fundación. Pérez Fajardo S, editor. Fundación SAMFyC; 2023. 247 p. Available from: https://www.samfyc.es/wp-content/uploads/2024/02/2023_GuiaClinicaDiabetesSAMFyC.pdf
4. Powers AC, Stafford JM, Rickels MR. CAPÍTULO 405 : Diabetes mellitus : complicaciones. In: Loscalzo J, Kasper D, Longo D, Fauci A, Hauser S, Jameson J, editors. Harrison Principios de Medicina Interna. 21st ed. McGraw-Hill Education; 2022. p. 4480.
5. French EK, Donihi AC, Korytkowski MT. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic syndrome : review of acute decompensated diabetes in adult patients. BMJ [Internet]. 2019;365:l1114. Available from <https://www.bmj.com/content/bmj/365/bmj.l1114.full.pdf>
6. Wilkinson CP, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. Ophthalmology [Internet]. 2003;110(9):1677–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13129861/>
7. Sánchez Santos I, Quiroz-Mercado H. Manual de retina SERV. In: Ruiz Moreno J, Arias Barquet L, editors. Sociedad Española de Retina y Vítreo. 2a edición. Barcelona: Elsevier; SERV; 2019. p. 400.
8. Andonegui J, Lasanta LJ. Edema macular diabético. An Sist Sanit Navar [Internet]. 2008;31(SUPPL. 3):35–44. Available from: <https://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v31s3/original4.pdf>

9. Chang MC, Yang S. Diabetic peripheral neuropathy essentials: a narrative review. *Ann Palliat Med*. 2023;12(2):390–8.
10. Rodriguez-Pérez MD, Santiago-corrall L, Ortega-hombrados L, Verdugo C, Mart E, Berm A, et al. The Effect of the Extra Virgin Olive Oil Minor Phenolic Compound 3',4'-Dihydroxyphenylglycol in Experimental Diabetic Kidney Disease. *Nutrients*. 2023;15(377):11.
11. Fuster V, Ibáñez B. Diabetes y enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 2008 [cited 2024 Mar 16];8:35C-44C. Available from: <https://www.revespcardiol.org/es-pdf-S1131358708735532>
12. Jaramillo-Morales OA, de la O-Arciniega M, Bautista M, Velázquez-González C, Guerrero-Solano JA. Estrés oxidativo en la neuropatía diabética dolorosa: evidencia y tratamiento frente a las especies reactivas. *Rev ALAD* [Internet]. 2023 May 23;12(4):127–39. Available from: <http://www.revistaalad.com>
13. Ortiz Escarza JM, Medina López ME. Estrés oxidativo ¿un asesino silencioso? *Educación Química*. 2020;31(1):2.
14. Demirci-Çekiç S, Özkan G, Avan AN, Uzunboy S, Çapanoğlu E, Apak R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2022;209:114477. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>
15. Ghezzi P. Environmental risk factors and their footprints *in vivo* – A proposal for the classification of oxidative stress biomarkers. *Redox Biol* [Internet]. 2020;34(December 2019):101442. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101442>
16. Behl T, Kaur I, Kotwani A. Implication of oxidative stress in progression of diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol* [Internet]. 2016;61(2):187–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.survophthal.2015.06.001>

17. Pérez-Torres, I., Castrejón-Téllez, V., Elena Soto, M., Rubio-Ruiz, M.E., Manzano-Pech, L., Guarner-Lans V. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1786):1–26.
18. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los fenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria: órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral.* 2012;27(1):76–89.
19. Tuttolomondo A, Simonetta I, Daidone M, Mogavero A, Ortello A, Pinto A. Metabolic and vascular effect of the mediterranean diet. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19).
20. Estruch R. 3rd International Immunonutrition Workshop Session 4 : Dietary strategies to prevent and mitigate inflammatory diseases Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet : the experience of the PREDIMED study *Proceedings of the Nutrition Society Proceed.* 2010;(October 2009):333–40.
21. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. *Diabetologia.* 2001;44(3):312–9.
22. Finicelli M, Squillaro T, Galderisi U, Peluso G. Polyphenols, the Healthy Brand of Olive Oil: Insights and Perspectives. 2021;1–20.
23. Solà-Alberich R, Valls-Zamora RM, Fernández-Castillejo S, Catalán-Santos Ú, Pedret-Figuerola A, Giralt-Batista M, et al. ¿Los compuestos fenólicos ejercen sus efectos en nuevas vías o, mecanismos que explicarían efectos cardiosaludables del aceite, de oliva virgen? *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis.* 2011;23(6):275–7.
24. Marx ÍMG. Co-Extraction Technique Improves Functional Capacity and Health-Related Benefits of Olive Oils: A Mini Review. *Foods.* 2023;12(8).

25. Boskou D, Clodoveo ML. Olive Oil: Processing Characterization, and Health Benefits. *Foods* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 Sep 1];9(11). Available from: [/pmc/articles/PMC7694685/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36800088/)
26. Dahdouh A, Khay I, Le Brech Y, El Maakoul A, Bakhouya M. Olive oil industry: a review of waste stream composition, environmental impacts, and energy valorization paths. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 Sep 1];30(16):45473–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36800088/>
27. Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, et al. PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* [Internet]. 2006 Jul 4 [cited 2024 Sep 1];145(1):1–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16818923/>
28. Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2024 Sep 1];58(1):50–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25940230/>
29. De La Cruz Cortés JP, Pérez de Algaba I, Martín-aurioles E, Arrebola MM, Ortega-hombrados L, Rodríguez-pérez MD, et al. Extra Virgin Oil Polyphenols Improve the Protective Effects of Hydroxytyrosol in an In vitro Model of Hypoxia-Reoxygenation of Rat Brain. *Brain Sci* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2024 Sep 1];11(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34573155/>
30. Cortés JPDLC, Vallejo-carmona L, Arrebola MM, Martín-aurioles E, Rodríguez-pérez MD, Ortega-hombrados L, et al. Synergistic Effect of 3',4'-Dihydroxifenilglicol and Hydroxytyrosol on Oxidative and Nitrosative Stress and Some Cardiovascular Biomarkers in an Experimental Model of Type 1 Diabetes Mellitus. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Sep 1];10(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34943086/>

31. 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* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2024 Sep 1];54(8):1287–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25504445/>
32. Parkinson L, Cicerale S. The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2024 Sep 1];21(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27999296/>
33. Balakumar P, Chakkarwar VA, Krishan P, Singh M. Vascular endothelial dysfunction: A tug of war in diabetic nephropathy? [Internet]. Vol. 63, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Biomed Pharmacother; 2009 [cited 2024 Sep 2]. p. 171–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18823739/>
34. Elsayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2024 Sep 2];46(Suppl 1):S19–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36507649/>
35. Dagar N, Das P, Bisht P, Taraphdar AK, Velayutham R, Arumugam S. Diabetic nephropathy: A twisted thread to unravel. *Life Sci* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 Sep 1];278. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34015285/>
36. Magee C, Grieve DJ, Watson CJ, Brazil DP. Diabetic Nephropathy: a Tangled Web to Unweave. *Cardiovasc Drugs Ther* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Sep 1];31(5–6):579–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28956186/>
37. Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int*. 2021;2021:17.
38. Sagoo MK, Gnudi L. Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress? *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2018 Feb 20 [cited 2024 Sep 1];116:50–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29305106/>

39. Chirkov YY, Nguyen TH, Horowitz JD. Impairment of Anti-Agregatory Responses to Nitric Oxide and Prostacyclin: Mechanisms and Clinical Implications in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 Sep 1];23(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35162966/>
40. Rodríguez-Poncelas A, Mundet-Tudurí X, Miravet-Jiménez S, Casellas A, Barrot-De La Puente JF, Franch-Nadal J, et al. Chronic Kidney Disease and Diabetic Retinopathy in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2024 Sep 1];11(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26886129/>
41. Rodríguez-Pérez MD, López-Villodres JA, Arrebola MM, Martín-Aurioles E, Fernández-Prior Á, Bermúdez-Oria A, et al. Nephroprotective Effect of the Virgin Olive Oil Polyphenol Hydroxytyrosol in Type 1-like Experimental Diabetes Mellitus: Relationships with Its Antioxidant Effect. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 Sep 1];10(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34829654/>
42. González-Correa JA, Rodríguez-Pérez MD, Márquez-Estrada L, López-Villodres JA, Reyes JJ, Rodríguez-Gutierrez G, et al. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetic Retinopathy: Relationship with Cardiovascular Biomarkers. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2018 Jan 24 [cited 2024 Sep 1];66(3):637–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29278909/>
43. Claro-Cala CM, Quintela JC, Pérez-Montero M, Miñano J, de Sotomayor MA, Herrera MD, et al. Pomace Olive Oil Concentrated in Triterpenic Acids Restores Vascular Function, Glucose Tolerance and Obesity Progression in Mice. *Nutrients* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2024 Sep 1];12(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31991894/>
44. Al-Waili N, Al-Waili H, Al-Waili T, Salom K. Natural antioxidants in the treatment and prevention of diabetic nephropathy; a potential approach that warrants clinical trials. *Redox Report* [Internet]. 2017;22(3):99–118. Available from: <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1297885>

45. Hernandez LF, Eguchi N, Whaley D, Alexander M, Tantisattamo E, Ichii H. Anti-Oxidative Therapy in Diabetic Nephropathy. *Front Biosci (Schol Ed)* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2024 Sep 1];14(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35730439/>
46. Tavafi M. Diabetic nephropathy and antioxidants. *J Nephropathol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Sep 1];2(1):20–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24475422/>
47. Marrone G, Urciuoli S, Di Lauro M, Ruzzolini J, Ieri F, Vignolini P, et al. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Protection in Chronic Kidney Disease. *Nutrients* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 Sep 1];14(20). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36296948/>
48. Noce A, Marrone G, Urciuoli S, Di Daniele F, Di Lauro M, Zaitseva AP, et al. Usefulness of Extra Virgin Olive Oil Minor Polar Compounds in the Management of Chronic Kidney Disease Patients. *Nutrients* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Sep 1];13(2):1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33578682/>
49. Cicero AFG, Nascetti S, Nyssönen K, Gaddi A V., López-Sabater MC, Elosua R, et al. Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: The EUROLIVE study. *J Am Coll Nutr* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2024 Sep 2];27(2):314–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18689564/>
50. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc*. 2021;1(4):1–21.
51. Olmo Peinado JM, Ruiz Rueda J, Olmo García L. Subproducto de la aceituna y procedimiento de obtención del mismo. España; ES 2 389 816 A1, 2011. p. 4.
52. Olmo-García L, Monasterio RP, Sánchez-Arévalo CM, Fernández-Gutiérrez A, Olmo-Peinado JM, Carrasco-Pancorbo A. Characterization of New Olive Fruit Derived Products Obtained by Means of a Novel Processing Method Involving

- Stone Removal and Dehydration with Zero Waste Generation. *J Agric Food Chem.* 2019;67(33):9295–306.
53. Comisión de comunidades europeas. REGLAMENTO (CEE) N° 2568 /91 DE LA COMISION de 11 de julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*; 1991. p. 83.
 54. Pérez-Camino MC, Cert A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem.* 1999;47(4):1558–62.
 55. International Union of Pure and Applied Chemistry Division. Commission on Oils F and D. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives.* Oxford: BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS; 1992. p. 151.
 56. Comisión de las comunidades europeas. REGLAMENTO (CEE) N° 183/93 DE LA COMISIÓN de 29 de enero de 1993 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Vol. 22. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*; 1993. p. 58–68.
 57. Márquez-Ruiz G, Jorge N, Martín-Polvillo M, Dobarganes MC. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *J Chromatogr A.* 1996;749(1–2):55–60.
 58. Vázquez-Roncero A, Valle CD, Valle MD. Determinacion de los fenoles totales del aceite de oliva. *Grasas Y Aceites.* 1973;
 59. Obied HK, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2007 Nov 12 [cited 2024 Sep 3];603(2):176–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17963838/>

60. Lane PH, Steffes MW, Mauer SM. Estimation of glomerular volume: a comparison of four methods. *Kidney Int* [Internet]. 1992 [cited 2024 Sep 3];41(4):1085–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1513090/>
61. Rodríguez-Pérez MD, Pérez de Algaba I, Martín-Aurioles E, Monsalud Arrebola M, Ortega-Hombrados L, Verdugo C, et al. Neuroprotective Effect of 3',4'-Dihydroxyphenylglycol in Type-1-like Diabetic Rats—Influence of the Hydroxytyrosol/3',4'-dihydroxyphenylglycol Ratio. 2022;14:13.
62. Ma X, Ma J, Leng T, Yuan Z, Hu T, Liu Q, et al. Advances in oxidative stress in pathogenesis of diabetic kidney disease and efficacy of TCM intervention. *Ren Fail* [Internet]. 2023;45(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2146512>
63. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* [Internet]. 2017 Feb 17 [cited 2024 Sep 4];120(4):713–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28209797/>
64. Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandenbroeck K, et al. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Sep 4];23(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35328769/>
65. Razaqat S, Sattar A, Khalid A, Razaqat S. Role of liver parameters in diabetes mellitus - a narrative review. *Endocr Regul* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2024 Sep 4];57(1):200–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37715985/>
66. Brenner RR, Bernasconi AM, Garda HA. Effect of experimental diabetes on the fatty acid composition, molecular species of phosphatidyl-choline and physical properties of hepatic microsomal membranes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* [Internet]. 2000 [cited 2024 Sep 4];63(3):167–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10991775/>

67. Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. Bull Exp Biol Med [Internet]. 2021 May 1 [cited 2024 Sep 4];171(2):179–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34173093/>
68. López-Villodres JA, Abdel-Karim M, De La Cruz JP, Rodríguez-Pérez MD, Reyes JJ, Guzmán-Moscoso R, et al. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. J Nutr Biochem. 2016 Nov 1;37:94–100.
69. Jin Q, Liu T, Qiao Y, Liu D, Yang L, Mao H, et al. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: role of polyphenols. Front Immunol [Internet]. 2023 [cited 2024 Sep 4];14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37545494/>
70. Brand-Miller J, Dickinson S, Barclay A, Allman-Farinelli M. Glycemic index, glycemic load, and thrombogenesis. Semin Thromb Hemost [Internet]. 2009 Feb [cited 2024 Sep 4];35(1):111–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19308899/>
71. De La Cruz JP, Del Río S, López-Villodres JA, Villalobos MA, Jebrouni N, González-Correa JA. Virgin olive oil administration improves the effect of aspirin on retinal vascular pattern in experimental diabetes mellitus. British Journal of Nutrition. 2010;104(4):560–5.
72. Javier Basterra-Gortari F, Ruiz-Canela M, Martínez-González MA, Babio N, Sorlí J V., Fito M, et al. Effects of a Mediterranean Eating Plan on the Need for Glucose-Lowering Medications in Participants With Type 2 Diabetes: A Subgroup Analysis of the PREDIMED Trial. Diabetes Care [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 Sep 4];42(8):1390–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31182491/>
73. Bozzetto L, Alderisio A, Clemente G, Giorgini M, Barone F, Griffo E, et al. Gastrointestinal effects of extra-virgin olive oil associated with lower postprandial glycemia in type 1 diabetes. Clin Nutr [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2024 Sep 4];38(6):2645–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30567626/>

74. Sheng CS, Miao Y, Ding L, Cheng Y, Wang D, Yang Y, et al. Prognostic significance of visit-to-visit variability, and maximum and minimum LDL cholesterol in diabetes mellitus. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Sep 4];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35144636/>
75. Yang T, Liu Y, Li L, Zheng Y, Wang Y, Su J, et al. Correlation between the triglyceride-to-high-density lipoprotein cholesterol ratio and other unconventional lipid parameters with the risk of prediabetes and Type 2 diabetes in patients with coronary heart disease: a RCSCD-TCM study in China. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Sep 4];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35659300/>
76. Santangelo C, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Filardi T, Fogliano V, et al. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *J Endocrinol Invest*. 2016;39(11):1295–301.
77. Balamash KS, Alkreathy HM, Al Gahdali EH, Khoja SO, Ahmad A. Comparative Biochemical and Histopathological Studies on the Efficacy of Metformin and Virgin Olive Oil against Streptozotocin-Induced Diabetes in Sprague-Dawley Rats. *J Diabetes Res* [Internet]. 2018 [cited 2024 Sep 4];2018. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30581871/>
78. An Y, Xu B tuo, Wan S rong, Ma X mei, Long Y, Xu Y, et al. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Sep 4];22(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37660030/>
79. Rossi M, Caruso F, Kwok L, Lee G, Caruso A, Gionfra F, et al. Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress in vitro and in vivo. Chemical and biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet. *PLoS One* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Sep 4];12(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29283995/>

80. Oliveras-López MJ, Molina JJM, Mir MV, Rey EF, Martín F, De la Serrana HLG. Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr* [Internet]. 2013 Sep [cited 2024 Sep 4];57(2):234–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23642776/>
81. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *Journal of the Formosan Medical Association* [Internet]. 2018;117(8):662–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.02.007>
82. Marrone G, Cornali K, Di Lauro M, Ceravolo MJ, Di Marco L, Manca di Villahermosa S, et al. Innovative Treatments to Counteract Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease Patients. *Biomedicines* [Internet]. 2024 May 1 [cited 2024 Sep 4];12(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38791047/>
83. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2024 Sep 4];64(4):409–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24101387/>
84. Zhang WR, Parikh CR. Biomarkers of Acute and Chronic Kidney Disease. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2019 Feb 10 [cited 2024 Sep 4];81:309–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30742783/>
85. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017 Dec 7 [cited 2024 Sep 4];12(12):2032–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28522654/>
86. Andrade-Sierra J, Pazarín-Villaseñor L, Yanowsky-Escatell FG, Díaz-de la Cruz EN, García-Sánchez A, Cardona-Muñoz EG, et al. The Influence of the Severity of Early Chronic Kidney Disease on Oxidative Stress in Patients with and without Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 Sep 4];23(19). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36232497/>

87. Gupta S, Gambhir JK, Kalra O, Gautam A, Shukla K, Mehndiratta M, et al. Association of biomarkers of inflammation and oxidative stress with the risk of chronic kidney disease in Type 2 diabetes mellitus in North Indian population. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2013 Nov [cited 2024 Sep 4];27(6):548–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24012111/>
88. Mohandes S, Doke T, Hu H, Mukhi D, Dhillon P, Susztak K. Molecular pathways that drive diabetic kidney disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2023 Feb 15 [cited 2024 Sep 4];133(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36787250/>
89. Watanabe S, Fujii H, Kono K, Watanabe K, Goto S, Nishi S. Influence of oxidative stress on vascular calcification in the setting of coexisting chronic kidney disease and diabetes mellitus. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 Sep 4];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33244056/>
90. Simó R, Simó-Servat O, Bogdanov P, Hernández C. Neurovascular Unit: A New Target for Treating Early Stages of Diabetic Retinopathy. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 Sep 4];13(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34452281/>
91. Stem M, Gardner T. Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr Med Chem* [Internet]. 2013 Aug 10 [cited 2024 Sep 4];20(26):3241–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23745549/>
92. Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, Ban N, Yuki K, Kubota S, et al. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model. *Exp Diabetes Res* [Internet]. 2011 [cited 2024 Sep 4];2011. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22144984/>
93. Wong TY, Cheung CMG, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2016 Mar 17 [cited 2024 Sep 4];2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27159554/>

94. Potilinski MC, Lorenc V, Perisset S, Gallo JE. Mechanisms behind Retinal Ganglion Cell Loss in Diabetes and Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2024 Sep 4];21(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32231131/>
95. González-Correa JA, Arrebola MM, Cansino AL, Muñoz-Marín J, Ruiz-Villafranca D, Guerrero A, et al. Effects of hypoxia reoxygenation in brain slices from rats with type 1-like diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2006 Sep [cited 2024 Sep 4];22(5):390–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16705623/>
96. Reyes JJ, Villanueva B, López-Villodres JA, De La Cruz JP, Romero L, Rodríguez-Pérez MD, et al. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetes Mellitus. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2017 Jun 7 [cited 2024 Sep 4];65(22):4378–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27700078/>
97. Bryl A, Mrugacz M, Falkowski M, Zorena K. A Mediterranean Diet May Be Protective in the Development of Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Sep 4];24(13). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37446322/>
98. Marrero AD, Cárdenas C, Castilla L, Ortega-Vidal J, Quesada AR, Martínez-Poveda B, et al. Antiangiogenic Potential of an Olive Oil Extract: Insights from a Proteomic Study. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2024 Jun 12 [cited 2024 Sep 4];72(23):13023–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38809962/>
99. Valero-Vello M, Peris-Martínez C, García-Medina JJ, Sanz-González SM, Ramírez AI, Fernández-Albarral JA, et al. Searching for the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Neuroprotective Potential of Natural Food and Nutritional Supplements for Ocular Health in the Mediterranean Population. *Foods* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2024 Sep 4];10(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34071459/>

100. Díaz-López A, Babio N, Martínez-González MA, Corella D, Amor AJ, Fitó M, et al. Mediterranean Diet, Retinopathy, Nephropathy, and Microvascular Diabetes Complications: A Post Hoc Analysis of a Randomized Trial. *Diabetes Care* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2024 Sep 4];38(11):2134–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26370380/>
101. Roohi TF, Faizan S, Parray ZA, Baig MAI, Mehdi S, Kinattungal N, et al. Beyond Glucose: The Dual Assault of Oxidative and ER Stress in Diabetic Disorders. *High Blood Press Cardiovasc Prev* [Internet]. 2023 Nov 1 [cited 2024 Sep 4];30(6):513–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38041772/>
102. Aparicio-Soto M, Sánchez-Hidalgo M, Rosillo MÁ, Castejón ML, Alarcón-De-La-Lastra C. Extra virgin olive oil: a key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food Funct* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2024 Sep 4];7(11):4492–505. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27783083/>
103. De Santis S, Clodoveo ML, Corbo F. Correlation between Chemical Characterization and Biological Activity: An Urgent Need for Human Studies Using Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 Sep 4];11(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35204146/>
104. Rodríguez-López P, Lozano-Sanchez J, Borrás-Linares I, Emanuelli T, Menéndez JA, Segura-Carretero A. Structure-Biological Activity Relationships of Extra-Virgin Olive Oil Phenolic Compounds: Health Properties and Bioavailability. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2024 Sep 4];9(8):1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32752213/>
105. Martínez-Rojas MÁ, Balcázar H, Ponce-Nava MS, González-Soria I, Marquina-Castillo B, Pérez-Villalva R, et al. A short treatment with resveratrol after a renal ischaemia–reperfusion injury prevents maladaptive repair and long-term chronic kidney disease in rats. *J Physiol* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2024 Sep 3];602(8):1835–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/JP285979>

106. Guerreiro Í, Ferreira-Pêgo C, Carregosa D, Santos CN, Menezes R, Fernandes AS, et al. Polyphenols and Their Metabolites in Renal Diseases: An Overview. *Foods*. 2022;11(7):1–22.
107. Nediani C, Ruzzolini J, Romani A, Calorini L. Oleuropein, a Bioactive Compound from *Olea europaea* L., as a Potential Preventive and Therapeutic Agent in Non-Communicable Diseases. *Antioxidants* 2019, Vol 8, Page 578 [Internet]. 2019 Nov 22 [cited 2024 Sep 3];8(12):578. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/12/578/htm>
108. Kanda H, Yamawaki K. Bardoxolone methyl: drug development for diabetic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2024 Sep 3];24(10):857–64. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10157-020-01917-5>
109. 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* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2024 Sep 3];54(8):1287–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25504445/>
110. Binou P, Stergiou A, Kosta O, Tentolouris N, Karathanos VT. Positive contribution of hydroxytyrosol-enriched wheat bread to HbA1c levels, lipid profile, markers of inflammation and body weight in subjects with overweight/obesity and type 2 diabetes mellitus. *Eur J Nutr* [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2024 Sep 3];62(5):2165–76. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-023-03133-9>
111. Gutiérrez RMP. Hypolipidemic and hypoglycemic activities of a oleanolic acid derivative from *Malva parviflora* on streptozotocin-induced diabetic mice. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Sep 3];40(5):550–62. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12272-016-0873-y>

112. Sanchez-Rodriguez E, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Calleja MA, Espejo-Calvo JA, Gil-Extremera B, et al. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on biomarkers of oxidative stress and inflammation in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients*. 2019;11(3).
113. Ayeleso TB, Matumba MG, Mukwevho E. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. *Molecules*. 2017;22(11).
114. Sen A. Prophylactic and therapeutic roles of oleanolic acid and its derivatives in several diseases. <http://www.wjgnet.com/> [Internet]. 2020 May 26 [cited 2024 Sep 3];8(10):1767–92. Available from:
<https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v8/i10/1767.htm>
115. Márquez Martín A, de la Puerta Vázquez R, Fernández-Arche A, Ruiz-Gutiérrez V. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radic Res* [Internet]. 2006 Mar [cited 2024 Sep 3];40(3):295–302. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10715760500467935>
116. Qin X, Qiu C, Zhao L. Maslinic acid protects vascular smooth muscle cells from oxidative stress through Akt/Nrf2/HO-1 pathway. *Mol Cell Biochem*. 2014;390(1–2):61–7.
117. Martínez-González J, Rodríguez-Rodríguez R, González-Díez M, Rodríguez C, Herrera MD, Ruiz-Gutierrez V, et al. Oleanolic Acid Induces Prostacyclin Release in Human Vascular Smooth Muscle Cells through a Cyclooxygenase-2-Dependent Mechanism. *J Nutr*. 2008 Mar 1;138(3):443–8.
118. Kim KM, Kim J, Baek MC, Bae JS. Novel factor Xa inhibitor, maslinic acid, with antiplatelet aggregation activity. *J Cell Physiol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 Sep 3];235(12):9445–56. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.29749>



ANEXOS



8 ANEXOS

8.1 ANEXO I: Autorización del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, en calidad de Órgano Habilitado para la realización de proyectos de investigación con animales.

El estudio se realizó de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Universidad de Málaga (Ref. CEUMA31-2018-A) y la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía (Ref. 9/07/2019/124).





INFORME Nº: 69
ANEXO VIII

INFORME DEL ORGANISMO 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.:

Correo E.:



INFORME Nº: 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 Nº 37 del 12/05/2018

Y

Reunión 40ª del 31/08/2018

Acta Nº 40 del 31/08/2018

Nº 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:



JUNTA DE ANDALUCÍA

S A L I D A	JUNTA DE ANDALUCÍA C. ADIC. DIV. PESC. Y S.C.
	20199900047881B - 15/07/2019
	Registro Auxiliar SV. SANIDAD ANIMAL SEVILLA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y
DESARROLLO SOSTENIBLE
Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera

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.



Tarifa, s/a
Teléfono 95 5032000
41071 - Sevilla

Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
Código: 640xu765PFIRMA6v8amp1g16+Nfz2D			
FIRMADO POR	MANUEL FERNANDEZ MORENTE	FECHA	12/07/2019
ID. FIRMA	640xu765PFIRMA6v8amp1g16+Nfz2D	PÁGINA	1/1

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".



Codigo:640xu691PFIRMA16P//EuaES+0d6Kx			
Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://w080.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	MANUEL GOMEZ GALERA	FECHA	10/07/2019
ID FIRMA	640xu691PFIRMA16P//EuaES+0d6Kx	PAGINA	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.



Código:64oxu691PFIRMA16P//EuaES+0d6Kx			
Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://wa050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	MANUEL GÓMEZ GALERA	FECHA	10/07/2019
ID. FIRMA	64oxu691PFIRMA16P//EuaES+0d6Kx	PÁGINA	3/3



8.2 ANEXO II: Ayudas y subvenciones para la realización de proyectos que han permitido la realización de la presente Tesis Doctoral.

Esta investigación ha sido financiada por:

- Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España, y por la Junta de Andalucía, a través del Programa FEDER INNTERCONECTA del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), Proyecto NUTRADAF nº ITC-20161265, “Caracterización y desarrollo de nuevos productos nutracéuticos procedentes de la industria elaiotécnica con aplicaciones finales”.
- UMA-20-FEDERJA-54, “Efecto de fenoles del aceite de oliva virgen extra sobre las complicaciones macro y microangiopáticas en un modelo experimental de diabetes mellitus”.



8.3 ANEXO III: Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral.

De La Cruz, J. P., Osuna-Esteban, L., Rodríguez-Pérez, M. D., Ortega-Hombrados, L., Sánchez-Tévar, A. M., Martín-Aurioles, E., ... González-Correa, J. A. (2024). Effect of a Triterpenoid-Rich Olive Oil on Chronic Kidney Disease in an Experimental Model of Diabetes Mellitus. *Nutrients*, 16(16). <https://doi.org/10.3390/nu16162794>



Article

Effect of a Triterpenoid-Rich Olive Oil on Chronic Kidney Disease in an Experimental Model of Diabetes Mellitus

José Pedro De La Cruz ¹ , Laura Osuna-Esteban ¹, María Dolores Rodríguez-Pérez ^{1,*}, Laura Ortega-Hombrados ¹, Ana María Sánchez-Tévar ¹, Esther Martín-Aurioles ², María África Fernández-Prior ³ , Sergio Pérez-Burillo ¹ , Juan Antonio Espejo-Calvo ⁴ and José Antonio González-Correa ¹

- ¹ Departamento de Farmacología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina—IBIMA Plataforma BIONAND, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; jpcruz@uma.es (J.P.D.L.C.); lauraoc@uma.es (L.O.-E.); hombrados@uma.es (L.O.-H.); amstevar@uma.es (A.M.S.-T.); spburillo@uma.es (S.P.-B.); correa@uma.es (J.A.G.-C.)
 - ² Distrito Sanitario Málaga-Guadalhorce, UGC La Roca, 29009 Málaga, Spain; estherd.martin.sspa@juntadeandalucia.es
 - ³ Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de la Grasa, 41013 Sevilla, Spain; mfprior@ig.csic.es
 - ⁴ Tecnofood I+D+i Soluciones S.L., Instituto para la Calidad y Seguridad Alimentaria (ICSA), 18320 Granada, Spain; jaespejo@hotmail.com
- * Correspondence: loladoct@uma.es



Citation: De La Cruz, J.P.; Osuna-Esteban, L.; Rodríguez-Pérez, M.D.; Ortega-Hombrados, L.; Sánchez-Tévar, A.M.; Martín-Aurioles, E.; Fernández-Prior, M.Á.; Pérez-Burillo, S.; Espejo-Calvo, J.A.; González-Correa, J.A. Effect of a Triterpenoid-Rich Olive Oil on Chronic Kidney Disease in an Experimental Model of Diabetes Mellitus. *Nutrients* **2024**, *16*, 2794. <https://doi.org/10.3390/nu16162794>

Academic Editor: Hiroshi Itoh

Received: 24 July 2024
Revised: 17 August 2024
Accepted: 20 August 2024
Published: 21 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The aim of this study was to assess the effect of triterpenoids on the development of diabetic nephropathy in an experimental model of diabetes mellitus. For this purpose, a destoned and dehydrated olive oil (DDOO) was used, comparing its effects to a destoned olive oil (DOO). DDOO had a higher triterpenoid content than DOO but an equal content of alcoholic polyphenols. Four study groups ($n = 10$ animals/group) were formed: healthy rats, diabetic control rats (DRs), and DRs treated orally with 0.5 mL/kg/day of DOO or DDOO for two months. DRs showed impaired renal function (proteinuria, increased serum creatinine, decreased renal creatinine clearance) and morphology (glomerular volume and glomerulosclerosis). These alterations correlated with increased systemic and renal tissue oxidative stress and decreased prostacyclin production. DDOO administration significantly reduced all variables of renal damage, as well as systemic and renal oxidative stress, to a greater extent than the effect produced by DOO. In conclusion, triterpenoid-rich olive oil may prevent kidney damage in experimental diabetes mellitus.

Keywords: diabetes; nephropathy; olive oil; triterpenoids; oxidative stress; prostacyclin

1. Introduction

Chronic kidney disease is one of the complications that appear in the evolution of diabetes mellitus, especially when glycemic control is inadequate [1,2]. More than 25–40% of patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus suffer from nephropathy after 20–35 years of disease evolution [3]. The main clinical features of diabetic nephropathy are increased urinary albumin excretion (≥ 300 mg/day), decreased glomerular filtration rate, and progressive deterioration of renal function ultimately leading to end-stage renal failure [4]. The pathophysiology of diabetic nephropathy is complex and involves numerous biochemical pathways that are related to each other, mainly by enhancing one another. A state of sustained hyperglycemia activates, among others, four renal damage pathways: (1) nuclear activation of growth factor synthesis, favoring mesangial cell proliferation phenomena [5], (2) dysfunction of renal hemodynamics, mainly activating vasoconstrictor factor synthesis pathways [6], (3) activation of inflammatory pathways, inducing the synthesis of chemotactic molecules, leukocyte and endothelial adhesion molecules, nuclear synthesis factors of various interleukins, etc. [7], (4) induction of biochemical pathways

