

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

Diferencias en el efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol en la diabetes mellitus experimental respecto a una situación de normoglucemia

Doctoranda: Beatriz Villanueva Torres

Directores:

Dr. José Antonio González Correa

Dr. José Pedro de la Cruz Cortés

Dr. José Julio Reyes de la Vega


MÁLAGA 2015





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Beatriz Villanueva Torres

 <http://orcid.org/0000-0002-0697-8267>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

<http://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





D. JOSE ANTONIO GONZALEZ CORREA, Doctor en Medicina y Cirugía,
D. JOSE PEDRO DE LA CRUZ CORTES, Doctor en Medicina y Cirugía y
D. JOSÉ JULIO REYES DE LA VEGA, Doctor por la Universidad de Málaga,
adscritos al Área de Farmacología del Departamento de Farmacología y
Pediatría de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN:

Que D^a. BEATRIZ VILLANUEVA TORRES ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral titulada **Diferencias en el efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol en la diabetes mellitus experimental respecto a una situación de normoglucemia**, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que la suscriben revisado su Tesis y estando conformes para ser juzgada.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en Málaga a cuatro de noviembre de dos mil quince.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología y Pediatría

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA







UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Según el pensamiento de Mulisch “Un comienzo no desaparece nunca, ni siquiera con un final” queda plasmado lo que hoy en día pienso y siento. Ha sido una de las mejores experiencias de mi vida tanto a nivel profesional como personal donde las anécdotas no han de faltar. Cuando pensaba que tenía casi todas las respuestas dentro de mi especialidad como profesora de enfermería entonces fue que surgieron muchas preguntas en el amplio mundo de la investigación. Quedé maravillada y enamorada más aún de la investigación.

Todo comenzó cuando al grupo de profesoras de enfermería fuimos orientadas sobre la posibilidad de realizar un grado doctoral con la Universidad de Málaga, España. Para mí fue un sueño lejano dada la circunstancia de que no llevaba tantos años como profesora a tiempo completo en la institución. Pero como decimos en mi tierra que Dios obra por caminos misteriosos y para mi sorpresa luego de llenar la solicitud con un grado de duda en ser seleccionada, me escogieron entre otras profesoras a su vez. Con solo ser aceptada ya era un sueño en planes de cumplirse. Luego de esto fue la entrevista con los representantes de la UMA y vino el ofrecimiento de mi vida, viajar a la universidad para realizar la investigación en el laboratorio LIAIT.

Son muchas las personas que tengo que agradecer por su enseñanza, apoyo, amistad y confiar en mí. En primer lugar a Dios por que fue una promesa cumplida.

Una mención muy especial al Dr. Carlos Padín Bibiloni, a la Dra. Lourdes Maldonado y a la Dra. Zaida Vega por depositar toda su confianza y respaldo durante el proceso. Estaré eternamente agradecida y sé que este grado doctoral será de gran provecho tanto para mí como para la universidad.

Una mención también especial a la Dra. María Teresa Labajos y al Dr. José Antonio González Correa por ofrecerme esta oportunidad, no tienen idea como transformaron mi vida profesional mirándola desde otro punto de vista de la investigación experimental. Les confieso que ese día cuando me hicieron el ofrecimiento no dudé ni por un segundo en aceptarlo y estaré eternamente agradecida por esta oportunidad única de trasladarme a otro continente. Gracias Dr. José Antonio

González por ser mi guía desde el inicio y no importando cuan ocupado estabas siempre atento a mi progreso.

Debo agradecer al Dr. José Pedro de la Cruz por su guía e interés de hacerme sentir como en casa desde que llegué y además por enseñarme tantas cosas de España. Estoy en deuda con usted. A ambos doctores mi más sincero agradecimiento por confiar en mí y acogerme a su laboratorio LIAIT, grupo de trabajo y estudiantes.

A la Dra. Ana Guerrero Loriguillo por su forma tan dulce y profesional de enseñar, los momentos que nos reímos juntas. Muy ameno trabajar con usted.

Al Dr. Juan Antonio López Villodres gracias por compartir tus conocimientos, por tu paciencia y por tu sentido del humor. Mi agradecimiento al Dr. José Julio Cruz por su guía, enseñanza y por su siempre disponibilidad. También al Sr. Antonio Pino Blanes por igual manera enseñar con tanta alegría y sentido del humor, a todos nos alegrabas el tiempo en el laboratorio.

Agradezco de igual manera al Dr. Jose Miguel Morales por brindarme la oportunidad también única de impartir una asignatura de enfermería en la Escuela de Ciencias de la Salud. Una experiencia inigualable. También al Profesor Daniel Lupión por su guía y amabilidad como profesor principal de la asignatura.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio, a Lydia, Elena, María, Rocío, Maribel, María Dolores, Lucía, todas ustedes me hicieron sentir también en casa y todo era más ameno. Nunca las olvidaré. Hasta los chicos del bar, Esteban y Jose que me recibían todas las mañanas con una sonrisa y un sentido del humor contagioso.

Finalmente agradezco a mis amados padres por su apoyo incondicional, el resto de mi familia y amigos pero sobre todo a mi amada y única hija que dejándola un tiempo atrás en mi país siempre me apoyó a través de la distancia.

En fin gracias a todo el equipo del laboratorio LIAIT de la UMA y a la Universidad Metropolitana por este grado obtenido.

***“Un comienzo no desaparece
nunca, ni siquiera con un final”***

Mulisch, Harry



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
<i>2. OBJETIVOS</i>	<i>35</i>
<i>3. METODOLOGÍA</i>	<i>37</i>
<i>4. RESULTADOS</i>	<i>55</i>
<i>5. DISCUSIÓN</i>	<i>93</i>
<i>6. CONCLUSIÓN</i>	<i>111</i>
<i>7. BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>113</i>



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. DIABETES MELLITUS

1.1 Definición y tipos

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015), la diabetes mellitas (DM) la diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos.

La clasificación de la diabetes mellitus propuesta por la OMS es la siguiente:

1.2 Diabetes tipo 1

La diabetes de tipo 1 (también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia). Se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Se desconoce aún la causa de la diabetes de tipo 1 y no se puede prevenir con el conocimiento actual.

Sus síntomas consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Estos síntomas pueden aparecer de forma súbita.

1.3 Diabetes tipo II

La diabetes de tipo 2 (también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta). Se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Este tipo representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero a menudo menos intensos. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse sólo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones. Hasta hace poco, este tipo de diabetes sólo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños.

1.4 Diabetes gestacional

La diabetes gestacional es un estado hiperglucémico que aparece o se detecta por vez primera durante el embarazo. Sus síntomas son similares a los de la diabetes de tipo 2, pero suele diagnosticarse mediante las pruebas prenatales, más que porque el paciente refiera síntomas.

1.5. Epidemiología

- En el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes.
- Se calcula que en 2014 fallecieron 3,4 millones de personas como consecuencias del exceso de azúcar en la sangre.
- Más del 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos y medios.
- La OMS prevé que las muertes por diabetes se multipliquen por dos entre 2005 y 2030.
- La dieta saludable, la actividad física regular, el mantenimiento de un peso corporal normal y la evitación del consumo de tabaco pueden prevenir la diabetes de tipo 2 o retrasar su aparición.

Por otro lado en el año 2015 la prevalencia estimada a nivel mundial (Sanidad, 2012), según la Federación Internacional de Diabetes (IDF), se situó en torno al 9%, que supone 366,3 millones de personas entre 20 y 79 años viviendo con la enfermedad. Las estimaciones para el año 2030 prevén un incremento en el número de afectados, que significaría que el 9,9 % de la población adulta mundial tendría diabetes (551 millones de personas). La prevalencia se distribuye desigualmente según las regiones y países del mundo, aunque conviene tener en cuenta las capacidades de los sistemas sanitarios y de los sistemas de información de los países a la hora de extraer conclusiones sobre los datos disponibles (Tabla 1). A nivel mundial la DM2 suma entre el 85 % y 95 % de los casos de diabetes en países industrializados. La DM1 sólo representa una pequeña parte de la carga total de enfermedad, aunque parece observarse un crecimiento en la incidencia. Se calcula que en torno a 78.000 niños y niñas menores de 15 años desarrollan la enfermedad cada año en todo el mundo.

Tabla 1. Prevalencia de DM según regiones del mundo en 2011

Región	Población Total en miles (20-79 años)	Población con DM en miles (20-79 años)	Prevalencia de Diabetes ajustada a Población Nacional	Prevalencia de Diabetes ajustada a Población Mundial
AFR	386.927	14.721	3,8 %	5 %
EUR	653.233	52.770	8,1 %	6,0 %
MENA	356.437	32.602	9,1 %	12,5 %
NAC	321.967	37.736	11,7 %	11,1 %
SACA	289.538	25.133	8,7 %	8,6 %
SEA	856.282	71.406	8,3 %	8,6 %
WP	1.544.462	131.896	8,5 %	10,1 %
Total	4.408.849	366.269	8,3 %	8,5 %

AFR: África, EUR: Europa, MENA: Medio Oriente y Norte de África, NAC: Norte América y Caribe, SACA: América Central y del Sur, SEA: Sudeste Asiático, WP: Pacífico Oeste. Fuente: Diabetes Atlas 5th Edition. 2011, IDF.

Tabla 2. La prevalencia aumenta con la edad. Los grupos más afectados son las personas mayores de 55 años.

Porcentaje de personas que declaran haber tenido DM diagnosticada por profesionales de la medicina alguna vez en su vida, según sexo y grupo de edad. España. Población mayor de 16 años.

Grupo de edad	Ambos sexos	Hombres	Mujeres
De 16 – 24	0,3	0,5	0,2
De 25 – 34	1,0	0,5	1,5
De 35 – 44	1,5	1,5	1,5
De 45 – 54	4,2	5,3	3,1
De 55 – 64	11,5	13,4	9,7
De 65 – 74	17,7	18,9	16,6
De 75 y más años	20,4	20,3	20,5
TOTAL	6,4	6,4	6,5

Fuente: Encuesta Europea de Salud en España 2009. IIS (MSSSI) e INE.

1.6. Mortalidad

Las estimaciones de la International Diabetes Federation (IDF) de mortalidad atribuible preveían 4,6 millones de defunciones a la diabetes en 2011 en población entre

20 y 79 años, el 8,2 % de la mortalidad por cualquier causa en personas de este grupo de edad. Sólo la región africana se sitúa por debajo del 10 % (Diabetes Atlas, 2013).

El número de muertes atribuibles a la diabetes en 2011 muestra un aumento del 13,3 % respecto a los cálculos para el año 2015. Este aumento podría explicarse por el incremento de la prevalencia de diabetes en algunos países densamente poblados en cada una de las regiones. Una de cada 10 muertes en adultos de la región Europea se puede atribuir a la diabetes, lo cual representa cerca de 600.000 personas en 2011.

1.7. Coste de la Diabetes

El impacto sanitario de esta enfermedad puede expresarse en términos de la carga económica que soportan las personas con diabetes y sus familias, de la pérdida de productividad y crecimiento económico como consecuencia de los días laborables perdidos, la restricción de la actividad, pérdida de productividad laboral, discapacidad y mortalidad consecuencia de la enfermedad y del valor monetario asociado con la discapacidad y mortalidad consecuencia directa de la diabetes o de sus complicaciones (Diabetes Atlas, 2013).

En la Región Europea, el impacto económico de la diabetes es también muy importante. En la UE el coste medio por paciente a causa de DM2 se estimó en torno a los 2.834 € /año de los que las hospitalizaciones supondrían la mitad del total, con una media de ingreso de 23 días al año⁷³. En países de la UE se estimó que en torno al 10 % del gasto en salud se destinó a prevenir y tratar la diabetes en 2010.

1.8. Complicaciones agudas y crónicas asociadas a la diabetes

Las complicaciones de la diabetes se clasifican en: **agudas**, en forma de hiperglucemia descontrolada o de hipoglucemia; y **crónicas** relacionadas con la hiperglucemia mantenida y las comorbilidades asociadas a la diabetes (obesidad, HTA, dislipemia, etc.), dando lugar a lesiones difusas en el vaso arterial de pequeño y gran tamaño respectivamente.

- **Las complicaciones agudas** de la diabetes incluyen: cetoacidosis, coma hiperosmolar no cetósico y la hipoglucemia.

- **Las complicaciones crónicas** de la diabetes en este grupo se encuentra la Enfermedad Cardiovascular (ECV) que incluye: cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, la enfermedad vascular cerebral (EVC) y la enfermedad vascular periférica (EVP).

1.8.1 Complicaciones macrovasculares

Los pacientes con DM2 se consideran pacientes con alto riesgo cardiovascular (RCV) tanto por la hiperglucemia como por las enfermedades asociadas que presentan, y estos pacientes tienen peor pronóstico ante eventos cardiovasculares, ya que con mayor frecuencia presentan enfermedad arterial de múltiples vasos con afectación difusa y extensa en cada arteria. La diabetes acentúa la gravedad de todas las fases de la aterosclerosis, tanto su génesis, como su desarrollo y sus complicaciones.

1.8.2. Complicaciones Microvasculares

Este grupo reúne la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía diabéticas. Su aparición viene influida en mayor medida por el grado de control glucémico de 60.

1.8.3. Consecuencias frecuentes de la diabetes

Con el tiempo, la diabetes puede dañar el corazón, los vasos sanguíneos, ojos, riñones y tejido nervioso.

- La diabetes aumenta el riesgo de cardiopatía y accidente vascular cerebral (AVC).
- Un 50% de los pacientes diabéticos mueren de enfermedad cardiovascular (principalmente cardiopatía y AVC).
- La neuropatía de los pies combinada con la reducción del flujo sanguíneo incrementan el riesgo de úlceras de los pies y, en última instancia, amputación.
- La retinopatía diabética es una causa importante de ceguera, y es la consecuencia del daño de los pequeños vasos sanguíneos de la retina que se va acumulando a lo largo del tiempo. Al cabo de 15 años con diabetes, aproximadamente un 2% de los pacientes se quedan ciegos, y un 10% sufren un deterioro grave de la visión.

- La diabetes se encuentra entre las principales causas de insuficiencia renal. Un 10 a 20% de los pacientes con diabetes mueren por esta causa.
- La neuropatía diabética se debe a lesión de los nervios a consecuencia de la diabetes, y puede llegar a afectar a un 50% de los pacientes. Aunque puede ocasionar problemas muy diversos, los síntomas frecuentes consisten en hormigueo, dolor, entumecimiento o debilidad en los pies y las manos.
- En los pacientes con diabetes el riesgo de muerte es al menos dos veces mayor que en las personas sin diabetes.

1.9. Fisiopatología de las complicaciones de diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia provocada por defectos de la insulina en su secreción, acción o ambas. La hiperglucemia crónica de la diabetes se acompaña de daño, disfunción e insuficiencia a largo plazo de diversos órganos, en especial ojos, nervios, corazón, piel y vasos sanguíneos.

Se caracteriza por niveles elevados de factor de Von Willebrand, disminución de la síntesis de prostaciclina y de inhibidores del activador de plasminógeno y disminución de la liberación de lipoproteína lipasa por las células endoteliales. Es muy probable que estos cambios conduzcan al desarrollo de la macroangiopatía diabética.

La diabetes mellitus, caracterizada por hiperglucemia se asocia con complicaciones micro y macro vasculares irreversibles que incluyen retinopatía, neuropatía, nefropatía, aterosclerosis y enfermedad cerebrovascular.

1.10. Diabetes mellitus y alteraciones vasculares

Las complicaciones vasculares de la diabetes constituyen la primera causa de morbi-mortalidad en estos pacientes (Mangiapane, 2012). En pacientes diabéticos, alteraciones con aterosclerosis, hipertensión o enfermedad coronaria son mucho más frecuentes que en el resto de la población y representan el principal factor de riesgo. La vasculopatía diabética se ha dividido habitualmente en microangiopatía y macroangiopatía. Las macroangiopatías afectan principalmente a los grandes vasos (coronarias, carótida, arterias de los miembros inferiores) produciendo grandes placas

de lípidos en las arterias y calcificación de la túnica media. En pacientes diabéticos estas complicaciones son la principal causa de isquemia, gangrena isquémica de miembros inferiores, infarto de miocardio e infarto cerebral. Sin embargo, la mayoría de las complicaciones vasculares ocurren en la microcirculación.

Los vasos afectados muestran cambios morfológicos como el engrosamiento de la membrana basal, lo que provoca una disminución del aporte de nutrientes a los tejidos y de la eliminación de los productos de desecho, lo que conduce a lesiones tisulares irreparables. La retinopatía y la nefropatía diabética son procesos característicos de microangiopatía. Al inicio de la enfermedad predominan las alteraciones funcionales que afectan al endotelio que recubre la luz vascular, lo que se conoce como disfunción endotelial.

La disfunción endotelial se define en general como una disminución de las respuestas vasodilatadores dependientes del endotelio y se considera el primer eslabón de la cadena de mecanismos fisiopatológicos que conducen a la vasculopatía diabética.

Estas alteraciones funcionales, que están estrechamente ligadas a la hiperglucemia o a fenómenos directamente relacionados con la misma, se pondrían de manifiesto con más facilidad en la microcirculación y serían potencialmente reversibles con el control de la glucemia (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995). En fases más avanzadas de la diabetes mellitus, la persistencia de estas alteraciones vasculares funcionales, junto con la aparición de otras manifestaciones de la enfermedad (especialmente las alteraciones del metabolismo lipídico y de las plaquetas) daría lugar a la aparición de fenómenos de remodelado vascular, con un engrosamiento de la capa media y un aumento en la rigidez de los vasos, así como al desarrollo de fenómenos inflamatorios de bajo grado y a la aparición de placas de ateroma en la capa íntima (Gärtner & Eigentler, 2008). Estas alteraciones estructurales son rápidamente irreversibles, se ponen de manifiesto fundamentalmente en los vasos de mayor diámetro y conducen al desarrollo de aterosclerosis y a la obstrucción de la luz vascular, lo que origina isquemia y/o infarto en los tejidos afectados.

1.11. Glucosa y disfunción endotelial

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por una agresión crónica al endotelio y asociada a un riesgo incrementado de enfermedad vascular prematura.

La disfunción endotelial juega un papel preponderante en la génesis de las complicaciones vasculares de la diabetes y precede a las evidencias anatómicas más tempranas de aterosclerosis. La etapa inicial de la misma involucra el reclutamiento de células inflamatorias y su migración a través del endotelio. Este proceso está regulado por moléculas de adhesión que se expresan en la superficie de leucocitos y células endoteliales (Ladeia et al., 2014).

Asimismo, estudios de reactividad vascular en aorta de rata, indican que la hiperglucemia daña la relajación dependiente de endotelio pero no a la vasodilatación independiente de endotelio (Paneni et al., 2013).

1.12. Diabetes y enfermedad vascular cerebral

La diabetes, al cursar como una hiperglucemia mantenida en el tiempo, activa, como ya se ha reflejado, las vías de daño en el endotelio, lo que resulta en un mayor deterioro de esta capa y de sus funciones, lo cual desemboca en que los pacientes aquejados de esta enfermedad tienen un mayor riesgo de sufrir complicaciones vasculares que otros pacientes no diabéticos. Entre las principales complicaciones de la diabetes a nivel vascular, se encuentra el accidente cerebro-vascular, que aparece como consecuencia a una isquemia producida por la obstrucción de las arterias que irrigan el territorio cerebral (Mellendijk et al., 2015).

2. ISQUEMIA-REPERFUSIÓN TISULAR

2.1. Fisiopatología del daño tisular por la isquemia- reperfusión

La isquemia cerebral se produce como consecuencia de una disminución del flujo sanguíneo hasta un nivel que condiciona alteraciones en la función del sistema nervioso. Por su falta de sistemas de almacenamiento de sustratos energéticos, el cerebro humano depende absolutamente del aporte continuado de sangre. Bastan 10 segundos de isquemia cerebral global para que un humano pierda la consciencia; después de 20

segundos cesa la actividad eléctrica, y al cabo de unos pocos minutos se manifiestan déficits neurológicos que pueden persistir durante toda la vida del individuo o incluso ocasionar la muerte. Este decremento del flujo sanguíneo es el resultado de la alteración del equilibrio de numerosos factores hemodinámicos y puede conducir a la aparición, en las neuronas y en la glía, de una serie de alteraciones metabólicas y bioquímicas que concluirán con la necrosis celular (Takano et al., 2009).

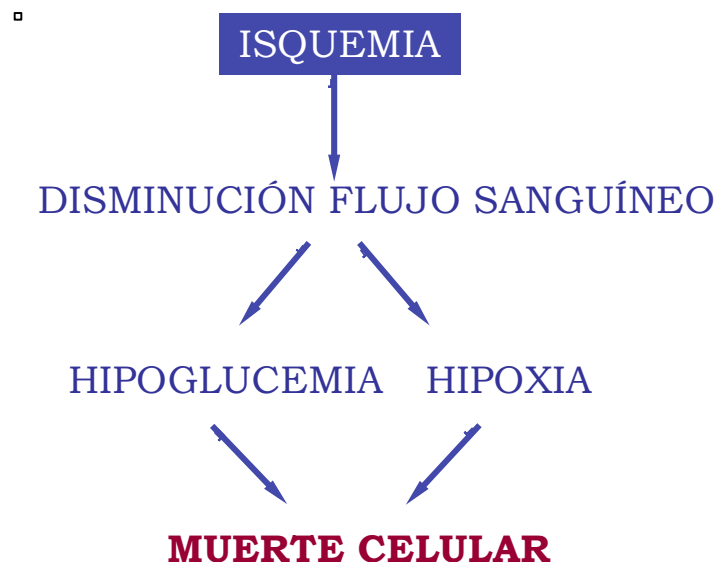


Figura 1.1. Esquema resumen del daño por isquemia

Entre los factores que pueden condicionar la aparición del infarto cerebral se encuentran:

- Hipoxia. Una disminución moderada de la presión parcial de oxígeno conlleva un ligero aumento del flujo cerebral, pero cifras inferiores a 40 mmHg originan confusión y por debajo de los 20 mmHg coma. La hipoxia aislada, sin la presencia simultánea de isquemia o acidosis, no es responsable de daño cerebral agudo. La persistencia de la hipoxia durante unos minutos, sobre todo si se asocia a shock o parada cardiorrespiratoria, produce un daño cerebral irreversible, con afectación preferente de la sustancia gris, de las zonas vasculares fronterizas y de los territorios arteriales más distales (George & Steinberg, 2015).
- Hipoglucemia. La presencia de hipoglucemia marcada produce alteraciones funcionales y estructurales del sistema nervioso central; concentraciones inferiores a 20

mg/dL de glucemia originan confusión, apareciendo el coma por debajo de los 10 mg/dL. Mientras el cerebro consume los escasos depósitos de glucosa y glucógeno, la situación es reversible, sin secuelas neurológicas. Al cabo de algún tiempo, el cerebro comienza a metabolizar otras sustancias y aparecen lesiones estructurales que consisten en una necrosis neuronal cortical selectiva, con preservación del tejido glial. Esta situación se acompaña de una disminución del consumo de oxígeno por el cerebro.

- Alteraciones del flujo sanguíneo cerebral. El flujo sanguíneo cerebral es una variable del gradiente de presión de la perfusión sanguínea y de la resistencia vascular. Esta variable puede afectarse de forma compleja durante el desarrollo de la isquemia cerebral, la cual, a su vez, también dependerá del estado y desarrollo individual de la circulación colateral, así como de la reactividad del tejido cerebral circundante (Spielvogel et al., 2013).

En situaciones fisiológicas, la regulación del flujo cerebral es independiente de variaciones amplias de presión de perfusión gracias a un mecanismo de autorregulación de circulación cerebral, en el que intervienen factores miogénicos, bioquímicos, neurogénicos y peptidérgicos. En situaciones de isquemia se produce una alteración en los mecanismos de autorregulación y de regulación funcional del flujo cerebral. El mecanismo de autorregulación desaparece del territorio isquémico y la presión de perfusión se hace dependiente de la tensión arterial. Esta dependencia se hace más intensa con la disminución que con el aumento de la tensión arterial debido a que en el tejido isquémico, la presión de perfusión está por debajo del límite inferior de la capacidad autorreguladora del lecho vascular, y por esta razón los vasos están dilatados al máximo; una disminución de la presión arterial no puede, en este caso, compensarse con una mayor reducción de la resistencia vascular (George & Steinberg, 2015).

La regulación funcional del flujo cerebral también está alterada durante el infarto cerebral y se produce una abolición de la reactividad al anhídrico carbónico en el centro del territorio afectado. En ocasiones, se llega a generar una disminución del flujo al aumentar la concentración de anhídrico carbónico por un fenómeno de “robo intracerebral” originado por la vasodilatación de las arterias normales como respuesta a la hipercapnia, que roba sangre del tejido isquémico donde los vasos ya están dilatados al máximo (George & Steinberg, 2015). La hiperventilación origina vasoconstricción en el tejido sano, con disminución de la presión intracraneal; ambos factores conducen a un

aumento del flujo sanguíneo en el territorio isquémico, conocido con el nombre de “fenómeno de robo invertido”. El área con abolición del mecanismo de autorregulación en la isquemia cerebral focal es mayor que la zona de arreatividad del anhídrido carbónico; ello origina en la periferia del infarto un desequilibrio entre el control hemodinámico y metabólico responsable de la “circulación de lujo” o perfusión superflua. En la circulación de lujo existe un flujo cerebral aumentado por encima de los requerimientos tisulares de oxígeno, lo que conduce a una extracción de oxígeno reducida y a la aparición de una red de sangre venosa (George & Steinberg, 2015).

Las alteraciones del flujo cerebral después del infarto persisten en algunos pacientes durante varias semanas e incluso meses; este hecho contribuye al fenómeno de hipoperfusión post-isquémica responsable de la afectación neuronal secundaria a la isquemia global, o a la progresión del infarto (Lapi & Colantuoni, 2015).

Aunque la isquemia afecta predominantemente a la sustancia gris, hasta un 20% de los infartos cerebrales tienen lugar en la sustancia blanca, como resultado de la oclusión de las pequeñas arterias penetrantes que irrigan las áreas más profundas de los hemisferios cerebrales (Rosenzweig & Carmichael, 2015).

La fisiopatología de la isquemia cerebral es diferente en la sustancia gris y en la sustancia blanca del cerebro, dado que ésta no contiene cuerpos neuronales ni sinapsis, pero sí axones mielinizados con una compleja estructura especializada (Rosenzweig & Carmichael, 2015).

La isquemia persistente produce alteraciones bioquímicas y morfológicas que inicialmente son reversibles, pero se transforman en irreversibles al cabo de un tiempo variable, según el tipo de célula. Pero no todas las células responden por igual al insulto isquémico y existe una vulnerabilidad selectiva en razón de la densidad neuronal, de la diferente perfusión regional y distinto metabolismo. Las neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo (en especial las de CA1), núcleo amigdalino y cerebelo son más sensibles a la isquemia y sufren cambios estructurales más precozmente que las neuronas de otras localizaciones y que las células gliales (Castillo & Rodríguez., 2004).

Inicialmente, el efecto lesivo de la isquemia a nivel celular resulta del fracaso en la producción de energía, que condiciona la pérdida de la homeostasis iónica y del potencial de membrana. Posteriormente, esto desencadena una cascada de reacciones

responsables de la progresión del daño, que se potencian si no ocurre la reperfusión de manera precoz. Los principales mediadores de estas reacciones son:

- 1.) Acidosis
- 2.) Sobrecarga citosólica de calcio
- 3.) Exceso de radicales libres

El desarrollo de una reacción inflamatoria y el daño secundario de la microcirculación contribuyen a perpetuar el proceso.

2.2. Bioquímica de la Isquemia Cerebral

La disminución del flujo sanguíneo cerebral por debajo de 55-60 mL/100 g de tejido/min, origina una rápida depleción energética, altera la función cerebral y desencadena una compleja cascada de alteraciones bioquímicas que condicionan la muerte celular (Deseano-Estudillo et al., 2003).

Estas alteraciones bioquímicas dependen fundamentalmente de dos mecanismos: desarrollo de acidosis y entrada de calcio iónico en la célula.

El aumento de calcio intracelular activa fosfolipasas, proteasas, sintetasas del oxido nítrico y la expresión de varios genes de respuesta inmediata.

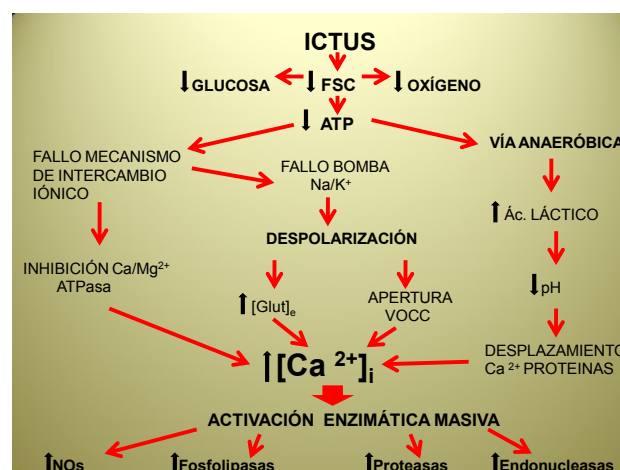


Figura 1.2. Cascada de acontecimientos tras la instauración de ictus-isquemia. (FSC: flujo sanguíneo cerebral. Glut: glutamato. VOCC: canales de calcio voltaje-dependientes. NOs: sintetasas de óxido nítrico).

El cerebro obtiene su energía de la oxidación de la glucosa, utilizando vías metabólicas comunes al resto del organismo. No obstante, para el cerebro la glucosa es el único sustrato metabólico. Incluso en situaciones de ausencia de aporte de glucosa, sus niveles se mantienen a través de un proceso de neoglucogénesis (convirtiendo aminoácidos en glucosa) y por la inhibición del consumo de glucosa en otros órganos.

Más de la mitad de la energía consumida por el cerebro es usada en el aporte iónico a través de las membranas celulares. Las bombas iónicas de membrana generan gradientes iónicos que son utilizados por las células como indicadores químicos y eléctricos.

El efecto lesivo de la isquemia cerebral acontece como resultado de la perturbación del metabolismo energético celular. La alteración funcional resultante se traduce principalmente en:

- Pérdida de la capacidad de los canales de membrana dependientes de ATP para mantener la homeostasis iónica, originando salida de K^+ con el consiguiente aumento citosólico de Na^+ y de agua, así como Ca^{++} . Se traduce en imposibilidad para mantener el potencial de membrana y la actividad eléctrica neuronal normal; cuando persiste, desemboca en la muerte celular (White et al., 2000).
- Abolición de los mecanismos de síntesis y reparación de macromoléculas esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de la célula.
- Aumento de los procesos de degradación.

Estos sucesos afectan tanto a neuronas como a células gliales o de la pared vascular, especialmente a células endoteliales teniendo como resultado la pérdida de sus funciones. Sin embargo, no todas las células del sistema nervioso central presentan la misma vulnerabilidad frente a la isquemia, siendo las neuronas más sensibles que las células gliales, por lo que el desarrollo de muerte celular e infarto puede tardar horas (Robbins et al., 2000).

En la pared arterial se traduce en ruptura de la barrera hematoencefálica y en abolición de la reactividad vascular normal y, por lo tanto, de la capacidad de

regulación de la circulación cerebral por cualquiera de sus mecanismos: físico-mecánico, metabólico humorales y neurógenos.

Esta alteración, aunque se produce con máxima expresión en el foco de infarto, también tiene lugar en el área de penumbra, siendo posible reducir el daño producido por la isquemia en esta zona mediante intervención terapéutica específica sobre los trastornos fisiopatológicos concretos.

2.3. Alteraciones primarias de la isquemia

El efecto final común de los tres mecanismos mediadores del daño por isquemia sería la destrucción de componentes funcionales y estructurales de la célula y el daño secundario a la microcirculación, que por diferentes mecanismos, (edema y lesión endotelial, formación de agregados celulares, alteración de la reactividad y permeabilidad vascular) ocasiona el denominado “fenómeno de no-reflujo”, cerrando el círculo y perpetuando el proceso.

Es lógico suponer que el restablecimiento del flujo cerebral debe ser uno de los pasos fundamentales a seguir en el tratamiento de la isquemia cerebral. No obstante, se ha comprobado que esta maniobra de forma aislada sólo es capaz de evitar la progresión del infarto cuando tiene lugar muy precozmente (antes de la primera hora) (Arnold, 2005), pues de no ser así, la cascada de mediadores del daño isquémico no sólo resulta imparable, sino que además se ve potenciada en la fase de reperfusión. De este modo, la reperfusión de tejidos sometidos a isquemia es responsable de efectos lesivos que se añaden al daño isquémico primario y que deben ser considerados para intentar evitar de manera total la extensión del infarto. Igual que para el daño por isquemia, el daño por reperfusión depende del tiempo que se haya mantenido la reducción del flujo sanguíneo cerebral.

2.4. Mecanismos de daño celular en la reperfusión

En la producción del daño por reperfusión participan diversos mecanismos:

- La reperfusión favorece el aporte y la diseminación de metabolitos producidos durante la isquemia como H^+ , agentes con acción vasoactiva, sustancias osmóticas y agua, induciendo la formación de edema.

- Aumento en la producción de radicales libres consecuencia de la normalización del aporte de oxígeno. La hiperoxia sobre moléculas reducidas durante la isquemia favorece la oxidación de las mismas y la formación de radicales de oxígeno.

- Durante la reperfusión aumenta la producción de óxido nítrico (NO), pues la NO sintasa (NOS) requiere oxígeno para mantener su acción oxidante. Por otra parte la producción de radicales libres a partir de NO es más importante durante la reperfusión, ya que aumenta la producción de ión superóxido.

- Las sustancias quimiotácticas acumuladas durante la isquemia pueden actuar sobre las células inflamatorias aportadas por el flujo sanguíneo durante la reperfusión.

Los leucocitos activados por estas sustancias se adhieren al endotelio vascular, forman agregados que dificultan el flujo sanguíneo normal (fenómeno de no-reflujo) y liberan de sus lisosomas radicales libres, fundamentalmente H_2O_2 y O_2^- , así como proteasas y lipasas que lesionan no sólo células parenquimatosas, sino también endoteliales, con lo que se trastorna la microcirculación y se perpetúa el daño.

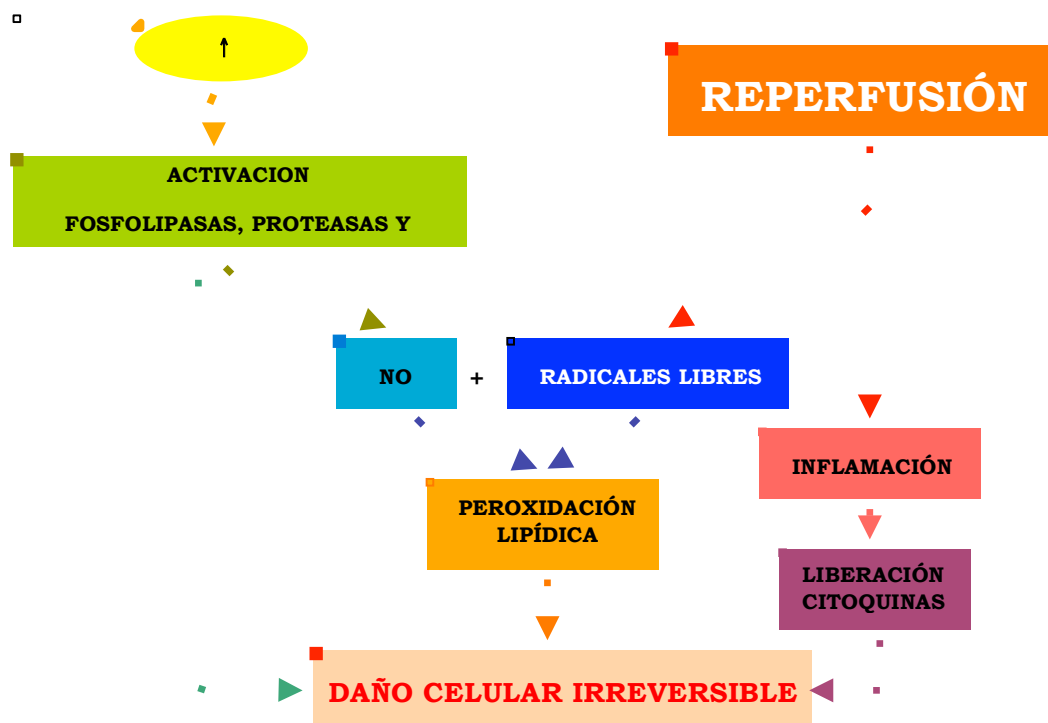


Figura 1.3. Daño celular por isquemia y reperfusión

En resumen, durante la reperfusión se agravan o se facilitan los fenómenos desencadenados por la isquemia, por lo que se habla de daño por isquemia-reperfusión.

2.5. Consecuencias a nivel celular de la isquemia-reperfusión

El infarto cerebral conduce básicamente a dos procesos fisiopatológicos:

- 1- La pérdida de la provisión de oxígeno secundaria a la oclusión vascular.
- 2- Una distribución de cambios en el metabolismo celular consecuentes al colapso de los procesos productores de energía, con desintegración de las membranas celulares.

Algunos de los procesos celulares que culminan en la muerte celular se pueden corregir mediante intervención oportuna, ya sea mediante el restablecimiento del flujo de sangre o al prevenir la entrada de calcio en la célula.

El cerebro es dependiente de un continuo aporte de glucosa y O₂ a través de un adecuado flujo sanguíneo cerebral; del metabolismo de la glucosa se obtiene la energía celular, habitualmente almacenada en forma de ATP. Dado que las reservas energéticas del tejido nervioso son escasas, la interrupción o una importante disminución del flujo sanguíneo cerebral, originan una rápida depleción energética y altera la función cerebral. Además, el fallo energético desencadena una compleja cascada de alteraciones bioquímicas que condicionan la muerte celular.

Desde un punto de vista anatómico-patológico, el área isquémica reconoce tres zonas diferenciadas (Milidonis et al., 2015):

- 1- Zona central de infarto. Es una región de daño irreversible tisular que se produce cuando el flujo sanguíneo es inferior a 10 mL/100g/min. En la actualidad, la orientación terapéutica en los pacientes con isquemia cerebral se centra en procurar limitar la extensión de esta área de infarto. En esta zona se produce una muerte celular aguda, principalmente por necrosis.
- 2- Zona intermedia de isquemia parcial, sin destrucción celular, en ella hay una inactivación sináptica de las neuronas; la supervivencia de ésta zona depende de

la circulación colateral. Se produce cuando el flujo es inferior a 20 mL/100g/min.

3- Zona periférica de hiperemia compensadora.

Alrededor de la zona de necrosis se define la zona denominada de “penumbra isquémica” (Scalzo et al., 2015). Estos autores definieron la penumbra isquémica como una región con flujo sanguíneo cerebral disminuido, con ausencia de potenciales eléctricos espontáneos o inducidos y que mantiene aún la homeostasis iónica y los potenciales eléctricos de membrana. Esta definición más bien reducida se ha ampliado con el tiempo, de manera que hay dos definiciones más recientes, una de ellas describe a la zona de penumbra como “una región de flujo sanguíneo disminuido en la cual se encuentra preservado el metabolismo energético” (Scalzo et al., 2015). La viabilidad de las células en la zona de penumbra tiene un tiempo limitado ya que la disminución de las reservas de oxígeno y glucosa desencadena diversos procesos patológicos que pueden conducir a la muerte celular (Hossmann, 2006). Esta zona de penumbra puede evolucionar hacia necrosis definitiva o hacia la recuperación. La viabilidad de esta zona está en relación inversa con la intensidad de reducción del flujo sanguíneo y por tanto con la severidad de la isquemia “umbral de flujo”, así como con la duración de la misma (Sun et al., 2010). De ser sobrepasado este umbral, siempre dependiendo del tiempo que se mantenga la reducción del flujo se producirá extensión de la zona de infarto a expensas de muerte celular en el área de penumbra. Los valores de flujo entre estos umbrales límite, condicionados por el factor tiempo, caracterizan la lesión funcional, aún reversible, propia de las células en el área de penumbra isquémica. A esto hay que añadir la vulnerabilidad selectiva de los diversos grupos celulares del SNC ante la isquemia. El desajuste entre la demanda metabólica y el reducido aporte energético confiere a estos tejidos una especial sensibilidad.

La reperusión precoz del tejido isquémico es fundamental para restaurar la función alterada, pero al mismo tiempo puede tener un efecto negativo al acentuar la destrucción de las células isquémicas aún no destruidas, es decir, las células de la zona de penumbra.

La extensión de la lesión isquémica, por tanto, puede continuar después que la circulación sanguínea haya sido restaurada. Esta lesión retardada o aplazada se llama también lesión secundaria por reperfusión.

El periodo de tiempo durante el cual persiste la penumbra, representa una “ventana potencial de oportunidad terapéutica” (Scalzo et al., 2015), sobrepasada la cual, cualquier medida para evitar la extensión del infarto resultará inútil. De manera que la zona de penumbra constituye el blanco principal para la mayoría de las intervenciones médicas agudas aplicadas entre las 3 y 6 horas post-ictal (Kwakkel et al., 2004), aunque existen estudios donde sugieren que la ventana terapéutica puede ser mayor de 6 horas.

2.6. Mediadores fundamentales del daño celular en la isquemia-reperfusión

Son muchos los mediadores implicados en las vías bioquímicas que modulan el daño celular en la isquemia-reperfusión cerebral, pero podemos asegurar que los siguientes constituyen posiblemente el eje central de las alteraciones observadas en este proceso.

En líneas generales, la privación absoluta de oxígeno y glucosa al tejido neuronal activa una serie de cascadas patológicas que conllevan a la extensión de la muerte neuronal. Entre estas vías con un papel crítico en el daño isquémico, especialmente en la zona de penumbra, están la sobreactivación de receptores de glutamato, la acumulación intracelular de iones calcio, el reclutamiento de células inflamatorias, el aumento de la producción de radicales libres que afectan a distintas estructuras y procesos patológicos de apoptosis (Taoufik & Probert, 2008).

En la siguiente figura podemos observar un esquema de estas vías y a continuación se desarrollaran con más detalle.

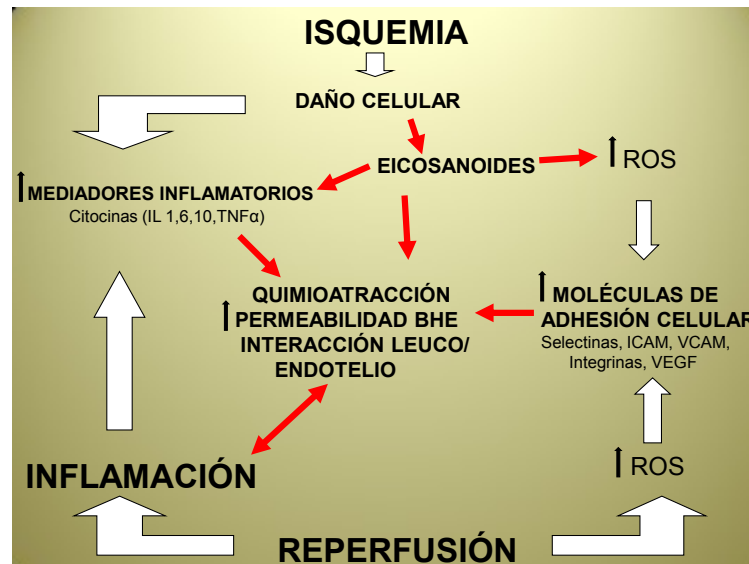


Figura 1.5. Esquema de eventos en isquemia/reperfusión

2.6.1 Acidosis intracelular

La disminución del aporte de oxígeno condiciona el metabolismo energético celular anaerobio de la glucosa y consecuentemente un aumento de H^+ (en relación directa con los niveles previos de glucemia), a la vez que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa origina un descenso en la producción de ATP (McKenna et al., 2015) y otros nucleótidos energéticos.

Se ha observado que en situaciones de hiperglucemia el daño cerebral consecuente a la isquemia es mayor y de evolución más rápida debido a la mayor severidad de la acidosis, consecuencia de la hiperproducción de ácido láctico por el metabolismo anaerobio de la glucosa. Otros estudios sin embargo, han podido demostrar un cierto efecto protector de la acidosis, siempre que sea moderada, al prevenir el exceso de flujo de calcio por cualquiera de sus vías, especialmente por inhibición de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato. En el caso de que la acidosis sea suficientemente severa puede agravar la lesión isquémica por varios mecanismos:

1. Aumentando el edema intracelular: Un aumento de H^+ puede ser intercambiado por Na^+ extracelular, induciendo así, en un intento de regular el contenido en H^+ , la entrada de Na^+ con H_2O osmóticamente obligada.

2. Inhibiendo la fosforilación oxidativa.

3. Alterando la microcirculación, a través del daño a la célula endotelial por los mecanismos anteriormente mencionados y por inducción de vasodilatación.

4. Incrementa el acúmulo intracelular de calcio al desplazarlo de su unión a proteínas intracelulares.

2.6.2. Acúmulo intracelular de calcio

Aunque el ión calcio es fundamental para gran cantidad de reacciones intracelulares, un aumento de sus niveles por encima de lo normal puede tener consecuencias nefastas.

En situaciones fisiológicas la concentración de Ca^{++} intracelular es muy baja respecto a la concentración de calcio extracelular, que es cuatro veces mayor. Las neuronas al igual que otras células contienen calcio fundamentalmente en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias. La entrada de calcio en las mitocondrias y su salida del retículo endoplásmico está controlada en parte por los receptores metabotrópicos de membrana mientras que la salida de calcio de las mitocondrias es un proceso energía-dependiente. Para mantener este gradiente a través de la membrana celular existe un movimiento de calcio (Schafer et al., 2014) a través de un complicado mecanismo.

Parece que los fenómenos iniciales desencadenados por la isquemia a nivel celular, además de la acidosis, sería la salida de K^+ al espacio extracelular, originando una despolarización incipiente, responsable de una corriente inicial de entrada de calcio, y el progresivo aumento de calcio citosólico como consecuencia de la liberación desde depósitos intracelulares.

El aumento de Ca^{++} unido a la despolarización inicial condicionaría una cascada de reacciones cuyo efecto sería amplificar estos trastornos para perpetuar el proceso de lesión isquémica:

1. El proceso isquémico junto al aumento de Ca^{++} citosólico favorece la permeabilidad de la membrana a los iones y esto contribuye al consumo de ATP en un intento de mantener la homeostasis. Cuando éste se agota, el fallo de la bomba favorece más el aumento de permeabilidad para alterar la homeostasis iónica y mantener la

despolarización de membrana. Por otra parte, en situaciones de sobrecarga citosólica de calcio, las mitocondrias derivan la producción de energía a la recaptación del mismo con el consiguiente descenso en la producción de ATP.

2. En la terminal presináptica, la despolarización ocasionada por la pérdida de la homeostasis permite la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje y el aumento de calcio citosólico induce la liberación de aminoácidos excitatorios como el glutamato, que además se ve favorecido a través de la inversión de su mecanismo de recaptación, que se lleva a cabo, en condiciones normales, en intercambio con Na^+ . Esta inversión tiene lugar como consecuencia de la despolarización y la pérdida del gradiente de Na^+ .

3. En la neurona postsináptica, el glutamato activa los receptores ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) (desinhibido por la despolarización de membrana) y kainato, aumentando aún más la entrada de calcio y facilitando la corriente iónica a favor del gradiente (Matute, 2011).

4. Todos estos fenómenos desembocarían en un aumento masivo de calcio citosólico por los siguientes mecanismos:

a) En función de la inversión del transporte acoplado a Na^+ , debido a la pérdida del gradiente del mismo.

b) Apertura de canales voltaje dependientes en la célula despolarizada.

c) Efecto de la acidosis creciente, que lo desplaza de su unión a proteínas.

d) Entrada a través del receptor NMDA.

e) Como consecuencia de la activación de fosfolipasa C (a través de glutamato), que mediante la producción de fosfatidil inositol favorecería la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico.

5. Además de glutamato, se liberan otros aminoácidos (GABA y glicina) y aminas biógenas (dopamina, noradrenalina, serotonina). Las aminas biógenas, concretamente la noradrenalina y la serotonina, tienen acción vasoconstrictora sobre las arterias cerebrales y contribuyen, al liberarse en cantidad excesiva, a favorecer el desarrollo de

hipoperfusión secundaria en el área de penumbra. Por otra parte, actúan como inductores de agregación plaquetaria y promueven la formación de agregados intravasculares que dificultan aún más el flujo sanguíneo. Finalmente, aumentan la demanda metabólica neuronal.

Clásicamente se ha considerado que la muerte celular producida por isquemia es necrosis. Estudios más recientes (Castillo & Rodríguez, 2004), han sugerido rasgos apoptóticos en la muerte neuronal secundaria a isquemia cerebral, es decir, en la zona de penumbra.

- La necrosis es el tipo más común de muerte celular tras estímulos exógenos y se produce por agresiones como la isquemia y la lesión química. Se caracteriza por una pérdida de la integridad de la membrana plasmática y manteniéndose la nuclear. Se manifiesta por hinchazón celular intensa o fragmentación celular, desnaturalización y coagulación de las proteínas citoplasmáticas, y fragmentación de las organelas celulares. La fragmentación del ADN es un evento tardío que sucede de manera desorganizada.
- La apoptosis se produce cuando una célula muere tras la activación de un programa intenso de suicidio. Es un fenómeno activo que precisa la síntesis de proteínas encargadas de llevar a término la muerte celular. Por este motivo, la apoptosis se considera una forma de muerte programada. Representa una desestructuración sutilmente orquestada de los componentes celulares cuya función es la eliminación normal de poblaciones celulares no deseadas. Sin embargo, también se produce en condiciones patológicas, en las que se acompaña en ocasiones, de necrosis. Con el término de apoptosis se distingue una forma de muerte celular caracterizada morfológicamente por la condensación temprana y extrema de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos, y bioquímicamente por la actuación temprana de endonucleasas que produce una fragmentación internucleosomal del ADN. Este proceso tiene lugar principalmente en la zona de penumbra isquémica, donde aún se mantiene la integridad celular y existe energía disponible.

2.6.3. Acúmulo de prostaglandinas

Durante la isquemia cerebral ocurre un aumento severo de la concentración citoplasmática de calcio, que constituye un estímulo no fisiológico para la puesta en marcha de una serie de reacciones enzimáticas que, fuera de control, son altamente

nocivas: proteasas que destruyen proteínas del citoesqueleto, endonucleasas que atacan ácidos nucleicos, proteinquinas que produciendo su fosforilación alteran la función de receptores y canales iónicos, y finalmente fosfolipasas, cuya activación tiene importantes consecuencias, además de producir la lesión estructural de membrana.

La activación de las fosfolipasas A₂ y C, a través de su acción sobre fosfolípidos de membrana, conduce a la formación de ácido araquidónico (Burch et al., 1987) que, por vía de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, da lugar a la formación de eicosanoides; éstos están implicados en la regulación de muchos procesos fisiológicos y se encuentran entre los mediadores y los moduladores de la reacción inflamatoria más importante.

Los eicosanoides principales son las prostaglandinas, los prostanoides (prostaciclina y tromboxano), leucotrienos y lipoxinas. El ácido araquidónico libre se metaboliza por medio de diversas vías, mediante la ciclooxigenasa (isoformas 1 y 2) de ácidos grasos que inician la biosíntesis de las prostaglandinas y de los prostanoides y por diversas lipooxigenasas que inician la síntesis de los leucotrienos y las lipoxinas.

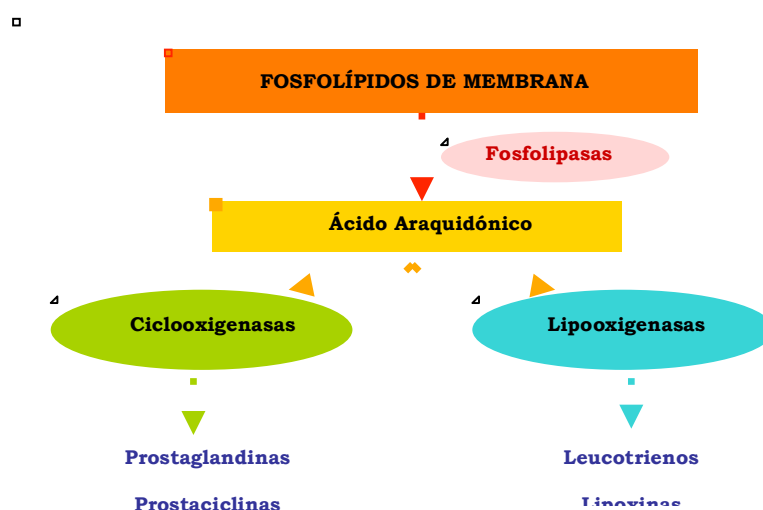


Figura 1.6. Esquema de la vía del ácido araquidónico.

Durante la isquemia cerebral, la expresión y la actividad de las fosfolipasas y sus eicosanoides está aumentada, por lo que se inicia una cadena de eventos que es responsable del desarrollo del daño neuronal. Esto sugiere que las estrategias terapéuticas encaminadas a inhibir fosfolipasas, ciclooxigenasas y lipooxigenasas,

reduciría la morbilidad subsecuente al daño producido por isquemia (Phillis et al., 2003).

2.6.4. Óxido nítrico

Existe evidencia de que el aumento de calcio citosólico conduce a la estimulación de la sintasa de óxido nítrico (NOS), un enzima dependiente de calmodulina, con el consiguiente acumulo de óxido nítrico (NO) (Steinert et al., 2010). El NO, que en condiciones normales es un mediador fisiológico de vasodilatación, así como inhibidor de la agregación plaquetaria y citoprotector, aunque resulta muy tóxico cuando existe en grandes cantidades, pues conduce a la formación de radicales libres muy reactivos (Steinert et al., 2010), como los peroxinitritos.

En resumen en los procesos de isquemia-reoxigenación cerebral se dan los siguientes fenómenos:

- Un aumento de la actividad y expresión de la eNOS (isoforma constitutiva endotelial) a los pocos minutos de producirse la hipoxia, en un intento urgente de regular por medio de una vasodilatación el flujo sanguíneo cerebral.
- Un aumento de la actividad y expresión de la nNOS (isoforma constitutiva neuronal) que produciría un incremento de NO, contribuyendo a medio plazo al daño isquémico en el cerebro.
- Un aumento de la actividad y expresión de la iNOS (isoforma inducible), que tiene lugar después de varias horas de iniciarse el estímulo hipóxico, con la producción de niveles incontrolados de NO, contribuyendo de manera decidida al progreso de la neuropatología.

Los efectos tóxicos del NO están relacionados con una serie de mecanismos entre los que destaca la producción de peroxinitritos (ONOO^-), radical que se genera mediante la reacción del NO con el anión superóxido, reacción favorecida por las altas concentraciones de NO que en estas condiciones reacciona más rápidamente con el anión, que éste con su enzima detoxificadora. El ONOO^- es el responsable de los efectos deletéreos del NO sobre las principales moléculas (peroxidación lipídica, daño a proteínas por nitración de tirosinas y daño al ADN) e induce la liberación de

neurotransmisores excitatorios. El NO también produce la inhibición de enzimas tan fundamentales como la glutatión peroxidasa y la citocromo c oxidasa mitocondrial y, al igual que los peroxinitritos, contribuye al daño por excitotoxicidad al liberar neurotransmisores como el glutamato (Steinert et al., 2010).

2.6.5. Mediadores inflamatorios

Por otro lado, el aumento de la concentración intracelular de Ca^{++} también desencadena la puesta en marcha de la denominada cascada inflamatoria de la isquemia cerebral, que se inicia con la expresión local de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α) y la interleucina (IL-1 β), que a su vez estimulan la liberación de otras citocinas (IL-6 e IL-8), así como de factores quimiotácticos y de moléculas de adhesión leucocitarias como las selectinas (P-selectina, E-selectina y L-selectina), la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1 y la molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial (PECAM) (Sama & Norris, 2013). La liberación de estas moléculas promueven el reclutamiento y la migración de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) hacia la zona isquémica. Aunque los datos en humanos son escasos, mediante técnicas de marcaje isotópico de leucocitos se ha demostrado un elevado número de estas células en zonas cerebrales hipoperfundidas, entre 6-12 horas después del episodio ictal (Akopov et al., 1996). Durante mucho tiempo se creyó que los leucocitos ejercían una función de limpieza del tejido necrótico infartado en fases tardías de la isquemia cerebral, sin embargo, en el momento actual se considera que desempeñan un papel fundamental en la lesión neuronal secundaria a la isquemia y en la posible extensión del área de infarto. De hecho, en modelos experimentales de isquemia cerebral se ha demostrado que los LPMN se encuentran ya en los microvasos cerebrales a los 30 minutos de evolución de la isquemia (Jickling et al., 2015). Este dato también ha sido comprobado después de la oclusión de arteria cerebral media (MCAO). La migración es mediada por 3 clases de moléculas de adherencia celular : selectinas, integrinas, y la inmunoglobulina, muestra de una regulación tanto intracelular como por citoquinas (Huang et al., 2006). El reclutamiento de neutrófilos en el cerebro isquémico comienza con el deslizamiento del mismo sobre células endoteliales de la pared vascular, mediado por selectinas, seguido de la activación y adhesión del mismo, mediada por integrinas e inmunoglobinas. Cuando están adheridos a las paredes del vaso sanguíneo, los

neutrófilos emigran al parénquima cerebral, en un proceso facilitado por la interrupción de barrera hematoencefálica (BHE). (Huang et al., 2006)

Existen diferentes mecanismos a través de los cuales los LPMN pueden ejercer su efecto deletéreo en la isquemia cerebral. En primer lugar, los LPMN pueden obstruir la microvasculatura cerebral originando lo que se conoce como fenómeno de no reflujo o imposibilidad para la recuperación completa del flujo sanguíneo cerebral en el área isquémica tras la recanalización del trombo fibrinoplaquetar que se produciría fundamentalmente como consecuencia de la interacción de los LPMN con las células endoteliales mediada por moléculas de adhesión leucocitaria. Por otro lado, los leucocitos pueden estimular la liberación de sustancias vasoconstrictoras con alteración secundaria de la vasoreactividad cerebral, así como de enzimas proteolíticas citotóxicas que pueden dañar el endotelio vascular facilitando el paso de agua y eritrocitos, lo que puede contribuir a la aparición de edema cerebral y transformación hemorrágica del infarto cerebral, respectivamente (Jickling et al., 2015).

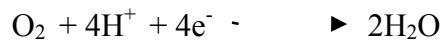
2.6.6. Radicales libres derivados del oxígeno (RLO)

En términos generales, un radical libre es un átomo o molécula que en su orbital más externo posee uno o más electrones desapareados, situación energéticamente inestable, por lo que tiende rápidamente a reaccionar con otro átomo o molécula a fin de aparear su electrón y alcanzar la estabilidad.

Bajo este concepto, cualquier molécula puede ser un radical libre; no obstante, cuanto más pequeña sea, más capacidad de formación de radicales libres posee, y en este sentido es el oxígeno quien con mayor frecuencia e importancia biológica lo realiza, de ahí que el término más comúnmente utilizado sea el de radicales libres derivados del oxígeno.

En comparación con otros órganos, el cerebro parece particularmente vulnerable al estrés oxidativo por diferentes motivos: 1-aún constituyendo un 2% del peso corporal, las células del cerebro humano utilizan un 20% del oxígeno consumido por el organismo completo; esto indica que el cerebro genera muchos más radicales libres y ROS que otros órganos; 2-varias regiones cerebrales contienen altas concentraciones de hierro, con lo que se cataliza la generación de radicales libres; 3-el cerebro es rico en

lípidos con ácidos grasos insaturados, los cuales constituyen diana para la peroxidación lipídica; 4-en comparación con otros órganos, como el riñón o el hígado, el cerebro posee una capacidad antioxidante protectora más bien baja o moderada. (Granger & Kvietyts, 2015) En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno molecular (95%) hasta agua, sin formación de intermediarios tóxicos, mediante la vía de la reducción tetravalente:



Sin embargo un pequeño porcentaje (5%), también puede reducirse por el aporte de un menor número de electrones, quedando su orbital externo con un electrón desapareado y por tanto formando un radical libre. Así, si se reduce por el aporte de un solo electrón, se forma el denominado radical perhidroxilo (HO_2^\cdot),



Que se ioniza rápidamente formando el anión superóxido (O_2^-),



El cual se dismuta rápidamente a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en peróxido de hidrógeno (Valko et al., 2015):



El anión superóxido junto al peróxido de hidrógeno y un electrón daría lugar al radical hidroxilo (OH^\cdot), el más reactivo de los radicales derivados del oxígeno, junto con agua y oxígeno, reacción que está catalizada por iones de transición, fundamentalmente por Fe^{+++} o Fe^{++} ,



También se puede producir radical hidroxilo sin la presencia del anión superóxido, a través del sistema ferroso-férrico como transportador de electrones; es la “Reacción de Fenton”.



Estos radicales libres se fijan a una cadena alquilo, originando la peroxidación lipídica (que desarrollamos más adelante), con formación de radicales peróxido e hidroperóxido.

Por tanto, a partir de la reducción parcial de la molécula de oxígeno se han formado en cadena, diversos radicales libres.

Nuestro organismo posee distintos mecanismos por los que contrarrestar el ataque oxidativo de las moléculas anteriormente citadas; a saber:

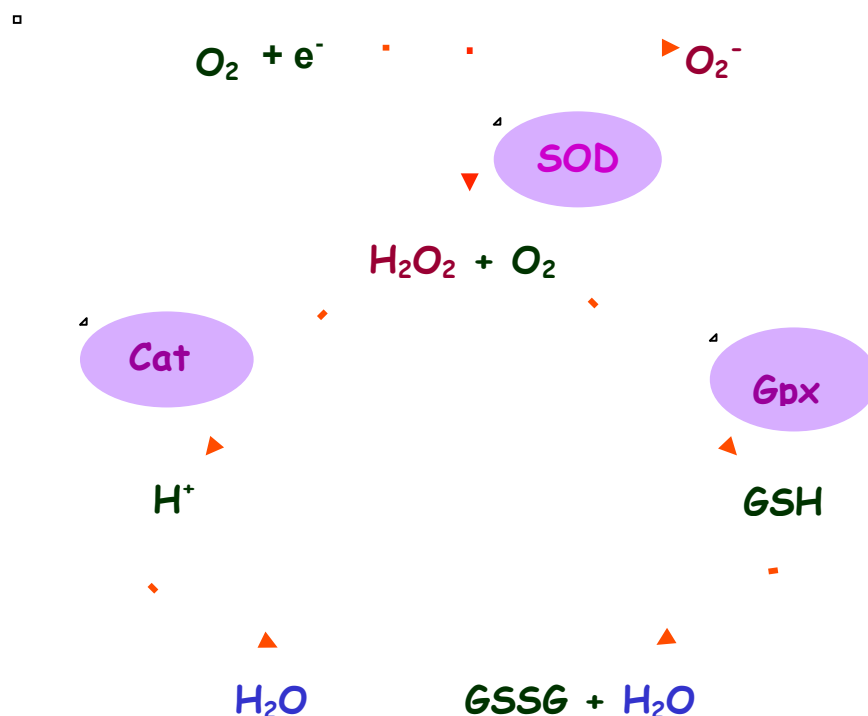


Figura 1.7. Sistema de defensa antioxidante.

Por un lado dispone de mecanismos enzimáticos (catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y NADPH), y por otro de mecanismos no enzimáticos (Vitamina E, C, carotenos, selenio), para neutralizar estas sustancias tóxicas naturales:

- Superóxido Dismutasa

Sea cual sea el origen del electrón aportado, cuando se incorpora a la molécula de oxígeno, se forma el ya conocido radical superóxido (O_2^-) (Clark, 1984). Este radical

puede reaccionar rápidamente con moléculas orgánicas y producir un daño reductor al liberarse del electrón sobrante, pero existe una enzima la superóxido-dismutasa (SOD), que acelera 10 veces la dismutación espontánea del anión. Esta enzima, en presencia de protones, facilita el paso de dicho anión a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Valko et al., 2015).



El peróxido de hidrógeno no es un verdadero radical, pero si se dejase reaccionar libremente daría paso a otros radicales mucho más reactivos.

- Sistema de la Catalasa

Esta enzima degrada al peróxido de hidrógeno transformándolo en agua (Valko et al., 2015). Está presente en el citosol, en las mitocondrias y otros gránulos, encontrándose en concentraciones bajas o ausentes en el plasma. La vida media de esta enzima al igual que la de la SOD es muy corta, por lo que deben ser fabricadas continuamente para mantener su concentración plasmática.

- Sistema de la glutatión-peroxidasa

El glutatión constituye un elemento central en la defensa antioxidante (Viña et al., 1992). Es un pequeño tripéptido constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina. Es el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el responsable de la capacidad neutralizadora de los radicales libres. Se encuentra prácticamente en todas las células pero la mayor parte es sintetizado en el hígado. Es posible que el glutatión inhiba enzimáticamente la peroxidación, actuando a nivel de la glutatión peroxidasa, que reduce los hidroperóxidos fosfolipídicos.

Son varios los sistemas enzimáticos que han aprovechado el enorme potencial reductor de este péptido: glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa:

- Actividad glutatión peroxidasa. Fue descrita por primera vez por Mills en 1957. Esta familia de enzimas cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH), a glutatión oxidado (GSSG) a expensas de ROOH⁻



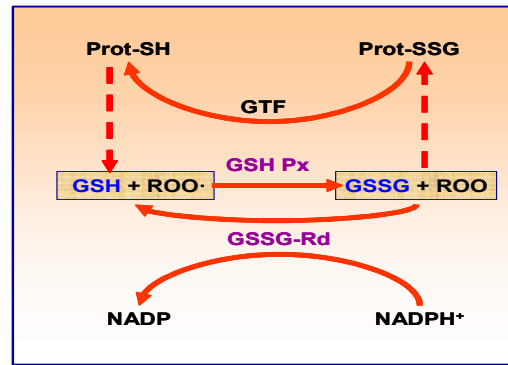
Estas enzimas pueden reducir tanto H_2O_2 como peróxidos orgánicos libres como los peróxidos de ácidos grasos. Existen 2 átomos de selenio ligados al centro activo en forma de selenio-cisteína. Tienen alta afinidad por sus sustratos pero baja capacidad de reacción. La glutatión peroxidasa está localizada en el citosol de las células, diferenciándose dos tipos:

- Glutatión peroxidasa dependiente de selenio, que es un tetrámero de cuatro subunidades presente en el citoplasma de las células eucariotas mayoritariamente, y en menor grado dentro de las mitocondrias. Es posible localizarla en varios órganos aunque su actividad más alta es en el hígado.

- A la actividad glutatión peroxidasa independiente de selenio también se le puede denominar glutatión transferasa. Constituye un grupo de isoenzimas diméricas cuya distribución es citosólica y mitocondrial. Tienen baja actividad frente a los peróxidos orgánicos, y nula frente al H_2O_2 . Su papel parece estar más relacionado con reacciones de biotransformación de xenobióticos y detoxificación de carcinógenos.

- Otras enzimas relacionadas pero de menor importancia son la glutatión reductasa y la glucosa 6-P deshidrogenada, que contribuyen al sistema defensivo antioxidante, proporcionando GSH para la actividad glutatión peroxidasa la primera, y NADPH para la actividad glutatión reductasa la segunda. La localización de la glutatión reductasa es idéntica a la de la glutatión peroxidasa; la de la glucosa 6-P deshidrogenasa es citosólica.

Estos sistemas antioxidantes son insuficientes en condiciones que dan lugar a la producción de radicales libres en gran cantidad como la exposición ionizante, infecciones, determinadas toxinas y en la isquemia, sobre todo si ésta se sigue de reperusión. En estos casos, los radicales libres son un importante mecanismo productor de daño tisular, siendo uno de los principales órganos diana la fracción lipídica de la membrana.



3. COMPONENTES FENÓLICOS

Los estudios más recientes han remarcado el importante papel de los compuestos fenólicos en la salud vascular y la prevención de enfermedades derivadas de la mala función de los vasos sanguíneos, especialmente tras la publicación del proyecto EUROLIVE (Cicero et al., 2008) en el cual se demostró que el incremento de los niveles de colesterol HDL y la disminución de los niveles de colesterol LDL tras el consumo de aceite de oliva virgen se relacionaba de forma directa con su contenido en compuestos fenólicos. Estos compuestos, principalmente alcoholes fenólicos, derivados secoiroides, ácidos fenólicos, lignanos y flavonoides, han demostrado poseer efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiaterogénico así como propiedades anticancerígenas (Suárez et al. 2011). Hoy día se considera el aceite más saludable frente al resto de aceites vegetales por la presencia de estos compuestos fenólicos (Visser et al. 2001).

Los principales responsables de la estabilidad oxidativa del aceite son los ortodifenoles, entre ellos, hidroxitirosol: forma aldehídica y dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína (Gutiérrez-Rosales et al. 2012).

Generalmente los estudios se han centrado en compuestos fenólicos específicos: hidroxitirosol y tirosol. Poco se ha investigado sobre otros componentes también biológicamente activos de la fracción fenólica como la forma dialdehídica del ácido elenoico ligado a hidroxitirosol (Suárez et al. 2011).

3.1. Efectos biológicos de los polifenoles

Los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo, ya sea, porque tienen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente.

Numerosos estudios han avalado las propiedades biológicas de los polifenoles (Quiñones et al. 2012). Estos efectos son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden usualmente justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas.

-Efecto vasodilatador: proporcionan una adecuada producción y biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) (Zenebe et al. 2003).

-Efectos antilipémico y antiaterogénico: mejoran el perfil lipídico, disminuyen los niveles de triglicéridos, ácidos grasos libres y apolipoproteína B, aumentan el cociente colesterol- HDL/colesterol-LDL en plasma y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

-Efecto antitrombótico: inhibición de la función plaquetaria al actuar sobre enzimas implicadas en la síntesis de eicoisanoides, como el Tromboxano A₂ (Murphy et al. 2003).

-Efecto antiinflamatorio: inhibición de las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LPO), reducción de la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, modulación y mejora de los mediadores inflamatorios (Fan et al. 2008).

-Efecto apoptótico y antiapoptótico: poseen actividad inhibidora de la apoptosis inducida por la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el H₂O₂ (Yamagishiet al. 2002) y modulan el nivel de expresión de distintos factores proapoptóticos (Delmas et al. 2011).

-Efecto antioxidante: pueden directamente neutralizar especies reactivas de oxígeno como el anión O₂⁻, el H₂O₂ o el HClO, y quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, evitando la formación de los radicales libres producidos por la reacción de Fenton (Quiñones et al. 2012).

3.2. Hidroxitirosol

El hidroxitirosol (HT) es un polifenol fitoquímico procedente de la hidrólisis de la oleuropeína. En su forma pura es un líquido transparente e inodoro. En la naturaleza se encuentra presente en el olivo, concentrándose principalmente en las hojas, y en

cantidades pequeñas y variables de un aceite a otro. El HT se encuentra en el aceite de oliva virgen extra bien en forma libre o en forma de éster contribuyendo en un 70 - 80% a la fracción fenólica total.

Químicamente el HT es un orto-difenol. Su fórmula molecular es $C_8H_{10}O_3$, y su peso molecular es 154,166 g/mol.

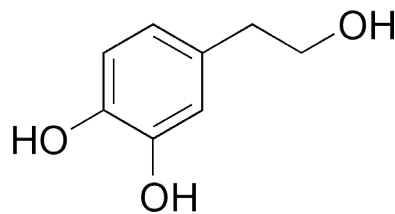


Figura 1-1. 3,4-dihidroxifeniletanol.

La principal actividad del HT se basa en sus propiedades antioxidantes así como su utilidad como aditivo alimentario para estabilizar alimentos funcionales ricos en los ácidos grasos poliinsaturados ω -3.

HT ha demostrado un gran número de propiedades beneficiosas para la salud, entre ellas:

- Es un importante barrador de radicales libres. Posee efecto quelante sobre el catión hierro, hecho que previene la formación de especies reactivas de oxígeno, como es el radical hidroxilo, mucho más reactivas (Covas, 2007). HT y oleuropeína muestran mayor protección antioxidante frente al daño por hipoclorito y mayor capacidad de eliminación del anión superóxido *in vitro*. Además el HT *in vitro* muestra una mayor potencia antioxidante que la vitamina E al ataque por radicales hidroxilos sobre el ácido salicílico (De la Fuente et al. 2004). Los resultados de estos estudios han sido confirmados por otros *in vivo* (en humanos y ratas) al determinar la secreción urinaria de la 8-ISO-PGF 2α , un marcador biológico de estrés oxidativo (Pérez-Jiménez et al. 2012).
- Previene la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Fito et al. 2007). Se cree que HT además ejerce dicho efecto por otros mecanismos adicionales, inhibiendo o frenando la vía inflamatoria (Bitler et al. 2005).

- Por otra parte, HT no solo participa en las fases iniciales del proceso aterogénico sino también en sus consecuencias, fundamentalmente en el proceso trombótico. Se ha demostrado que inhibe la agregación plaquetaria por inhibición del Tromboxano B₂ debido a una inhibición de la enzima ciclooxigenasa y por un aumento en la vida media del óxido nítrico (González-Correa et al. 2008; 2009).
- Se ha comprobado que HT presenta efecto anticancerígeno atenuando la proliferación de células en cultivos celulares humanos de adenocarcinoma colo-rectal, un efecto presumiblemente relacionado con su actividad antiinflamatoria (Terzuoli et al.2010).
- Se han identificado propiedades antimicrobianas atribuidas al HT, acetato de hidroxitirosilo y oleuropeína en infecciones de tracto respiratorio e intestinal (Waterman et al. 2007).
- HT y acetato de hidroxitirosilo presentan propiedades neuroprotectoras. Ambos fenoles lo demostraron en experimentos *in vitro* y *ex vivo*, este último tras la administración oral en ratas y en ambos compuestos, tras someter el tejido cerebral a un proceso de hipoxia-reoxigenación (González-Correa et al. 2008).
- Schaffer et al. en trabajos realizados en los años 2007 y 2010 comprobaron el efecto citoprotector de hidroxitirosol en experimentos *in vitro* y *ex vivo*, en cultivos celulares PC12 y células cerebrales de ratones tras su administración oral subcrónica. Así se identificó la importancia de las propiedades antioxidantes de esta sustancia en el efecto neuroprotector mostrado.
- También se ha identificado el efecto beneficioso de hidroxitirosol y tirosol en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, a través de su exposición conjunta con un inductor tóxico A β en cultivos celulares de neuroblastoma N2, en los que provocan una disminución de la muerte celular mediante la atenuación de la traslocación del factor nuclear NF- κ B (St-Laurent-Thibault et al.2011).

Cabe destacar la ausencia de toxicidad que se ha observado en los datos científicos disponibles, incluso a altas concentraciones, tanto *in vitro* como *in vivo*. (Granados-Principal et al. 2010)

2. OBJETIVOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El amplio estudio PREDIMED ha demostrado que la dieta mediterránea es un pilar muy importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares (cardíacas, cerebrales y periféricas), síndrome metabólico, procesos neurodegenerativos (Martínez-González et al., 2015) y, más recientemente, algunos tipos de cánceres (Toledo et al., 2015).

Por otra parte, como consecuencia de numerosos estudios preclínicos y clínicos, se centra la responsabilidad de este beneficio en varios aspectos, siendo posiblemente el de más relevancia la mayor ingesta de micronutrientes, respecto a otro tipo de alimentación. Entre dichos micronutrientes se encuentran los flavonoides y los polifenoles (Tresserra-Rimbau et al., 2014): los primeros se encuentran mayoritariamente en cereales, frutas y verduras; los polifenoles principales se encuentran en vino tinto y aceite de oliva virgen. En este esquema no hay que olvidar que la dieta mediterránea también se caracteriza por el consumo habitual de pescados ricos en ácidos grasos omega-3, los cuales han demostrado también un beneficio evidente sobre algunos aspectos de la prevención de enfermedades (Enns et al., 2014). Por último, los factores no alimenticios (sociabilidad de la comida, ambiente tranquilo y relajado, ejercicio moderado, etc.) hay que tenerlos en cuenta a la hora de entender globalmente por qué la dieta mediterránea es recomendada en todos los ámbitos de la Medicina como factor preventivo de primera línea.

Debido a la trayectoria de investigación de nuestro grupo, nos interesó especialmente el papel del aceite de oliva virgen y de su principal componente polifenólico hidroxitirosol, en la prevención de fenómenos isquémicos cerebrales. Se ha demostrado que este componente del aceite de oliva virgen disminuye una serie de factores bioquímicos y/o funcionales reconocidos como participantes fundamentales en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, tales como agregación plaquetaria, oxidación de la lipoproteína LDL, estrés oxidativo, etc. (Covas et al., 2015; Reyes et al., 2013), así como diversas vías reconocidas de daño cerebral tras la isquemia-reperusión (Cabrerizo et al., 2014).

La mayor parte de estos estudios se realizan en modelos experimentales *in vitro* o en animales de experimentación sanos. En ambos casos se induce el daño bioquímico-funcional mediante agentes químicos reconocidos y se observa que la presencia de hidroxitirosol reduce la mayor parte de los efectos de estos agentes nocivos. Sin

embargo, son pocos los estudios que utilizan modelos en los que el daño cardiovascular se derive del desarrollo de una enfermedad determinada. Por ello nos interesó abordar este campo, ya que constituye un paso más en el conocimiento de los efectos protectores cardiovasculares del hidroxitirosol.

Uno de los principales factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular es la diabetes mellitus. Las complicaciones a largo plazo de esta enfermedad a nivel vascular son bien conocidas y se han estudiado los principales mecanismos de daño. Por ello elegimos un modelo experimental de diabetes mellitus que analiza el daño cerebral en los primeros estadios de la diabetes, es decir, cuando se produce una inflamación vascular sin detectar aún un daño morfológico evidente. En esta situación quisimos valorar el posible efecto neuroprotector de hidroxitirosol y sus posibles diferencias respecto a una situación de normoglucemia.

Como consecuencia de estos conocimientos, nos planteamos un trabajo en un modelo experimental de diabetes mellitus con los siguientes objetivos:

- Objetivo principal: valorar si el efecto neuroprotector de hidroxitirosol es cualitativa y/o cuantitativamente diferente en la diabetes respecto a una situación de normoglucemia, en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en cortes cerebrales.

- Objetivos secundarios:

- Analizar el efecto antioxidante *in vitro* y *ex vivo* de hidroxitirosol en ambas situaciones glucémicas.

- Comprobar si en las diferencias en el efecto neuroprotector de hidroxitirosol en la diabetes podrían influir otros mecanismos distintos al antioxidante, tales como su efecto sobre el estrés nitrosativo o la producción de mediadores inflamatorios.

3. METODOLOGÍA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. TIPO DE ESTUDIO

Realizamos un estudio experimental *in vitro* y *ex vivo* en ratas normoglucémicas y en ratas con diabetes mellitus inducida con estreptozotocina.

2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN Y TIPOS DE EXPERIMENTOS

Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 250-350g, que permanecieron bajo condiciones estándar de estabulación en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, mantenidos con un ciclo alternante de luz/oscuridad de 12 h, temperatura ambiente de 22°C y con libre acceso a comida y agua.

Los animales fueron estabulados de acuerdo con la normativa de uso, manejo y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 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), según lo dispuesto en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo, de 22 de septiembre de 2010. El protocolo de estudio fue aprobado y supervisado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Málaga

El estudio se realizó en tres fases consecutivas, cada una de ellas con un objetivo concreto:

1. Estudio del efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol en tejido cerebral de ratas normoglucémicas en situación *in vitro*. En estos experimentos el compuesto fenólico se incubó con tejido cerebral sano y se exploró su efecto antioxidante y neuroprotector en tres situaciones:
 - a. Muestras oxigenadas, sin inducción alguna de daño tisular.
 - b. Muestras cerebrales oxigenadas y sometidas a un estrés químico (sales ferrosas) que indujo un daño oxidativo tisular.
 - c. Tejido cerebral sometido a un proceso de hipoxia-reoxigenación, que intenta reproducir los fenómenos tisulares acontecidos en una isquemia-reperusión.

2. Estudio comparativo del efecto antioxidante y neuroprotector *in vitro* en tejido cerebral procedente de animales con diabetes inducida con estreptozotocina con el obtenido en tejido cerebral de animales normoglucémicos. En este caso, el estrés oxidativo se indujo con sales ferrosas (estudio del efecto antioxidante) y el daño celular se indujo mediante el modelo de hipoxia-reoxigenación (análisis del efecto neuroprotector).
3. Experimentos conducentes al análisis del efecto neuroprotector y de las principales vías bioquímicas de daño tisular en tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados por vía oral con hidroxitirosol y sometidos a un proceso experimental de hipoxia-reoxigenación. En este caso se administró el compuesto fenólico por vía oral durante los dos meses de evolución de la diabetes, sometiendo al tejido cerebral al modelo de hipoxia-reoxigenación al finalizar este periodo. Se valoraron distintos tipos de variables:
 - a. Muerte celular en los cortes cerebrales sometidos al modelo de hipoxia-reoxigenación.
 - b. Variables relacionadas con el estrés oxidativo.
 - c. Variables relacionadas con el estrés nitrosativo.
 - d. Variables que definen las principales vías inflamatorias cerebrales.

Para realizar este estudio *ex vivo* en animales diabéticos establecimos 7 grupos de 10 animales cada uno. Establecimos dos grupos controles, uno no diabético y uno diabético, a los que se les administró suero fisiológico. El resto de grupos experimentales estaban compuestos por animales diabéticos a los cuales se les administró diversas concentraciones de hidroxitirosol (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día).

El tratamiento a todos los animales se les administró diariamente vía oral mediante canulación orogástrica (Animal Feeding Needles – STR 13 X 3” (76.2MM) W/4 HARVARD APPARATUS) durante un periodo de dos meses, iniciando el mismo 7 días antes de la inducción diabética (Imagen 1).

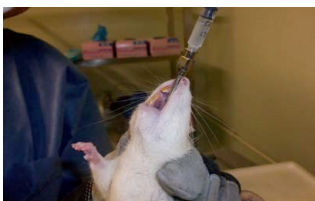


Imagen 1. Canulación orogástrica

3. MÉTODO DE INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

3.1. PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA

Para inducir la diabetes experimental, se utilizó una única dosis de 40 mg/kg de estreptozotomicina (S0130, Sigma-Aldrich Chem.) administrada por vía intravenosa disuelta en 1 mL de tampón citrato. El tampón citrato se preparó mezclando dos soluciones: la solución A es una preparación de ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España) 2,1 g/100 ml de agua destilada; la solución B se preparó con fosfato sódico (Panreac, Barcelona, España) 2,8 g/100 ml de agua destilada. El tampón citrato lo obtuvimos mezclando 11,2 ml de la solución A con 8,8 ml de la solución B. Se conservó en el frigorífico a 4°C.

3.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

Los animales de experimentación fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de diazepam (Valium[®], Roche Farma, S.A. Madrid-España). Una vez anestesiados, se procedió a realizar una incisión longitudinal en el pliegue inguinal (afectando a la piel, el tejido celular subcutáneo y las aponeurosis musculares). Tras la localización del paquete vasculonervioso femoral, se inyectó la estreptozotocina en la vena femoral (Imagen 2) con una jeringa U-100 de insulina (0.33x13mm/29G Becton Dickinson, Madrid-España). Finalizada la administración, se procedió a suturar la piel con seda trenzada de 4 / 0.



Imagen 2. Inyección de estreptozotocina

3.3. MEDICIÓN Y CONTROL DE LAS CIFRAS DE GLUCEMIA

Se localizó la vena safena externa, se realizó una punción con una aguja desechable (Imagen 2). Obtenida la gota de sangre, la toma de muestra se hizo por capilaridad. Se utilizó una determinación electroquímica de glucosa en sangre total con las tiras reactivas Glucocard™ G Sensor (Barcelona-España) con las cuales se utilizó el analizador de glucosa para sangre capilar Glucocard™ Gmeter (Barcelona-España) (Imagen 3).



Imagen 3. Determinación glucemia

Figura 2. Medición de las cifras de glucemia.

Una vez obtenida la muestra sanguínea se realizó el control de glucemia con la siguiente pauta temporal:

- Antes de anestesiar el animal e inducirle la diabetes.
- A las 24 horas de la administración de estreptozotocina.
- Medición diaria hasta considerar un animal como diabético, que se definió cuando se obtuvieron dos días de manera consecutiva cifras de glucemia superior a 200 mg/dl.
- Para controlar la glucemia durante la evolución de diabetes, se realizaron mediciones cada 15 días.
- Previo al sacrificio del animal.

Igualmente se practicó un control semanal del peso de los animales a todos los grupos experimentales, ajustándose la dosis del fármaco al peso semanal del animal tratado.

Todos los animales diabéticos mantuvieron cifras de glucemia entre 400 y 600 mg/dl, mediante la inyección subcutánea de insulina *Levemir_FlexPen*® (Bagsværd-Dinamarca)

usando agujas desechables NovoFine® (Madrid-España). La dosis de insulina administrada osciló entre 4 y 6 UI dependiendo de la cifra de glucemia obtenida previamente.

4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

El órgano objeto de estudio fue el cerebro. Una vez sacrificado los animales mediante decapitación, habiendo sido previamente anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg. Dolethal. Vetoquinol S.A.) y diazepam (50 mg/kg. Valium®, Roche Farma, S.A. Madrid-España), se procedió a la disección de la piel y el tejido muscular de la región occipital para facilitar el decalotaje. Se realizaron dos osteotomías longitudinales sobre los huesos temporales hasta el frontal, levantándose con cuidado la escama resultante; de esta forma el cerebro queda libre de la calota (Imagen 4)

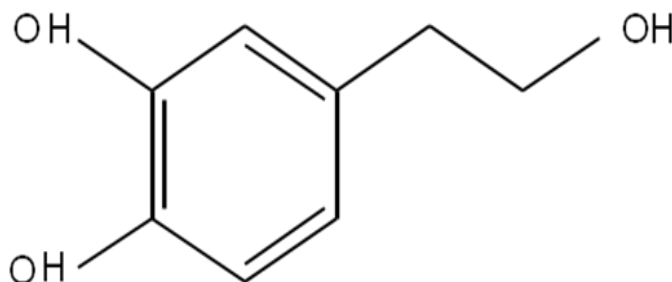


Imagen 4. Obtención tejido cerebral

Se cortaron los tubérculos olfatorios y los pares craneales, siendo extraído el cerebro y el cerebelo, del total de tejido se aisló el cerebro medio, que se mantuvo en hipotermia inducida por hielo, con el fin de retardar la autólisis del órgano.

5. COMPUESTO DE ESTUDIO

El compuesto de estudio fue **HIDROXITIRO SOL** (3,4-dihidroxifeniletanol), cedido por Dr. J. Fernández Bolaños, Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa, CSIF, Sevilla. El método de obtención fue siguiendo el método descrito previamente por dichos autores (Fernandez-Bolaños et al., 2005).



6. MODELO EXPERIMENTAL DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN CEREBRAL

Los experimentos se realizaron utilizando un modelo *ex vivo* de hipoxia-reoxigenación durante y tras los cuales se obtuvieron muestras de sobrenadante (tampón o medio de incubación) y tejido cerebral.

Este modelo experimental trata de reproducir, en condiciones *in vitro*, las distintas situaciones que suceden durante la isquemia-reperfusión, en el proceso de ictus isquémico. Ha sido aplicado tanto al tejido de los animales tratados, como al de los no tratados con los distintos compuestos de estudio.

Tras extraerse el cerebro, se introdujo en un tampón de disección: 10 mL (en mM: NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 0.5, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 10, KH₂PO₄ 1.18, glucosa 11 y sacarosa 200. pH: 7.4) sumergido en hielo y con perfusión continua de oxígeno.

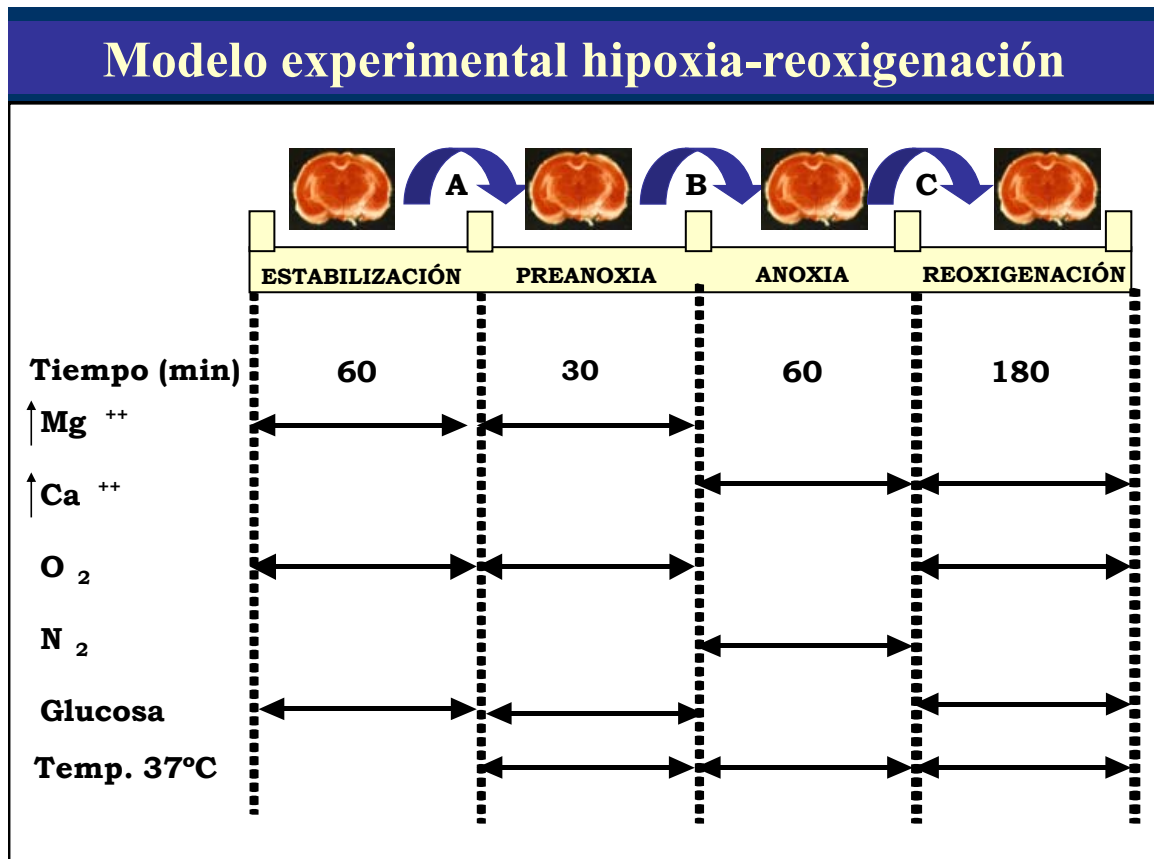
A continuación, se procedió a obtener los cortes de unas 500 micras realizadas con vibrotomo y se introdujeron durante 60 minutos en tampón de estabilización (igual al de disección pero sin sacarosa), a temperatura ambiente y sometido a una perfusión continua de oxígeno (utilizamos para cada fase donde sea necesaria una mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5%, Alphagaz MIX. Air Liquide. España), etapa a la que llamamos de estabilización.

Seguidamente, iniciamos la etapa de prehipoxia, consistente en sumergir los cortes en un tampón con la misma composición que en la fase anterior y burbujeado con oxígeno durante 30 minutos a una temperatura de 37°C (baño de bloque en seco para tubos “Multiplaces” con temperatura regulable de 10-200°C. Selecta. España).

A continuación, establecemos la etapa de hipoxia en la cual sometemos al tejido durante 60 minutos a una perfusión continua de nitrógeno (Alphagaz N₂. Air Liquide. España) en un tampón de hipoxia (En mM: NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 1.19, KH₂PO₄ 1.18. pH: 7.4), a 37°C.

Por último, tiene lugar la etapa de reoxigenación que dura 180 minutos, aunque metodológicamente la dividimos en tres fases de 60 minutos (R1, R2 y R3), utilizando un tampón de reoxigenación (igual al anterior añadiéndole glucosa 11 mM), a 37°C y con burbujeo continuo de oxígeno.

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



Al inicio de cada fase del modelo no se añadió compuesto alguno, sino, únicamente, 5 ml del tampón correspondiente.

Al final del proceso, se obtuvieron distintas muestras: por un lado, se recogió muestra de tampón (sobrenadante) al finalizar cada una de las fases intermedias del modelo, así como tras la finalización del mismo y, por otro lado, se recogió el tejido cerebral al concluir el período de reoxigenación. Todas las muestras obtenidas se congelaron a $-80^{\circ}C$ para las posteriores determinaciones.

7. VARIABLES ANALÍTICAS

7.1. Muerte celular cerebral

Se cuantificó la muerte celular a través de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH) en las muestras de tampón (sobrenadante) de incubación tras las distintas fases del proceso de hipoxia-reoxigenación.

7.2. Estrés oxidativo: peroxidación lipídica y defensa antioxidante:

En las muestras de cerebro, se valoró el daño oxidativo tisular a través de la determinación de la peroxidación lipídica de las membranas celulares (productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), cuyo principal representante es el malondialdehído o MDA). Por otro lado, estudiamos la capacidad defensiva antioxidante del tejido mediante la cuantificación del contenido celular de glutatión total, oxidado y reducido (GST, GSSG y GSH, respectivamente) y actividad glutatión peroxidasa (GSHpx).

7.3. Estrés nitrosativo: nitritos y nitratos y 3-nitrotirosina:

La producción de óxido nítrico se determinó a través de la medición de sus productos finales, nitritos y nitratos en las muestras de sobrenadante. También se estudió la producción de 3-nitrotirosina.

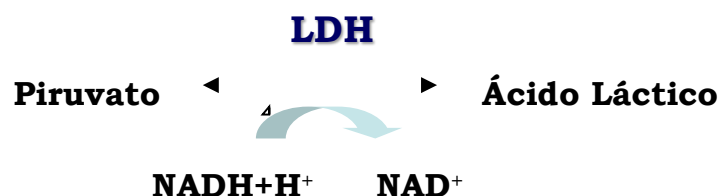
7.4. Mediadores inflamatorios:

Determinación de la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) e interleucina (IL) 1β cerebrales. Se cuantificó en el tejido tras su obtención una vez finalizado el proceso de reoxigenación y se procesó según el parámetro a determinar.

8. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

8.1. ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

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



Para la medición de este parámetro empleamos el Cytotoxicity Detection Kit de Roche (Roche Applied Science). Este kit es una alternativa para cuantificar citotoxicidad/citolisis, basada en la medida de la actividad LDH que se libera durante el daño celular, es decir, cuando hay daño en la membrana plasmática. Para su realización previamente se centrifugan las muestras obtenidas tras el proceso de hipoxia-reoxigenación (500 μ L de sobrenadante) a 250 x g durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5415D) y, a continuación, procedemos a realizar el kit con posterior lectura en espectrofluorímetro. Los resultados obtenidos se ajustan al peso de las muestras de tejido correspondientes.

8.2. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

A) OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE MEMBRANAS

Las fracciones de los tejidos extraídos se lavaron con agua bidestilada y desionizada y se pesaron. Posteriormente se procedió a obtener fracciones enriquecidas de membranas mediante gradientes de centrifugación (fracción P2), para lo cual los tejidos se diluyeron en todos los casos en proporción 1:10 en una solución de incubación (NaCl 0.1 M, KCl 5×10^{-4} M, CaCl_2 3.1×10^{-3} M, MgSO_4 1×10^{-3} M, Glucosa 4.9×10^{-3} M, NaHCO_3 2.4×10^{-2} M, KH_2PO_4 5.5×10^{-4} M, en agua bidestilada y desionizada), con Tris 50 mM y Sacarosa 0.32 M, a pH 7.4 y mantenida en frío mediante su inmersión en hielo triturado.

Cada fracción de tejido se sometió a homogeneización manual. Durante todo el proceso, los recipientes que contenían los tejidos, fueron mantenidos en hielo triturado y agua.

Los distintos homogeneizados se repartieron posteriormente en alícuotas en tubos siliconados y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C.

Al finalizar la centrifugación se procedió a la extracción, mediante una pipeta pasteur, del sobrenadante (fracción S1), el cual fue transferido a tubos de centrifuga y se desechó el pellet (fracción P1).

La fracción S1 fue centrifugada posteriormente a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C, obteniéndose de nuevo un sobrenadante (fracción S2), que fue desechado y un pellet. Este segundo pellet o Fracción P2 fue resuspendido mediante agitación continua hasta

su total dilución en la solución de incubación, pero sin sacarosa, en proporción 1:10 (peso/volumen) respecto al peso inicial. En todos los casos la dilución se realizó en proporción al peso original de cada una de las fracciones. Las diluciones obtenidas fueron congeladas a -80°C .

B) DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN CON ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Finalidad y fundamento

El malondialdehído es un producto derivado del metabolismo del ácido araquidónico, que se produce por hidrólisis del endoperóxido cíclico PGH_2 junto al ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico (HHT).

La determinación de este metabolito del ácido araquidónico nos indica de modo indirecto los niveles de peroxidación alcanzados por un tejido y, aunque no es un metabolito específico del catabolismo peroxidativo, sí es un buen indicador, aceptado por muchos autores, del funcionalismo de esta vía oxidativa. Presenta también la ventaja de que puede colorearse al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico; lo que nos permite de forma fácil cuantificar sus niveles en cualquier muestra determinando simplemente su absorbancia espectrofotométrica.

Método

Se procedió a la dilución de las alícuotas de tejido mediante agitación en el tampón de incubación descrito para la obtención de la fracción P2 con Tris-20 mM en proporción 1:2 (peso/volumen).

Una vez obtenida la dilución de los tejidos, se repartieron las muestras en alícuotas en tubos de cristal y se acomodaron en una gradilla. Estas se mantuvieron inmersas en hielo triturado y agua durante todo el tiempo de preparación.

En los casos de experimentos *in vitro* de tejido no sometido al modelo de hipoxia-reoxigenación y en las que realizamos una incubación con algún compuesto, esto se hizo con 50 μl del mismo (de una concentración superior para obtener la adecuada al diluirlo en el volumen final). A las muestras se les añadió los inductores de la

peroxidación lipídica, sulfato ferroso y ácido ascórbico, ambos en un volumen de 50 μ l también, mientras que al control se le añade el mismo volumen pero de agua (100 μ l). El volumen final de las muestras fue en todos los casos el mismo.

En los experimentos de tejido no sometido al modelo de hipoxia-reoxigenación ni a inducción química, pero si incubados con algún compuesto esto se hizo con 50 μ l del mismo (de una concentración superior para obtener la adecuada al diluirlo en el volumen final). Se les añadió, 100 μ l de agua destilada para igualar volumen, al igual que al control al que se añadió 150 μ l de agua destilada. El volumen final de las muestras fue en todos los casos el mismo.

En el caso de las muestras de tejido que ya han tomado contacto con el fármaco (tejido sometido a hipoxia-reoxigenación) y de sus controles correspondientes, el volumen añadido es siempre de 150 μ l de agua destilada a fin de igualarlos. El volumen final de las muestras fue en todos los casos el mismo.

En los casos de inducción química, la peroxidación lipídica se indujo durante un período de tiempo de 45 minutos. Durante todo el proceso, los tubos se taparon y cubrieron con papel de aluminio, para evitar su exposición a la luz, y fueron sometidos a una temperatura de 37°C y agitados continuamente a una velocidad de 100 bats/min.

Tras la incubación, las muestras fueron extraídas del baño y destapadas. Se añadió, a las muestras problema y sus controles, un volumen de 500 μ L de una solución de ácido tiobarbitúrico al 0.5% en ácido tricloroacético al 20%, para colorear los TBARS formados en el paso anterior.

A continuación, todas las muestras, problemas y controles, fueron introducidas en un baño termostataado a 100°C durante 15 minutos y protegidas de la luz, debido a su fotosensibilidad. Posteriormente, se enfría en hielo triturado para detener la reacción.

Finalizado este tiempo, fueron pasadas a tubos de plástico siliconados y centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C.

Una vez obtenido el sobrenadante, se procedió a su medición mediante un espectrofluorímetro, a una longitud de onda de 532 nm en el espectro de luz visible.

Valoración de los resultados

El valor de la absorbancia resultante, fue transformado en nmoles de TBARS mediante su comparación con una curva de calibración estándar de TBARS realizada previamente con malondialdehido-bis-dietilacetal en un rango de concentraciones de 0 a 100 nmol/l y siguiendo la metódica anteriormente descrita para la determinación de TBARS en los tejidos, pero utilizando como sustituto del tejido concentraciones crecientes de TBARS.

Los datos de la curva estándar de TBARS se analizaron mediante un programa de regresión no lineal y, sobre estos datos, se compararon las absorbancias de las muestras, obteniéndose la cantidad de TBARS de las mismas en nmol/ml.

Los valores de TBARS en nmoles producidos por las muestras, se relacionaron posteriormente con los miligramos de proteínas existentes en ellas, expresando el índice de productos lipídicos reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico en último término en nmoles de MDA/mg de proteínas.

C) DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se cogieron tantos tubos como muestras se obtuvieron. A cada tubo se le adicionó 50 µl de las muestras, excepto al blanco al que se le adicionó 50 µl de disolución de ClNa 5N.

A continuación se añadieron 2,5 ml del reactivo de Bradford a cada tubo y se agitaron.

Tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió a realizar la medición de las proteínas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para ello, vertimos el volumen suficiente del blanco y de las muestras en placas que introducimos en el espectrofotómetro, obteniéndose la absorbancia de cada muestra.

Para hallar el valor de las proteínas, sólo restó por aplicar la ecuación de la curva patrón para las proteínas:

$$(y) = a(x) + b$$

Sustituimos "y" por su valor, que es la absorbancia de cada muestra, despejamos la "x" obteniendo así la concentración de proteínas, expresada en µg prot/100 µl.

REACTIVOS DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SEGÚN EL MÉTODO DE BRADFORD

Su composición se detalla a continuación:

- Brillant Blue G: Pm 854,0. Lote 32H7706. SIGMA Chemical Co.USA. La cantidad que se utiliza es 0,1g ;
- Alcohol etílico (CH₃-CH₂OH) al 96% (P/V). Densidad 0.816g/cc. Probus. España. La cantidad utilizada es 50 ml;
- Acido ortofosfórico (H₃PO₄): Pm 98,00. Riqueza 85%. Lote 28070. Montplet& esteban. La cantidad que se utiliza es 100 ml.

Todo ello se pone en un matraz y se completa hasta 1000 ml de agua destilada.

8.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN

La determinación de los niveles de glutatión se realizó mediante espectrofluorimetría.

1.) Para el desarrollo de esta experiencia se tomaron entre 50 y 90 mg de tejido, que una vez pesados fueron cortados en pequeñas fracciones, las cuales se pusieron en un homogeneizador al que se adicionó un volumen fijo de 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 8.0).

2.) Se realizó la homogeneización manual y una vez obtenida una mezcla homogénea, se añadió 0,25 ml de ácido fosfórico al 25%.

3.) En los casos de incubación con algún compuesto (protocolo aplicable al tejido no sometido al proceso de hipoxia-reoxigenación) éste se hizo en un volumen de 50 µl y en las mismas condiciones expresadas para la técnica de la peroxidación lipídica. La incorporación o no de dietil maleato (DEM), se hizo conjuntamente con el compuesto y durante el mismo periodo de tiempo y condiciones. Al finalizar dicha incubación, se añadió el ácido ortofosfórico.

4.) Esta solución contenida en el homogeneizador fue vertida en un tubo siliconado para proceder a su centrifugación, la cual se realizó a 13000 x g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.

5.) Durante la espera de la centrifugación, se elaboró una curva patrón de GSH, a partir de una solución 1 mol/l (3,073 mg de GSH en 10 ml de tampón fosfato sódico), realizando sucesivas diluciones: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 y 1/2048. Todo ello se mantuvo en frío utilizando hielo triturado y agua.

6.) Una vez finalizada la centrifugación se recoge del sobrenadante del cual 200µl se utilizan para la determinación de GSSG y se le añadieron 8 µl de 4-vinilpiridina (V3204. Sigma-Aldrich. USA), con el objeto de bloquear todo paso de glutatión reducido a oxidado. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

7.) A continuación, se pusieron en tubos de plástico y según el orden que se indica, los siguientes componentes: 0,9 ml de tampón fosfato sódico a todos los tubos, 50µl de las muestras (ya sean de GST o de GSSG) o de la correspondiente concentración estándar y por último a todos los tubos se les adicionó 50 µl de o-phtaldehído (P0657. Sigma-Aldrich. USA).

8.) Se agitaron y se incubaron durante 15 minutos.

9.) Pasado este tiempo se procedió a la lectura en el espectrofluorímetro, utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm dando lugar a los valores de la curva patrón y del glutatión total (GST) y oxidado (GSSG).

Valoración de los resultados

Una vez obtenido el dato de glutatión en nmol/100 µl, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y el peso del tejido añadido, se aplicó la siguiente expresión matemática (para una dilución 1:5):

$$\text{Glutatión} = \frac{\text{Glutatión (nmol/100 } \mu\text{l)} \times 273.5}{\text{mg de tejido}}$$

Expresándose los resultados, de esta forma, en µmol/g de tejido.

Esta valoración se realizó para glutatión total (GST) y glutatión oxidado (GSSG), calculándose el glutatión reducido (GSH) mediante la diferencia:

$$\text{GSH} = \text{GST} - \text{GSSG}$$

Asimismo, se calculó el porcentaje de glutatión que se encontraba en forma oxidada, según la siguiente expresión:

$$\% \text{ GSSG} = \frac{\text{GSSG} \times 100}{\text{GSH} + \text{GSSG}}$$

8.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA

El estudio se llevó a cabo mediante cinética espectrofotométrica.

En primer lugar se procedió a la obtención de las muestras del tejido, con peso aproximado de 300-400mg. Una vez pesado, se cortó en pequeñas fracciones el material y se vertió en un homogeneizador al que se le añadieron 4mL de tampón fosfato potásico 0.1M pH 7.0. Seguidamente se realizó la homogeneización manual, movimiento que se repitió entre 20 y 30 veces, con el fin de lograr una mezcla homogénea que fue vertida en un tubo de plástico de 10mL.

El siguiente paso consistió en someter la muestra a una centrifugación a 13000xg durante 15 minutos a 4°C. Terminada la centrifugación se extrajo el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur y se vertió en un tubo de plástico siliconado de 5mL, que se mantuvo en inmersión en hielo triturado y agua. Con el sobrenadante obtenido se llevó a cabo a continuación la determinación de proteínas por el método de Bradford.

Se tomó de cada muestra un volumen equivalente a 25µg de proteínas determinadas por el método de Bradford, que se añadieron a una microcubeta, adicionando además y según el orden en el que se indica, tampón fosfato potásico 0.1M, en un volumen necesario para conseguir 880µL tras restar el volumen de muestra añadido, 53µL de GSHrd, 133µL de GSH y 100µL de NADPH. Se agitó la microcubeta por inversión y se incubó en un baño termostataado a una temperatura de 37oC durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se extrajo la microcubeta del baño, y se le adicionó a la muestra 100µL de ter-Butyl-hidroperóxido, agitando de nuevo por inversión, e introduciéndola en el espectrofotómetro. A continuación se realizó la lectura a una longitud de onda de 340nm durante 5 minutos, midiendo el decremento de la absorbancia de la muestra cada 30 segundos.

8.5. DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS

La determinación de los nitritos-nitratos se utiliza como medida indirecta de la producción de óxido nítrico, se realizó en el sobrenadante de los cortes cerebrales en el proceso de hipoxia-reoxigenación que, una vez obtenidos, se congelaron a -80°C hasta su procesamiento con el kit nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical Company) y posterior medición en espectrofluorímetro. Los resultados de la lectura se ajustaron según el peso del tejido correspondiente.

8.6. DETERMINACIÓN DE LA NITRACIÓN DE PROTEÍNAS

La formación de 3-nitrotirosina ha sido demostrada en algunos desórdenes inflamatorios, lesiones arterioscleróticas y enfermedades neurodegenerativas. La nitración de proteínas es usada como índice de la producción de peroxinitritos, por ello a través de su expresión se puede valorar el efecto tóxico del óxido nítrico.

Para la determinación de la nitrotirosina utilizamos el Nitrotyrosine Elisa Test Kit de Hycult biotechnology b.v. El tejido sobre el que se determina se obtuvo tras un proceso de hipoxia-reoxigenación donde lo incubamos con una concentración del compuesto a estudiar y tras ello congelamos a -80°C . Posteriormente se descongeló y se homogeneizó con un tampón compuesto por $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100mM y 0,1% de digitonina y pH de 7.4 a razón de 1mL/100mg de tejido. Tras ello lo centrifugamos 5000 x g durante 10 minutos a 4°C y en el sobrenadante obtenido aplicamos el kit.

8.7. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROSTAGLANDINAS E_2

El tejido obtenido tras el proceso de hipoxia-reoxigenación fue homogeneizado en una disolución del 15% de metanol (Methanol. LiChrosolv. MERK. Alemania) en 0,1 M de PBS con un pH de 7.5 (100 mg de tejido en 1 mL de metanol-buffer). El resultante se ultracentrifugó en tubos de silicona (Ultracentrífuga Modelo L-80. Beckman Instrument S.A. España) a 15000 x g, a 4°C durante 15 minutos, y recogimos el sobrenadante.

Se procedió a preparar la columna de separación cromatográfica (Sep-Pak-Plus Cartridges. WATERS. Ireland), para ello se lavó la columna con 2 mL de metanol seguido de 2 ml de agua destilada-desionizada ultrapura (milliQ-biopak. Millipore USA). A continuación se pasó la muestra por la columna y ajustamos el flujo a 1

ml/minuto. La siguiente operación consistió en lavar la columna con 2 mL de metanol al 15% en agua, seguido de 2 ml de petroleum ether (Petroleum ether anhydrous, 300314 SIGMA-ALDRICH Inc USA). De esta forma, las prostaglandinas quedan fijadas en la columna. Las prostaglandinas se eluyeron con 2 mL de metilformato (Methylformate, anhydrous, 99%. 291056. SIGMA-ALDRICH Inc USA). Por último el metilformato se evaporó con nitrógeno (N₂) y el residuo obtenido está preparado para su determinación mediante kit comercial por técnica de enzimoimmunoensayo PGE₂ (PGE₂, RPN222-96 celdas. Amersham Biosciences) y posterior medición en espectrofluorímetro.

8.8. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA 1 β e IL-10

El tejido obtenido tras el proceso de hipoxia-reoxigenación se homogeneizó en un volumen comprendido entre 0,25-1 mL de un tampón de extracción a 4°C y pH de 7.2 y que contiene 50 mM de Tris, 1mM de EDTA, 6 mM de MgCl₂, 1 mM de Phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/mL de Leupeptin, 1 μ g/mL Antipain, 1 μ g/mL de Aprotinin, 1 μ g/mL Soybean trysin inhibitor. Después de homogeneizar, las muestras se pasaron a tubos de silicona y fueron sonicadas (Vibracell VC-50T. Sonios Materials Inc. USA) durante 5-10 segundos y ultracentrifugadas (Ultracentrífuga Modelo L-80. Beckman Instrument S.A. España) durante 10 minutos a 14000 x g (4°C). Acto seguido, recogimos el sobrenadante y las procesamos mediante kits comerciales de técnica ELISA para la IL-1 β (Interleukin-1 β , Rat Biotrak ELISA System RPN2743-96 determinaciones) y la IL-10 (Interleukin-10, Rat Biotrak ELISA System RPN2739-96 determinaciones); obteniendo los resultados tras su medición en el espectrofluorímetro. Los resultados se corrigieron según las proteínas de cada muestra. El contenido total de proteínas se midió utilizando el método de Bradford. Los datos son expresados como pg de IL/100 μ g de proteína total.

9. MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos expresados en el texto, tablas y figuras representa la media \pm error estándar de la media (SEM) de los valores obtenidos en los distintos grupos.

La valoración estadística de dichos resultados se realizó mediante la utilización del programa para ordenador personal SPSS (Social Program for Statistical Sciences) para Windows, versión 23.0 (licenciado para el Servicio Central de Informática de la Universidad de Málaga).

Las diferencias entre los distintos grupos experimentales con respecto al grupo control, en relación con las distintas variables, se realizó utilizando el test de la *t* de student para muestras independientes.

Las diferencias entre las distintas dosis del compuesto utilizado respecto a las distintas variables, se han establecido mediante la aplicación de test de ANOVA con posterior transformación de Bonferroni.

En todos los casos, se ha asumido significación estadística con un valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En este apartado mostraremos los principales resultados obtenidos en nuestro estudio, de una forma consecutiva temporal, tal y como los planeamos desde el principio.

En términos generales los resultados que exponremos estarán incluidos en los siguientes apartados:

1. Efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol en tejido cerebral de ratas normoglucémicas en situación *in vitro*.

2. Comparación del efecto antioxidante y neuroprotector *in vitro* en tejido cerebral procedente de animales con diabetes inducida con estreptozotocina con el obtenido en tejido cerebral de animales normoglucémicos.

3. Análisis del efecto neuroprotector y de las principales vías bioquímicas de daño tisular en tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados por vía oral con hidroxitirosol y sometidos a un proceso experimental de hipoxia-reoxigenación.

1. Efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol en tejido cerebral de ratas normoglucémicas en situación *in vitro*.

1.1. Efecto antioxidante *in vitro* de hidroxitirosol

En la Tabla 4.1. se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a la producción de los peróxidos lipídicos o productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tres situaciones experimentales: tejido cerebral sin inducción de estrés oxidativo, muestras inducidas con sales ferrosas y cortes cerebrales cuya inducción de estrés oxidativo se realizó mediante experimentos de hipoxia-reoxigenación.

En cada una de esas tres situaciones se muestra el valor IC_{50} (μM), definido como la concentración micromolar de hidroxitirosol que redujo en un 50% la producción de TBARS, respecto a las muestras controles, es decir, sin incubación del compuesto.

En la Figura 4.1. se muestran los valores basales de TBARS en cada una de las tres situaciones experimentales señaladas y en la Figura 4.2. se muestran las curvas concentración-efecto de hidroxitirosol, representando los valores en porcentajes de cambio respecto al valor de TBARS obtenido en las muestras controles en cada situación experimental.

Tabla 4.1. Valores medios (media \pm SEM) de producción de peróxidos lipídicos (TBARS) en muestras cerebrales (a) no inducidas, (b) inducidas con sales ferrosas (Fe_2SO_4) y (c) sometidas a un proceso de hipoxia-reoxigenación, incubadas con distintas concentraciones de hidroxitirosol.

TBARS (nmol/mg proteína)			
Hidroxitirosol (μM)	No inducción	Fe_2SO_4 (100 μM)	Hipoxia-reoxigenación
0	3.75 \pm 0.30	12.12 \pm 0.71	13.00 \pm 1.03
0.5	3.81 \pm 0.28	12.16 \pm 0.45	13.54 \pm 1.11
1	3.56 \pm 0.41	12.01 \pm 0.55	12.95 \pm 1.23
10	3.66 \pm 0.25	11.87 \pm 0.63	8.05 \pm 0.66
50	3.70 \pm 0.20	5.99 \pm 0.35	6.48 \pm 0.50
100	3.66 \pm 0.26	3.08 \pm 0.21	3.26 \pm 0.12
500	3.54 \pm 0.35	2.84 \pm 0.19	2.00 \pm 0.16
1000	2.90 \pm 0.27	2.80 \pm 0.38	2.15 \pm 0.15
IC₅₀ (μM)	> 1000	49.60 \pm 3.25	47.49 \pm 3.84

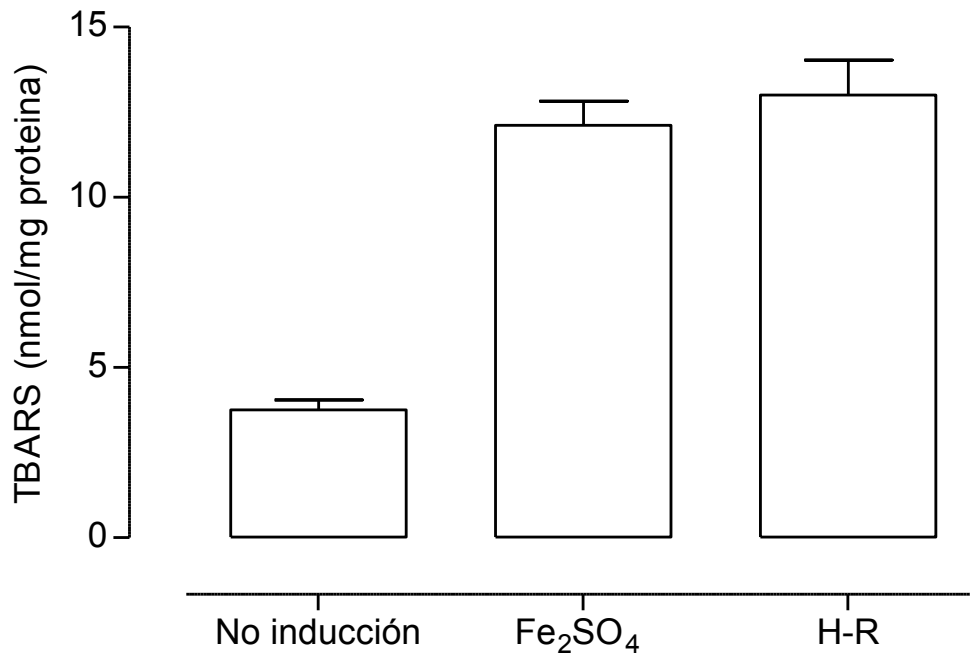


Figura 4.1. Valores basales (sin incubación con hidroxitirosol) de TBARS en muestras sin inducción, inducidas con sales ferrosas (Fe₂SO₄) o sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación (H-R)

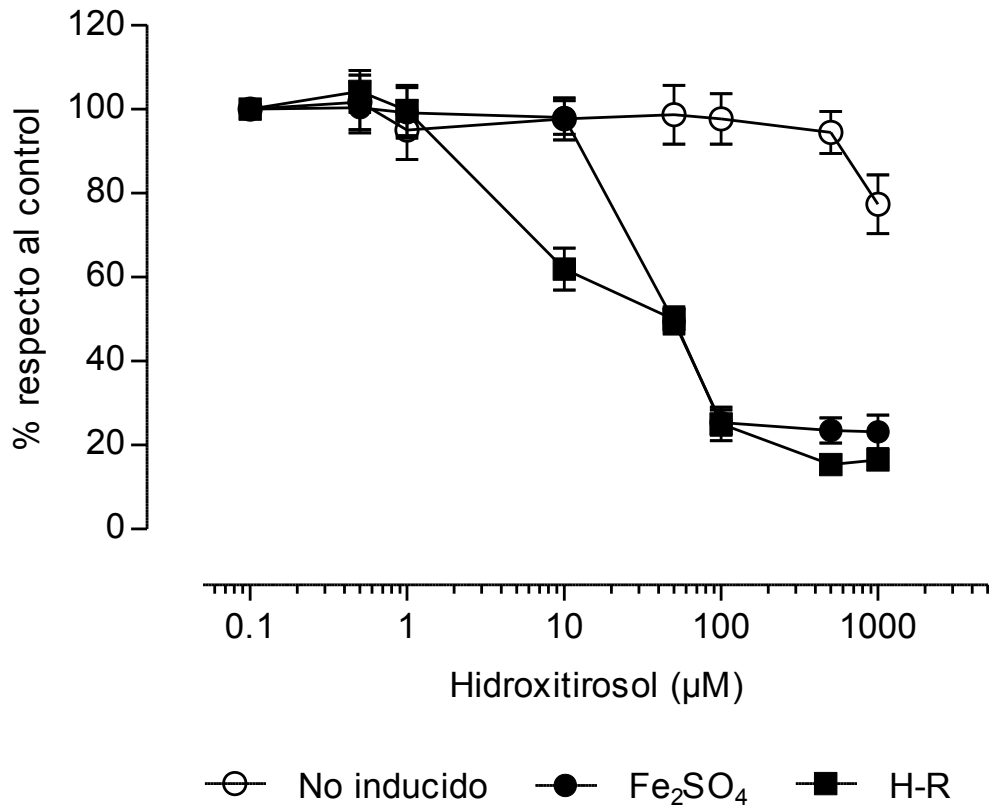


Figura 4.2. Curvas concentración-efecto de producción de TBARS en muestras sin inducción, inducidas con sales ferrosas (Fe_2SO_4) o sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación (H-R)

1.2. Efecto neuroprotector *in vitro* de hidroxitirosol

En la Tabla 4.2. se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a la producción de lactato deshidrogenasa (LDH) en tres situaciones experimentales: tejido cerebral sin inducción de estrés oxidativo, muestras inducidas con sales ferrosas y cortes cerebrales cuya inducción de estrés oxidativo se realizó mediante experimentos de hipoxia-reoxigenación.

En cada una de esas tres situaciones se muestra el valor IC_{50} (μM), definido como la concentración micromolar de hidroxitirosol que redujo en un 50% la producción de LDH, respecto a las muestras controles, es decir, sin incubación del compuesto.

En la Figura 4.3. se muestran los valores basales de LDH en cada una de las tres situaciones experimentales señaladas y en la Figura 4.4. se muestran las curvas concentración-efecto de hidroxitirosol, representando los valores en porcentajes de cambio respecto al valor de LDH obtenido en las muestras controles en cada situación experimental.

Tabla 4.2. Valores medios (media \pm SEM) de producción de lactato deshidrogenasa (LDH) en muestras cerebrales (a) no inducidas, (b) inducidas con sales ferrosas (Fe_2SO_4) y (c) sometidas a un proceso de hipoxia-reoxigenación, incubadas con distintas concentraciones de hidroxitirosol.

LDH (unidades arbitrarias)			
Hidroxitirosol (μM)	No inducción	Fe_2SO_4 (100 μM)	Hipoxia-reoxigenación
0	0.11 \pm 0.01	3.14 \pm 0.11	3.25 \pm 0.21
0.5	0.11 \pm 0.01	3.15 \pm 0.12	3.12 \pm 0.18
1	0.12 \pm 0.01	3.20 \pm 0.11	2.95 \pm 0.41
10	0.10 \pm 0.01	3.05 \pm 0.16	2.01 \pm 0.16
50	0.11 \pm 0.01	2.85 \pm 0.31	1.76 \pm 0.23
100	0.10 \pm 0.01	1.96 \pm 0.20	1.43 \pm 0.18
500	0.11 \pm 0.01	1.38 \pm 0.19	1.55 \pm 0.14
1000	0.08 \pm 0.01	1.40 \pm 0.15	1.86 \pm 0.23
IC₅₀ (μM)	> 1000	368 \pm 52	70.45 \pm 5.25

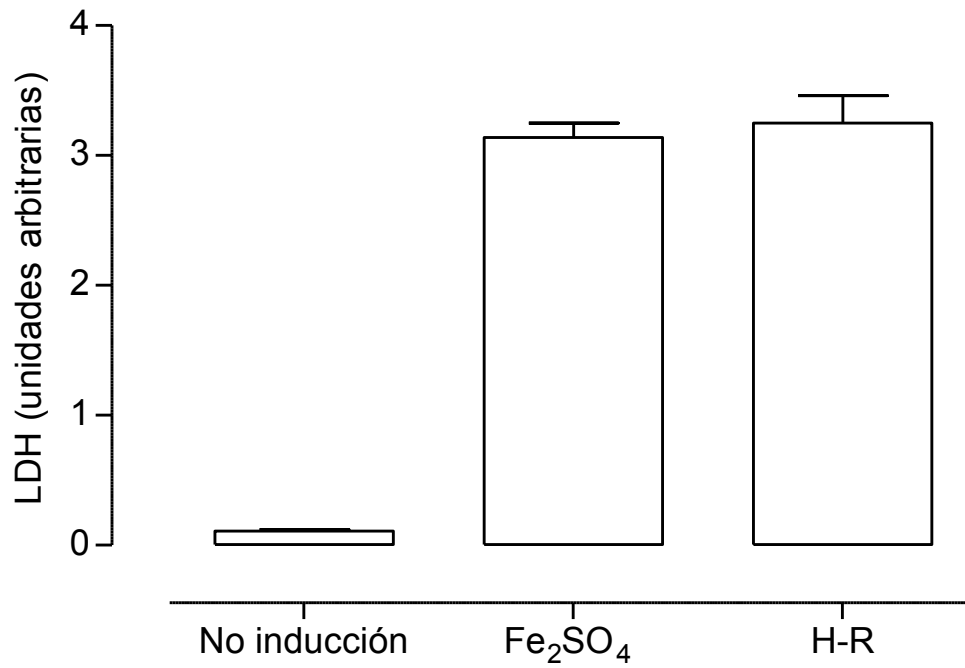


Figura 4.3. Valores basales (sin incubación con hidroxitirosol) de LDH en muestras sin inducción, inducidas con sales ferrosas (Fe₂SO₄) o sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación (H-R)

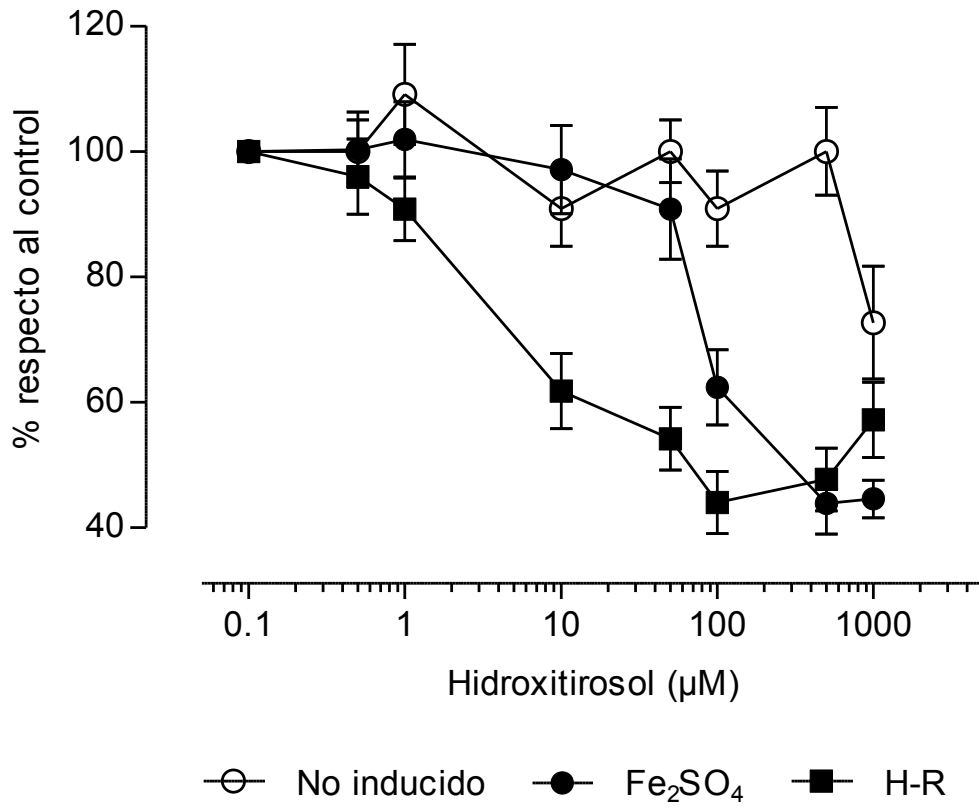


Figura 4.4. Curvas concentración-efecto de producción de LDH en muestras sin inducción, inducidas con sales ferrosas (Fe₂SO₄) o sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación (H-R)

2. Comparación del efecto antioxidante y neuroprotector *in vitro* en tejido cerebral procedente de animales con diabetes inducida con estreptozotocina con el obtenido en tejido cerebral de animales normoglucémicos.

2.1. Efecto antioxidante *in vitro* de hidroxitirosol

En la Tabla 4.3. se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a la producción de los peróxidos lipídicos o productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) inducida con sales ferrosas en muestras de tejido cerebral procedente de animales normoglucémicos y de animales con diabetes experimental inducida con estreptozotocina de dos meses de evolución.

En cada una de esos dos grupos se muestra el valor IC_{50} (μM), definido como la concentración micromolar de hidroxitirosol que redujo en un 50% la producción de TBARS, respecto a las muestras controles, es decir, sin incubación del compuesto.

En la Figura 4.5. se muestran los valores basales de TBARS en cada una de las dos situaciones experimentales señaladas y en la Figura 4.6. se muestran las curvas concentración-efecto de hidroxitirosol, representando los valores en porcentajes de cambio respecto al valor de TBARS obtenido en las muestras controles en cada situación experimental.

Tabla 4.3. Valores medios (media \pm SEM) de producción de peróxidos lipídicos (TBARS) en muestras cerebrales procedentes de animales normoglucémicos y de animales diabéticos de dos meses de evolución. La producción de TBARS se indujo con sales ferrosas (Fe_2SO_4) y se evaluó el efecto de distintas concentraciones de hidroxitirosol.

TBARS (nmol/mg proteína)		
Hidroxitirosol (μM)	Normoglucemia	Diabetes
0	12.08 \pm 0.45	15.28 \pm 1.19*
0.5	12.00 \pm 0.31	14.63 \pm 1.00
1	12.01 \pm 0.55	12.18 \pm 0.96
10	11.62 \pm 0.57	10.98 \pm 1.25
50	5.14 \pm 0.48	5.07 \pm 0.65
100	2.83 \pm 0.30	1.25 \pm 0.10
500	2.15 \pm 0.11	1.06 \pm 0.09
1000	2.63 \pm 0.29	1.38 \pm 0.15
IC₅₀ (μM)	45.44 \pm 2.58	32.61 \pm 2.55*

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

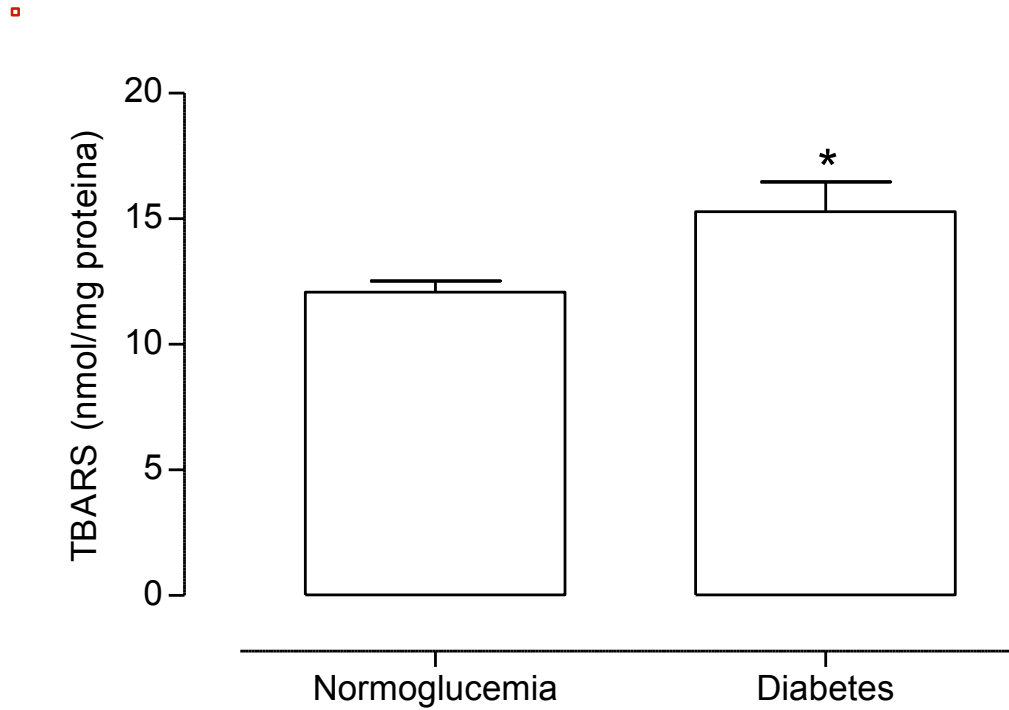


Figura 4.5. Valores basales (sin incubación con hidroxitirosol) de TBARS en muestras inducidas con sales ferrosas (Fe_2SO_4). * $P < 0.05$ respecto a las muestras procedentes de animales normoglucémicos.

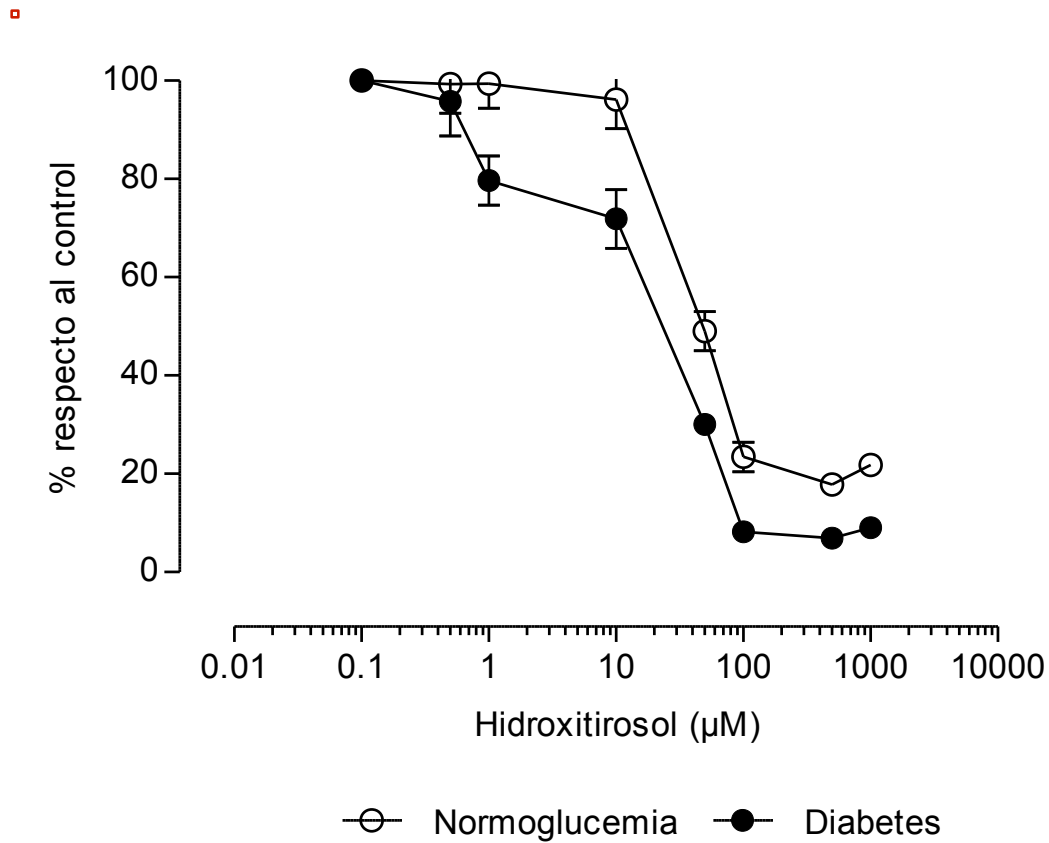


Figura 4.6. Curvas concentración-efecto de producción de TBARS en muestras de tejido cerebral inducidas con sales ferrosas (Fe_2SO_4) procedentes de animales normoglicémicos o diabéticos de dos meses de evolución.

2.2. Efecto neuroprotector *in vitro* de hidroxitirosol

En la Tabla 4.4. se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a la producción de lactato deshidrogenasa (LDH) en muestras de tejido cerebral procedente de animales normoglucémicos y de animales con diabetes experimental inducida con estreptozotocina de dos meses de evolución, sometidos al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación.

En cada una de esos dos grupos se muestra el valor IC_{50} (μM), definido como la concentración micromolar de hidroxitirosol que redujo en un 50% la producción de LDH, respecto a las muestras controles, es decir, sin incubación del compuesto.

En la Figura 4.7. se muestran los valores basales de TBARS en cada una de las dos situaciones experimentales señaladas y en la Figura 4.8. se muestran las curvas concentración-efecto de hidroxitirosol, representando los valores en porcentajes de cambio respecto al valor de LDH obtenido en las muestras controles en cada situación experimental.

Tabla 4.4. Valores medios (media \pm SEM) de producción de lactato deshidrogenasa (LDH) en muestras cerebrales procedentes de animales normoglucémicos y de animales diabéticos de dos meses de evolución y sometidas al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación.

LDH (unidades arbitrarias)		
Hidroxitirosol (μM)	Normoglucemia	Diabetes
0	3.20 \pm 0.18	5.24 \pm 0.38*
0.5	3.22 \pm 0.26	4.14 \pm 0.25
1	3.00 \pm 0.28	3.25 \pm 0.30
10	2.15 \pm 0.16	2.76 \pm 0.11
50	1.78 \pm 0.12	2.05 \pm 0.09
100	1.21 \pm 0.10	0.55 \pm 0.05
500	1.63 \pm 0.18	0.21 \pm 0.03
1000	1.77 \pm 0.21	0.43 \pm 0.05
IC₅₀ (μM)	65.69 \pm 5.60	20.89 \pm 3.68*

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

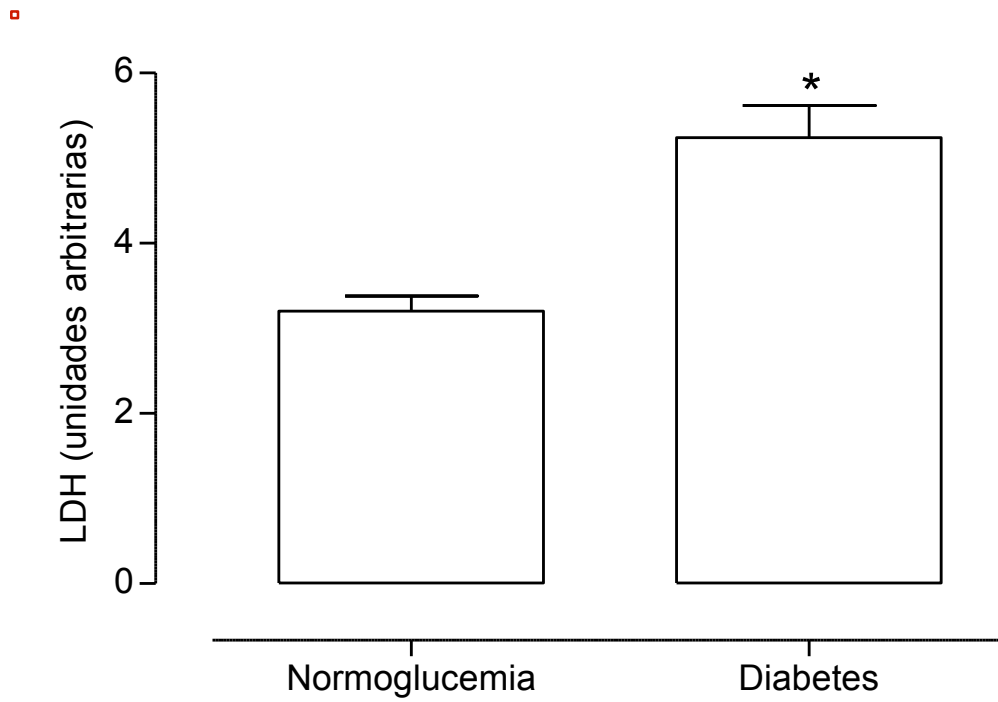


Figura 4.7. Valores basales (sin incubación con hidroxitirosol) de LDH en muestras procedentes de animales normoglucémicos y diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación. *P < 0.05 respecto a las muestras procedentes de animales normoglucémicos.

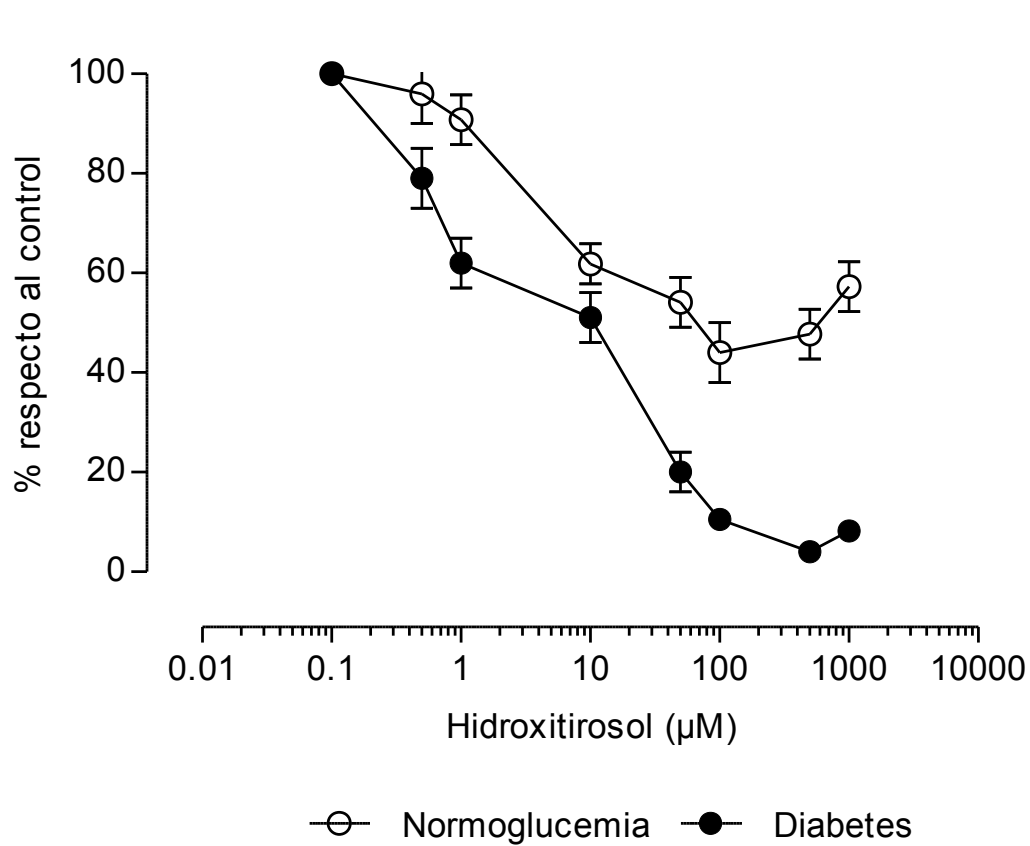


Figura 4.8. Curvas concentración-efecto de producción de LDH en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación.

3. Efecto neuroprotector y de las principales vías bioquímicas de daño tisular en tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados por vía oral con hidroxitirosol y sometidos a un proceso experimental de hipoxia-reoxigenación

En esta sección se mostrarán los resultados obtenidos en los animales normoglucémicos y en los diabéticos de dos meses de evolución, tratados desde el inicio de la diabetes (o el tiempo equivalente en los animales no diabéticos), con 1, 5 o 10 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol.

En todos los casos se realizó el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación cerebral al final del periodo de tratamiento, cuantificando las diversas variables al finalizar la fase de reoxigenación de los cortes cerebrales.

Expondremos los resultados obtenidos en varios apartados:

1. Resultados correspondientes a la muerte celular en los cortes cerebrales sometidos al modelo de hipoxia-reoxigenación.
2. Valoración de las modificaciones determinadas en las variables relacionadas con el estrés oxidativo.
3. Valoración de las modificaciones determinadas en las variables relacionadas con el estrés nitrosativo.
4. Resultados correspondientes a las variables que definen las principales vías inflamatorias cerebrales.

En primer lugar mostraremos los principales resultados de variables zoométricas, a fin de descartar un posible efecto de hidroxitirosol sobre las mismas (Tabla 4.5. y Figura 4.9.).

Tabla 4.5. Valores (media \pm SEM) de las principales variables zoométricas determinadas en los animales normoglucémicos (controles no diabéticos –CND-) a en aquellos con diabetes de dos meses de evolución (controles diabéticos –CD- o diabéticos tratados con hidroxitirisol –HT-)

	CND	CD	HT		HT		HT	
			1 mg/kg/d ND D	5 mg/kg/d ND D	10 mg/kg/d ND D			
Peso (g)	420 \pm 7	387 \pm 16	418 \pm 10	391 \pm 14	421 \pm 9	393 \pm 12	425 \pm 11	350 \pm 14
Glucemia (mg/dL)	102 \pm 3*	491 \pm 8	99.6 \pm 2.5	512 \pm 9	105 \pm 5	474 \pm 14	100 \pm 5	496 \pm 5
Hemáties (X10¹²/L)	8.6 \pm 0.2	9.0 \pm 0.2	8.5 \pm 0.2	8.2 \pm 0.2	8.5 \pm 0.1	8.6 \pm 0.2	8.6 \pm 0.3	8.2 \pm 0.7
Leucocitos (X10⁶/L)	6.1 \pm 0.3	6.4 \pm 1.9	6.1 \pm 0.4	5.3 \pm 0.4	6.2 \pm 0.2	5.0 \pm 0.3	6.0 \pm 0.3	5.1 \pm 0.6
Plaquetas (X10⁶/L)	909 \pm 33	924 \pm 20	895 \pm 58	882 \pm 30	916 \pm 41	890 \pm 22	905 \pm 50	925 \pm 13
Hb (g/L)	16.0 \pm 0.4	16.7 \pm 0.5	16.1 \pm 0.3	16.3 \pm 0.3	16.1 \pm 0.3	16.7 \pm 0.3	16.0 \pm 0.3	16.4 \pm 0.5
Hematocrito (%)	46.8 \pm 1.0	46.4 \pm 1.3	46.5 \pm 2.6	45.8 \pm 0.8	46.5 \pm 0.9	48.4 \pm 0.7	46.5 \pm 0.9	45.2 \pm 1.2

*P < 0.05 respecto al resto de grupos diabéticos

D: animales diabéticos. ND: animales no diabéticos

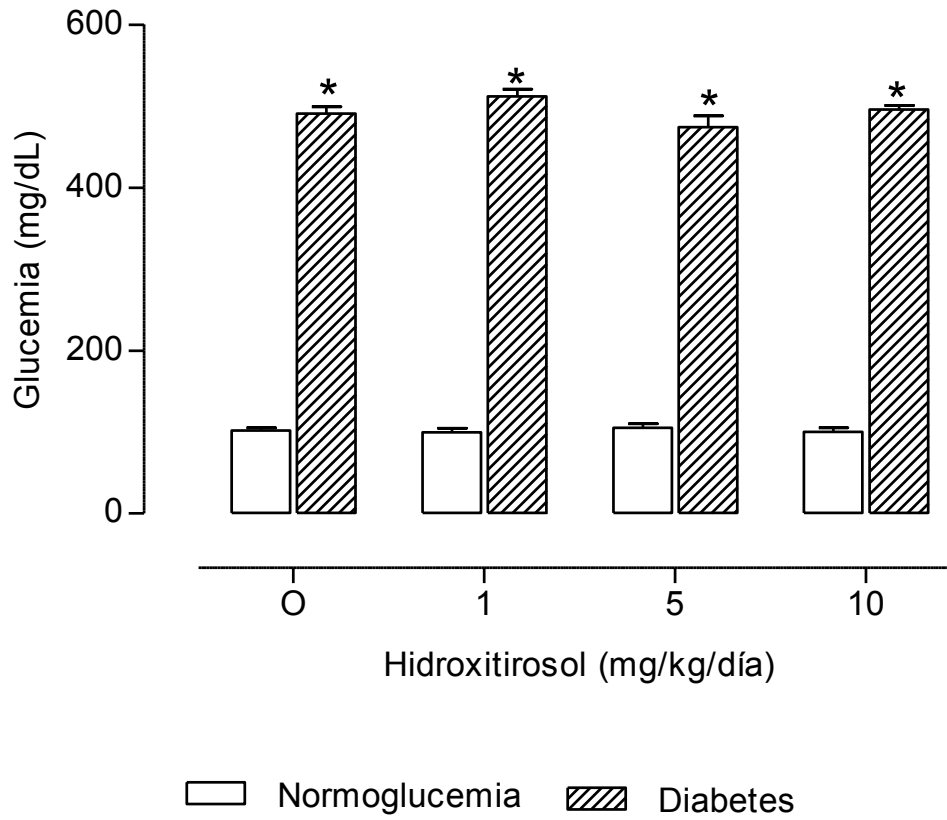


Figura 4.9. Valores medios de glucemia al finalizar el tratamiento con hidroxitirosol en los animales normoglucémicos y en los diabéticos de dos meses de evolución. *P < 0.0001 respecto a los valores de los animales normoglucémicos.

3.1. Resultados correspondientes a la muerte celular en los cortes cerebrales sometidos al modelo de hipoxia-reoxigenación.

En la Tabla 4.6. se representan los valores medios (media \pm SEM) de los valores de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de las muestras cerebrales sometidas al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación, tras el periodo de reoxigenación, correspondientes a los animales normoglucémicos y a los diabéticos de dos meses de evolución, tratados con suero fisiológico (grupos controles), 1, 5 ó 10 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol.

Tabla 4.6.

LDH (unidades arbitrarias)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	0,10 \pm 0.02	0,10 \pm 0.02
0	3,10 \pm 0.10	3,97 \pm 0.29*
1	2,50 \pm 0.08	2,49 \pm 0.21
5	2,20 \pm 0.26	2,38 \pm 0.13
10	1,90 \pm 0.21	2,54 \pm 0.36

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

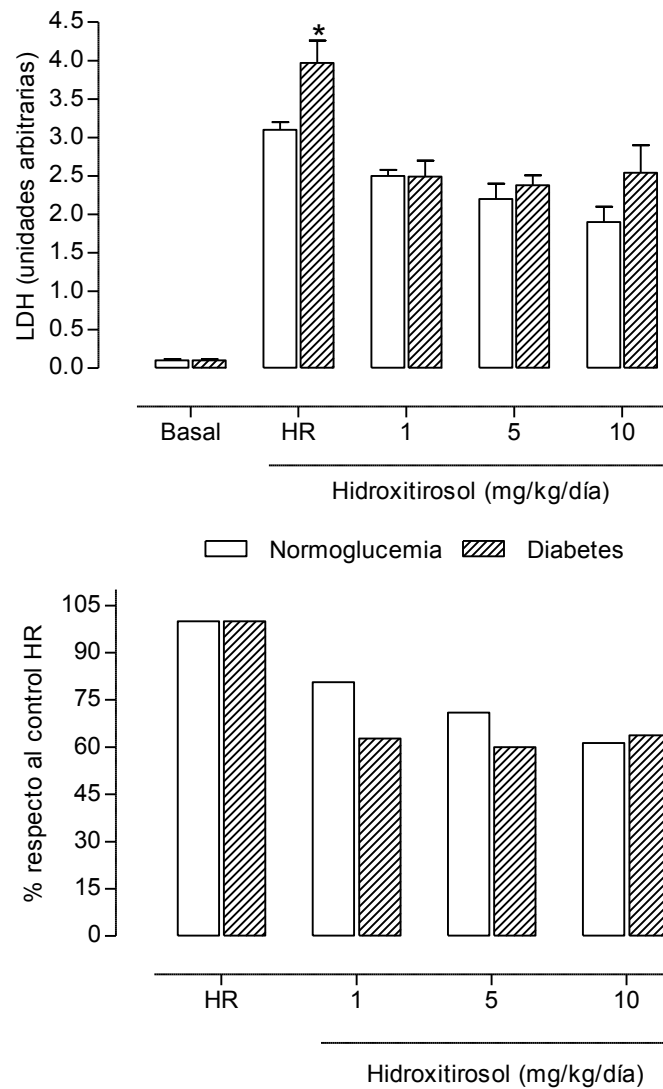


Figura 4.10. Producción de LDH en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol. *P < 0.05 respecto al grupo normoglucémico.

3.2. Valoración de las modificaciones determinadas en las variables relacionadas con el estrés oxidativo.

En las Tablas 4.7. a 4.10. se representan los valores medios (media \pm SEM) de los valores de las variables relacionadas con el estrés oxidativo en las muestras cerebrales sometidas al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación, tras el periodo de reoxigenación, correspondientes a los animales normoglucémicos y a los diabéticos de dos meses de evolución, tratados con suero fisiológico (grupos controles), 1, 5 ó 10 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol.

Las variables cuantificadas han sido las siguientes:

- Peróxidos lipídicos, determinados mediante los productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Tabla 4.7.).
- Concentración tisular de glutatión reducido (GSH) (Tabla 4.8.).
- Porcentaje de glutatión oxidado (GSSG) en relación a la cantidad de glutatión total (Tablas 4.9.).
- Actividad glutatión peroxidasa (GSHpx) (Tabla 4.10.).

En las Figuras 4.11. a 4.14. se representan gráficamente en forma de histograma, estos resultados así como los porcentajes de cambio calculados en cada grupo respecto a su control, es decir, al valor obtenido en los animales sin tratamiento con hidroxitirosol.

Tabla 4.7. Valores de peróxidos lipídicos (TBARS) en muestras de tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con hidroxitirosol sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación.

TBARS (nmol/mg proteína)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	3,60 ± 0.31	3,84 ± 0.41
0	8,72 ± 0.53	13,30 ± 0.81*
1	7,81 ± 0.50	8,80 ± 0.75
5	6,85 ± 0.38	7,35 ± 0.64
10	5,94 ± 0.55	7,81 ± 1.23

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

Tabla 4.8. Valores de glutatión reducido (GSH) en muestras de tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con hidroxitirosol sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación.

GSH (μmol/g tejido)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	16,00 ± 0.62	15,41 ± 1.02
0	8,84 ± 0.25	5,66 ± 0.32*
1	13,11 ± 0.86	5,63 ± 0.39*
5	14,10 ± 0.75	5,92 ± 0.46*
10	15,51 ± 0.93	6,52 ± 0.30*

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

□

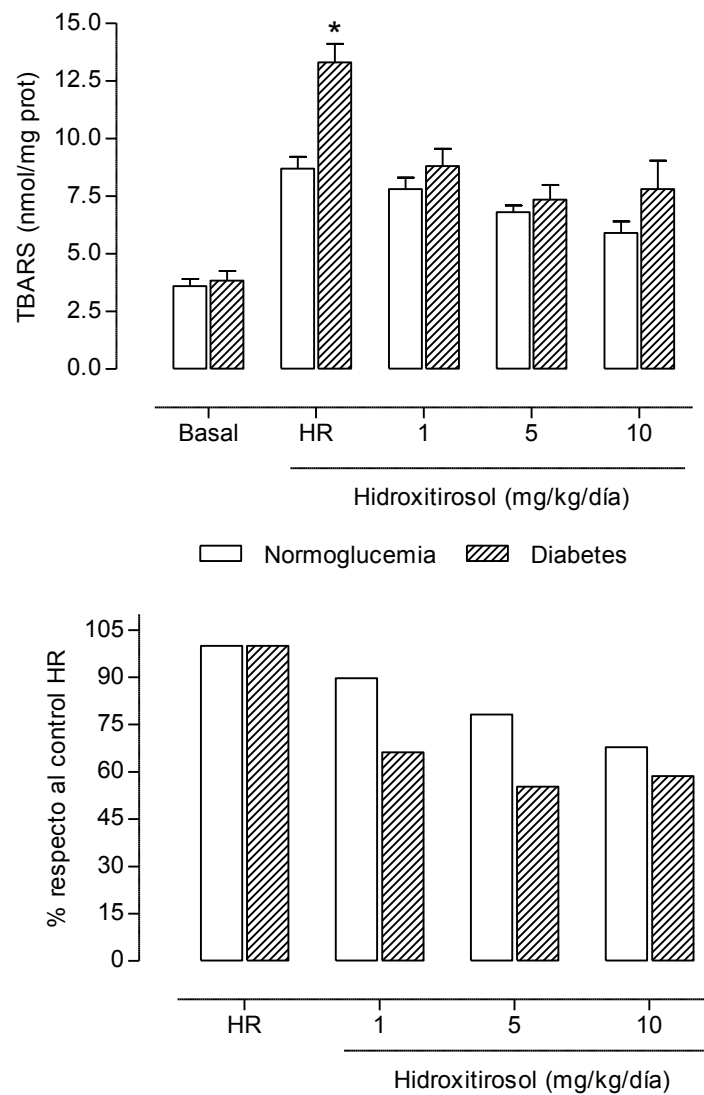


Figura 4.11. Concentración de peróxidos lipídicos (TBARS) en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol. * $P < 0.05$ respecto al grupo normoglucémico.

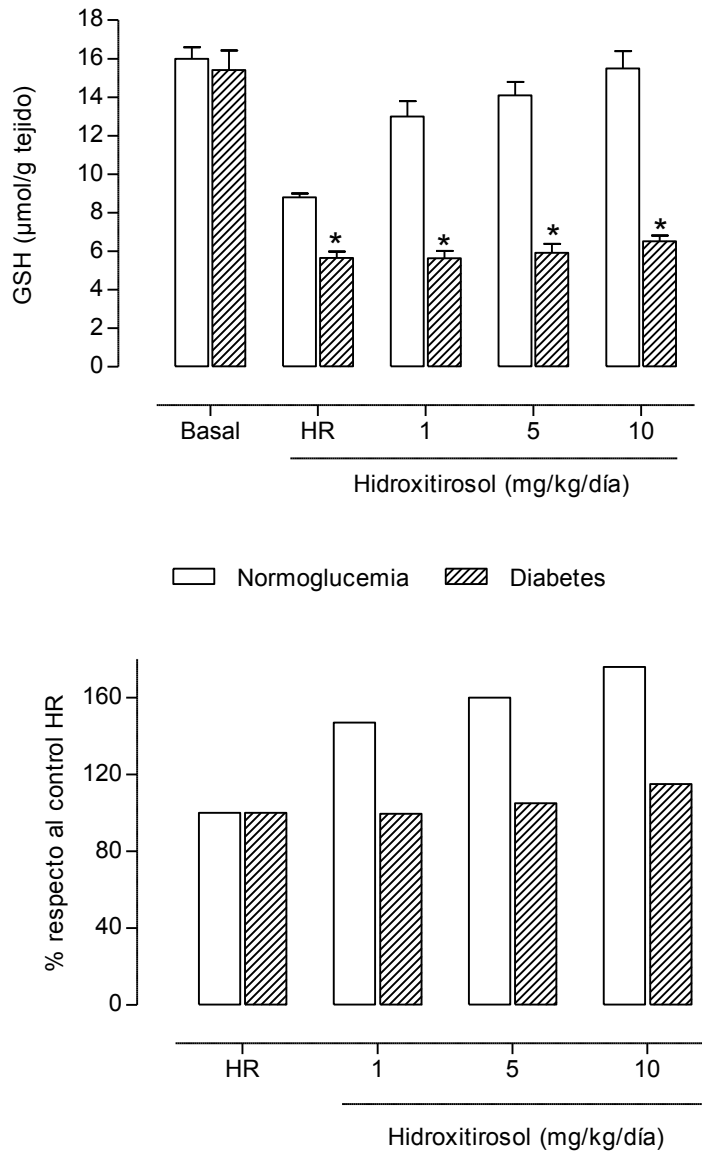


Figura 4.12. Concentración de glutatión reducido (GSH) en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol.

* $P < 0.05$ respecto al grupo normoglucémico.

Tabla 4.9. Valores de porcentaje de glutatión oxidado (GSSG) respecto a la concentración de glutatión total (GSH+GSSG) en muestras de tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con hidroxitirosol sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación.

%GSSG respecto a (GSH+GSSG)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	16,42 ± 0.41	15,92 ± 0.64
0	13,95 ± 0.22	21,13 ± 0.81*
1	16,30 ± 0.43	22,13 ± 0.79*
5	16,75 ± 0.60	20,94 ± 1.02*
10	16,46 ± 0.71	19,58 ± 0.76

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

Tabla 4.10. Valores de actividad glutatión peroxidasa (GSHpx) en muestras de tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con hidroxitirosol sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación.

GSHpx (µmol/min/mg proteína)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	5,20 ± 0.45	5,05 ± 0.54
0	6,63 ± 0.38	11,54 ± 0.36*
1	7,45 ± 0.55	9,72 ± 0.10*
5	7,57 ± 0.36	9,03 ± 0.15*
10	8,11 ± 0.30	9,91 ± 0.11*

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

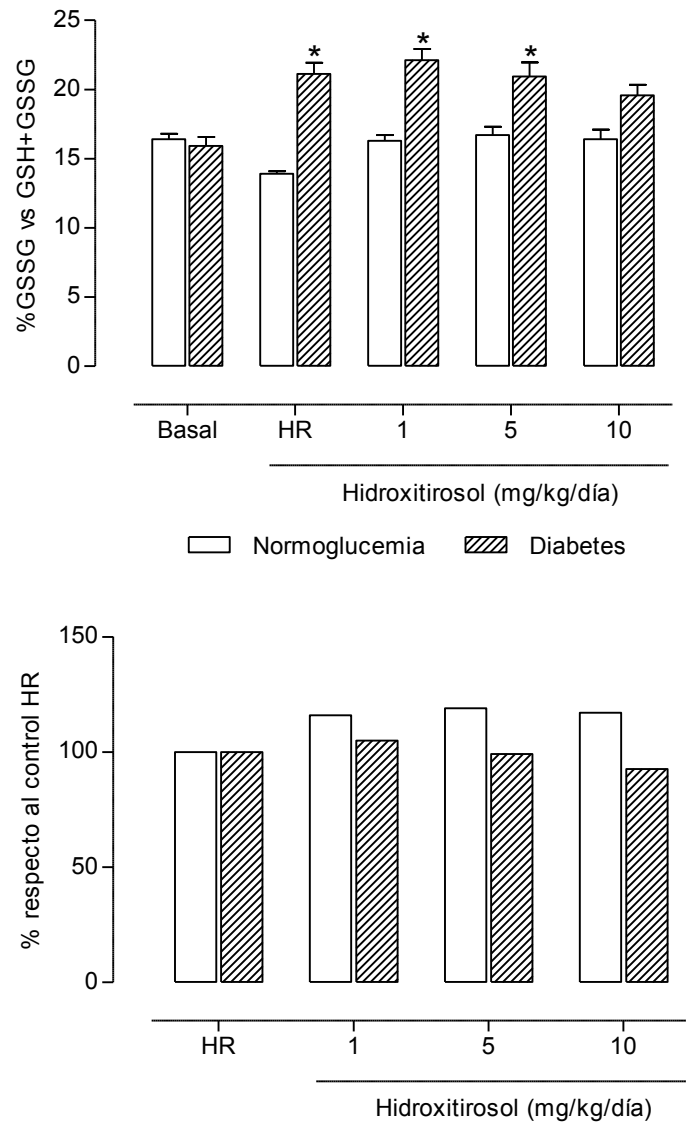


Figura 4.13. Porcentaje de glutatión oxidado (GSSG) respecto a glutatión total (GSH+GSSG) en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol. *P < 0.05 respecto al grupo normoglucémico.

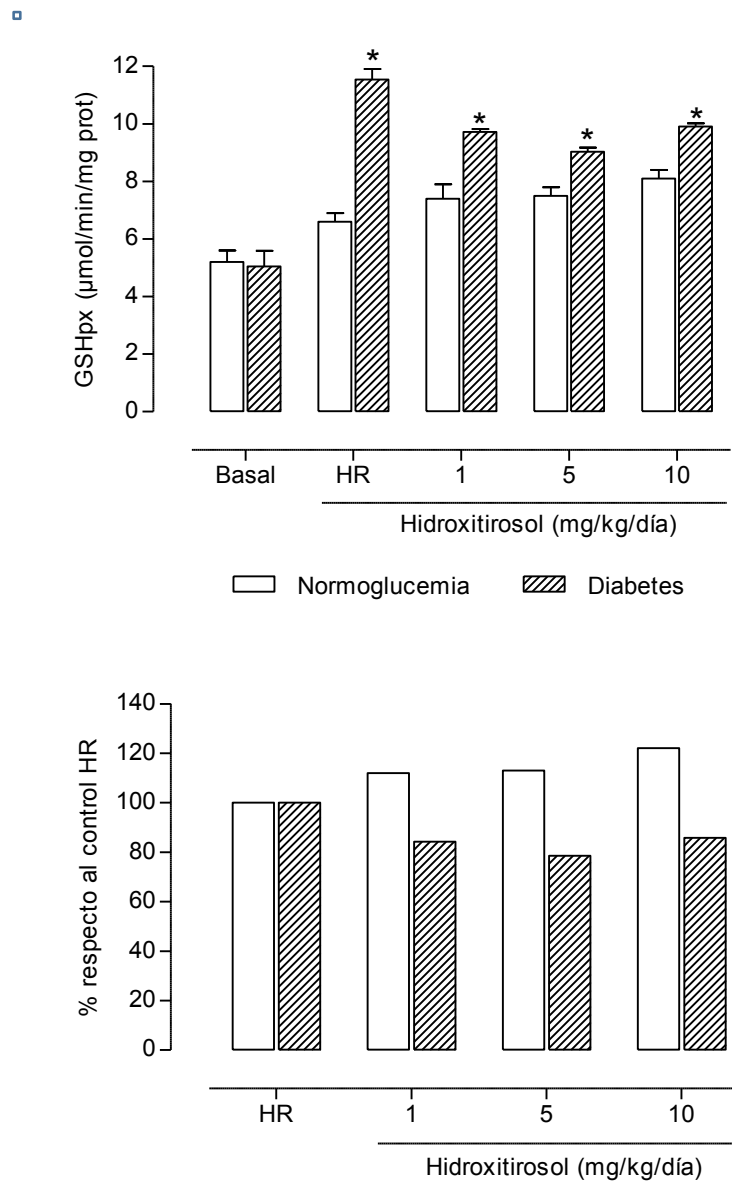


Figura 4.14. Actividad glutatión peroxidasa (GSHpx) en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol.

*P < 0.05 respecto al grupo normoglucémico.

3.3. Valoración de las modificaciones determinadas en las variables relacionadas con el estrés nitrosativo.

En las Tablas 4.11. y 4.12. se representan los valores medios (media \pm SEM) de los valores de las variables relacionadas con el estrés nitrosativo en las muestras cerebrales sometidas al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación, tras el periodo de reoxigenación, correspondientes a los animales normoglucémicos y a los diabéticos de dos meses de evolución, tratados con suero fisiológico (grupos controles), 1, 5 ó 10 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol.

Las variables cuantificadas han sido las siguientes:

- Concentración de nitritos más nitratos, como índice de producción de óxido nítrico (Tabla 4.11.).
- Concentración de 3-nitrotirosina, como índice de producción de peroxinitritos (Tabla 4.12.).

En las Figuras 4.15. y 4.16. se representan gráficamente en forma de histograma, estos resultados así como los porcentajes de cambio calculados en cada grupo respecto a su control, es decir, al valor obtenido en los animales sin tratamiento con hidroxitirosol.

Tabla 4.11. Valores de nitritos más nitratos ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) en muestras de tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con hidroxitirosol sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación.

$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (pmol/0.1 g tejido)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	6,82 ± 0.70	6,51 ± 0.64
0	17,85 ± 1.11	26,25 ± 1.26*
1	17,76 ± 1.55	24,18 ± 0.83*
5	16,93 ± 1.23	13,66 ± 1.35
10	14,50 ± 1.13	15,60 ± 1.50

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

Tabla 4.12. Valores de 3-nitrotirosina en muestras de tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con hidroxitirosol sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación.

3-nitrotirosina (nmol/0.1 g tejido)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	1,15 ± 0.22	0,94 ± 0.03
0	3,91 ± 0.20	6,92 ± 0.81*
1	3,00 ± 0.23	3,93 ± 0.45
5	2,11 ± 0.18	2,03 ± 0.29
10	1,24 ± 0.10	1,75 ± 0.07

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

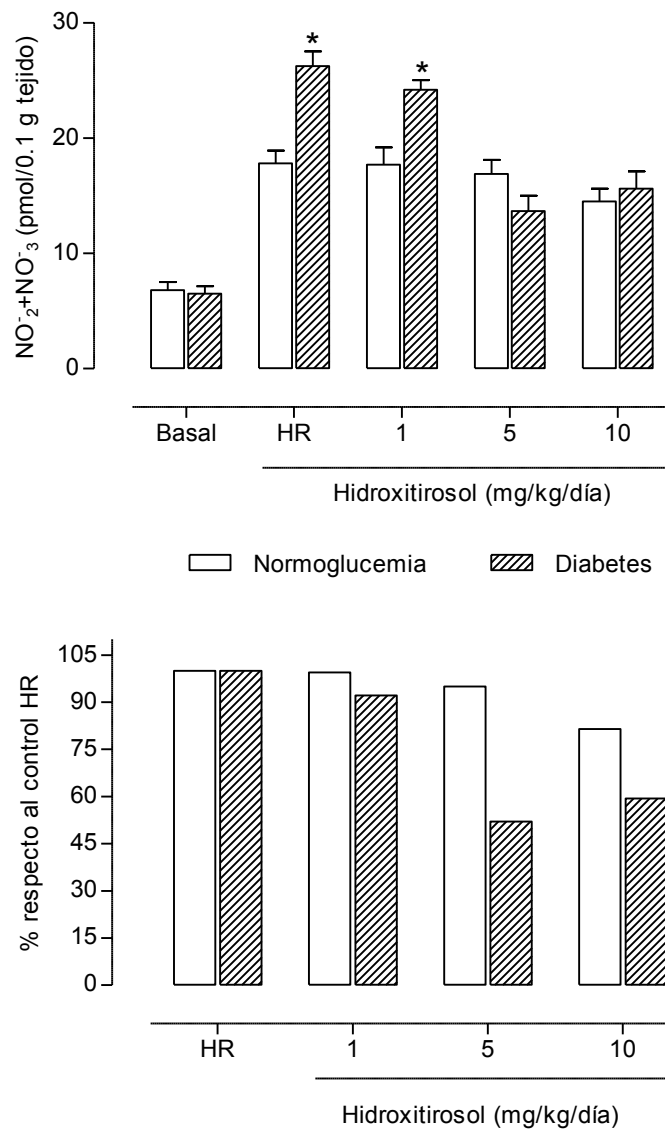


Figura 4.15. Concentración de nitritos más nitratos ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol. * $P < 0.05$ respecto al grupo normoglucémico.

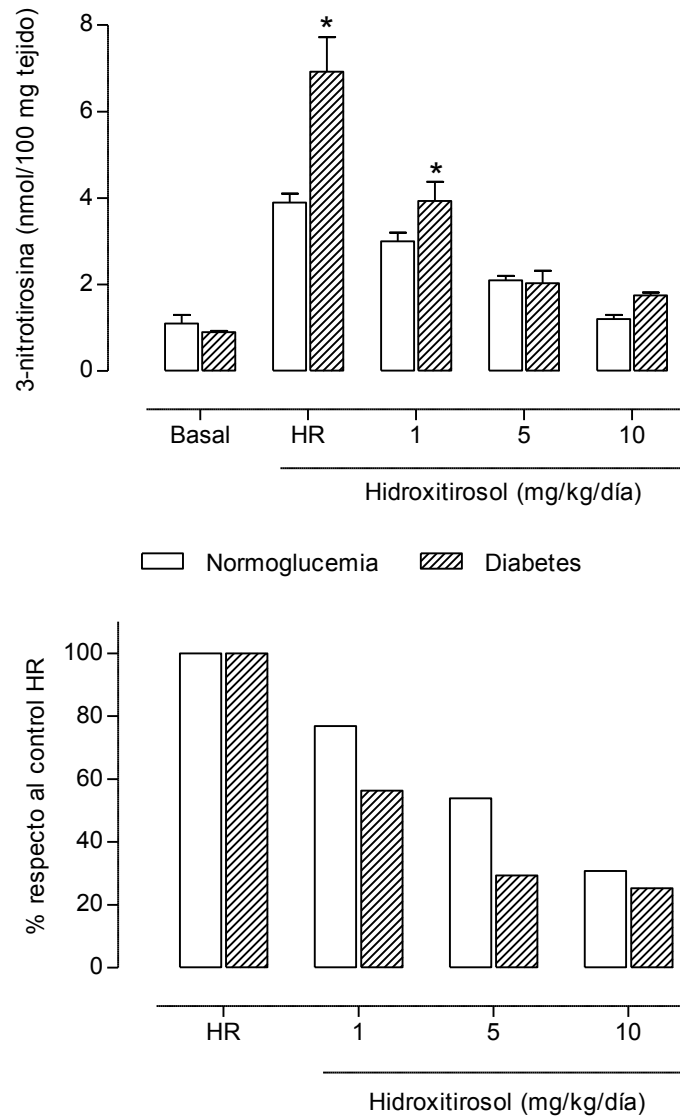


Figura 4.16. Concentración de 3-nitrotirosina en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol. *P < 0.05 respecto al grupo normoglucémico.

3.4. Resultados correspondientes a las variables que definen las principales vías inflamatorias cerebrales.

En las Tablas 4.13. y 4.14. se representan los valores medios (media \pm SEM) de los valores de las variables relacionadas con los mediadores inflamatorios en las muestras cerebrales sometidas al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación, tras el periodo de reoxigenación, correspondientes a los animales normoglucémicos y a los diabéticos de dos meses de evolución, tratados con suero fisiológico (grupos controles), 1, 5 ó 10 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol.

Las variables cuantificadas han sido las siguientes:

- Concentración de prostaglandina E₂ (Tabla 4.13.).
- Concentración de interleucina 1 β (Tabla 4.14.).

En las Figuras 4.17. y 4.18. se representan gráficamente en forma de histograma, estos resultados así como los porcentajes de cambio calculados en cada grupo respecto a su control, es decir, al valor obtenido en los animales sin tratamiento con hidroxitirosol.

Tabla 4.13. Valores de prostaglandina E₂ (PGE₂) en muestras de tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con hidroxitirosol sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación.

PGE ₂ (pg/0.1 g tejido)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	19,00 ± 0.85	21,45 ± 2.08
0	56,25 ± 1.32	105 ± 5*
1	52,14 ± 1.08	85,44 ± 7.49*
5	40,00 ± 1.64	85,26 ± 10.06*
10	29,46 ± 0.68	62,37 ± 8.00*

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

Tabla 4.14. Valores de interleucina 1β (IL-1β) en muestras de tejido cerebral de animales normoglucémicos y diabéticos tratados con hidroxitirosol sometidas al modelo de hipoxia-reoxigenación.

IL-1β (pg/0.1 g tejido)		
Hidroxitirosol (mg/kg/día p.o.)	Normoglucemia	Diabetes
Basal	16,25 ± 0.51	16,50 ± 0.97
0	35,41 ± 2.63	49,73 ± 1.54*
1	25,14 ± 1.50	49,60 ± 1.68*
5	22,78 ± 1.12	33,92 ± 1.45*
10	20,39 ± 1.73	20,93 ± 0.55

*P < 0.05 respecto a las muestras equivalentes de los animales normoglucémicos

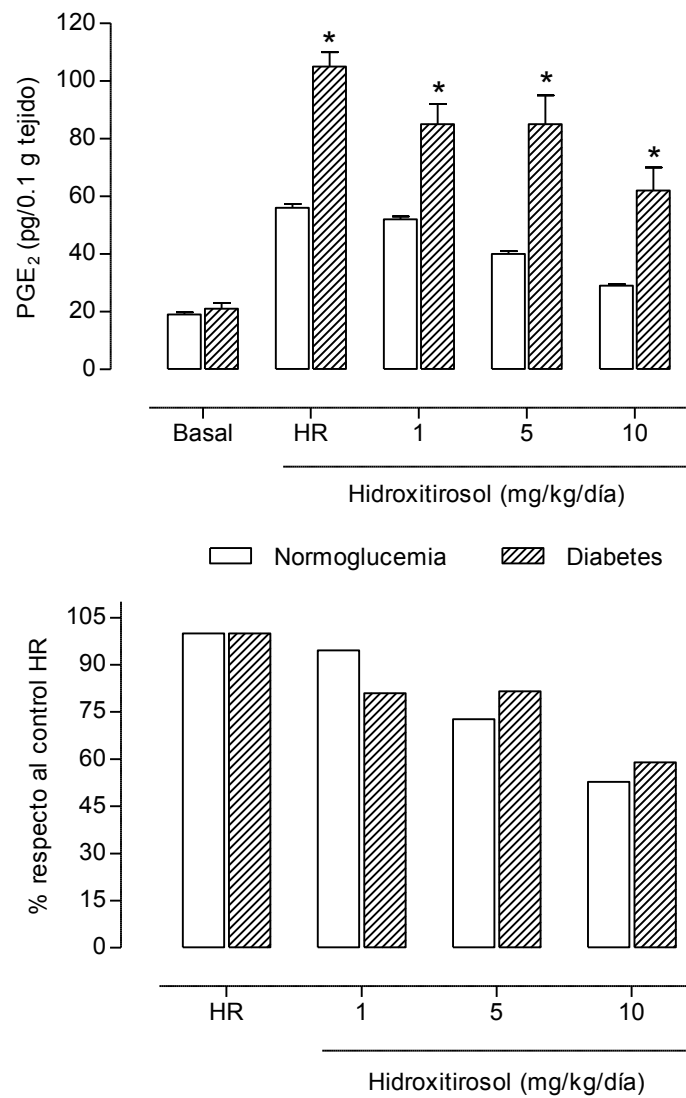


Figura 4.17. Concentración de prostaglandina E₂ (PGE₂) en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol.

*P < 0.05 respecto al grupo normoglucémico.

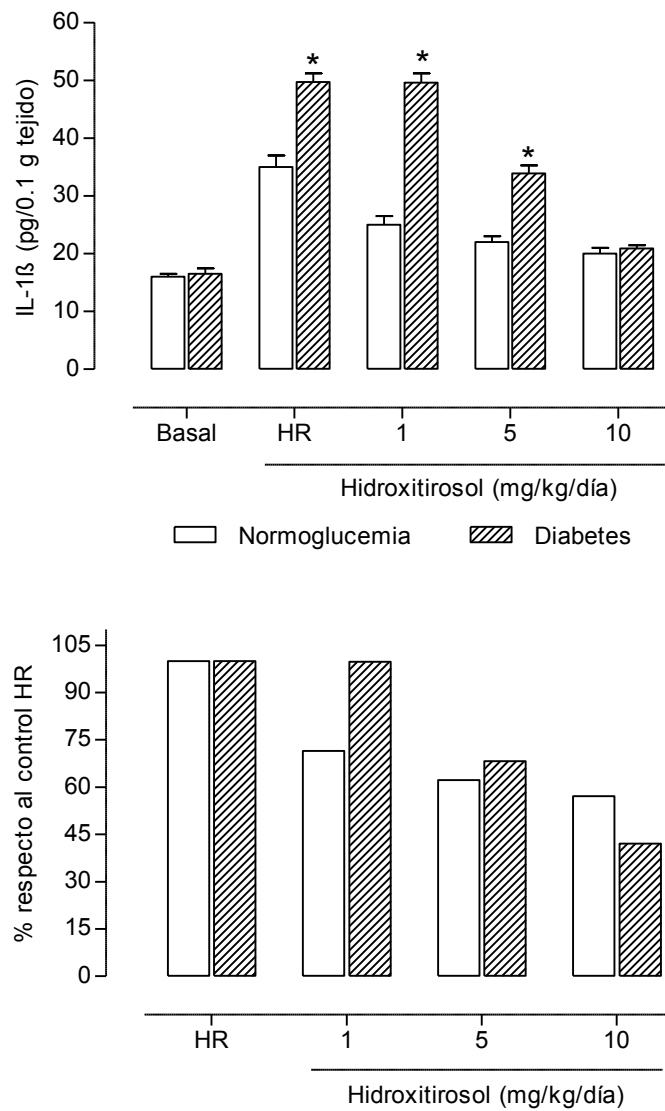


Figura 4.18. Concentración de interleucina 1 β (IL-1 β) en muestras de tejido cerebral procedentes de animales normoglucémicos o diabéticos de dos meses de evolución tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación (HR), tratados con hidroxitirosol.

*P < 0.05 respecto al grupo normoglucémico.

5. DISCUSIÓN





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En el desarrollo temporal del presente estudio hemos seguido una secuencia conceptual basada en una serie de pasos consecutivos basados en hallazgos previos ya conocidos, los cuales sirvieron como base de impulso hacia el intento de responder al objetivo principal, es decir, valorar si la administración de hidroxitirosol ejercía un efecto neuroprotector distinto en la diabetes mellitus respecto al observado en situación de normoglucemia.

Antes de comenzar con el análisis de los resultados obtenidos, hemos de considerar algunas premisas que han configurado el cuerpo de doctrina del trabajo realizado. La secuencia de experimentos tuvo la siguiente fundamentación.

1. En primer lugar, las principales acciones reconocidas para el hidroxitirosol se basan fundamentalmente en su capacidad antioxidante tisular. Este efecto ha sido ampliamente descrito en la bibliografía, tanto en modelos químicos como en biológicos (véase revisiones de Raederstorff, 2009 y de Granados-Principal et al., 2010). No obstante, a fin de establecer el primer escalón secuencial en el modelo experimental utilizado en nuestro estudio, quisimos confirmar este efecto *in vitro* en cortes cerebrales, utilizando dos formas de estimulación de estrés oxidativo, tal y como se describió en trabajos previos de nuestro grupo (Cabrerizo et al., 2014; De La Cruz et al., 2015).

2. En este mismo estadio quisimos confirmar que hidroxitirosol ejercía un efecto neuroprotector en situaciones *in vitro* de estímulo de estrés oxidativo cerebral, eligiendo las mismas inducciones que para estudiar el efecto antioxidante. Asimismo, este efecto fue demostrado en trabajos previos de nuestro grupo, fundamentalmente utilizando el modelo de hipoxia-reoxigenación cerebral (Cabrerizo et al., 2014; González-Correa et al., 2008).

3. Una vez confirmado el efecto antioxidante y neuroprotector *in vitro* en tejido cerebral procedente de animales normoglucémicos, quisimos valorar si en esta misma situación experimental, ambos efectos diferían o no respecto al observado en cortes cerebrales procedentes de animales diabéticos. En este sentido, partíamos de la base de un estudio de nuestro grupo en el que se demostró que el tejido cerebral de animales diabéticos era

más sensible a padecer un daño isquémico que el procedente de animales normoglucémicos (González-Correa et al., 2006).

4. El último paso de la secuencia experimental consistió en administrar hidroxitirosol a animales diabéticos y normoglucémicos y valorar el efecto neuroprotector en ambas situaciones. En este punto nos basamos en trabajos previos de nuestro grupo (Cabrerizo et al., 2014; De La Cruz et al., 2015; González-Correa et al., 2008; Guerrero et al., 2012) en los que se demostraba que el efecto de hidroxitirosol en el modelo de hipoxia-reoxigenación de cortes cerebrales de ratas normoglucémicas, no solo era responsabilidad de su acción antioxidante tisular, sino también debida a un efecto a distintos niveles bioquímicos, fundamentalmente el estrés nitrosativo y los mediadores inflamatorios. Por eso, en esta fase de la experimentación analizamos en los animales diabéticos y en los normoglucémicos, además del estrés oxidativo, las citadas vías bioquímicas en los cortes cerebrales sometidos a hipoxia-reoxigenación.

Atendiendo a esta secuencia, comentaremos los principales resultados obtenidos en el presente estudio.

1. Efecto antioxidante *in vitro* de hidroxitirosol en tejido cerebral

El efecto citoprotector de los polifenoles de diversos alimentos ha sido directamente relacionado con su reconocido efecto antioxidante (González-Correa et al., 2008; Pereira-Caro et al., 2011; Schaffer et al., 2007). Por esta razón, se cuantificaron la principal variable de estrés oxidativo (peroxidación lipídica) para determinar el efecto antioxidante de hidroxitirosol en los cortes de cerebro de rata. Para ello, realizamos estas determinaciones en tres tipos de experimentos:

- Tejido cerebral oxigenado.
- Tejido cerebral con inducción de origen químico del estrés oxidativo.

- Tejido cerebral con inducción del estrés oxidativo mediante hipoxia-reoxigenación.

En primer lugar se determinó el posible efecto antioxidante de hidroxitirosol en cortes de cerebro sin estímulo del estrés oxidativo, para ello se mantuvieron oxigenados durante todo el tiempo experimental. En estas condiciones en ningún caso se modificó significativamente la peroxidación lipídica (índice de daño oxidativo tisular) (Tabla 4.1.).

Este comportamiento es coherente con la de la mayoría de los compuestos antioxidantes, que ejercen su efecto sólo en situaciones de estrés oxidativo y no muestran ningún efecto en las situaciones de equilibrio bioquímico. Esta falta de efecto sobre el estado oxidativo celular es importante porque significa que hidroxitirosol no altera el equilibrio redox celular fisiológico.

En segundo lugar, hemos estudiado el posible efecto antioxidante de estos compuestos en una situación de inducción química del estrés oxidativo en el tejido cerebral oxigenado. Se indujo la producción peroxidación lipídica con sales ferrosas. En esta situación hidroxitirosol inhibió la producción de peróxidos lipídicos de una manera concentración-dependiente (Figura 4.2.). Este efecto se cuantificó principalmente en un rango 10^{-5} M, tomando como referencia al valor de IC_{50} ($49.60 \pm 3.25 \mu\text{M}$). Estos resultados son consistentes con los publicados por Pereira-Caro et al. (2011), quienes demostraron que la incubación de derivados alquil éter de hidroxitirosol no mostró ningún efecto significativo sobre los niveles de malondialdehído en cultivos de células HepG2 no inducidos, pero mostraron un efecto inhibitorio en las células tratadas con t-BOOH.

En tercer lugar, realizamos experimentos en los que se indujo el estrés oxidativo en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en cortes de cerebro de rata. En este modelo se observó un aumento de la peroxidación lipídica (Figura 4.1.). La importancia de este modelo es que el estrés oxidativo no fue inducido externamente con un producto químico, sino que fue el resultado de la activación o la inhibición de diferentes vías bioquímicas intracelulares que son alteradas después de la privación de

oxígeno y de glucosa y la reoxigenación posterior. Este proceso es similar al de las alteraciones producidas en el ictus isquémico en humanos (Sahota y Savitz, 2011).

Hidroxitirosol inhibe la peroxidación lipídica en el modelo de hipoxia-reoxigenación. Este efecto antioxidante pudiera ser el mecanismo más directo para explicar el efecto neuroprotector de este compuesto, aunque debemos especificar que, desde un punto de vista cuantitativo, la inhibición de la peroxidación lipídica parece predominar.

Por lo tanto, confirmamos que hidroxitirosol muestra un efecto antioxidante (concretamente antiperoxidativo lipídico) *in vitro* en cortes cerebrales de animales normoglucémicos cuando el estrés oxidativo es inducido, ya sea mediante estimulación química o mediante el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación cerebral.

2. Efecto neuroprotector *in vitro* de hidroxitirosol en tejido cerebral

Los resultados obtenidos en esta fase del estudio muestran que hidroxitirosol presenta un efecto neuroprotector *in vitro* en cortes cerebrales de rata. Este efecto se deriva de la reducción en el flujo de LDH que se observó tras la estimulación de la peroxidación lipídica con sales ferrosas y tras el periodo de reoxigenación en las muestras incubadas, respecto a las muestras controles (Figura 4.4.). La potencia relativa de protección celular (IC_{50}) se encontraba en el rango 10^{-5} M tras la hipoxia-reoxigenación y en el rango 10^{-4} M tras estimulación con sales ferrosas.

En este sentido el efecto neuroprotector de los polifenoles contenidos en diversos tipos de alimentos ha sido documentado en la bibliografía utilizando diversos métodos experimentales (Craggs & Kalaria, 2011; Panickar & Jang, 2013). Estos estudios han relacionado este efecto principalmente con las conocidas propiedades antioxidantes de los polifenoles, aunque también se han postulado otros mecanismos adicionales para algunos de estos compuestos, por ejemplo, la inhibición de mediadores inflamatorios o acumulación de prostaglandinas (Simonyi et al., 2005).

El efecto citoprotector de estos polifenoles ha sido demostrado en otros tipos celulares no neuronales. En cultivos de células HepG2, hidroxitirosol y algunos derivados eterificados han mostrado un efecto citoprotector (Goya et al., 2007) en presencia del agente citotóxico ter-butil hidroperóxido (t-BOOH) (Pereira-Caro et al., 2011).

La afirmación de que el efecto neuroprotector de hidroxitirosol podría ser debido no solo a su acción antioxidante se puede deducir al comparar los valores de IC₅₀ para peroxidación lipídica y para neuroprotección:

Tabla 5.1.

	Peroxidación lipídica	Neuroprotección
No inducción	> 1000	> 1000
Sales ferrosas	49.60 ± 3.25	368 ± 52*
Hipoxia-reoxigenación	47.49 ± 3.84	70.45 ± 5.25

*P < 0.05 respecto al valor de IC₅₀ para la peroxidación lipídica inducida con sales ferrosas y respecto al valor de IC₅₀ para neuroprotección inducida con hipoxia-reoxigenación

Podemos apreciar que cuando el daño cerebral se induce con sales ferrosas, es decir, cuando es derivado de la producción de estrés oxidativo, el efecto neuroprotector de hidroxitirosol es un rango molar inferior que cuando se induce éste con el modelo de hipoxia-reoxigenación (10⁻⁴ frente a 10⁻⁵ M), es decir, cuando se ponen en marcha diversas vías bioquímicas que complementan al estrés oxidativo en la consecución del daño neuronal. Como complemento de apoyo, el poder antioxidante de hidroxitirosol es similar en ambas situaciones. Por todo ello pensamos que hidroxitirosol posee un efecto antioxidante, que participa en su acción neuroprotectora, si bien no se puede explicar todo este efecto solo mediante una inhibición del estrés oxidativo.

3. Efecto antioxidante y neuroprotector *in vitro* de hidroxitirosol en tejido cerebral procedente de animales diabéticos

Respecto a la producción de peróxidos lipídicos, en los animales diabéticos se produjo un 26.5% más cantidad de TBARS, respecto a los animales normoglucémicos, tras la inducción con sales ferrosas. Nuestros resultados coinciden con los ya publicados por diversos autores que mostraron una mayor tasa de peróxidos lipídicos en la diabetes, ya sea en animales estreptozotocin-diabéticos (De Morais et al., 2014) o en pacientes humanos afectados de diabetes tipo I (Răchișan et al., 2014) o tipo II (Chattopadhyay et al., 2015), sobre todo en aquellos con un mal control de los niveles de glucemia, situación que es reproducida en nuestro modelo experimental de diabetes. Este incremento en la producción de peróxidos lipídicos puede ser debido al ya conocido incremento en la producción de radicales libres en la diabetes, ya sean derivados de los productos finales de glicación o de la activación de la vía metabólica del sorbitol. Sea de una forma u otra, los peróxidos lipídicos a nivel cerebral indican que ese tejido es más propenso al daño oxidativo, ya que la base del mismo ya está incrementada en las membranas celulares.

En cuanto al daño tisular tras la hipoxia-reoxigenación, determinado mediante la producción de LDH, éste es casi un 64% mayor en los animales diabéticos, respecto a los normoglucémicos, tras la reoxigenación de los cortes cerebrales. En este sentido encontramos diversos trabajos en la bibliografía consultada, que demuestran una mayor susceptibilidad de las neuronas o tejido cerebral diabético al daño isquémico, respecto a una situación de normoglucemia. Así, ya es clásico el estudio de Tekkök et al. (1998), quienes demostraron que cortes de hipocampo cerebral de ratas estreptozotocin-diabéticas muestran una menor velocidad de transmisión sináptica al someterlos a un déficit de glucosa, que las sinapsis equivalentes en animales no diabéticos. Respecto a modelos de isquemia *in vivo*, son más numerosos los trabajos que se han realizado comparando la sensibilidad de los cerebros de ratas diabéticas respecto a las normales, ya sea tras una isquemia transitoria originada por ligadura arterial periférica (Liu et al., 2015) o de la arteria cerebral media, de una forma transitoria (Jing et al., 2014) o

permanente (Liang et al., 2014). En todos los casos se concluye que el daño neuronal, fundamentalmente valorado histológicamente, es mayor en los animales estreptozotocin-diabéticos, encontrándose una mayor graduación de muerte neuronal, así como un incremento en los parámetros que definen y marcan el grado de apoptosis neuronal.

La incubación de las muestras cerebrales procedentes de animales diabéticos con hidroxitirosol produjo una inhibición de ambas variables: redujo la peroxidación lipídica y disminuyó la muerte celular tras la hipoxia-reoxigenación. No obstante, se apreciaron algunas diferencias en el efecto de este compuesto según el origen de los cortes cerebrales. Podemos resumir estos resultados en la siguiente tabla, en la que se muestran los valores de IC₅₀ (μM) en cada caso:

Tabla 5.2.

	Peroxidación lipídica	Neuroprotección
Normoglucemia	45.44 ± 2.58	65.69 ± 5.60
Diabetes	32.61 ± 2.55*	20.89 ± 3.68*

*P < 0.05 respecto al valor de IC₅₀ en las muestras procedentes de animales normoglicémicos

Tanto el efecto antioxidante como el neuroprotector de hidroxitirosol se muestra con mayor potencia en tejido cerebral procedente de animales diabéticos que normoglicémicos. Esta diferencia podría enmarcarse en la ya conocida mayor capacidad de la mayor parte de los antioxidantes para inhibir la producción y/o daño de los radicales libres en situaciones de estrés oxidativo respecto a un escenario de equilibrio oxidativo tisular. Es más, en este mismo estudios hemos comprobado cómo hidroxitirosol mostraba una potencia antiperoxidativa lipídica mayor cuando el tejido cerebral era estimulado con sales ferrosas o mediante el modelo de hipoxia-reoxigenación, respecto a una situación de oxigenación normal sin estímulo oxidativo exógeno.

Por lo tanto, si añadimos a la estimulación del estrés oxidativo en el modelo de hipoxia-reoxigenación, la inducción adicional de la diabetes mellitus, podemos establecer un estado cerebral de mayor estrés oxidativo, por lo que hidroxitirosol ejercería un mayor efecto antioxidante en esta situación. Igualmente podríamos decir respecto a su efecto neuroprotector, si bien en este punto, tal y como comentamos con anterioridad, hay que tener en cuenta otras vías bioquímicas de daño cerebral sobre las cuales hidroxitirosol ha demostrado efectos inhibidores en animales no diabéticos (Cabrerizo et al., 2014; De La Cruz et al., 2015).

Por todo ello, a fin de unir todos estos factores (mayor efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol en tejido cerebral de animales diabéticos, así como la participación de otras vías bioquímicas subsidiarias del efecto de este compuesto) y teniendo en cuenta la posible aplicación clínica de hidroxitirosol en la prevención del daño cerebral en el ictus isquémico, nos planteamos el siguiente grupo de experimentos.

4. Efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol tras su administración oral a animales diabéticos y normoglucémicos

En primer lugar es necesario acotar el efecto observado tras la administración de hidroxitirosol al propio compuesto y no a un posible efecto indirecto sobre los niveles de glucosa en sangre, ya que es conocido que el control de la glucemia es un elemento clave para frenar las complicaciones de la diabetes mellitus. Por otra parte, algunos estudios han de mostrado que este polifenol podría mejorar el perfil glucémico en distintos modelos experimentales de diabetes (Cao et al., 2014; Jemai et al., 2009). Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que ninguna de las dosis de hidroxitirosol utilizadas modifica los niveles de glucosa en sangre tras dos meses de tratamiento, ni en los animales normoglucémicos ni en los diabéticos (Tabla 4.5.). En los estudios en los que se postula un posible efecto antidiabético de hidroxitirosol, los animales mostraron niveles plasmáticos de glucosa alrededor de 280-300 mg/dL

mientras que en nuestro estudio éstos alcanzaron valores de 350-420 mg/dL. Posiblemente estas cifras tan altas puedan ser un hándicap para ejercer un efecto reductor de la glucosa circulante. Por lo tanto, sin descartar un posible efecto reductor de la glucemia, en nuestro estudio no se puede adjudicar una responsabilidad a este mecanismo en la interpretación global de los efectos de hidroxitirosol sobre los biomarcadores analizados.

Respecto a la dosificación del hidroxitirosol, nos basamos en estudios anteriores de nuestro grupo en los que se utilizaba el mismo modelo experimental, pero en ratas sanas (Cabrerizo et al., 2013; González-Correa et al., 2008, Muñoz-Marín et al., 2012). En estos estudios, el rango de dosis más óptimo en cuanto a efectos neuroprotectores fue 5-10 mg/kg/día, no obstante quisimos incluir una dosis inferior al no existir datos en la bibliografía sobre dosificación de hidroxitirosol en animales diabéticos.

Respecto a las variables determinadas en tejido cerebral sometido a hipoxia-reoxigenación en animales diabéticos tratados con hidroxitirosol, en comparación con animales normoglucémicos, no encontramos en la bibliografía consultada estudios con los que realizar una comparación directa con el nuestro. Por lo tanto, aportamos con este trabajo una comparación del efecto de hidroxitirosol en una situación de mayor sensibilidad del tejido cerebral al daño isquémico (diabetes experimental) respecto al efecto observado en animales que parten de una situación bioquímica cerebral normal.

Como ya se comentó con anterioridad, se ha descrito que en este mismo modelo la administración de hidroxitirosol modifica no solo el estrés oxidativo, sino también otras vías bioquímicas cerebrales (Cabrerizo et al., 2014; De La Cruz et al., 2015). En primer lugar, la Tabla 5.3. muestra los valores de las principales variables cuantificadas en ambos grupos de animales tras el modelo de hipoxia-reoxigenación. Estas variables hacen referencia a la muerte celular (LDH), estrés oxidativo (TBARS, glutatión reducido –GSH-, porcentaje de glutatión oxidado respecto al total -%GSSG- y actividad glutatí'con peroxidasa –GSHpx-), estrés nitrosativo (concentración de nitritos más nitratos y de 3-nitrotirosina) y producción de mediadores inflamatorios en tejido cerebral (prostaglandina E₂ e interleucina 1β).

Tabla 5.3. Valores medios de las principales variables determinadas tras el modelo de hipoxia-reoxigenación.

	Normoglucemia	Diabetes
LDH (unidades arbitrarias)	3.10 ± 0.02	3.97 ± 0.29*
TBARS (nmol/mg prot)	8.72 ± 0.53	13.30 ± 0.81*
GSH (μmol/d tejido)	8.84 ± 0.25	5.66 ± 0.32*
%GSSG	13.95 ± 0.22	21.13 ± 0.81*
GSHpx (μmol/min/mg prot)	6.63 ± 0.38	11.54 ± 0.36*
NO₂⁻+NO₃⁻ (pmol/0.1 g tejido)	17.85 ± 1.11	26.25 ± 1.26*
3-nitrotirosina (nmol/0.1 g tejido)	3.91 ± 0.20	6.92 ± 0.81*
PGE₂ (pg/0.1 g tejido)	56.25 ± 1.32	105 ± 5*
IL-1β (pg/0.1 g tejido)	35.41 ± 2.63	49.73 ± 1.54*

*P < 0.05 respecto al valor del grupo normoglucémico

Si observamos los niveles de LDH (signo indirecto de muerte celular) al final del proceso de hipoxia-reoxigenación, apreciamos este hecho: en los animales diabéticos se obtuvieron cifras de LDH 28% mayores que en los animales normoglucémicos. A la vista de estos datos, podemos asegurar que el tejido cerebral de los animales diabéticos sufre un mayor daño, en términos de muerte celular, que los no diabéticos. Los comentarios sobre este resultado ya lo comentamos anteriormente en este mismo apartado, por lo que no volveremos a incidir sobre ello.

El proceso de hipoxia-reoxigenación, no solo incrementa la tasa de muerte celular cerebral, sino que los parámetros de estrés oxidativo se encuentran más

desequilibrados en los animales diabéticos respecto a los normoglucémicos. Así, la reoxigenación incrementa la producción de peróxidos lipídicos (52.5% respecto a los animales normoglucémicos) y disminuye el contenido de glutatión cerebral (36.6% menor en los animales diabéticos) en mayor medida, presentando un mayor intento de defensa antioxidante debido a un mayor daño peroxidativo (51.7% mayor producción de GSSG y 74% mayor actividad GSH peroxidasa), si bien este intento de reacción no es efectivo debido al mayor daño oxidativo en los animales diabéticos, hecho que no puede compensar el intento de reacción antioxidante, posiblemente debido al agotamiento de los depósitos cerebrales de GSH. En este sentido, Santos et al. (2001) demostraron que las mitocondrias de cerebros e hígado de ratas diabéticas (modelo experimental de tipo II) muestran una mayor sensibilidad para el acúmulo de peróxidos lipídicos ante una agresión oxidativa, acompañada de un descenso del contenido de sustancias antioxidantes, tales como la vitamina E o la coenzima Q.

En conjunto, los cerebros de los animales diabéticos muestran un estrés oxidativo mayor en el modelo de hipoxia-reoxigenación que los procedentes de animales no diabéticos, lo cual los hace más susceptibles al daño celular demostrado por los resultados de LDH.

Respecto a la vía del óxido nítrico, la producción global de este mediador en el tejido cerebral de los animales diabéticos es mayor (47%) en los animales diabéticos respecto a los normoglucémicos. Este mediador endógeno es neuroprotector hasta una cierta concentración, para ser neurotóxico a partir de otra mayor. El límite entre ambas lo establece la producción de peroxinitritos, potentes radicales libres derivados del óxido nítrico, que se forman por la reacción de éste con radicales libres (aumentados en dicho modelo). Efectivamente, la producción específica de peroxinitritos se vio incrementada en un 77% en los animales diabéticos respecto a los no diabéticos. Este resultado no es extraño debido a dos motivos fundamentales: los animales diabéticos producen más estrés oxidativo tras la reoxigenación y en un trabajo de nuestro grupo en este mismo modelo experimental, se demostró que la actividad iNOS estaba claramente aumentada en los cerebros de animales diabéticos tras la reoxigenación (González-Correa et al., 2006).

Respecto a los mediadores inflamatorios, el acúmulo de prostaglandinas cerebrales ocasionado por la reoxigenación posthipóxica es mayor en los animales diabéticos que en los normoglucémicos (86.6% mayor en los animales diabéticos). En este sentido, se ha demostrado que en tejido cerebral de rata, en la diabetes experimental se muestra una disminución significativa de la síntesis de prostaciclina y una tendencia al incremento en la de tromboxano A₂ y prostaglandina E₂ (González-Correa et al., 2006; Zhang et al., 2003).

Respecto a la producción de IL-1 β sigue el mismo patrón que el de prostaglandina E₂: los animales diabéticos producen un 40.4% más de este mediador proinflamatorio que los no diabéticos, tras la reoxigenación. En este sentido, se ha postulado que el proceso de la diabetes origina una disregulación de los mediadores inflamatorios, tanto en su regulación nuclear como en la expresión y producción de interleucinas cerebrales (Kim et al., 2014), lo cual coincide plenamente con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Es decir, las vías bioquímicas inflamatorias de daño celular en la isquemia-reperfusión también se ven alteradas, lo cual podría participar en el mayor grado de muerte celular en dicho modelo experimental en los animales diabéticos.

Por lo tanto, el mayor estrés oxidativo tisular, la mayor producción de mediadores inflamatorios y la estimulación de la producción de peroxinitritos, plantea un escenario cerebral en los animales diabéticos que justifican el mayor daño celular observado tras la hipoxia-reoxigenación.

Habida cuenta que hidroxitirosol ha demostrado algún tipo de efecto sobre las vías bioquímicas afectadas en los animales diabéticos, pasaremos a comentar el efecto de este polifenol sobre el daño tisular cerebral en nuestro modelo experimental. En primer lugar valoraremos el posible efecto neuroprotector de hidroxitirosol en los animales diabéticos en el modelo de hipoxia-reoxigenación. Como ya comentamos anteriormente, se ha descrito el efecto neuroprotector de diversos polifenoles, fundamentalmente en experimentación animal. No obstante, el uso de estos compuestos en modelos de diabetes mellitus no está muy documentado y se refiere

fundamentalmente al ámbito metabólico o de neuropatía periférica (Solayman et al., 2015). Respecto a un posible uso en alteraciones que afectan al sistema nervioso, algunos polifenoles han mostrado un efecto neuroprotector, como es el caso de algunos derivados de la curcumina (Rastogi et al., 2008), silibinina (Marrazzo et al., 2011), polifenoles del té verde (Silva et al., 2013) y otros extractos de plantas diversas.

En cuanto al posible efecto como neuroprotectores tras un evento isquémico cerebral, solo se ha descrito este aspecto con resveratrol (Prabhakar, 2013) y algunas catequinas (Yunoki et al., 2014). Hidroxitirosol se ha estudiado como neuroprotector tras la isquemia en animales sanos (Cabrerizo et al., 2014; Rodríguez-Morató et al., 2015), pero no en diabéticos. Por lo tanto, aportamos el efecto neuroprotector de la administración de hidroxitirosol en un modelo de diabetes experimental.

El efecto neuroprotector observado en los animales diabéticos tras el modelo de hipoxia-reoxigenación, es proporcionalmente mayor que en los animales no diabéticos (Figura 4.10.), fundamentalmente con las dosis de 1 (18% mayor efecto en diabetes) y 5 (11% mayor efecto) mg/kg/día. Sin embargo, con la dosis de 10 mg/kg/día no se aprecian diferencias en cuanto al efecto neuroprotector de hidroxitirosol en la diabetes o en animales normoglucémicos (2% de diferencia entre ambos grupos). Estos datos hablan a favor de lo expuesto en apartados anteriores de esta discusión, en lo referente a un mayor efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol cuando existe un estrés oxidativo, respecto a un estado oxidativo normal. No olvidemos que el cerebro de los animales diabéticos muestra una mayor sensibilidad ante el daño producido tras la hipoxia-reoxigenación, de ahí que pueda ser motivo de un mayor efecto proporcional en estos animales.

A continuación, valoraremos el efecto diferencial de hidroxitirosol en animales diabéticos y normoglucémicos en las distintas vías bioquímicas cerebrales tras el modelo de hipoxia-reoxigenación, siguiendo el mismo orden utilizado con anterioridad: estrés oxidativo, estrés nitrosativo y mediadores inflamatorios.

La administración de hidroxitirosol a los animales diabéticos redujo el estrés oxidativo después de la reoxigenación en nuestro modelo experimental, fundamentalmente mediante una inhibición de la peroxidación lipídica, estimulada en los animales diabéticos. El efecto antioxidante del HT ha sido ampliamente demostrada tanto en experimentos químicos como en medios biológicos (Lee et al., 2010; Raederstorff, 2009; Visioli & Bernardini, 2011). En cuanto al mecanismo por el cual hidroxitirosol puede ejercer su efecto antioxidante, se han postulado diversas vías de actuación, incluyendo un efecto eliminador de peróxido de hidrógeno y aniones hidroxilo, y la activación de la Nrf2, HO-1 y las vías JNK-p62/SQSTM1 (Fabiani et al., 2011; O'Dowd et al., 2004; Zou et al., 2011; Zrelli et al., 2011). Algunos estudios, sobre todo *in vitro* y tras estimulación química del estrés oxidativo en cultivos celulares, han demostrado que hidroxitirosol puede recuperar los niveles de glutatión depleccionados tras la inducción oxidativa (Pereira-Caro et al., 2011). Este efecto sobre los niveles de glutatión lo comprobamos en los grupos de animales normoglucémicos tras hipoxia-reoxigenación cerebral (Figura 4.12.-4.14.). No obstante, en los animales diabéticos del presente estudio no hemos podido apreciar un efecto de hidroxitirosol sobre el sistema del glutatión cerebral tras la hipoxia-reoxigenación. Posiblemente en la diabetes se produzca un deterioro de los sistemas de control de este tripéptido antioxidante que sea incapaz el hidroxitirosol de recuperarlo. Es decir, el efecto antioxidante de este polifenol en los animales diabéticos parece centrarse en una inhibición de la peroxidación lipídica cerebral.

Estas diferencias originan un perfil de acción distinto en ambos tipos de modelos glucémicos, siendo el efecto mayor en animales normoglucémicos tras el modelo de hipoxia-reoxigenación que en los diabéticos. Posiblemente la depleción de glutatión podría ser un factor bastante limitante a la hora de poder observar un posible efecto de hidroxitirosol a este nivel. Por otra parte, si analizamos los resultados comparativos a nivel de peroxidación lipídica, observamos que las diferencias de inhibición porcentual causada por hidroxitirosol se aprecian mayormente con las dosis de 1 y 5 mg/kg/día (23% de diferencia en ambos casos), siendo mucho menores con la de 10 mg/kg/día (9% de diferencia) (Figura 4.11.).

Respecto a este comportamiento con la dosis mayor, tanto en el efecto neuroprotector como antioxidante, los trabajos de Son et al., (2008) muestran que varios agentes fitoquímicos muestran un efecto hormético (fenómeno de hormesis), definido como una relación dosis-respuesta bifásica con un efecto beneficioso a dosis bajas, el cual se torna tóxico a dosis altas. Estos autores postulan la activación de vías de adaptación como respuesta al estrés celular (por ejemplo vía Nrf2 –antioxidante- en el sistema nervioso central): dosis bajas de estos compuestos activarían estos mecanismos de adaptación, mientras que dosis altas no lo harían. Pero es importante destacar que es necesaria la presencia de un estrés celular para la activación de estas vías. No obstante esta teoría posee a nuestro entender una limitación importante: definir como tóxicos o nocivos a los compuestos activos de los alimentos. La observación realizada por estos autores es cierta, es decir, dosis o concentraciones bajas de estos compuestos inducen mecanismos endógenos protectores, mientras que dosis altas no lo hacen o el efecto es mucho menor, pero asimismo se afirma que estos compuestos no son capaces de realizar un efecto beneficioso per se, sino que son los mecanismos citoprotectores inducidos los causantes del beneficio, a pesar del efecto tóxico intrínseco de estos compuestos.

En línea con los resultados sobre el estrés oxidativo cerebral, la hiperproducción de óxido nítrico y de peroxinitritos tras la hipoxia-reoxigenación es inhibida tras la administración de hidroxitirosol, tanto en animales diabéticos como en hiperglucémicos. Se ha demostrado que hidroxitirosol inhibe la expresión y regulación de actividades enzimáticas inducibles, entre las que se encuentra la iNOS (González-Correa et al., 2009; Zhang et al., 2009), por lo que es lógico pensar que disminuya la producción de peroxinitritos, además de por una disminución en la producción de radicales libres.

Al comparar el efecto de hidroxitirosol en los animales diabéticos respecto a los normoglucémicos, observamos que el exceso de producción de óxido nítrico se frena en mayor medida en los diabéticos, si bien con las dosis de 5 y 10 mg/kg/día (42% y 22% de diferencia, respectivamente, frente a 7% con la dosis de 1 mg/kg/día), mientras que en la producción de peroxinitritos este mayor efecto se aprecia con las dosis de 1 y 5

mg/kg/día (20% y 25% de diferencia respectivamente, frente a 5% con la dosis de 10 mg/kg/día).

Este diferente perfil comparativo de óxido nítrico y peroxinitritos en ambos tipos de animales se podría deber a la relación de la producción de peroxinitritos con la de radicales libres, de ahí que las dosis mayores ejerzan un efecto “poco diferencial”, mientras que la producción de óxido nítrico va en relación a un posible efecto enzimático, de ahí que sea dosis-dependiente. No obstante, esta hipótesis requiere de nuevos trabajos de investigación que profundicen sobre estos mecanismos.

Respecto a las vías inflamatorias cerebrales, la administración de hidroxitirosol redujo la hiperproducción de interleucina 1 β y de prostaglandina E₂ tras la hipoxia-reoxigenación. Algunos estudios han demostrado que la incubación con hidroxitirosol inhibe la expresión y la liberación de interleucinas (Cabrerizo et al., 2013; Zhang et al., 2009) y la expresión y actividad de la ciclooxigenasa tipo 2 en leucocitos sanguíneos (González-Correa et al., 2009; Zhang et al., 2009).. Por lo tanto estos mecanismos, principalmente la inhibición de la concentración tisular de PGE₂ podrían contribuir, de forma secundaria al efecto antioxidante, para obtener un efecto citoprotector en el modelo experimental utilizado en este estudio.

A diferencia de lo acontecido en las vías bioquímicas antes mencionadas, ambos mediadores inflamatorios son inhibidos en mayor medida en los animales normoglucémicos que en los diabéticos o como mucho, hidroxitirosol presenta el mismo efecto en ambas situaciones metabólicas. Obviamente esta situación es puramente descriptiva, ya que no encontramos en la bibliografía estudios con los que comparar nuestros resultados, así como necesitaríamos estudios más concretos y profundos sobre estos mecanismos y su modificación con hidroxitirosol en la diabetes mellitus.

5. Limitaciones del estudio y consideraciones finales

En primer lugar, para ejercer un efecto neuroprotector, hidroxitirosol debe penetrar en el tejido cerebral. La biodisponibilidad de este polifenol después de la administración oral como tal compuesto o como un componente del aceite de oliva virgen, ha sido bien documentado (Fitó et al., 2007). Por otra parte, se ha detectado hidroxitirosol en tejido cerebral después de la inyección intravenosa de $14[C]$ hidroxitirosol (Serra et al., 2012) o después de la administración oral de un extracto fenólico procedente del aceite de oliva (Sánchez-Fidalgo et al., 2012).

En segundo lugar, la población general que toma una dieta mediterránea ingiere hidroxitirosol a través del aceite de oliva virgen. En la mayoría de los casos la ingesta aproximada de este polifenol en la dieta es inferior a la usada en nuestro trabajo, ya que usando el aceite que más cantidad de hidroxitirosol posee (aceite obtenido de aceituna de la variedad Picual) la ingesta media sería de 0.1 mg/kg/día (de la Torre-Robles et al., 2014). Además de las posibles diferencias entre el ser humano y los animales de experimentación a este nivel, hemos de tener en cuenta que el aceite de oliva virgen contiene una serie de compuestos que pueden influir sobre las vías bioquímicas cerebrales estudiadas en este trabajo, pudiendo existir interacciones potenciales de tipo sinérgico.

Por último, en este estudio hemos demostrado que hidroxitirosol no posee efecto sobre los niveles de glucosa en sangre, pero también hemos señalado las concentraciones tan altas de glucosa que se alcanzan en este modelo, a fin de asegurar una descompensación total de la diabetes y valorar en su mayor intensidad las lesiones tisulares derivadas. Obviamente sería imprescindible abordar nuevos trabajos con distintos niveles de hiperglucemia a fin de poder discriminar totalmente entre el efecto directo de hidroxitirosol en el tejido cerebral y el papel que una posible reducción de la glucemia podría tener a este nivel.

Sea de una forma u otra, la administración de hidroxitirosol podría participar de las medidas preventivas de daño cardiovascular y cerebral en la diabetes mellitus, reconociendo claramente el papel beneficioso del control metabólico de la diabetes en este terreno. La profundización en los mecanismos neuroprotectores de hidroxitirosol en la diabetes, así como el inicio de estudios clínicos, constituyen la base de nuevos trabajos de investigación, los cuales están en vía de desarrollo por nuestro grupo de estudio.

6. CONCLUSIÓN





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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

1. La incubación de muestras cerebrales de ratas normoglucémicas con hidroxitirosol reduce la peroxidación lipídica y la muerte neuronal en relación directa a la estimulación del estrés oxidativo tisular.
2. El efecto antioxidante y neuroprotector de hidroxitirosol in vitro es mayor en las muestras cerebrales de animales diabéticos que de normoglucémicos.
3. La administración oral de hidroxitirosol a animales diabéticos de dos meses de evolución produce un efecto neuroprotector en un modelo de hipoxia-reoxigenación, mayor que el observado en animales normoglucémicos.
4. La producción de peróxidos lipídicos y peroxinitritos cerebrales tras la anoxia-reoxigenación fue inhibida en mayor medida en los animales diabéticos tratados con hidroxitirosol.
5. Las diferencias porcentuales del efecto de hidroxitirosol en ambos grupos de animales son más marcadas con las dosis de 1 y 5 mg/kg/día, igualándose dicho efecto con la de 10 mg/kg/día.

7. BIBLIOGRAFÍA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Akopov S, Sercombe R, Seylaz J. (1996). Cerebrovascular reactivity: role of endothelium/platelet/leukocyte interactions. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.*, 8(1), 11-94.
- Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 15(7), 539–553.
- Arnold M, Nedeltchev K, Remonda L, Fischer U, Brekenfeld C, Keserue B, Schroth G, Mattle HP. (2005). Recanalisation of middle cerebral artery occlusion after intra-arterial thrombolysis: different recanalisation grading systems and clinical functional outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 76(10), 1373-1376.
- Balsano, C., & Alisi, A. (2009). Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), 3063–3073.
- Burch RM, Axelrod J. (1987). Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84 (18), 6374-6378.
- Cabrerizo, S., De La Cruz, J. P., López-Villodres, J. A., Muñoz-Marín, J., Guerrero, A., Reyes, J. J., ... González-Correa, J. A. (2013). Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12), 2152–2157.
- Cao, K., Xu, J., Zou, X., Li, Y., Chen, C., Zheng, A., ... Feng, Z. (2014). Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 67, 396–407.
- Castillo J, Rodríguez I. (2004). Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis.*, 17 Suppl 1, 7-18.

- Chattopadhyay M, Khemka VK, Chatterjee G, Ganguly A, Mukhopadhyay S, Chakrabarti S. Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Mol Cell Biochem.* 2015; 399: 95-103.
- Chen, X., Chen, H., Xu, M., & Shen, J. (2013). Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(1), 67–77.
- Cicero AF1, Nascetti S, López-Sabater MC, Elosua R, Salonen JT, Nyssönen K, Poulsen HE, Zunft HJ, Kiesewetter H, de la Torre K, Covas MI, Kaikkonen J, Mursu J, Koenbick C, Baumler H, Gaddi AV; EUROLIVE Study Group. (2008). 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.*, 27(2), 314-320.
- Covas MI. (2007). Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.*, 55, 175–186.
- Covas, M.-I., de la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., ... de la Torre, R. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 40(4), 608–616.
- Covas, M.-I., de la Torre, R., & Fitó, M. (2015). Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *The British Journal of Nutrition*, 113 Suppl 2, S19–28.
- Covas, M.-I., Nyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J. F., Kiesewetter, H., ... EUROLIVE Study Group. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(5), 333–341.
- Craggs L, Kalaria RN. Revisiting dietary antioxidants, neurodegeneration and dementia. *Neuroreport.* 2011; 22: 1-3.

- Cruz Hernández, J., Licea Puig, M., Hernández García, P., Abraham Marcel, E., & Yanes Quesada, M. (2011). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*, 58(1), 4–15.
- De La Cruz, J., González-Correa, J., Guerrero, A., & de la Cuesta, F. (2004). Pharmacological approach to diabetic retinopathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20(2), 91–113.
- De La Cruz, J. P., Del Río, S., López-Villodres, J. A., Villalobos, M. A., Jebrouni, N., & González-Correa, J. A. (2010). Virgin olive oil administration improves the effect of aspirin on retinal vascular pattern in experimental diabetes mellitus. *The British Journal of Nutrition*, 104(4), 560–565.
- De La Cruz, J. P., González-Correa, J. A., Guerrero, A., & de la Cuesta, F. S. (2004). Pharmacological approach to diabetic retinopathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20(2), 91–113.
- De La Cruz, J. P., Jebrouni, N., López-Villodres, J. A., Muñoz-Marín, J., Guerrero, A., & González-Correa, J. A. (2012). Effects of terutroban, a thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, on retinal vascularity in diabetic rats. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(2), 132–138.
- De La Cruz, J. P., Ruiz-Moreno, M. I., Guerrero, A., López-Villodres, J. A., Reyes, J. J., Espartero, J. L., ... González-Correa, J. A. (2015). Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(5), 549–555.
- De La Cruz, J. P., Villalobos, M. A., Carmona, J. A., Martín-Romero, M., Smith-Agreda, J. M., & de la Cuesta, F. S. (2000). Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thrombosis Research*, 100(4), 305–315.
- De la Fuente P, Chamorro P, Moreno M, Poza MA. (2004). Propiedades antioxidantes de hidroxitirosol procedente de la hoja de olivo (*Olea europaea* L.). *Rev Fitoterapia.*, 34, 139-148.

- de la Puerta, R., Martínez-Domínguez, E., & Ruíz-Gutiérrez, V. (2000). Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 55(9-10), 814–819.
- de la Puerta, R., Martínez Domínguez, M. E., Ruíz-Gutiérrez, V., Flavill, J. A., & Hoult, J. R. (2001). Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitregeric neurotransmission. *Life Sciences*, 69(10), 1213–1222.
- de la Torre-Robles A, Rivas A, Lorenzo-Tovar ML, Monteagudo C, Mariscal-Arcas M, Olea-Serrano F. Estimation of the intake of phenol compounds from virgin olive oil of a population from southern Spain. *Food Addit Contam.* 2014; 31: 1460-1469.
- Delmas D, Solary E, Latruffe N. (2011). Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr Med Chem.*, 18 (8), 1100-1121.
- De Morais H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Werner MF, Andreatini R, da Cunha JM, Zanoveli JM. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res.* 2014; 258: 52-64.
- Deseano-Estudillo JL, Castañón-González JA, Carbajal-Ramírez A, Castrejón-Román H, León-Gutiérrez MA. (2003). Cerebral Blood flow velocity spectrum by transcranial doppler ultrasound in patients with brain death clinical criteria. *Gac Med Mex.*, 139 (6), 535-538.
- Diabetes Atlas, 5th Edition. 2011. <http://www.diabetesatlas.org/>.
- Diabetes Atlas, 6th Edition. 2013. https://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E.pdf
- Enns, J. E., Yeganeh, A., Zarychanski, R., Abou-Setta, A. M., Friesen, C., Zahradka, P., & Taylor, C. G. (2014). The impact of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the incidence of cardiovascular events and complications in

- peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders*, 14, 70.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., ... Martínez-González, M. A. (2013). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279–1290.
- Fabiani R, Sepporta MV, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Crescimanno M, Morozzi G. Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide. *Eur J Nutr*. 2012; 51: 455-464.
- Fan E, Zhang L, Jiang S, Bai Y. (2008). Beneficial effects of resveratrol on atherosclerosis. *J Med Food.*, 11(4), 610-614.
- Fernández-Bolaños, J., Heredia, A., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Jimenez, A., & Guillen, R. (2005). Method for obtaining purified hydroxytyrosol from products and by-products derived from the olive tree., *US 6,849,770 B2*.
- Fitó, M., de la Torre, R., Farré-Albaladejo, M., Khymenetz, O., Marrugat, J., & Covas, M.-I. (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*, 43(4), 375–381.
- Gärtner V, Eigentler TK (2008). Pathogenesis of diabetic macro- and microangiopathy. *Clin Nephrol.*, 70(1), 1-9.
- George PM, Steinberg GK. (2015). Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron.*, 87(2), 297-309.
- González-Correa JA, Arrebola MM, Cansino AL, Muñoz-Marín J, Ruiz-Villafranca D, Guerrero A, Sánchez de la Cuesta F, De La Cruz JP. Effects of hypoxia reoxygenation in brain slices from rats with type 1-like diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006; 22: 390-400.
- González-Correa, J. A., Arrebola, M. M., Guerrero, A., Cañada, M. J., Muñoz Marín, J., Sánchez De la Cuesta, F., & De la Cruz, J. P. (2006). Antioxidant and antiplatelet

- effects of the alpha-tocopherol-aspirin combination in type 1-like diabetic rats. *Life Sciences*, 79(15), 1405–1412.
- González-Correa JA, López-Villodres JA, Asensi R, Espartero JL, Rodríguez-Gutiérrez G, De La Cruz JP. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Br J Nutr*. 2009; 101: 1157-1164.
- González-Correa, J.A., López-Villodres, J. A., Asensi, R., Espartero, J. L., Rodríguez-Gutiérrez, G., & De La Cruz, J. P. (2009). Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *The British Journal of Nutrition*, 101(8), 1157–1164.
- González-Correa, J. A., Navas, M. D., Lopez-Villodres, J. A., Trujillo, M., Espartero, J. L., & De La Cruz, J. P. (2008). Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neuroscience Letters*, 446(2-3), 143–146.
- González-Correa, J. A., Navas, M. D., Muñoz-Marín, J., Trujillo, M., Fernández-Bolaños, J., & de la Cruz, J. P. (2008). Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7872–7876.
- Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr*. 2007; 46: 70-78.
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P., & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010a). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*, 68(4), 191–206.
- Granger DN, Kvietys PR. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.*, 6, 524-551.

- Guerrero, A., De la Cruz, J. P., Muñoz-Marín, J., López-Villodres, J. A., Madrona, A., Espartero, J. L., & González-Correa, J. A. (2012). Neuroprotective effect of alkyl hydroxytyrosyl ethers in rat brain slices subjected to a hypoxia-reoxygenation model. *Food Chemistry*, 134(4), 2176–2183.
- Gutierrez-Rosales F, Romero MP, Casanovas M, Motilva MJ, Mínguez-Mosquera MI. (2012). β -Glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropein during the growth and development of olive fruits (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different farming practices. *J Agric Food Chem.*, 60(17), 4348-4358.
- Hossman KA. (2009). Pathophysiological basis of translational stroke research. *Folia Neuropathol.*, 47 (3), 213-227.
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia, *Surgical Neurology.*, 66, 232–245.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2-3), 88–98.
- Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8798–8804.
- Jickling GC, Liu D, Ander BP, Stamova B, Zhan X, Sharp FR. (2015). Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 35(6), 888-901.
- Jing L, Wang JG, Zhang JZ, Cao CX, Chang Y, Dong JD, Guo FY, Li PA. Upregulation of ICAM-1 in diabetic rats after transient forebrain ischemia and reperfusion injury. *J Inflamm (Lond)*. 2014; 11: 35-46.
- Kim E, Tolhurst AT, Cho S. Deregulation of inflammatory response in the diabetic condition is associated with increased ischemic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2014; 11:83-95.



- Ladeia, A. M., Sampaio, R. R., Hita, M. C., & Adan, L. F. (2014). Prognostic value of endothelial dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 5(5), 601–605.
- Lapi D, Colantuoni A. (2015). Remodeling of Cerebral Microcirculation after Ischemia-Reperfusion. *J Vasc Res.*, 52(1), 22-31.
- Lee OH, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour Technol.* 2010; 101: 3751-3754.
- Liang Y, Lei Z, Zhang H, Xu Z, Cui Q, Xu ZC. Toll-like receptor 4 is associated with seizures following ischemia with hyperglycemia. *Brain Res.* 2014; 1590: 75-84.
- Liu, H., Huang, H., Li, B., Wu, D., Wang, F., Zheng, X. hua, ... Fan, X. (2014). Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause. *Clinical Interventions in Aging*, 9, 2087–2095.
- Mangiapanè H. (2012). Cardiovascular disease and diabetes. *Adv Exp Med Biol.*, 771, 219-28.
- Marrazzo G, Bosco P, La Delia F, Scapagnini G, Di Giacomo C, Malaguarnera M, Galvano F, Nicolosi A, Li Volti G. Neuroprotective effect of silibinin in diabetic mice. *Neurosci Lett.* 2011; 504: 252-256.
- Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., Corella D, D., Fitó, M., Ros, E., & PREDIMED INVESTIGATORS. (2015). Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. *Progress in Cardiovascular Diseases.*, 58, 50-60.
- Matute C. (2011). Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. *J Anat.*, 219(1), 53-64.
- McKenna MC, Scafidi S, Robertson CL. Metabolic Alterations in Developing Brain After Injury: Knowns and Unknowns. *Neurochem Res.*, 40(12), 2527-2543.

- Mellendijk L, Wiesmann M, Kiliaan AJ. (2015). Impact of Nutrition on Cerebral Circulation and Cognition in the Metabolic Syndrome. *Nutrients.*, 7(11), 9416-9139.
- Milidonis X, Marshall I, Macleod MR, Sena ES. (2015). Magnetic resonance imaging in experimental stroke and comparison with histology: systematic review and meta-analysis. *Stroke.*, 46(3), 843-851.
- Miro-Casas, E., Covas, M.-I., Farre, M., Fito, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., ... de la Torre, R. (2003). Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*, 49(6 Pt 1), 945–952.
- Muñoz-Marín, J., De La Cruz, J. P., Guerrero, A., López-Leiva, I., López-Villodres, J. A., Reyes, J. J., González-Correa, J. A. (2012). Cytoprotective effect of hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives after oral administration to rats in a model of glucose-oxygen deprivation in brain slices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7659–7664.
- Muñoz-Marín, J., De la Cruz, J. P., Reyes, J. J., López-Villodres, J. A., Guerrero, A., López-Leiva, I., ... González-Correa, J. A. (2013). Hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives inhibit platelet activation after oral administration to rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 58, 295–300.
- Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr.*, 77 (6), 1466-1473..
- O'Dowd Y, Driss F, Dang PM, Elbim C, Gougerot-Pocidallo MA, Pasquier C, El-Benna J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68: 2003-2008.

- Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. (2013). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J.*, 34(31), 2436-2443.
- Panickar KS, Jang S. Dietary and plant polyphenols exert neuroprotective effects and improve cognitive function in cerebral ischemia. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 2013; 5: 128-143.
- Pereira-Caro G, Sarriá B, Madrona A, Espartero JL, Goya L, Bravo L, Mateos R. Alkyl hydroxytyrosyl ethers show protective effects against oxidative stress in HepG2 cells. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 5964-5976.
- Pérez-Jiménez J, Hubert J, Hooper L, Cassidy A, Manach C, Williamson G, Scalbert A. (2012). Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.*, 92, 801-809.
- Phillis JW, O'Regan MH. (2003). The role of phospholipases, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cerebral ischemic/traumatic injuries. *Crit Rev Neurobiol.*, 15 (1), 61-90.
- Prabhakar O. Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2013; 386: 705–710.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. (2012). The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutr Hosp.*, 27 (1), 76-89.
- Răchișan AL, Hrușcă A, Căinap S, Pop TL, Andreica M, Miu N, Samașca G. The activity of 8-iso-prostaglandin F2alpha as an oxidative stress marker in vivo in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus and associated autoimmunities. *Clin Lab.* 2014; 60: 253-259.
- Raederstorff, D. (2009). Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale*

- Zeitschrift Für Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*, 79(3), 152–165.
- Rafehi, H., Ververis, K., & Karagiannis, T. C. (2012). Mechanisms of Action of Phenolic Compounds in Olive. *Journal of Dietary Supplements*, 9(2), 96–109.
- Rastogi M, Ojha RP, Rajamanickam GV, Agrawal A, Aggarwal A, Dubey GP. Curcuminoids modulates oxidative damage and mitochondrial dysfunction in diabetic rat brain. *Free Radic Res*. 2008; 42: 999-1005.
- Reyes, J. J., De La Cruz, J. P., Muñoz-Marin, J., Guerrero, A., Lopez-Villodres, J. A., Madrona, A., ... Gonzalez-Correa, J. A. (2013). Antiplatelet effect of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. *European Journal of Nutrition*, 52(2), 591–599.
- Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. (2000). Manual de patología estructural y funcional. Capítulo: 28 ‘Enfermedades del Sistema Nervioso Central. Mc Graw-Hill 6ª edición. 30, 1353-1357.
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., & de la Torre, R. (2015). Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(3), 4655–4680.
- Rosenzweig S, Carmichael ST. (2015). The axon-glia unit in white matter stroke: mechanisms of damage and recovery. *Brain Res.*, 1623, 123-134.
- Sahota P, Savitz SI. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics*. 2011; 8: 434-451.
- Sama DM, Norris CM. (2013). Calcium dysregulation and neuroinflammation: discrete and integrated mechanisms for age-related synaptic dysfunction. *Ageing Res Rev.*, 12(4), 982-995.
- Sánchez-Fidalgo S, Sánchez de Ibargüen L, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. *Eur J Nutr*. 2012; 51: 497-506.

- Scalzo F, Nour M, Liebeskind DS. (2015). Data science of stroke imaging and enlightenment of the penumbra. *Front Neurol.*, 6, 8-16.
- Schäfer MK, Pfeiffer A, Jaeckel M, Pouya A, Dolga AM, Methner A. (2014). Regulators of mitochondrial Ca(2+) homeostasis in cerebral ischemia. *Cell Tissue Res.*, 357(2), 395-405.
- Schaffer S, Podstawa M, Visioli F, Bogani P, Müller WE, Eckert GP. Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:5043-9.
- Schaffer, S., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 62(4), 322–327.
- Serra A, Rubió L, Borràs X, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol. Nutr Food Res.* 2012; 56: 486-496.
- Silva KC, Rosales MA, Hamassaki DE, Saito KC, Faria AM, Ribeiro PA, Faria JB, Faria JM. Green tea is neuroprotective in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54: 1325-1336.
- Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2005; 31: 135-147.
- Solayman M, Ali Y, Alam F, Islam MA, Alam N, Khalil MI, Gan SH. Polyphenols: Potential Future Arsenals in the Treatment of Diabetes. *Curr Pharm Des.* 2015. DOI: 10.2174/1381612822666151125001111
- Son TG, Camandola S, Mattson MP. Hormetic Dietary Phytochemicals. *Neuromol Med.* 2008; 10: 236-246.

- Spielvogel D, Kai M, Tang GH, Malekan R, Lansman SL. (2013). Selective cerebral perfusion: a review of the evidence. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 145(3 Suppl), S59-62.
- Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. (2010). Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist.*, 16(4), 435-452.
- St-Laurent-Thibault, C., Arseneault, M., Longpré, F., & Ramassamy, C. (2011). Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- β -induced toxicity. Involvement of the NF- κ B signaling. *Current Alzheimer Research*, 8(5), 543–551.
- Suárez M, Valls RM, Romero MP, Maciá A, Fernández S, Giralt M, Solá R, Motilva MJ. (2011). Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. *Br J Nutr.*, 106 (11), 1691-1701.
- Sun Z, Zhang X, Zhang Y, Guo H, Zhang J, Yu C. (2010). Estimation of the ischemic penumbra based on CT perfusion a pilot study. *Acad Radiol.*, 17(12), 1535-1542.
- Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M. (2009). Astrocytes and ischemic injury. *Stroke.*, 40(3 Suppl), S8-12.
- Taoufik E, Probert L. (2008). Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des.*, 14(33), 3565-3573.
- Tekkök S, Kriz J, Padjen AL, Krnjević K. Higher sensitivity of CA1 synapses to aglycemia in streptozotocin-diabetic rats is age-dependent. *Brain Research* 1998; 813: 268-273.
- Terzuoli, E., Donnini, S., Giachetti, A., Iñiguez, M. A., Fresno, M., Melillo, G., & Ziche, M. (2010). Inhibition of hypoxia inducible factor-1 α by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(16), 4207–4216.

- The Diabetes Control and Complications Trial. (1995). The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent diabetes mellitus.. *Archives of Ophthalmology*, 113(1), 36–51.
- Toledo, E., Salas-Salvadó, J., Donat-Vargas, C., Buil-Cosiales, P., Estruch, R., Ros, E., ... Martínez-González, M. A. (2015). Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Internal Medicine*, 175(11), 1752–1760.
- Tresserra-Rimbau, A., Rimm, E. B., Medina-Remón, A., Martínez-González, M. A., de la Torre, R., Corella, D., ... PREDIMED Study Investigators. (2014). Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 24(6), 639–647.
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. (2015). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.*, Sep 7. [Epub ahead of print]
- Visioli F, Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des.* 2011; 17: 786-804.
- Visioli, F., & Galli, C. (2002). Biological Properties of Olive Oil Phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 209–221.
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., & Caruso, D. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, 468(2-3), 159–160.
- Visioli, F., Galli, C., Grande, S., Colonnelli, K., Patelli, C., Galli, G., & Caruso, D. (2003). Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *The Journal of Nutrition*, 133(8), 2612–2615.

- Vissers, M. N., Zock, P. L., & Katan, M. B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(6), 955–965.
- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 12(4), 331–342.
- White BC, Sullivan JM, De Gracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.*, 179, 1-33.
- World Health Organization. Healthy diet. Retrieved April 14, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/>
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5), 1047–1053.
- World Health Organization. (2015). Diabetes. Fact sheet N°312 Retrieved January 30, 2015.
- Yamagishi O, Peterson TE, Harrison DG. (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.*, 91, 2546–2551.
- Yunoki T, Deguchi K, Omote Y, Liu N, Liu W, Hishikawa N, Yamashita T, Abe K. Anti-oxidative nutrient-rich diet protects against acute ischemic brain damage in rats. *Brain Res.* 2014; 1587: 33-39.
- Zenebe W, Pechánová O, Andriantsitohaina R. (2003). Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res.*, 52 (4), 425-432.
- Zhang, X., Cao, J., & Zhong, L. (2009). Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379(6), 581–586.

- Zhang RL, Lu CZ, Ren HM, Xiao BG. Metabolic changes of arachidonic acid after cerebral ischemia-reperfusion in diabetic rats. *Exp Neurol*. 2003;184:746-752.
- Zou, M.-H. (2007). Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 82(1–4), 119–127.
- Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P, Fu Y, Liu J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem*. 2011; 23: 994-1006.
- Zrelli H, Matsuoka M, Kitazaki S, Araki M, Kusunoki M, Zarrouk M, Miyazaki H. Hydroxytyrosol induces proliferation and cytoprotection against oxidative injury in vascular endothelial cells: role of Nrf2 activation and HO-1 induction. *J Agric Food Chem*. 2011; 59: :4473-4482.
- Zrelli, H., Matsuka, M., Araki, M., Zarrouk, M., & Miyazaki, H. (2011). Hydroxytyrosol induces vascular smooth muscle cells apoptosis through NO production and PP2A activation with subsequent inactivation of Akt. *Planta Medica*, 77(15), 1680–1686.