



**Programa de Doctorado en Biomedicina, Investigación
Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga**

TESIS DOCTORAL

**Efecto de aceites de oliva, obtenidos por distintos
métodos de procesado, sobre el estrés oxidativo y los
biomarcadores cardiovasculares en la diabetes
mellitus experimental**

Laura Iserte Terrer

Málaga, noviembre 2024

DIRECTORES:

José Pedro de la Cruz Cortés y José Antonio González Correa

TUTOR:

José Pedro de la Cruz Cortés



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Laura Iserte Terrer

 <https://orcid.org/0009-0009-1930-5932>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

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

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

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





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

Dña LAURA ISERTE TERRER

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: EFECTO DE ACEITES DE OLIVA, OBTENIDOS POR DISTINTOS MÉTODOS DE PROCESADO, SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS BIOMARCADORES CARDIOVASCULARES EN LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL

Realizada bajo la **tutorización** de JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS y **dirección** de JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS Y JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ CORREA.

DECLARO QUE:

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

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

En Málaga, a 14 de NOVIEMBRE de 2024

Fdo.: LAURA ISERTE TERRER Doctorando/a	Fdo.: JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS Tutor/a
Fdo.: JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS Y JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ CORREA Director/es de tesis	





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA. Departamento de Farmacología y Pediatría

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

CERTIFICAN:

Que Dña. LAURA ISERTE TERRER ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “EFECTO DE ACEITES DE OLIVA, OBTENIDOS POR DISTINTOS MÉTODOS DE PROCESADO, SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS BIOMARCADORES CARDIOVASCULARES EN LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL”, que consideramos tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y que la publicación en coautoría que avala la presentación de esta tesis y cuya referencia es: JP de la Cruz, L Iserte Terrer, MD Rodríguez Pérez, L Ortega Hombrados, A Sánchez Tévar, MM Arrebola Ramírez, A Fernández Prior, C Verdugo Cabello, JA Espejo Calvo, JA González Correa. Effects of Some Olive Fruits-Derived Products on Oxidative Stress and Cardiovascular Biomarkers on Experimental Diabetes Mellitus. *Antioxidants* 2024, 13, 1127. <https://doi.org/10.3390/antiox13091127>

no ha sido utilizada en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en Málaga, a 14 de noviembre de 2024.

José Pedro de la Cruz Cortés

(Tutor y Director)

José Antonio González Correa

(Director)





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

No puedo empezar los agradecimientos sin hacer mención especial al tutor de la tesis, el Dr. José Pedro de la Cruz Cortés, que junto con el Dr. José Antonio González Correa han dirigido todo el trabajo con una disposición, amabilidad, sabiduría y dedicación incalculables. Compartir este tiempo con personas como vosotros ha sido un regalo y estoy segura de que sin vuestra ayuda no habría sido posible. Este trabajo es vuestro. Gracias de corazón, nunca lo voy a olvidar.

A todas las compañeras del Departamento de Farmacología de la Universidad de Málaga y a las personas del grupo de investigación, gracias por haber participado y ayudado de una forma excepcional en todo el trabajo que hay detrás de la elaboración de esta tesis.

A mis padres, Vicente y Teo, y a mi hermano Daniel, gracias por haberme inculcado desde pequeña que cuando uno quiere algo debe luchar y trabajar para conseguirlo. Siempre he sentido que, junto a vosotros puedo con todo.

Cuando me aventuré en este proyecto solo éramos dos personas en casa y los días tenían 24 horas. Casi 5 años después nos acompañan dos hijos preciosos a los que quiero profundamente, Julia e Ignacio. Gracias Javier por apoyarme siempre y creer en mi; y sobre todo por añadir horas a los días para poder dedicarle tiempo a este trabajo.

Gracias a Dios y a la vida por poner a todas y cada una de estas personas en mi camino.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales de la diabetes mellitus	1
1.1.1. Definición	1
1.1.2. Prevalencia e incidencia	1
1.1.3. Clasificación	3
1.1.4. Principales complicaciones de la diabetes mellitus	4
1.1.4.1. Macroangiopatía diabética	5
1.1.4.2. Microangiopatía diabética	7
1.2. Fisiopatología de las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus	11
1.2.1. Mecanismos del daño vascular	11
1.2.2. Etapas del daño vascular	12
1.2.2.1. Primera etapa: Cambios en las vías bioquímicas intra-celulares	13
1.2.2.2. Segunda etapa: Disfunción endotelial	17
1.2.2.2.1. Alteración de la función antitrombótica	20
1.2.2.2.2. Alteración de la función de regulación del flujo sanguíneo	27
1.2.2.3. Tercera etapa: Fallo de la función vascular	29
1.3. Estrés oxidativo como centro de la vasculopatía en la diabetes mellitus	30
1.3.1. Producción/eliminación de especies reactivas de oxígeno	31
1.3.2. Especies reactivas del óxido nítrico	33
1.3.3. Consecuencias de la formación de especies reactivas de oxígeno y de NO	35
1.4. Papel del estrés oxidativo en la génesis y evolución de la macroangiopatía diabética	37
1.4.1. Fase inicial de adaptación bioquímica	37
1.4.2. Inicio de la vasculopatía: fase de trans migración leucocitaria y lipídica	39
1.4.3. Fase de inflamación vascular	39
1.4.4. Extensión del daño inflamatorio	40
1.4.5. Potencial trombogénico	41
1.4.6. Estrés oxidativo en el tejido afectado: el caso del tejido cerebral	41
1.4.7. Medidas preventivas	44
1.5. Aceite de oliva virgen extra como fuente de compuestos antioxidantes	45
1.5.1. Concepto	45
1.5.2. Composición	46

1.5.3. Compuestos polifenólicos con actividad sobre el sistema cardiovascular	47
1.5.3.1. Hidroxitirosol	48
1.5.3.2. Tirosol	49
1.5.3.3. Oleocantal	49
1.5.3.4. 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG)	50
1.5.4. Tipos de aceite	51
1.5.5. Elaboración del aceite de oliva virgen extra	52
1.5.6. Elaboración del aceite de oliva refinado	59

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Justificación	63
2.2. Hipótesis	65
2.3. Objetivos	65
2.3.1. Objetivo principal	65
2.3.2. Objetivos secundarios	65

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño del estudio	69
3.2. Compuestos del estudio	69
3.2.1. Aceite de oliva virgen extra (AOVE)	69
3.2.2. Aceite de semillas (AS)	70
3.2.3. Aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas	70
3.3. Animal de experimentación	73
3.4. Grupos experimentales	74
3.4.1. Inducción de la diabetes mellitus experimental	75
3.5. Obtención de las muestras biológicas	76
3.5.1. Modelo experimental de hipoxia-reoxigenación	76
3.6. Técnicas analíticas	77
3.6.1. Analítica sérica estándar, incluyendo perfil hepático, renal y lipídico	78
3.6.2. Variables iniciales de la vasculopatía	79
3.6.3. Variables de inflamación vascular: estrés oxidativo y nitrosativo	79
3.6.3.1. Variables oxidativas	79

3.6.3.2. Variables antioxidantes	80
3.6.4. Variables de estimulantes trombogénica	80
3.6.5. Repercusión morfológica vascular de la macroangiopatía	81
3.6.6. Variables de daño cerebral tras un modelo de hipoxia-reoxigenación	81
3.7. Análisis estadístico	82

4. RESULTADOS

4.1. Parámetros zoométricos básicos	85
4.2. Variables analíticas séricas	89
4.3. Variables iniciales de la vasculopatía	99
4.4. Variables de inflamación vascular: estrés oxidativo y nitrosativo	102
4.5. Variables del estado trombogénico	108
4.6. Morfometría de la pared vascular aórtica	112
4.7. Variables de daño cerebral tras un modelo de hipoxia-reoxigenación	116

5. DISCUSIÓN

5.1. Influencia del modelo experimental en las variables determinadas	125
5.2. Modificaciones causadas por la administración de los aceites	128
5.3. Una visión general de los resultados obtenidos	142

6. CONCLUSIONES

147

7. BIBLIOGRAFÍA

151

8. ANEXOS

8.1. Anexo I: Autorización del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga	171
8.2. Anexo II: Fuentes de financiación	183
8.3. Anexo III: autorización para el uso de figuras	185
8.3. Anexo IV: Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral	187



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA DIABETES MELLITUS

1.1.1. Definición

Diabetes Mellitus es el término que hace referencia a un trastorno metabólico caracterizado por la elevación de la concentración de glucosa en sangre de forma mantenida, debido bien, a un defecto en la producción y/o secreción de insulina, a la resistencia de ésta para utilizar la glucosa, a un aumento en la producción de glucosa, o la suma de ellas (Petersmann et al., 2019).

En cuanto al diagnóstico, los signos y síntomas más frecuentes son poliuria, polidipsia y polifagia, pero no todos los pacientes los presentan.

Los criterios utilizados para el diagnóstico se basan en los planteados por la *American Diabetes Association* (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2022):

- Determinación de glucosa sérica en ayunas igual o mayor a 126 mg/dl (7,0 mmol/L) y/o
- Determinación de glucosa sérica a las dos horas de la ingesta de 75 gramos de glucosa anhidrada igual o mayor de 200 mg/dl (11,1 mmol/L) y/o
- HbA1c igual o mayor de 6,5 % (48 mmol/mol)

El diagnóstico debe confirmarse con un segundo valor alterado, bien en la misma muestra de sangre, o en otra muestra distinta. No obstante, si existen síntomas compatibles con hiperglucemia (polifagia, polidipsia y/o poliuria) y una glucemia plasmática aleatoria mayor o igual a 200 mg/dl (11,1 mmol/L), no precisa de un segundo valor alterado.

1.1.2. Prevalencia e incidencia

En 2017, se determinó la existencia de aproximadamente 425 millones de personas adultas con diabetes mellitus en todo el mundo. Según valores estimados, esta cifra rondaba los 382 millones en 2013 y no alcanzaba los 108 millones en 1980 (Instituto

Nacional de Estadística, 2020; International Diabetes Federation, 2022) (Diabetes Atlas de la FID). El tipo 2 representa el 90% aproximadamente de los casos. Estos datos implican que un 8,8% de la población mundial (aproximadamente uno de cada 11 adultos) presentan diabetes, siendo dos terceras partes menores de 65 años.

La *International Diabetes Federation (IDF)* incrementa esta cifra a 693 millones para el próximo 2045.

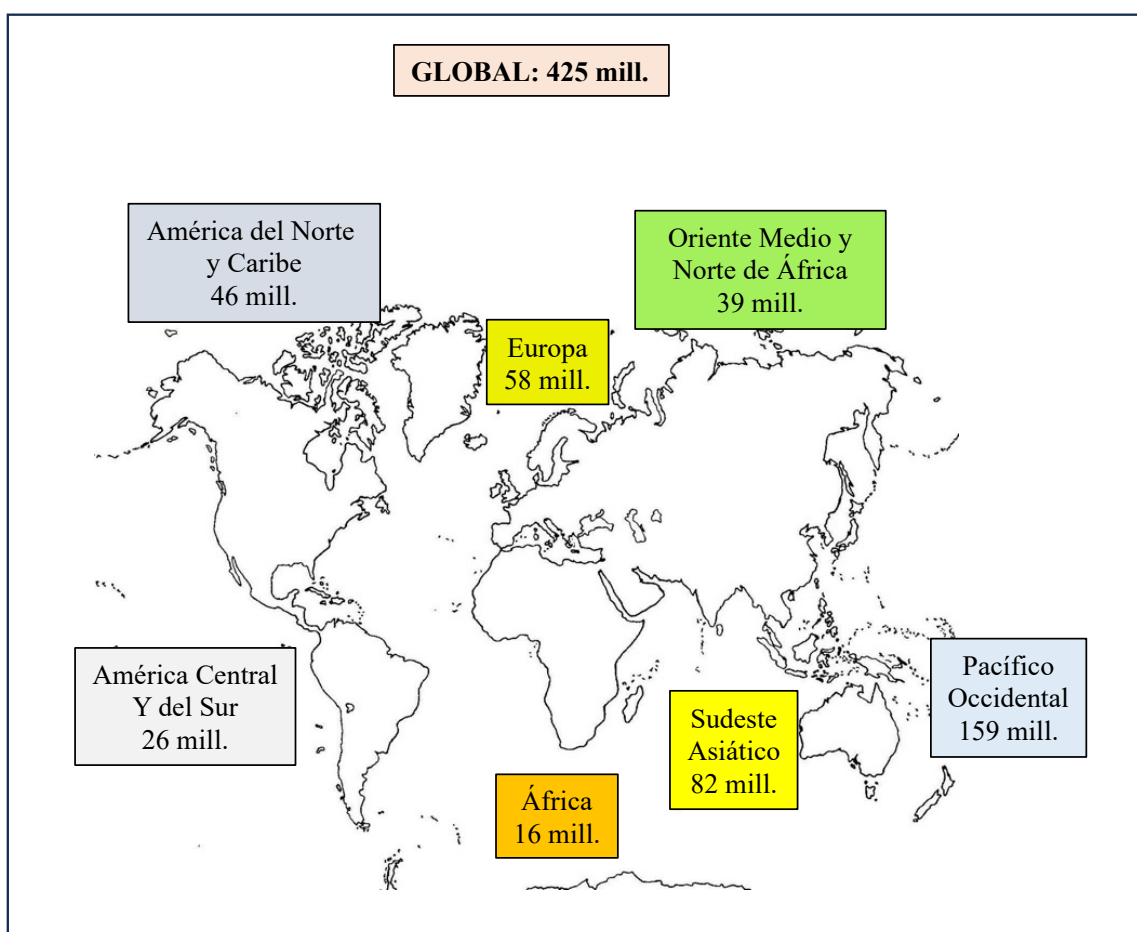


Figura 1.1. Personas afectadas de diabetes en el mundo (datos extraídos de International Diabetes Federation, 2022).

Según el estudio di@bet.es, España en el año 2020 presenta una incidencia anual bruta de diabetes de 8,5 casos por cada 1000 personas (Rojo et al., 2020).

1.1.3. Clasificación

Dependiendo del organismo que la realice, existen diferentes clasificaciones de la diabetes mellitus.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) inicialmente reconocía tres tipos de diabetes mellitus: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional.

El comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) realiza la división de diabetes mellitus en 4 grupos: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional y diabetes producida por otras causas. En este último subgrupo encontramos la diabetes tipo MODY, diabetes neonatal (ambas producidas por defectos genéticos de la función de las células β), entre otros.

Actualmente se han reunificado y consensado ambas clasificaciones, reconociendo los siguientes tipos de diabetes mellitus (ElSayed et al., 2023):

1. Diabetes tipo 1. Es debida a la destrucción autoinmune de células β de los Islotes de Langerhans del páncreas, que suele conducir a una deficiencia absoluta de insulina y por ende a un incremento crónico de la glucemia. Aquí se incluye también la diabetes autoinmune latente de la edad adulta.

2. Diabetes tipo 2. Es debida a una resistencia tisular a la insulina, lo cual conduce a una pérdida progresiva no autoinmune de la secreción adecuada de insulina por las células β . En este grupo se contempla el síndrome metabólico.

3. Tipos específicos de diabetes. Son aquellos tipos que se deben a otras causas diferentes de las anteriores, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (como la diabetes neonatal y la diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes, más conocida como tipo MODY (-Maturity Onset Diabetes of the Young-), enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística y la pancreatitis), y diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas (como con el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH/SIDA o tras el trasplante de órganos).

4. Diabetes mellitus gestacional. Se diagnostica diabetes tipo 1 o tipo 2 en el segundo o tercer trimestre del embarazo en mujeres que no padecían de diabetes claramente manifiesta antes de la gestación). Generalmente desaparece después de la gestación.

1.1.4. Principales complicaciones de la diabetes mellitus

El correcto control de las cifras de glucemia a lo largo del tiempo puede disminuir o incluso evitar la aparición de complicaciones derivadas de la patología glucídica, mejorando la calidad de vida y también la supervivencia. Hay varios estudios publicados donde se comprueba la relación inversa que existe entre el correcto control glucémico y el desarrollo de complicaciones de la diabetes, tanto en los pacientes con DM tipo 1 como en pacientes con DM tipo 2 (Kirkman et al., 2018; Leslie, 1999; Shichiri et al., 2000; Ueki et al., 2021).

El hecho de que se trate de una enfermedad crónica implica que el correcto control debe ser diario y de por vida, hecho que hace que sea complicado y es por eso por lo que el 75-80% de los pacientes a partir de los 10-15 años de evolución de la diabetes presentan alguna complicación de diferente tipo y gravedad.

Una hiperglucemia mantenida en el tiempo puede ocasionar daño en diferentes órganos y sistemas, pero tienen un factor común: el daño del sistema vascular. Se identifican dos tipos de vasculopatías como complicación a largo plazo crónica de la diabetes mellitus: macroangiopatía y microangiopatía diabéticas (Figura 1.2.).

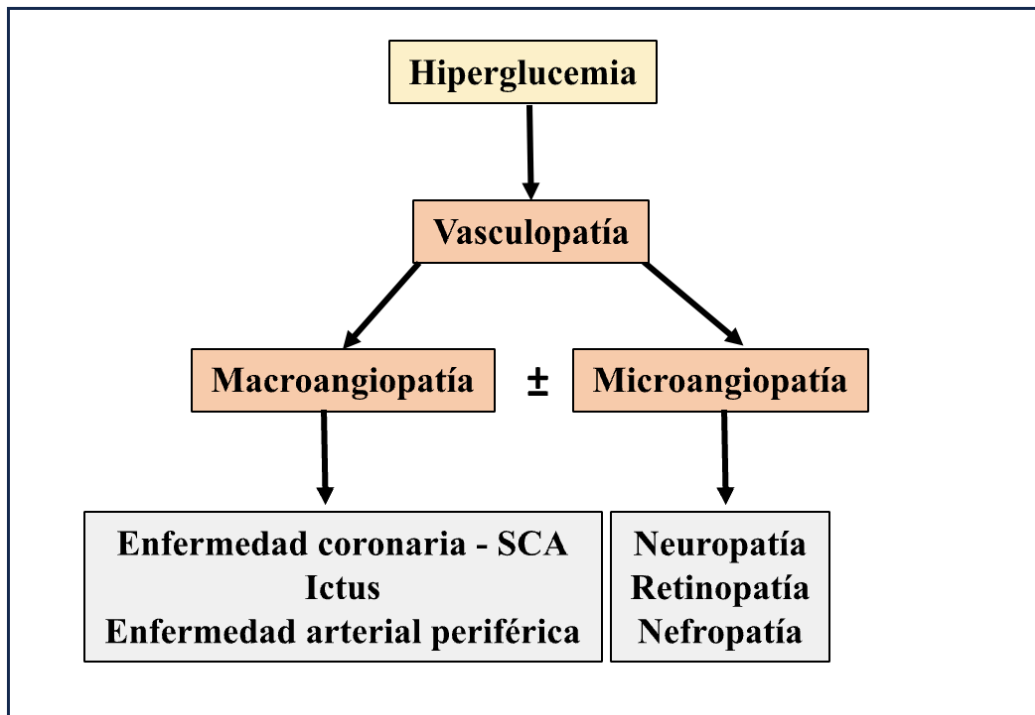


Figura 1.2. Principales complicaciones vasculares de la diabetes mellitus (figura de elaboración propia).

1.1.4.1. MACROANGIOPATÍA DIABÉTICA

Se refiere a un daño en los grandes vasos sanguíneos, siendo su desarrollo similar a la pléyade de eventos arteriales acaecidos en la arteriosclerosis que se produce en personas no diabéticas, tan solo que las lesiones son más intensas y precoces.

La diabetes mellitus actúa favoreciendo la aparición de una inflamación vascular y la posterior arteriosclerosis, produciendo como consecuencia final un proceso isquémico trombótico. Las principales localizaciones de estos procesos son: circulación coronaria, cerebral y/o periférica, dando lugar a síndrome coronario agudo, ictus isquémico y/o claudicación intermitente, respectivamente. Estas complicaciones aparecen en mayor medida en la diabetes mellitus tipo 2. La diabetes mellitus por sí misma, independientemente del resto de factores de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, hipertensión arterial, obesidad, etc.), aumenta en 2-4 veces la probabilidad de presentar un síndrome coronario agudo, un ictus isquémico o incluso la muerte por causa cardiovascular (Henning, 2018).

La asociación de la diabetes mellitus con una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular fue inicialmente demostrada en el estudio *The Framingham study*, siendo esta asociación entre dos y cuatro veces mayor en pacientes con diabetes frente a pacientes sin diabetes (Fox, 2010; Kannel & McGee, 1979).

Según algunas asociaciones científicas, la diabetes ha llegado a considerarse un “equivalente de riesgo cardiovascular”. Se ha demostrado que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 sin enfermedad cardiovascular activa tenían una mortalidad similar a pacientes sin diabetes mellitus y con enfermedad cardiovascular previa (Juutilainen et al., 2005).

Desde el año 2016 en adelante, las sociedades Europeas de Cardiología, reconocen que el riesgo cardiovascular en los pacientes con diabetes mellitus es similar a tener patología coronaria cuando la duración de la enfermedad supera los 10 años y/o cuando existe deterioro de la función renal (Mach et al., 2020).

- Enfermedad arterial coronaria

La diabetes mellitus tipo 2 es un importante factor de riesgo que afecta a la enfermedad arterial coronaria. Además, el 75% de los pacientes con este tipo de diabetes mueren como consecuencia de enfermedades cardiovasculares, incluida la enfermedad coronaria. En los pacientes, es más probable que la enfermedad arterial coronaria sea una enfermedad compleja caracterizada por una afectación multivaso pequeña, difusa y calcificada y que a menudo requiere revascularización coronaria además de un tratamiento médico óptimo para controlar la angina (Naito et al., 2017).

- Accidente cerebrovascular

La diabetes mellitus también se asocia con el daño cerebrovascular. Su incidencia está incrementada en todos los grupos de edad, siendo los pacientes diabéticos de raza afroamericana con edad inferior a 55 años, y antes de los 65 años en raza blanca, los más afectados (Lau et al., 2019).

El exceso de producción de lactato cerebral que se produce en pacientes con diabetes mellitus reduce la recuperación del tejido dañado en los accidentes cerebrovasculares

isquémicos, provocando mayor tamaño del infarto final y en los hemorrágicos aumentando la expansión del hematoma y del edema perilesional, es por ello por lo que los accidentes cerebrovasculares en pacientes diabéticos presentan un peor pronóstico (Chen et al., 2016; Quast et al., 1997).

- Enfermedad arterial periférica

Las manifestaciones clínicas más significativas de los trastornos circulatorios periféricos en la diabetes mellitus suelen ser las lesiones en el conocido “pie diabético”, como son las úlceras y la gangrena (Edmonds, 2019).

La enfermedad arterial periférica en la diabetes se caracteriza por una afectación multisegmento con estenosis y/u oclusión de zonas del vaso, en su zona más distal, con formaciones colaterales insuficientes, siendo los territorios más afectados la circulación a nivel crural y distal de las extremidades inferiores (Edmonds, 2019). La diabetes, junto con el hábito tabáquico, es uno de los factores de riesgo más importante, presentando de dos a cuatro veces más riesgo que pacientes sin diabetes. La prevalencia general de enfermedad arterial periférica en personas con diabetes mellitus mayores de 40 años es del 20%, aumentando a un 29% en los pacientes mayores de 50 años (Barnes et al., 2020). Se estima que el 1% de los pacientes con diabetes serán sometidos a amputación de miembros inferiores a lo largo de la enfermedad (Sen et al., 2019).

1.1.4.2. MICROANGIOPATÍA DIABÉTICA

Al contrario de la macroangiopatía, afecta predominantemente a los pequeños vasos arteriales y a los capilares, aparece con mayor frecuencia en la diabetes mellitus tipo 1 y es un proceso patognomónico de la diabetes mellitus. Como factor común a la macroangiopatía, su aparición depende del correcto control glucémico, dependiendo de éste el momento de su aparición y la intensidad de la afectación (Sun et al., 2021).

La neuropatía periférica, retinopatía y nefropatía diabética son las tres principales complicaciones derivadas de la microangiopatía diabética.

- Neuropatía diabética

Es también conocida como neuropatía periférica diabética y hace referencia a la presencia de signos y/o síntomas de afectación del nervio periférico debidos al daño en los sistemas nerviosos somático y autónomo en pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus, tras haber excluido otras causas. La neuropatía diabética se clasifica en dos tipos: neuropatía focal y neuropatía difusa. Esta última presenta diferentes subtipos, siendo los dos más frecuentes la polineuropatía sensitivo-motora distal simétrica (75% de las neuropatías) y la neuropatía autonómica, siendo las más comunes y teniendo una presentación progresiva (Russell et al., 2014; Torné, 2019)

Afecta tanto a pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (45%) como a los de tipo 2 (54-59%), pudiendo ser asintomática en hasta el 50% de los casos y aparecer en cualquier momento del transcurso de la enfermedad (Sasaki et al., 2020).

El diagnóstico es fundamentalmente clínico, apareciendo inicialmente los síntomas sensitivos (dolor, parestesias y la pérdida sensorial). La afectación motora es infrecuente y en caso de aparecer, lo hace en fases más avanzadas. Esta alteración nerviosa favorece la aparición de otras complicaciones tardías, como sería la ulceración del pie y las alteraciones osteoarticulares como la neuro-artropatía de Charcot (Russell et al., 2014; Torné, 2019).

Fisiopatológicamente, podríamos decir que la neuropatía diabética se centra en las anomalías vasculares provocadas por la hipoxia, tales como el engrosamiento de la membrana basal de los capilares y la hiperplasia endotelial. Estas lesiones son causadas por un estado de hiperglucemia mantenida, que produce una hiperactivación de la vía de los polioles, lo que da como resultado una disminución del mioinositol, la vía de los productos finales de glicación, la vía de la diacilglicerol-protein cinasa C (DAG/PKC), así como la vía de la hexosamina, que conduce a un estado de estrés oxidativo provocando una reducción del flujo sanguíneo y, por consiguiente, el daño neuronal (Jin & Ma, 2021).

- Retinopatía diabética

Se trata de la microangiopatía más frecuente en la población diabética, presentando cifras de incidencia similares entre la diabetes tipo 1 y la tipo 2, tan solo varía el tipo de lesiones principales: isquémicas en la tipo 1 y edematosas en la tipo 2. No obstante, es la principal causa de pérdida visual y ceguera de los adultos entre 20-65 años (Vieira-Potter et al., 2016). La pérdida visual es 25 veces más común entre las personas con diabetes mellitus que en las personas sin esta enfermedad (Mahmood et al., 2023). Según la Federación Internacional de Diabetes y la *International Association on the Prevention of Blindness*, una de cada tres personas de los 415 millones que viven en el mundo, desarrollará alguna forma de daño ocular a lo largo del transcurso de la enfermedad (International Diabetes Federation, 2022; Wong et al., 2016).

La retinopatía diabética afecta a los pequeños vasos de la retina, presentando una mayor permeabilidad y mayor riesgo de hemorragias oculares y exudados lipídicos, pudiendo desarrollar nuevos vasos (neovascularización retiniana) como intento de compensación de una isquemia (Wong et al., 2016).

La forma de lesión retiniana condiciona el tipo de retinopatía clínica, distinguiéndose dos tipos (Yang et al., 2022):

- Retinopatía diabética no proliferativa (leve, moderada y grave): las formas leve y moderada pueden no progresar y no amenazar a la visión, a diferencia de la forma grave, que se caracteriza por la aparición de microaneurismas, microangiopatía capilar, engrosamiento de membrana basal, hemorragias parenquimatosas, lesiones microvasculares, exudados duros y anomalías venosas.
- Retinopatía diabética proliferativa: es la etapa avanzada de la retinopatía diabética. Pueden aparecer neovascularizaciones, hemorragias prerretinianas o vítreas, proliferación fibrovascular y desprendimiento de retina (Wong et al., 2016).

La inflamación de los vasos sanguíneos retinianos puede ser debida a diferentes estímulos, como serían la hiperglucemia mantenida, altas concentraciones de citosinas y quimiocinas circulantes o vítreas, AGE (*advanced glycation and*

products), especies reactivas de oxígeno y factores de crecimiento (Jin & Ma, 2021). El aumento del estrés oxidativo, inducido por cada una de las vías bioquímicas anteriores, combinado con los niveles reducidos de glutatión, inducen la producción de mediadores inflamatorios, la destrucción de la barrera hematorretiniana, la muerte de los pericitos capilares y, como consecuencia, un aumento de la permeabilidad vascular. La hipoxia retiniana estimula la producción de citosinas proinflamatorias y factores de crecimiento proangiogénicos, promoviendo el crecimiento descontrolado de nuevos vasos sanguíneos y la pérdida de células de la retina (Jin & Ma, 2021; Zhabg et al., 2023).

- Nefropatía diabética

La diabetes mellitus es la primera causa de enfermedad renal crónica terminal con necesidad de tratamiento sustitutivo renal, y la tercera causa de trasplante renal (tras poliquistosis renal y glomerulonefritis crónica). El registro anual de la Sociedad Española de Nefrología en el año 2016 situó en un 23,1% la cifra de pacientes con diabetes que precisaron inicio de tratamiento sustitutivo renal (Umanath & Lewis, 2018).

Se trata de la pérdida parcial o total de la función renal asociada con síndrome nefrótico, albuminuria crónica (excreción de albúmina urinaria igual o superior a 300 mg/día, al menos dos veces, con 3-6 meses de diferencia), lesiones glomerulares típicas (glomeruloesclerosis), reducción del filtrado glomerular, hipertensión y retención hídrica, en ausencia de otra patología renal. La presencia de retinopatía es un criterio diagnóstico de nefropatía diabética, pero su ausencia no excluye la existencia de la afectación renal en contexto de diabetes (Alicic et al., 2017).

La albuminuria en la diabetes mellitus se asocia con unas características histopatológicas distintivas como el engrosamiento de la membrana basal glomerular y la expansión mesangial. La nefropatía diabética progresa a través de cinco etapas (Naaman & Bakris, 2023):

- Etapa I: hiperfiltración hipertrófica
- Etapa II: quietud fisiopatológica

- Etapa III: microalbuminuria
- Etapa IV: insuficiencia renal crónica
- Etapa V: insuficiencia renal terminal

El 20-30% de los pacientes con diabetes mellitus de larga evolución (15 años aproximadamente) presenta microalbuminuria y casi la mitad de ellos desarrollará una nefropatía real. A partir de los 20 años de evolución, la mitad de los pacientes desarrollará nefropatía y el 15% de ellos evolucionará a una etapa terminal de insuficiencia renal.

En cuanto al mecanismo de producción, la hiperglucemia crónica induce las mismas vías bioquímicas comentadas en la neuropatía y en la retinopatía. La activación de múltiples cascadas de transducción de señales conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios y profibróticos, cambiando la hemodinámica renal y contribuyendo al cambio en la estructura y función del riñón (alteración de la permeabilidad glomerular, engrosamiento de la membrana basal glomerular, hiperfiltración glomerular, síntesis de matriz mesangial...) provocando finalmente esclerosis del glomérulo y la fibrosis intersticial, así como una disminución de la fracción de filtrado glomerular (Lin et al., 2018).

1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS COMPLICACIONES VASCULARES DE LA DIABETES MELLITUS

1.2.1. Mecanismo del daño vascular

En el ámbito vascular, las cifras elevadas de glucosa de forma mantenida establecen una secuencia de fenómenos bioquímicos que tienen como consecuencia final la alteración del endotelio como órgano, disfunción del músculo liso vascular, alteraciones de los elementos de la coagulación, deficiente metabolismo de los lípidos, etc., y todo ello se manifiesta finalmente como enfermedad micro y macrovascular. Si a esto le añadimos otros factores de riesgo cardiovasculares (hipertensión, dislipemia, tabaquismo, obesidad), tenemos como consecuencia tasas de evolución más rápidas con aparición de esta patología en edades más tempranas (Henning, 2018).

La célula endotelial ha ido aumentando en importancia en los modelos de investigación de la enfermedad vascular, llegando a ser el principal responsable, por su función, de la mayoría de los fenómenos relacionados con la enfermedad arteriosclerótica y sus consecuencias (Shi & Vanhoutte, 2017). Además de ocupar una posición estructural en la interrelación de la sangre y la pared del vaso, cumple un conjunto de funciones destinadas a mantener la homeostasis del sistema estableciendo un equilibrio mediante la activación de una maquinaria citoplasmática, que es capaz de producir sustancias biológicamente activas que modifican la hemodinamia del sistema, y también la expresión de receptores de membrana que modifican las capacidades de los elementos figurados para adherirse, migrar o aglutinarse. Por tanto, en términos generales, la disfunción endotelial se traduce en alteraciones de la regulación del flujo sanguíneo, migración anormal de células entre las capas de la pared del vaso, alteraciones en la diapédesis de células inmunológicas y fenómenos trombóticos (Zhang, 2022).

Los fenómenos fisiopatológicos que se producen en la disfunción endotelial en el transcurso de la diabetes mellitus se resumen en los siguientes eventos (Carrizzo et al., 2018):

- Alteración en la biodisponibilidad del óxido nítrico.
- Aumento de la producción de vasoconstrictores.
- Alteración en la función del músculo liso vascular.
- Expresión anormal de receptores de membrana que aumentan la adhesión y migración celular y estimulan la agregación plaquetaria.
- Aparición de fenómenos inflamatorios en la pared vascular.

1.2.2. Etapas del daño vascular

Los cinco fenómenos descritos anteriormente, se pueden agrupar en lo que llamamos las 3 etapas del daño vascular. Se trata de etapas progresivas, es decir, una etapa conduce a la siguiente; por tanto, si se consigue frenar o bloquear una, se retrasa o evita la aparición de la siguiente.

1.2.2.1. PRIMERA ETAPA: CAMBIOS EN LAS VÍAS BIOQUÍMICAS INTRA-CELULARES

El exceso de glucosa en sangre de forma mantenida provoca cambios importantes en el metabolismo celular, fundamentalmente con el objetivo de disminuir el acúmulo de glucosa a raíz de estar saturadas las vías fisiológicas de utilización de dicha glucosa. Las principales vías bioquímicas que se ponen en marcha en esta situación son: ruta de los polioles, ruta de las hexosaminas, glicosilación no enzimática (AGE), activación de la vía del diacilglicerol-proteína cinasa C (DAG-PKC); la activación de estas rutas bioquímicas tiene un punto común final para todas ellas: la generación de un estrés oxidativo celular, punto clave y central de todo el proceso fisiopatológico en las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus. Estas alteraciones se describen por separado, pero están interrelacionadas entre sí.

- Ruta de los polioles

El riñón, retina, corazón y tejido nervioso son insulino-independientes para la captación de glucosa, y es por lo que son los órganos que manifiestan las principales complicaciones derivadas de la hiperglucemia. En éstos, la glucosa puede seguir la ruta de los polioles, donde se transforma por la acción sucesiva de la aldosa reductasa (AR) en sorbitol dependiente de $\text{NADPH} + \text{H}^+$, y la sorbitol deshidrogenasa (SDH) que oxida el sorbitol a fructosa generando $\text{NADH} + \text{H}^+$ respectivamente. Una consecuencia del consumo de NADPH es que disminuye la actividad de otras enzimas como la óxido nítrico sintasa (eNOS), la glutatión reductasa (GR), la catalasa y la NADPH oxidasa, lo que se traduce en la deficiencia de los sistemas antioxidantes en el paciente diabético (Bonfont-Rousselot, 2002; Brownlee, 2001 (Figura 1.3.).

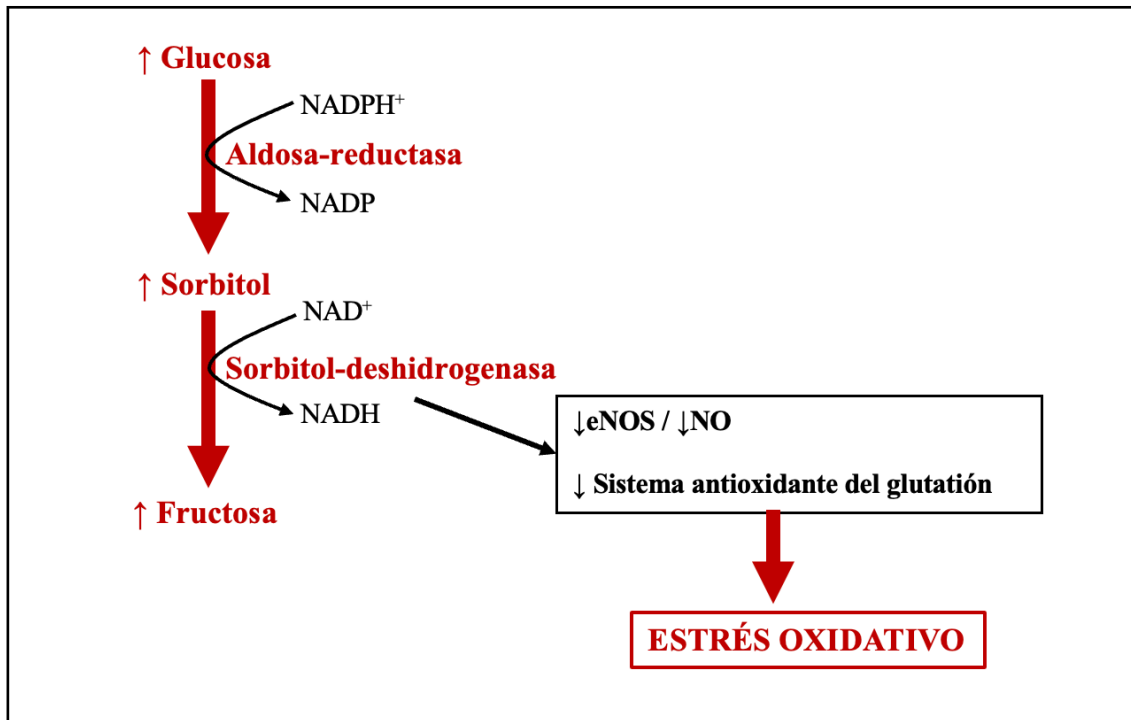


Figura 1.3. Esquema básico de la vía de los polioles (figura de elaboración propia).

- Ruta de biosíntesis de las hexosaminas

La glucosamina-6-fosfato se origina a partir de la fructosa-6-fosfato y glutamina; tras tres reacciones da origen a la UDP-N-acetilglucosamina y a la UDP-N-acetilgalactosamina. Ambas se utilizan en la formación de glicoproteínas y proteoglicanos. En la diabetes mellitus existe un aumento de flujo a través de esta vía, contribuyendo al aumento de la expresión de genes como los de TGF α , TGF β 1 (factores de crecimiento transformante) y del inhibidor del activador del plasminogeno-1 (PAI-1). También participa en la resistencia a la insulina inducida por lípidos e hiperglucemia. Administrando glucosamina se ha observado una correlación entre el incremento de UDP-N-acetilglucosamina y la actividad de la GFAT; con la baja captación de glucosa en los tejidos adiposo y muscular (Singh et al., 2007) (Figura 1.4.).

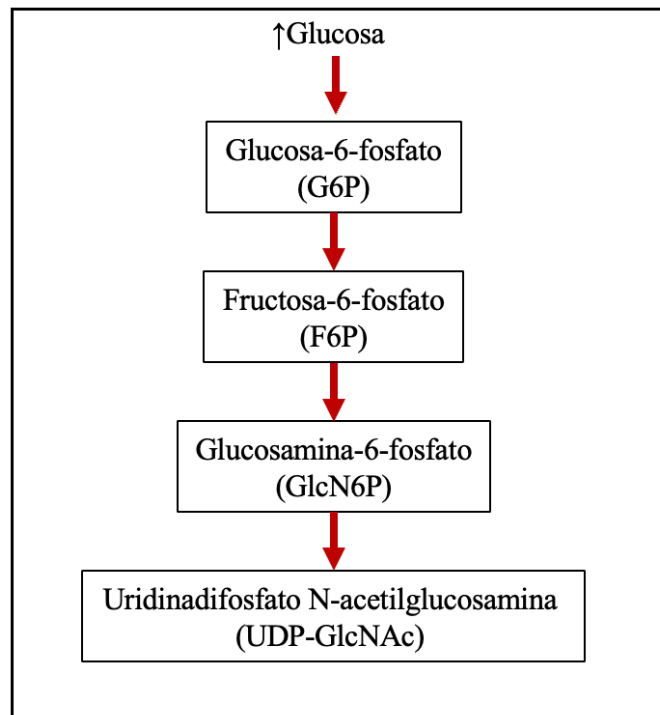


Figura 1.4. Esquema básico de la vía de las hexosaminas (figura de elaboración propia).

- Glicosilación no enzimática: formación de productos finales de glicación avanzada (AGE)

La glucosa se puede unir de manera no enzimática a grupos amino libres de proteínas y lípidos dando lugar a AGE (*advanced glycation and products*) que pueden acumularse en las células durante períodos prolongados (Pinto et al., 2022). La formación de AGE se acelera en la diabetes mellitus; a más concentración de glucosa en sangre, mayor formación de AGE (Figura 1.5.).

Los precursores de AGE intracelulares dañan a las células por tres mecanismos:

1. Interaccionan con proteínas intracelulares (de señalización).
2. Con macromoléculas de la matriz extracelular, que interactúan de forma anómala con otros componentes y los receptores de las integrinas.
3. Las proteínas plasmáticas modificadas por los precursores se unen a los receptores RAGE en las células endoteliales, mesangiales y los macrófagos. Así, aumenta la

sensibilidad de los vasos sanguíneos a los radicales libres, y al daño que causan al ADN nuclear.

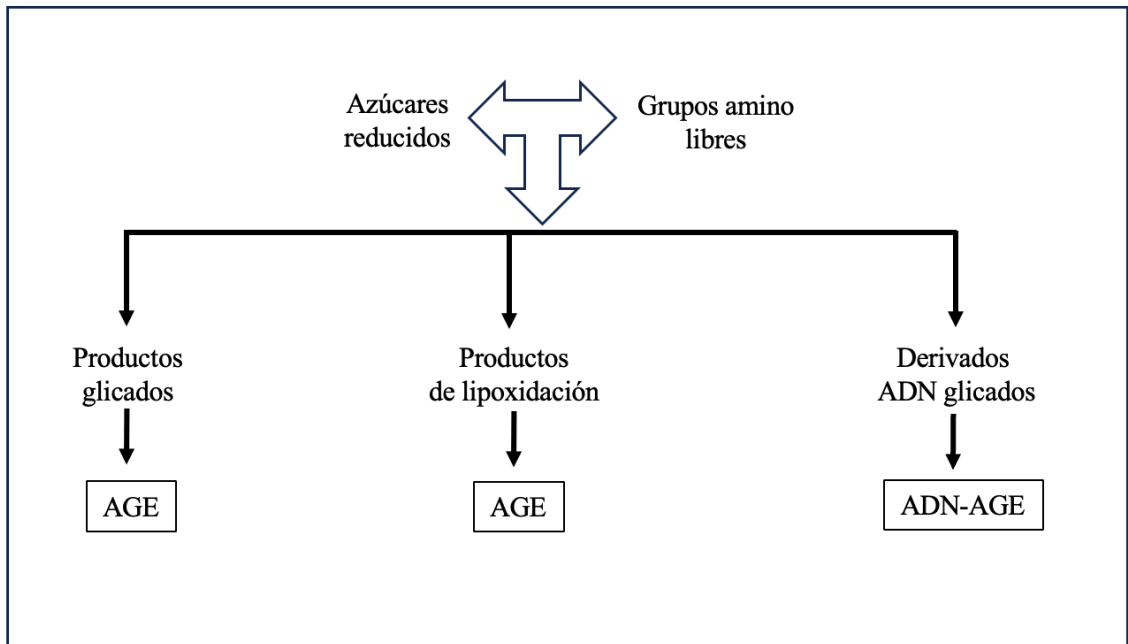


Figura 1.5. Esquema básico de formación de los productos finales de glicación avanzada (figura de elaboración propia).

- Activación de la vía del diacilglicerol-proteína cinasa C (DAG-PKC)

La PKC regula muchas funciones celulares, sobre todo la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Los niveles elevados de glucosa intracelular aumentan la concentración de diacilglicerol (DAG), por un aumento de la síntesis *de novo*, siendo un potente estimulador de la PKC (Mochly-Rosen et al., 2012).

Otras vías también contribuyen al aumento de la PKC en la diabetes mellitus, como serían la activación del inositol trifosfato (IP3) o el desequilibrio NADH/NAD⁺. El aumento de la síntesis de DAG y la activación prolongada de PKC pueden favorecer la liberación de factores de crecimiento celular (Mochly-Rosen et al., 2012).

- Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libres, que provocan daño

oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Casi todas las actividades antioxidantes endógenas disminuyen en la diabetes mellitus (Azul et al., 2020). El daño celular que producen los radicales libres ocurre en los enlaces de proteínas (polimerización anómala), los fosfolípidos (peroxidación de lípidos), hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena (Demirci-Çekiç, 2022).

La acumulación de radicales libres puede dar lugar a la glicación no enzimática de proteínas, la activación de la vía DAG-PKC, la acumulación de sorbitol y la activación de la expresión del factor nuclear NFkB en las células endoteliales; asimismo, todas estas vías se reconocen como generadoras de radicales libres, cerrando un círculo vicioso de autoestimulación (An et al., 2023) (Figura 1.6.). En un apartado posterior analizaremos con más detalle el papel del estrés oxidativo en la génesis y evolución de las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus.

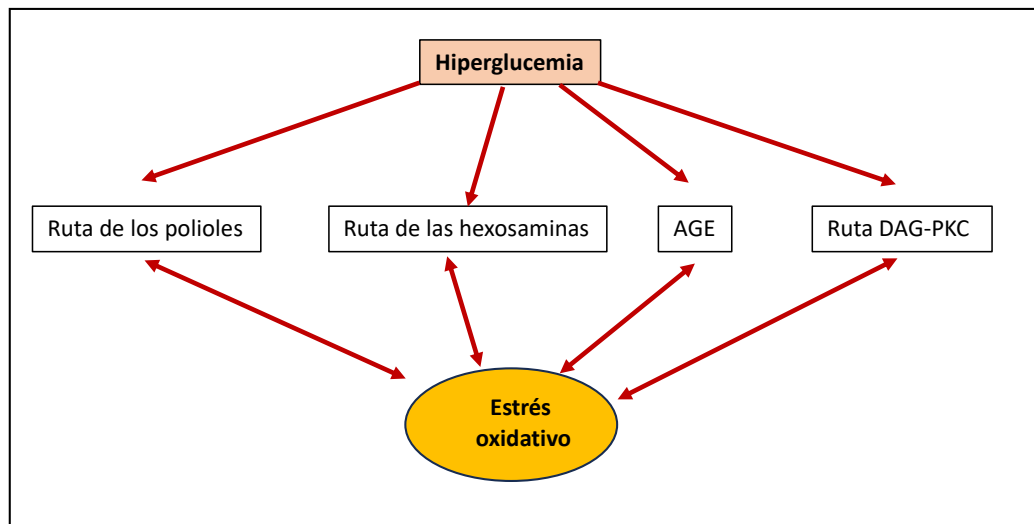


Figura 1.6. Interacción bidireccional entre estrés oxidativo y vías bioquímicas activadas por la hiperglucemia crónica (figura de elaboración propia).

1.2.2.2. SEGUNDA ETAPA: DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Las diferentes alteraciones bioquímicas que se producen en la diabetes mellitus tienen un punto en común, el endotelio, donde se produce una alteración de sus

funciones, teniendo como resultado final la **disfunción endotelial**, centro fisiopatológico de la mayor parte de las alteraciones cardiovasculares.

Se conoce como disfunción endotelial la presencia de un fenotipo endotelial alterado caracterizado por una biodisponibilidad reducida de óxido nítrico (NO), estrés oxidativo aumentado, expresión aumentada de factores protrombóticos y proinflamatorios y una reactividad vascular aumentada (incremento de endotelinas y disminución de prostaciclina (Xu et al., 2021). En las pruebas de funcionalidad se observa una vasodilatación, dependiente de endotelio, deteriorada y una activación endotelial caracterizada por un estado proinflamatorio, proliferativo, prooxidante y procoagulante (Clyne, 2021). Esto conduce a un desequilibrio en la circulación sanguínea y, por ende, en los órganos irrigados por los vasos afectados.

El endotelio humano posee una serie de funciones, todas ellas conducentes a mantener un flujo sanguíneo adecuado en cada momento a los tejidos. Las principales funciones, de forma muy resumida, son las siguientes (Figura 1.7.):

- **Barrera física**, con el objetivo de mantener a la sangre dentro de la luz vascular y permitir la salida de sustancias en su lugar adecuado.
- **Reparación de daño vascular**. En caso de una ruptura morfológica o un proceso de isquemia focal, el endotelio sano intenta recomponer esos posibles fallos, para ello produce el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (VEGF), que favorece la neoformación de vasos en una zona localizada.
- **Regulación del tono vascular**. Para ello, las células endoteliales producen compuestos vasoconstrictores (endotelinas) y, en mayor medida, vasodilatadores (prostaciclina y óxido nítrico). La prostaciclina se une a sus receptores de membrana de la fibra muscular lisa vascular y estimula la formación de AMPc; el NO difunde hacia esta capa vascular e incrementa la producción de GMPc; ambos nucleótidos son los responsables de la relajación de las fibras musculares, produciendo vasodilatación. La endotelina-1 se une a sus receptores de membrana en las células musculares vasculares, incrementando los niveles citoplasmáticos de calcio, provocando vasoconstricción.

- **Regulación de la hemostasia.** En términos generales, el endotelio es un órgano antitrombótico, siendo quizás una de sus principales funciones la de mantener una hemostasia que no se active en condiciones no hemostáticas, es decir, evitando la activación trombótica. Para ello produce compuestos antiagregantes plaquetarios (prostaciclina, óxido nítrico), anticoagulantes (trombomodulina, complejo proteína C/proteína S) y pro-fibrinolíticas (activador tisular del plasminógeno).

Todas estas funciones se alteran en la diabetes mellitus con un mal control metabólico (Figura 1.8.).

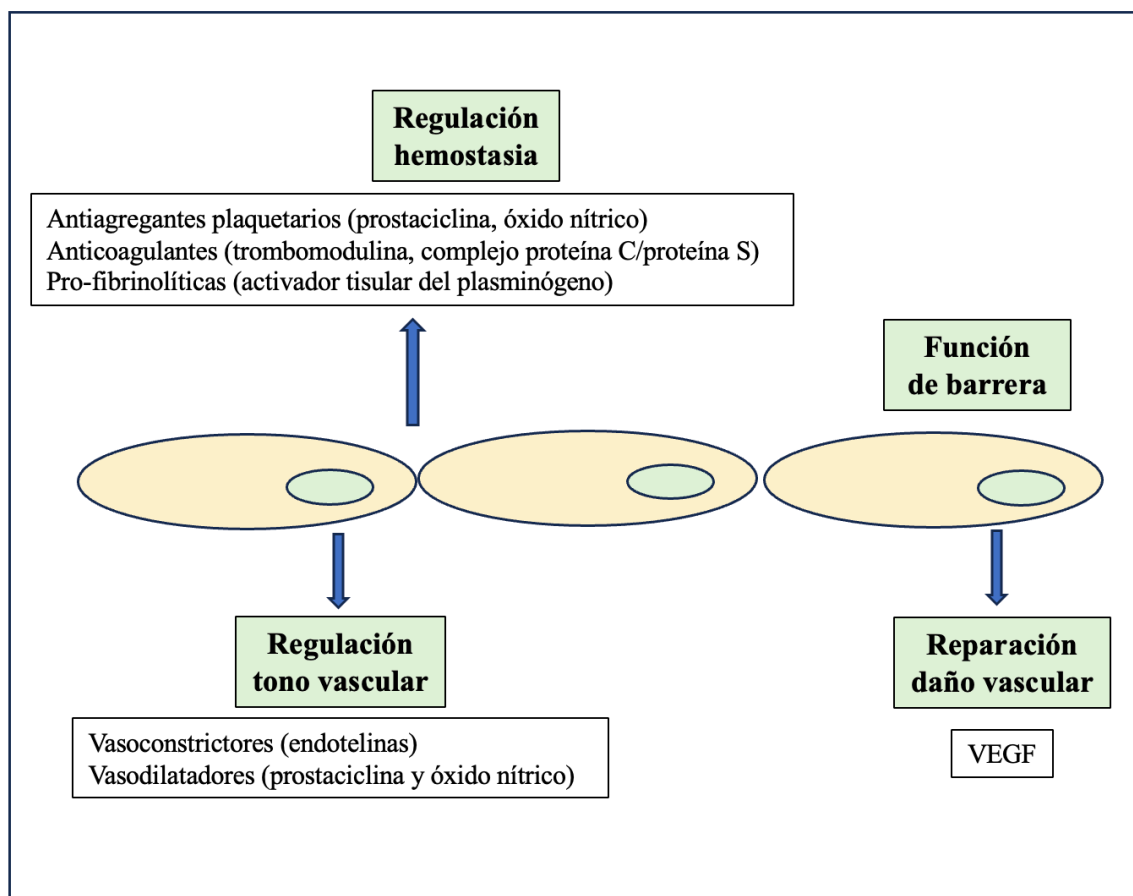


Figura 1.7. Principales funciones del endotelio vascular (figura de elaboración propia).

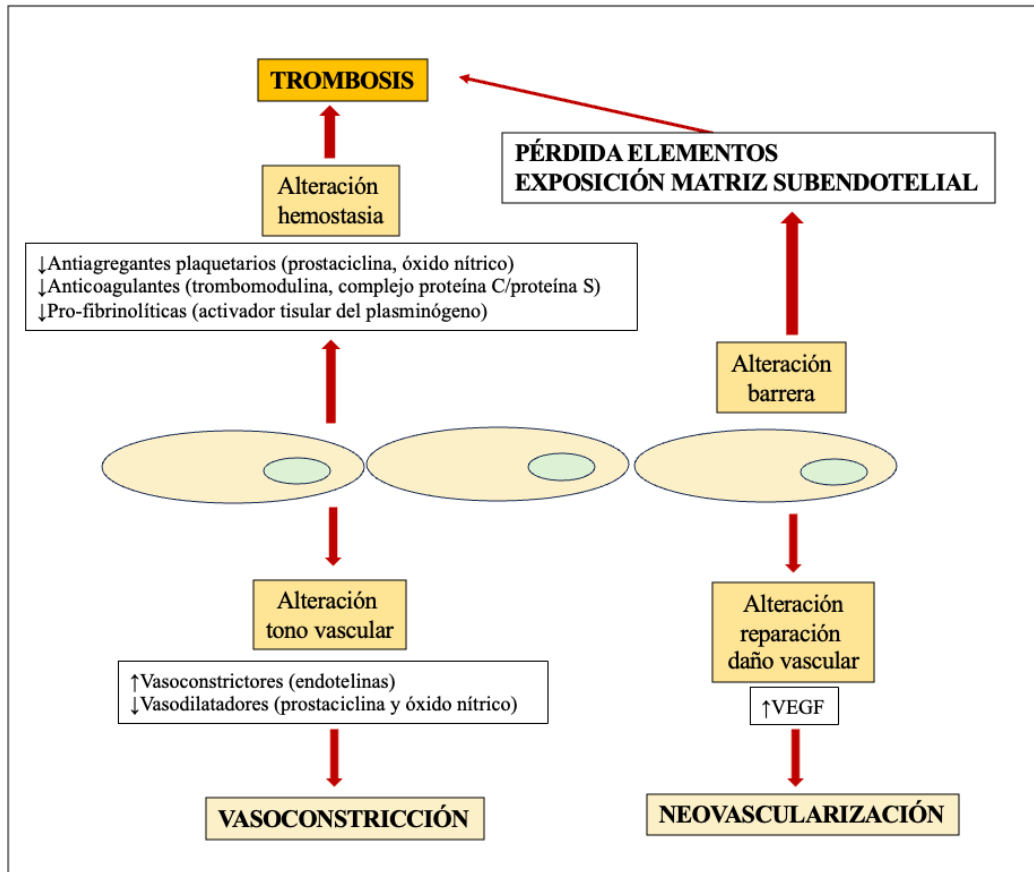


Figura 1.8. Principales consecuencias de la disfunción endotelial (figura de elaboración propia).

1.2.2.2.1. Alteración de la función antitrombótica

Como ya hemos indicado, la función antitrombótica del endotelio se produce como consecuencia de la liberación de sustancias antiagregantes plaquetarias (ADPasa, NO y prostaciclina), sustancias anticoagulantes (trombomodulina y similares a heparina) y estimuladores de fibrinólisis (tPA o activador tisular del plasminógeno) (Neubauer & Zieger, 2022). Todas estas funciones se alteran en los pacientes diabéticos con un mal control de sus cifras de glucemia. Paralelamente, en un estado hiperglucémico mantenido en el tiempo, también existe un estado de **activación plaquetaria**, que, junto a la disfunción endotelial, agrava la posibilidad de una activación trombótica (Maruhashi & Higashi, 2021; Neubauer & Zieger, 2022).

Para contextualizar lo anterior, es importante conocer el funcionalismo plaquetario, para así entender cuál es su papel y función en el estado protrombótico de la diabetes

mellitus, ya que conduce a que estos pacientes tengan mayor riesgo de accidentes isquémicos.

Función plaquetaria

Las plaquetas son elementos sanguíneos de pequeño tamaño y forma oval, que cumplen con diferentes funciones, entre las que destacan su papel en la reparación de las lesiones vasculares internas y participación en el proceso de la coagulación. Cuando un estímulo protrombótico interactúa con una plaqueta, ésta es capaz de cambiar su forma oval, emitiendo pseudópodos, y de esta forma se adhiere a otras plaquetas y al subendotelio vascular, liberando todo su contenido y formando, como resultado final, el trombo arterial. La liberación del contenido intraplaquetario tiene varios objetivos: activar a nuevas plaquetas (reclutamiento plaquetario), facilitar el proceso de vasoconstricción (serotonina, calcio) y activar la fase plasmática de la coagulación (factor 3 plaquetario). Así, el trombo crece y se estabiliza, originando un proceso obstructivo-isquémico bien establecido (Yung et al., 2016).

Desde que se expone el colágeno subendotelial a la sangre hasta que se forma el agregado plaquetario primario se puede definir como un proceso de cuatro fases:

. Fase de lesión vascular:

El endotelio vascular, mediante mecanismos químicos y físicos, evita que las plaquetas se adhieran y queden retenidas en algún punto de la circulación vascular, y así no puedan formar trombos arteriales.

Cuando los mecanismos antiplaquetarios del endotelio fallan, puede ser debido a una desendotelización física en la superficie de las células endoteliales, perdiendo así su carga negativa, que servía en condiciones fisiológicas para “repeler” en parte a las cargas negativas de la superficie de las plaquetas (Ni et al., 2020). Por otra parte, el colágeno subendotelial se pone en contacto con la sangre y sus elementos y, exponiendo su carga eléctrica positiva, atrae así a las plaquetas.

. Fase de adhesión:

Las plaquetas circulantes pueden adherirse a la pared de los vasos sanguíneos dañados o al endotelio disfuncional, promoviendo el reclutamiento de células involucradas en la inmunidad innata y adaptativa. El endotelio dañado cambia su estado a prothrombótico, aumentando la liberación de difosfato de adenosina (ADP) y de factor de von Willebrand, e incrementando la expresión de factor tisular (TF), así como de diversas moléculas de adhesión, como las moléculas de adherencia intercelular (ICAM), las moléculas de adhesión a células vasculares (VCAM) y las proteínas quimiotácticas de monocitos 1 (MCP-1), entre otras (Iba & Levy, 2018).

La P-selectina es una molécula de adhesión indispensable para la unión de las plaquetas al endotelio a través del ligando de P-selectina (PSGL-1) o con el receptor del factor de von Willebrand glicoproteína Ib (GPIb) presentes en el endotelio; a su vez, las plaquetas se unen mediante el mismo receptor GPIb a la P-selectina del endotelio, permitiendo la adhesión y el rodamiento de estas sobre la capa endotelial (Blair & Frelinger, 2020).

Otras sustancias proagregantes plaquetarias (ADP, tromboxano, serotonina, trombina...) activan una serie de vías metabólicas, cuyo objetivo es liberar calcio al citoplasma plaquetario.

En este momento, las plaquetas son más adhesivas a la superficie endotelial y a otras plaquetas, iniciándose de esta forma el camino hacia una activación plaquetaria plena.

En la Figura 1.9. se muestran los dos procesos claves de interacción entre leucocitos y células endoteliales (inicio del proceso de la vasculopatía) y plaquetas y subendotelio vascular (consecuencia del desarrollo de la inflamación vascular y la disfunción endotelial).

. Fase de activación:

La activación de las glucoproteínas de membrana, sustancias procedentes de otras células y sustancias procedentes de la coagulación plasmática, intentan inducir la

activación plaquetaria, constituyendo el inicio de las vías de activación/inhibición plaquetaria.

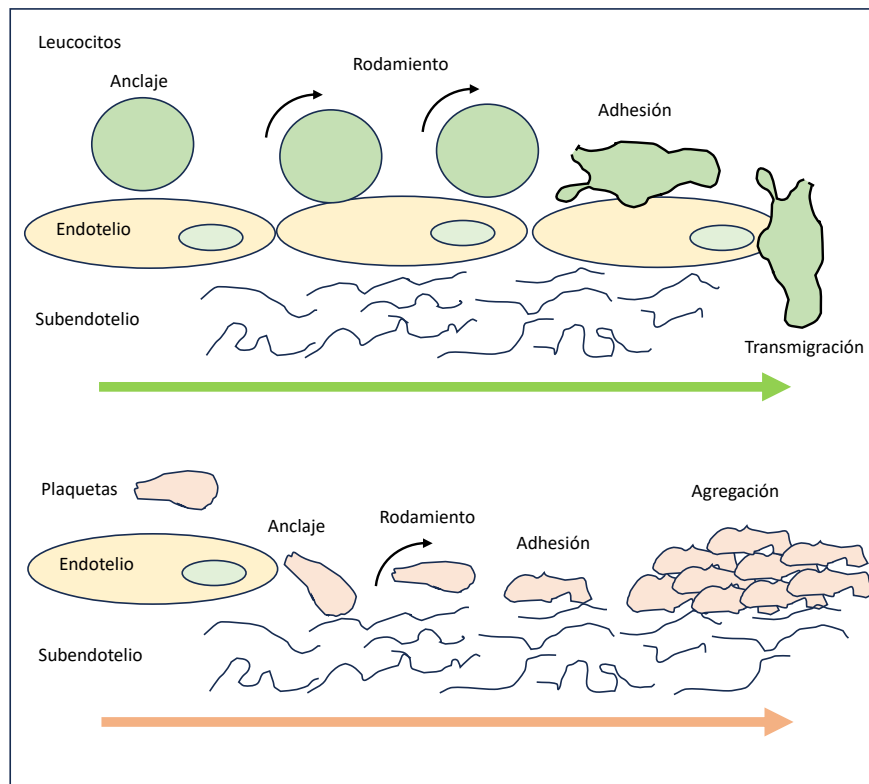


Figura 1.9. Interacción entre leucocitos y células endoteliales (inicio del proceso de la vasculopatía) y plaquetas y subendotelio vascular (consecuencia del desarrollo de la inflamación vascular y la disfunción endotelial) (figura de elaboración propia).

- Activación plaquetaria:

La adhesión plaquetaria comienza a exponer glicoproteínas receptoriales y a liberar compuestos intraplaquetarios cuya misión es la de activar a otras plaquetas y reclutar nuevos trombocitos para incrementar la formación del agregado plaquetario irreversible. La unión que se produce entre estos activadores trombocitarios y los receptores específicos de membrana, facilita la activación de proteínas G acopladas a receptores de membrana. Tras su unión a la activación de la fosfolipasa C (PLC) por parte de las proteínas G estimulantes, se activa el ciclo del fosfoinositol, cuyos dos productos fundamentales son: diacilglicerol (DAG), cuyo metabolismo conduce a la producción de ácido araquidónico, y el inositol trifosfato (IP₃), el cual activa la

salida de calcio de sus depósitos intracelulares al citoplasma (Smyth et al., 2009). La salida de calcio al citoplasma estimula a otra enzima, la fosfolipasa A₂ (PLA₂), quien libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. Sobre el ácido araquidónico actúa la enzima ciclooxigenasa (COX), formándose una serie de prostaglandinas, que finalmente producen dos prostanoides fundamentalmente: tromboxano A₂ (TxA₂) en la plaqueta y prostaciclina o prostaglandina I₂ (PGI₂) en la pared vascular, siendo el TxA₂ un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor, y la PGI₂ un potente antiagregante plaquetario y vasodilatador (Mitchell et al., 2021). Se denomina balanza tromboxano/prostaciclina al equilibrio entre ambos, debido al mismo origen de ambos prostanoides con funciones tan opuestas, siendo de gran importancia para el correcto funcionamiento de las plaquetas.

El calcio libre citoplasmático se une a la calmodulina citoplasmática, formando el complejo calcio-calmodulina, que activa la contracción de los filamentos de actina y miosina plaquetarios, produciendo la liberación de su contenido y activando nuevas plaquetas y también la fase plasmática de la coagulación (Smyth et al., 2009) (Figura 1.10.).

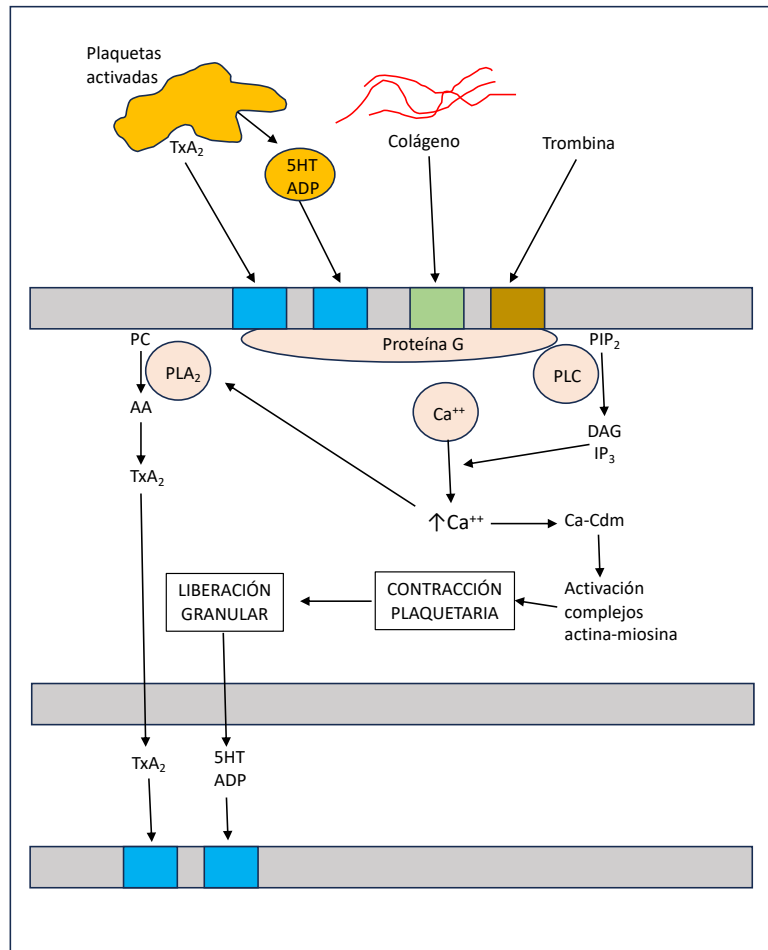


Figura 1.10. Mecanismo de activación plaquetaria (figura de elaboración propia).

(ADP: adenosina difosfato; 5-HT: 5-hidroxi-triptamina (serotonina); TxA_2 : Tromboxano A_2 ; PLA_2 : Fosfolipasa A_2 ; PLC: fosfolipasa C; PC: fosfatidilcolina; AA: ácido araquidónico; PG: prostaglandina; GP: glucoproteína; PIP_2 : difosfoinositol; DAG: diacilglicerol; IP_3 : inositol trifosfato; Ca^{++} : calcio; Cdm: calmodulina)

- Inhibición plaquetaria

Al mismo tiempo, existen mecanismos opuestos a los anteriores, provocando la inhibición de la función plaquetaria. Estos mecanismos se centran en los nucleótidos plaquetarios AMPc y GMPc. La adenosina y la prostaciclina se unen a sus receptores específicos de membrana y activan la adenilciclasa, que forma AMPc a partir de ATP. La enzima fosfodiesterasa AMPc-dependiente (tipo III) tiene como función degradar este nucleótido a AMP, inactivo sobre la función plaquetar (Fuentes et al., 2014; Makhoul et al., 2018).

El óxido nítrico activa directamente la guanilciclase, que produce GMPc, tanto en la plaqueta (inhibición de la activación trombocitaria) como en la fibra muscular lisa de la pared arterial (vasodilatación); la fosfodiesterasa tipo IV tiene como función degradar el GMPc a GMP, inactivo a efectos de funcionalismo plaquetario. Tanto el AMPc como el GMPc activan los mecanismos de transporte de entrada de calcio a sus depósitos intracelulares, por lo que evitan la liberación granular y, por tanto, la activación trombocitaria (Fuentes et al., 2014; Makhoul et al., 2018) (Figura 1.11.).

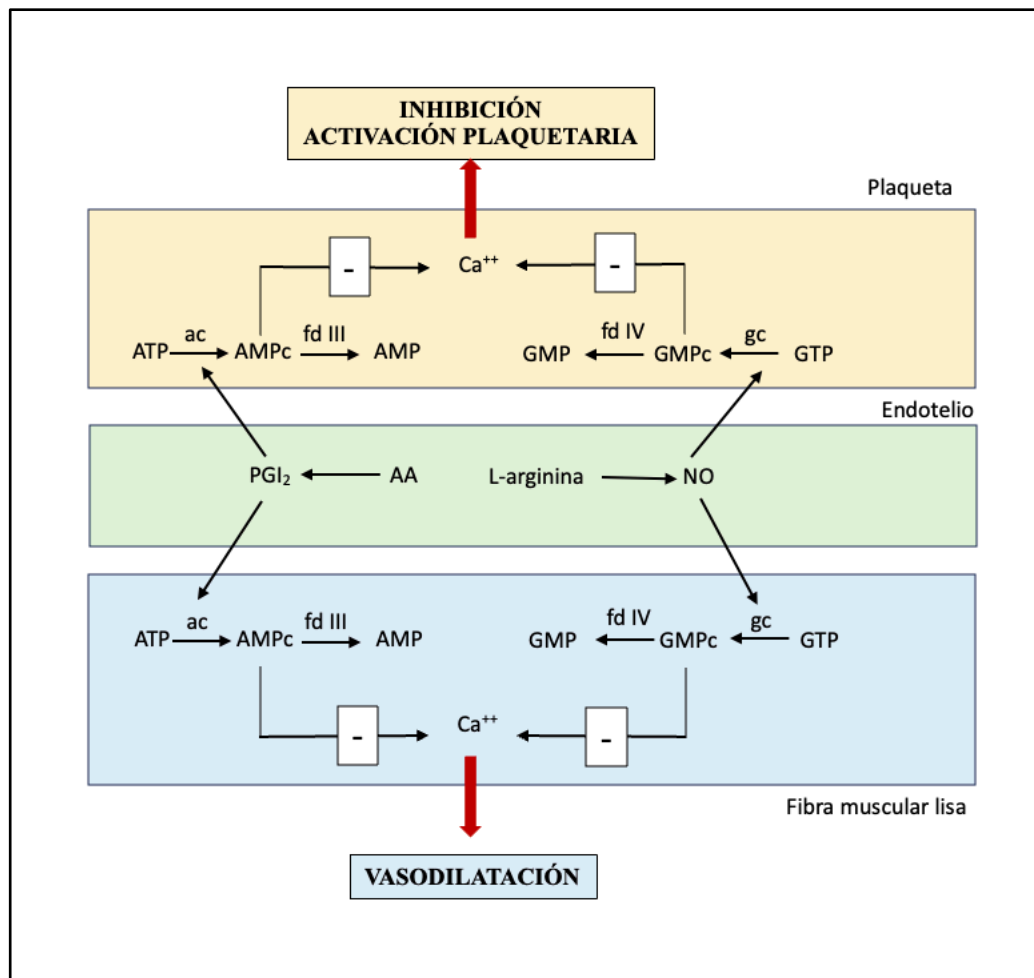


Figura 1.11. Mecanismos básicos de inhibición plaquetaria endógena (figura de elaboración propia).

(NO: óxido nítrico; PGI₂: prostaciclina; gc: guanilciclase; ac: adenilciclase; fd: fosfodiesterasa)

. Fase de agregación plaquetaria:

El calcio libre citoplasmático facilita, además de la liberación del contenido granular de sus depósitos, los mecanismos de externalización de otros complejos de glucoproteínas, como por ejemplo el denominado IIb/IIIa, que sirve de receptor para el fibrinógeno (Yang et al., 2019), facilitando la unión entre plaquetas a través de puentes compuestos por la triada:

GP IIb/IIIa (plaqueta 1) – fibrinógeno – GP IIb/IIIa (plaqueta 2)

Dependiendo de la consistencia de la activación plaquetaria existen dos tipos de agregación:

- Agregación reversible: cuando la activación plaquetaria no es lo suficientemente fuerte, la liberación de los gránulos es fundamentalmente del tipo alfa y se externaliza un porcentaje de complejos glucoproteicos IIb/IIIa. De esta forma, los agregados son débiles y fácilmente disueltos por los mecanismos antiagregantes endógenos, formando así microagregados que pueden devolver a sus plaquetas a la circulación sanguínea. No obstante, estas plaquetas no disponen de parte de su contenido granular, y circulan parcialmente activas por los vasos de tal forma que, se activarán con mucha facilidad ante un mínimo estímulo intravascular.
- Agregación irreversible: cuando la activación plaquetaria es completa y firme, la plaqueta activa todos sus sistemas enzimáticos, libera todo su contenido y externaliza la mayor parte de los complejos glucoproteicos. Al no poseer núcleo, no puede realizar síntesis *de novo* y esto le condiciona una muerte biológica.

1.2.2.2.2. Alteración de la función de regulación del flujo sanguíneo

Las endotelinas (ET) son los vasoconstrictores endoteliales de mayor relevancia. Se sintetizan y liberan en las células endoteliales por la acción de múltiples factores, como por ejemplo citoquinas, trombina, insulina, factores de crecimiento, etc. y son controladas de forma negativa por prostaciclina, heparina y NO, entre otras. El subtipo 1 de endotelina (ET-1) interacciona directamente con receptores de

específicos de membrana en la fibra muscular lisa vascular (A y B), desencadenando un efecto vasoconstrictor (Angeli et al., 2021).

La prostaciclina y el NO son los compuestos vasodilatadores de origen endotelial de mayor relevancia, es por eso por lo que merecen mención a parte. Ambos tienen una vida media muy corta, por lo que sus efectos únicamente son percibidos por las células que están en contacto directo con el endotelio: las plaquetas y las fibras musculares lisas vasculares (Figura 1.11.).

. **Prostaciclina:** se forma a partir del ácido araquidónico (AA) mediante la participación de la ciclooxigenasa, para formar endoperóxidos. La actividad ciclooxigenasa se reconoce tanto en las plaquetas como en el endotelio, siendo la principal diferencia que, cuando se activa en las plaquetas implica en segundo lugar a la tromboxano sintetasa, que produce tromboxano A₂ (potente vasoconstrictor y agregante plaquetario) y, por el contrario, cuando se produce en el endotelio implica en segundo lugar a la prostaciclina sintetasa (potente vasodilatador y antiagregante plaquetario) (Zhou et al., 2021). La prostaciclina se une a receptores de membrana específicos de una proteína G que estimula la adenilciclase, aumentando los niveles de AMPc en la fibra muscular lisa vascular y de las plaquetas.

. **Óxido nítrico (NO):** se forma a partir del aminoácido L-arginina mediante la participación de la enzima NO-sintetasa (NOS), siendo conocidas dos formas principales de ésta: forma constitutiva y forma inducible (Haynes et al., 2004).

La NOS constitutiva (cNOS) depende del calcio y forma constantemente pequeñas cantidades de NO. Hay descritas dos formas de cNOS: endotelial (ecNOS) y neuronal (ncNOS). Se cree que el NO producido por cNOS está involucrado en funciones fisiológicas (Förstermann & Sessa, 2012).

La NOS inducible (iNOS) se activa solo tras la estimulación por citosinas, no expresándose normalmente en células humanas. La iNOS forma NO en grandes cantidades de forma intermitente (ráfagas). El NO producido por iNOS participa en mecanismo fisiopatológicos, sobre todo cuando existe una alta concentración de radicales libres (como ocurre en la diabetes), contribuyendo a la formación de

peroxinitritos, radicales libres muy dañinos para las células (Förstermann & Sessa, 2012).

El NO se distribuye fácilmente a través de las membranas y estimula la guanil ciclasa en las células del músculo liso vascular, aumentando el contenido en GMPc. Tanto el GMPc como el AMPc (estimulado por la prostaciclina) son responsables de la vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria que se observa en respuesta a la prostaciclina y al NO (Figura 1.11.).

Entre las alteraciones descritas en la DM se encuentran una disminución de prostaciclina y un aumento en la actividad de la iNOS. Esto, junto con el aumento de radicales libres y el aumento de la agregación plaquetaria, desencadenan un entorno vascular que favorece la reducción del flujo sanguíneo y la tendencia a la formación de trombosis intravasculares.

1.2.2.3. TERCERA ETAPA: FALLO DE LA FUNCIÓN VASCULAR

El resultado final conlleva una disfunción endotelial, con una función antitrombótica deficiente que, junto con la estimulación de la función plaquetaria, incrementa el riesgo de procesos trombótico-isquémicos.

Los territorios vasculares más afectados (en lo que se refiere a la aparición de eventos trombóticos) en los pacientes con diabetes mellitus son los vasos coronarios, los cerebrales y las arterias de extremidades inferiores, siendo patologías con mayor incidencia y prevalencia en pacientes con diabetes mellitus que en la población no diabética (Figura 1.12.).

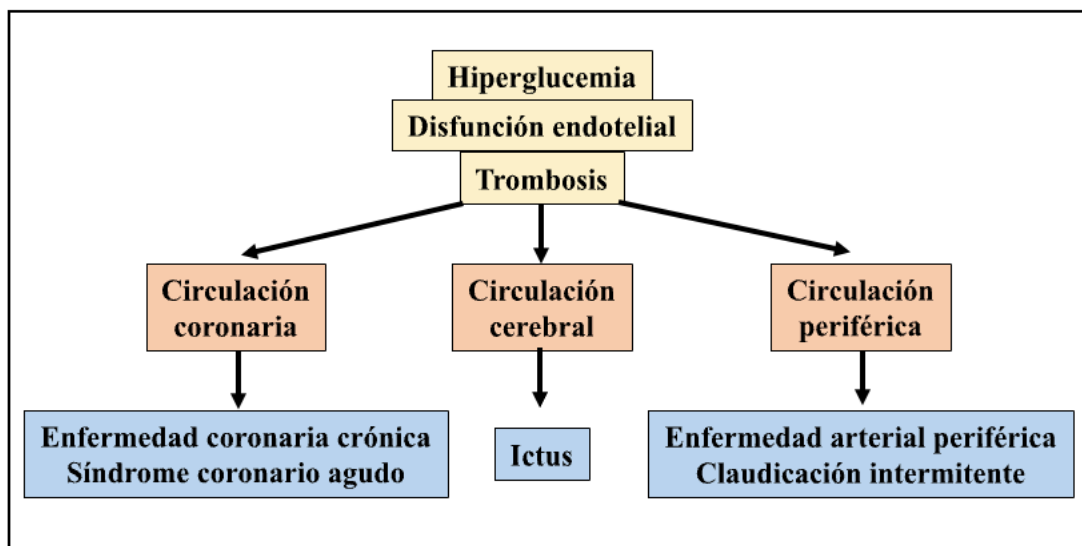


Figura 1.12. Principales consecuencias de la disfunción endotelial en la diabetes (figura de elaboración propia).

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO COMO CENTRO DE LA VASCULOPATÍA EN LA DIABETES MELLITUS

Como se ha indicado en diversos apartados anteriores, existe un punto en común en la mayoría de las modificaciones bioquímicas y funcionales que explican el inicio de las lesiones vasculares en la diabetes mellitus: el **estrés oxidativo**. Se entiende por estrés oxidativo el desequilibrio entre compuestos oxidantes y mecanismos de defensa antioxidante, ya sea por un exceso de los primeros, un déficit o desbordamiento de los segundos o ambas cosas a la vez (An et al., 2023).

La mayor parte de los compuestos oxidantes que generan un estrés oxidativo son **radicales libres**. La mayoría de las sustancias químicas conocidas, poseen electrones de forma apareada realizando una órbita alrededor de un núcleo atómico. Existen especies químicas que contienen uno o más electrones que realizan su recorrido orbital de manera impar, lo que trae consigo una inestabilidad del equilibrio molecular, que se restablece cuando se consigue sustraer de sus proximidades el electrón requerido para constituir la paridad electrónica. A estas sustancias químicas se les conoce como radicales libres (Pérez-Matute et al., 2009). Cualquier molécula puede transformarse en radical libre, pero las de menor tamaño son las más

susceptibles, es por lo que el oxígeno es una de las principales dianas para los electrones procedentes de otras moléculas integrantes de la estructura celular (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, sobre todo). Los radicales libres del oxígeno presentan una vida media muy corta y pueden reaccionar con macromoléculas orgánicas modificando su estructura y función, por lo que son potencialmente tóxicas. Durante estas reacciones se forman compuestos que no son radicales libres del oxígeno (no presentan electrones impares), pero son sus precursores o moléculas intermedias en la formación de éstos y son también dañinos. Los radicales libres del oxígeno y estas últimas sustancias se denominan especies reactivas del oxígeno, entre las que destacan el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el oxígeno singlete (1O_2) y el ácido hipocloroso (HOCL).

Los radicales libres pueden originarse por errores en el proceso mitocondrial de la respiración aeróbica, por lo que funciones vitales como el metabolismo de los alimentos, el ejercicio físico y muchas otras son productoras de radicales libres, no obstante, también se pueden originar como producto de alteraciones ambientales como la exposición a radiaciones ionizantes, rayos X, rayos gamma, luz ultravioleta, combustión de compuestos orgánicos con producción de humo (cigarrillos, carne...), xenobióticos (fungicidas, herbicidas...) y algunos fármacos (Sies et al., 2022).

La formación-destrucción de radicales libres es un fenómeno continuo en todas las células del organismo, constituyendo un equilibrio dinámico fisiológico cuyo resultado final no lleva a un exceso de oxidaciones ni a un déficit de mecanismos antioxidantes; este estado es el denominado **estado oxidativo**, a diferencia del **estrés oxidativo**, en el que hay un desequilibrio entre ambos factores bioquímicos, siempre a favor de un daño celular por acúmulo de radicales libres. Estos fenómenos presentan varias fases.

1.3.1. Producción/eliminación de especies reactivas de oxígeno (Figura 1.13.)

Cuando un átomo de oxígeno capta un electrón, se convierte en un radical libre denominado **anión superóxido (O_2^-)**, que intenta reaccionar con otras moléculas para volver a su equilibrio atómico. Para evitar esta reacción, la enzima **superóxido**

dismutasa (SOD) reacciona con el anión superóxido y lo “anula”, pero a costa de formar un producto intermedio, el **peróxido de hidrógeno (H₂O₂)**, que no es un radical libre per se, pero que es una molécula oxidante y es el primer paso para formar otros radicales libres más reactivos (Schieber & Chandel, 2014; Sies et al., 2022).

Para evitar las consecuencias oxidantes del peróxido de hidrógeno, el organismo posee dos mecanismos antioxidantes fundamentales (Sies et al., 2017):

- **Catalasa**, que transforma el peróxido de hidrógeno en agua.

- **Sistema del glutatión**, que es proporcionalmente el sistema antioxidante más importante del ser humano. El glutatión es un tripéptido (ácido glutámico, cisteína y glicina), cuyos grupos SH son el centro de su poder antioxidante. El glutatión se almacena en forma reducida (GSH) y, cuando se forma H₂O₂, se activa la enzima glutatión peroxidasa (GSHpx), que oxida al GSH y forma glutatión oxidado (GSSG), formando agua y eliminando al H₂O₂ del medio celular. En el mantenimiento de los niveles de este sistema antioxidante participan dos enzimas más: la glutatión reductasa (GSSGrd) (reduce el GSSG a GSH) y la glutatión transferasa (GSHtf) (capta grupos SH de otras moléculas y los incorpora al sistema antioxidante).

Si se produce un exceso de H₂O₂ y/o el sistema del glutatión es insuficiente o se desborda, en presencia de hierro (Fe) se forma un radical libre más reactivo incluso que el O₂⁻, el **radical hidroxilo (·OH)**.

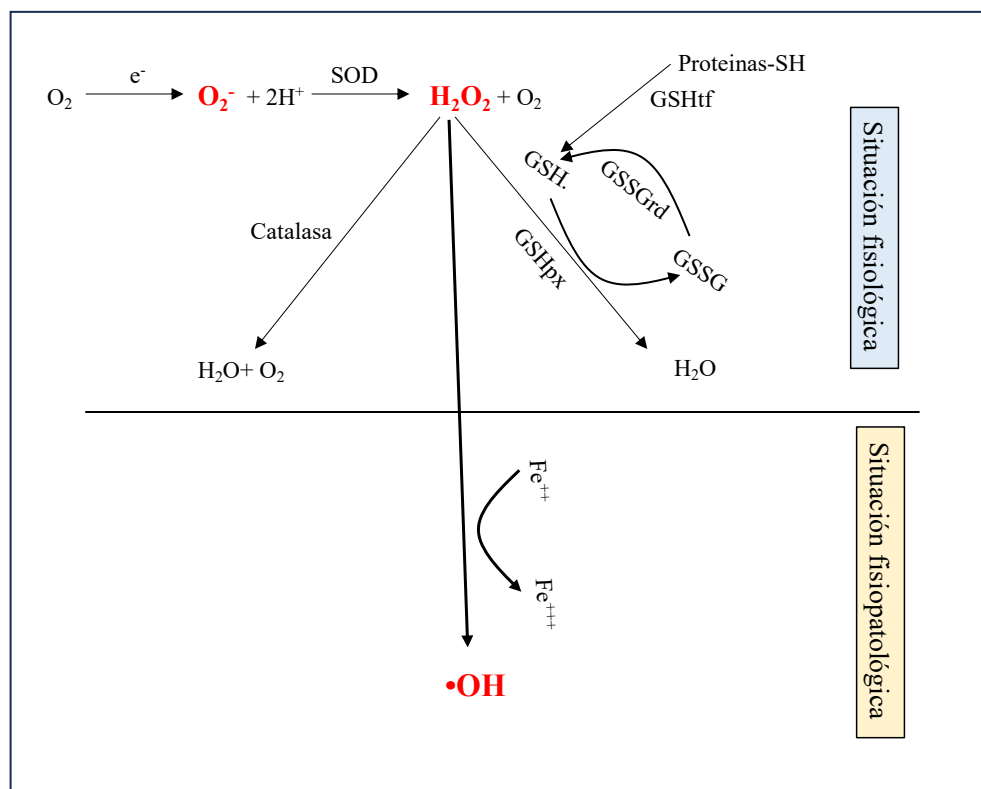


Figura 1.13. Formación de especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes (figura de elaboración propia).

1.3.2. Especies reactivas del óxido nítrico (Figura 1.14.)

En el sistema cardiovascular, uno de los mediadores más importantes, sintetizado en las células endoteliales, es el **NO**, que como ya hemos comentado en apartados anteriores, posee un efecto vasodilatador y antiagregante plaquetario (Fuentes et al., 2014; Makhoul et al., 2018), a través de un estímulo de la guanil-ciclasa, y por ende estimulante de los niveles de GMPc. (Förstermann & Sessa, 2012). El NO es una molécula muy inestable, que reacciona fácilmente con compuestos oxidantes, como el anión superóxido, formándose especies reactivas del NO.

En condiciones fisiológicas, la NO sintasa constitutiva, endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS), facilita la formación de NO a partir de la L-arginina, en concentraciones nanomolares y de forma continua, facilitando su unión a la guanil-ciclasa y produciendo sus acciones fisiológicas vasodilatadora y antiagregante plaquetaria (Förstermann & Sessa, 2012).

En situaciones fisiopatológicas, como ocurre en la vasculopatía diabética, sobre todo la macroangiopatía, se produce un estado inflamatorio con liberación de citoquinas (interleucinas, factor de necrosis tumoral, etc.) que inducen la formación de radicales libres, los cuales incrementan aún más el estado inflamatorio (Soares et al., 2023). En esta situación, los mediadores inflamatorios activan factores nucleares, como el NfκB, que inducen la síntesis de la enzima NO sintasa inducible (iNOS), que forma NO en concentraciones micromolares y en oleadas (Islam, 2017). Las células se ven desbordadas y el NO reacciona con otras moléculas, como la hemoglobina, diversas proteínas o con los radicales libres del medio, sobre todo con el anión superóxido. Por lo tanto, las mismas situaciones que generan radicales libres van a formar también un exceso de NO, pudiendo reaccionar entre ellos y formar especies reactivas derivadas del NO, como son los **peroxinitritos (-ONOO[•])**, que siguen las mismas características y funcionamiento que los radicales libres derivados del oxígeno, reaccionando con otras moléculas para lograr el equilibrio electrónico, cosa que ocurre con algunos aminoácidos como la tirosina, formando **3-nitrotirosina** (Bartesaghi & Radi, 2018).

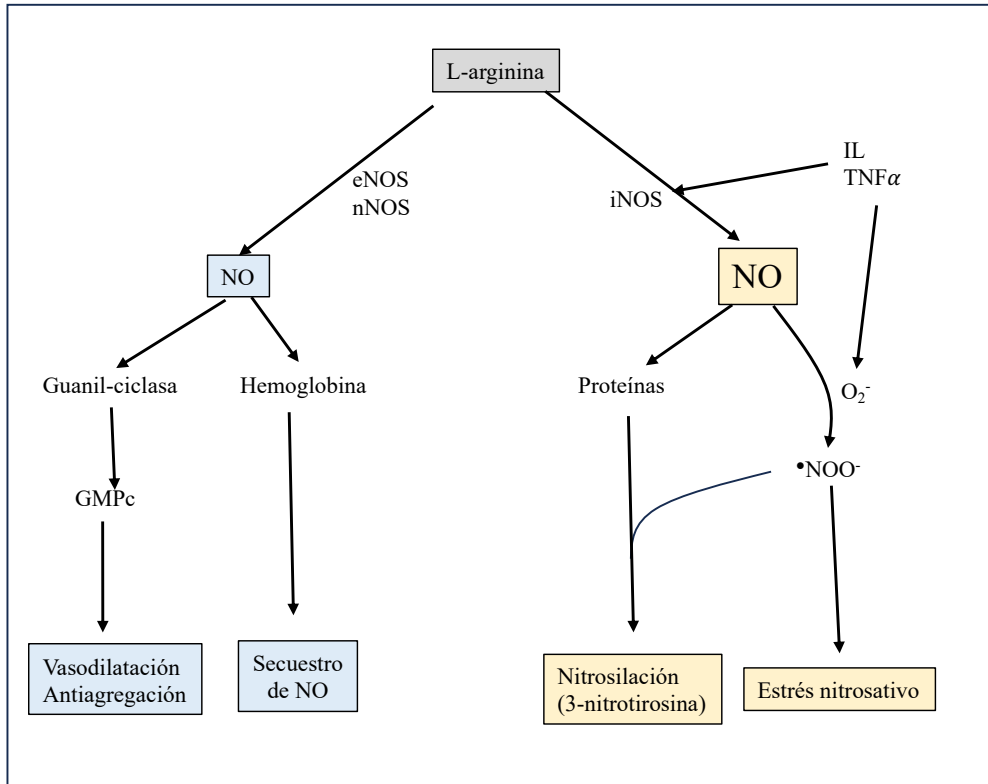


Figura 1.14. Reacciones del NO y sus consecuencias según su concentración (figura de elaboración propia).

1.3.3. Consecuencias de la formación de especies reactivas de oxígeno y de NO

Una vez formadas las especies reactivas de oxígeno o de NO, estas tienden a reaccionar con cualquier molécula cercana para intentar re-equilibrar el número de electrones desapareados, siendo la oxidación la reacción más frecuente. En términos generales, la reacción de un radical libre con otra molécula la convierten en un nuevo radical libre, tendiendo ésta a reaccionar con otra y establecer así una reacción en cadena.

Si bien pueden reaccionar con cualquier molécula, las de mayor repercusión son: lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Figura 1.15.).

- **Lípidos.** Los radicales libres formados pueden reaccionar con los lípidos, estableciendo una cadena de formaciones sucesivas de radicales libres lipídicos, que en su conjunto se denomina **peroxidación lipídica** (Singh et al., 2023). Los radicales

libres lipídicos provocan que las funciones morfológicas y funcionales de los lípidos sean anómalas, incluyendo funciones de membrana celular o síntesis de eicosanoides, como las prostaglandinas y prostanoïdes. Un caso especial es la formación de isómeros de las prostaglandinas, como consecuencia de la interacción con radicales libres, formando los denominados **isoprostanos**, que se utilizan como índice de formación de radicales libres (Murphy & Fahy, 2010).

- **Proteínas.** Las especies reactivas derivadas del NO (peroxinitritos) y los radicales hidroxilos, reaccionan con diversos aminoácidos, sobre todo a través de sus grupos SH, creando enlaces covalentes muy difíciles de revertir, alterando de esta forma las proteínas que contienen esos aminoácidos (histidina, cisteína, fenilalanina, metionina, triptófano, y tirosina) (Di Meo et al., 2016). Esta desestructuración proteica afecta también a unas proteínas funcionales, las enzimas, trastocando su función fisiológica normal (Jomova et al., 2023).

- **Glúcidos.** Los radicales libres pueden reaccionar con los monosacáridos alterando su metabolismo, pero lo más frecuente es que reaccionen con los polisacáridos, rompiendo enlaces glucosídicos y desestructurando la secuencia de glúcidos simples en las cadenas poliméricas (Dai et al., 2017). El secuestro electrónico de los átomos de hidrógeno hace que los radicales libres centren su acción sobre los carbonos de las moléculas, causando una ruptura de las cadenas de polisacáridos (Chen et al., 2021).

- **ADN.** La reacción de los radicales libres con los ácidos nucleicos originan un estado de oxidación de algunas bases púricas y pirimidínicas que pueden formar una estructura de ADN anómala, con las consecuencias que ello puede tener en el desarrollo de la síntesis proteica celular; además, en casos más graves (ausencia de defensa antioxidante) puede llegar a una situación de ruptura irreversible de las cadenas de nucleótidos (Jomova et al., 2023). Una de las bases oxidadas anómalas que se originan es la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, que se utiliza como medida indirecta del daño producido por los radicales libres a nivel del ADN.

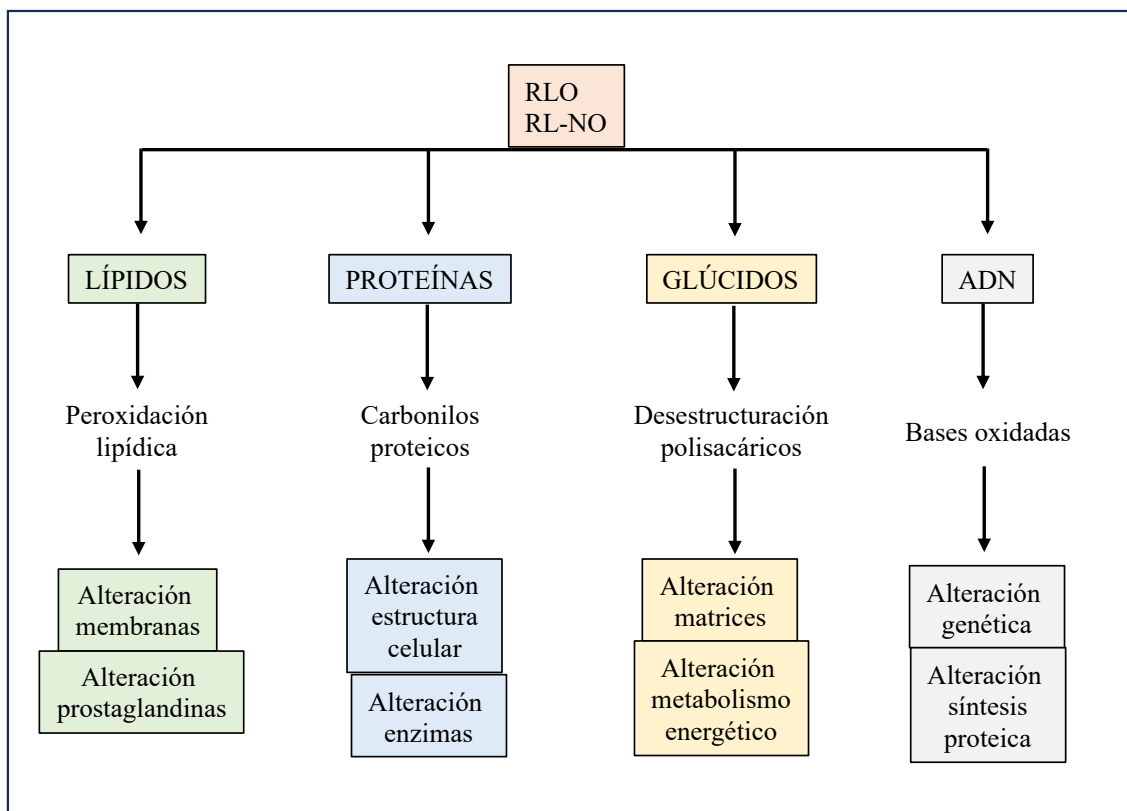


Figura 1.15. Principales consecuencias de la interacción de los radicales libres con moléculas orgánicas (figura de elaboración propia).

1.4. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA GÉNESIS Y EVOLUCIÓN DE LA MACROANGIOPATÍA DIABÉTICA

El estrés oxidativo participa en todas y cada una de las fases reconocidas y aceptadas de la enfermedad vascular microangiopática en la evolución de la diabetes mellitus mal controlada. Recordemos que la macroangiopatía diabética no difiere de la arteriosclerosis, tan solo se presenta con más intensidad y más precozmente (Katakami, 2018).

Comentaremos a continuación cómo el estrés oxidativo condiciona y/o influye en cada una de las fases del proceso macroangiopático.

1.4.1. Fase inicial de adaptación bioquímica

Todas las vías bioquímicas que se ponen en marcha para intentar paliar el acúmulo de glucosa crónico (hiperglucemia mantenida), independientemente de diversos

compuestos finales formados y modificaciones del metabolismo celular normal, presentan un punto en común, el estrés oxidativo, ya sea de forma directa o indirecta (Figura 1.6.).

- La propia autooxidación de la glucosa en condiciones de altas concentraciones, produce radicales libres directamente (González et al., 2023).

- La activación de la vía de los polioles, iniciada por una hiperactividad de la enzima aldosa-reductasa, produce un consumo excesivo de NADPH, que es un cofactor natural de las actividades enzimáticas GSH peroxidasa (GSHpx) y GSSG reductasa (GSSGrd): el déficit de la GSSGrd disminuye el contenido intracelular de GSH (entre otros factores presentes en la diabetes) y el de GSHpx resta de capacidad antioxidante, por lo que se presenta un desequilibrio entre formación y destrucción de radicales libres, es decir, un estrés oxidativo (Ighodaro, 2018).

- En la ruta de las hexosaminas se forma glucosamina-6-fosfato, que es un activador de la producción de factores de crecimiento y de transformación celular, los cuales inducen la formación de radicales libres, es decir, sería una vía de producción indirecta de estrés oxidativo (Singh et al., 2007).

- La formación de productos avanzados de glicación (AGEs) implica una interacción de niveles altos de glucosa con diversos compuestos celulares, entre los que se encuentran los lípidos, formando productos de lipooxidación, es decir, radicales lipídicos; además, la interacción de los AGEs con sus receptores (RAGEs) origina secundariamente la formación de aniones superóxidos (Boyer et al., 2015; Pinto et al., 2022).

- Por último, la ruta del diacilglicerol-proteína cinasa C (DAG-PKC), además de estimularse directamente ante una situación de hiperglucemia, también es activada a través de la vía de los polioles y de los productos avanzados de glicación (Ighodaro, 2018). Un incremento en los niveles intracelulares de PKC estimulan la actividad NADPH oxidasa (NOX), generadora de aniones superóxidos (Mochly-Rosen et al., 2012).

Por lo tanto, desde el inicio de la fisiopatología de la vasculopatía diabética ya se forman radicales libres y comienza a disminuir la capacidad antioxidante celular, es decir, a formarse un estrés oxidativo. Esta formación de radicales libres comienzan a ejercer los efectos nocivos que se han descrito en el apartado 1.3.3. y poseen una característica especial: su presencia tiende a reforzar todas las vías que los generaron, creando una especie de círculo de retroalimentación para perpetuar su daño (Figura 1.6.).

1.4.2. Inicio de la vasculopatía: fase de trans migración leucocitaria y lipídica

Ya sea de forma directa o indirecta, la producción de radicales libres afecta a las células endoteliales, induciendo la expresión de factores nucleares que generan moléculas de adhesión de monocitos circulantes, como son la ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule*), VCAM-1 (*Vascular Cito-Adhesion Molecule*) y MCP-1 (*Monocyte Chemoattractive Protein*), lo que origina un acercamiento de dichos monocitos a la superficie endotelial, una adhesión a la misma, un rodamiento a través de dicha superficie y una trans migración entre las células endoteliales hacia el espacio subendotelial (Libby et al., 2011; Mauersberger et al., 2022).

Por otra parte, un exceso de LDL colesterol, lo cual es frecuente en pacientes diabéticos (sobre todo tipo 2 mal controlados), hace que estas lipoproteínas también contacten con la superficie endotelial y sufran un proceso parecido al de los monocitos, adhiriéndose y trans migrando hacia el espacio subendotelial (Schnitzler et al., 2019). (Figura 1.16.)

1.4.3. Fase de inflamación vascular

Los monocitos trans migrados en el espacio subendotelial comienzan a madurar y transformarse en macrófagos, que es la forma celular activa de los procesos inflamatorios, generando la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias (interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa, etc.), que comienzan un mecanismo de “autoperpetuación” del fenómeno inflamatorio que han iniciado: inducen la síntesis de más proteínas adhesivas (reclutamiento de nuevos monocitos circulantes) y activan la formación de radicales libres, los cuales facilitan en dichos macrófagos

la formación de más citocinas y, por ende, de más inflamación y mayor producción de radicales libres (Moreira et al., 2015; Yuan et al., 2019).

Por otra parte, un efecto clave de los radicales libres formados es su interacción con la lipoproteína LDL colesterol, oxidándola y convirtiéndola en un radical libre lipídico: **LDL oxidada (oxLDL)**, la cual presenta un papel clave en el procesos de inflamación vascular: activa la producción de citocinas, de radicales libres, de proteínas adhesivas, activa la función de las plaquetas y estimula la siguiente fase de proliferación celular de la capa de células musculares (Hartley et al., 2019; Khatana et al., 2020) (Figura 1.16.).

1.4.4. Extensión del daño inflamatorio

Todos los eventos que acontecen en el subendotelio vascular alteran el funcionamiento de las capas adyacentes, es decir, el endotelio y la capa de fibras musculares, provocando la denominada **disfunción endotelial** y la **proliferación y engrosamiento vascular**.

Los radicales libres formados y sus consecuencias inflamatorias alteran el funcionalismo de las células endoteliales (véase apartado 1.2.2.2.), siendo el estado de estrés oxidativo el responsable de la reducción en la vida media de dos componentes fundamentales en la regulación del flujo sanguíneo y la activación plaquetaria: prostaciclina y óxido nítrico (Fuentes et al., 2014; Makhoul et al., 2018). Por otra parte, el estrés oxidativo, ya sea por acción directa de los radicales libres o a través de la propia oxLDL, activan a las plaquetas, que ya estaban activadas por la propia hiperglucemia mantenida, lo cual crea un estado protrombótico evidente (Gimbrone & García-Cardena, 2016; Kaur et al., 2018; Xu et al., 2021).

Asimismo, los radicales libres y la oxLDL facilitan la síntesis de factores de crecimiento en las células endoteliales, estimulando la diferenciación y proliferación de las fibras musculares lisas vasculares, las cuales captan moléculas de oxLDL y se transforman y migran hacia la capa íntima, engrosando y disturbando la pared vascular, no solo funcionalmente, sino creando la base morfológica de la arteriosclerosis (Marchio et al., 2019) (Figura 1.16.).

1.4.5. Potencial trombogénico

Si se suma el déficit de función antitrombótica y vasodilatadora del endotelio (disfunción endotelial), el engrosamiento de la pared vascular (inflamación vascular) y la activación plaquetaria propia de la diabetes mal controlada (hiperactividad plaquetaria), podemos deducir que el estrés oxidativo participa activamente en cada uno de los elementos que van a incrementar la posibilidad de formación de un trombo arterial y, por lo tanto, un proceso de isquemia, cuya representación clínica depende del sector vascular donde se produzca (coronario, cerebral o periférico).

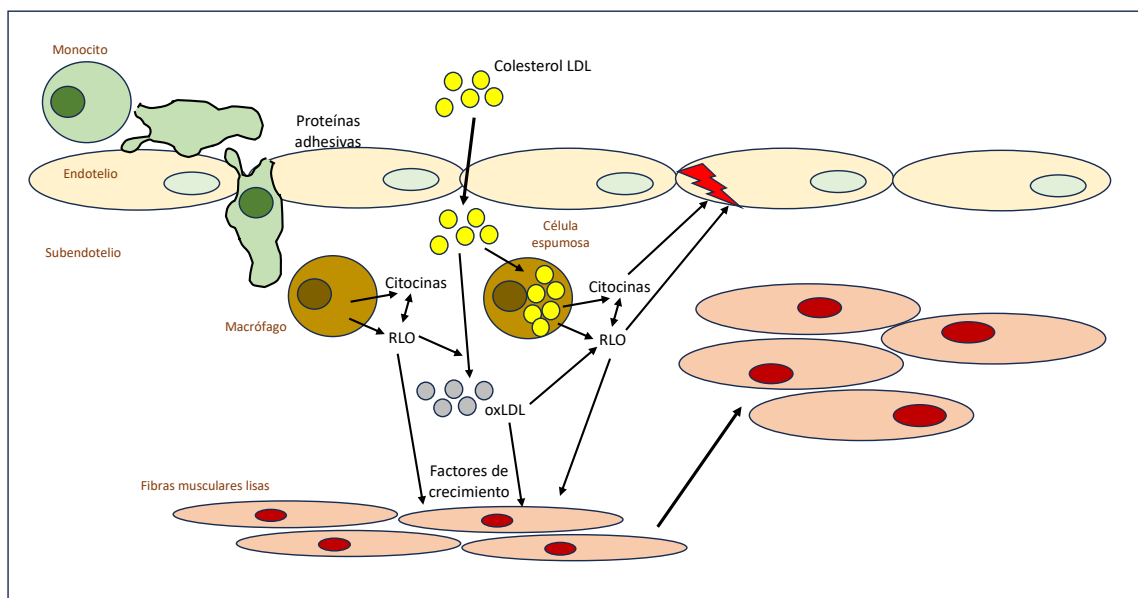


Figura 1.16. Esquema sobre el papel de los radicales libres (RLO) en las distintas fases del proceso arteriosclerótico (figura de elaboración propia).

1.4.6. Estrés oxidativo en el tejido afectado: el caso del tejido cerebral

El escenario tisular que induce un proceso isquémico-trombótico favorece la aparición de un estado bioquímico que genera radicales libres, tanto en la fase de hipoxia como de reoxigenación, pero se trata de un tejido que, previamente a la isquemia, está sometido al influjo de una tasa alta de glucosa, lo cual ya es un estímulo prooxidante y de activación de estrés oxidativo tisular de base, lo cual hace más sensible a dicho tejido ante una agresión isquémica posterior. Si bien esto puede

ocurrir en cualquier órgano, es el cerebro quien más predisposición presenta en este sentido, posiblemente por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, entre otros motivos, siendo diana principal de los radicales libres, tal y como explicamos en apartados anteriores (apartado 1.3.3.) (González-Correa et al., 2006; Cobley et al., 2018; Silva-Rodrigues et al., 2020).

El estrés oxidativo participa activamente en las tres fases fundamentales del proceso de isquemia-reperfusión cerebral, de forma más intensa en la situación de diabetes mellitus, de la siguiente forma (Figura 1.17.):

- Fase de isquemia

La disminución del flujo de oxígeno a una determinada zona cerebral disminuye el aporte de glucosa, lo cual condiciona a las células a usar la vía anaerobia para conseguir energía con el consiguiente acúmulo de ácido láctico y, por lo tanto, produciendo un estado de acidosis intracelular (Isaev et al., 2008).

Asimismo, la hipoxia induce la activación de la NADPH oxidasa (NOX), generadora de radicales superóxidos, reforzado por la estimulación de la proteína cinasa C (PKC), que se activa por el incremento del calcio intracelular secundario a la caída del ATP por déficit de la glucólisis aerobia (Mochly-Rosen et al., 2012). La PKC es una de las vías que se potencia en situación de hiperglucemia mantenida (apartado 1.2.2.1.).

El acúmulo de calcio en esta fase estimula muchas actividades enzimáticas, sobre todo las relacionadas con la inflamación (NOS, COX, oxidasas, proteasas, etc.). En un ambiente inflamatorio se producen más radicales libres, lo cual incrementa más aún el proceso inflamatorio, cerrándose un círculo vicioso de autoestimulación - inflamación - radicales libres - inflamación.

- Fase de perfusión

Entendemos por “fase de perfusión” dos situaciones en el proceso de isquemia-reperfusión cerebral: una posible reentrada de oxígeno a la zona isquémica y la zona de penumbra isquémica, en la que se origina una reoxigenación relativa, es decir, una

zona en la que las células nerviosas no están muertas, pero tampoco funcionan bien, pudiendo extender a través de sus mediadores el daño a zonas no afectadas adyacentes (Walther et al., 2023).

El oxígeno que entra en esta fase junto al exceso de actividad de la NOX en la fase isquémica y la situación de inflamación tisular, genera más especies reactivas de oxígeno (ROS) y de óxido nítrico (RNO), creando un ambiente de mayor inflamación y daño oxidativo, con las consecuencias que ya hemos descrito en el apartado 1.3.3.

Es en esta fase en la que se acumulan y actúan con más intensidad los radicales libres, produciéndose el mayor déficit de defensa antioxidante, fundamentalmente en el sistema del glutatión cerebral (González-Correa et al., 2006).

- Fase de reparación

Los radicales libres formados activan la expresión nuclear de factores transcripcionales que sintetizan mediadores de proliferación tisular y vascular, en un intento de reparar el daño tisular originado en las dos fases anteriores.

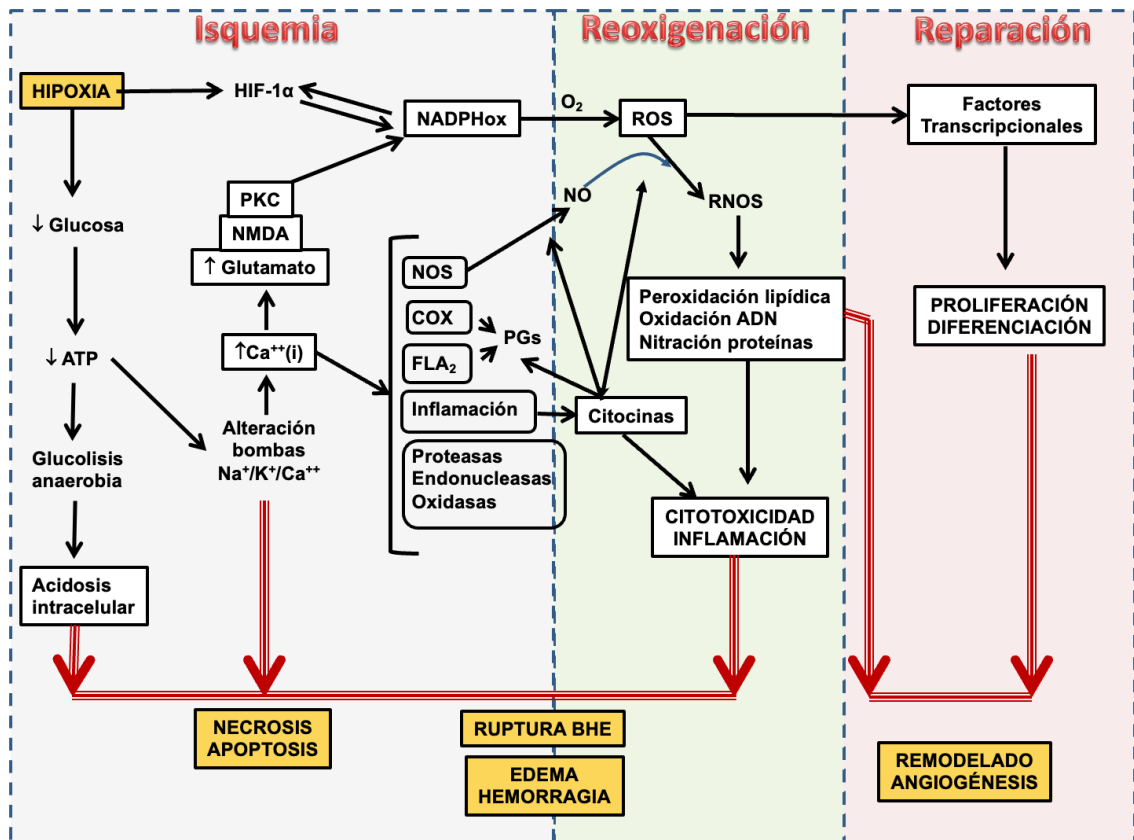


Figura 1.17. Esquema de las tres fases del proceso de isquemia-reperfusión cerebral (Tesis doctoral de I. Pérez de Algaba Fuentes, cedido con permiso de la autora: Anexo III).

1.4.7. Medidas preventivas

Obviamente, la mejor prevención de la macroangiopatía diabética es el control de los factores de riesgo que conducen a ella. El primero de todos sería el control de la glucemia (Madonna et al., 2018), para lo cual se dispone de todo un arsenal farmacológico y dietético que debería ser suficiente para dicho control. Asimismo, el control de la hipertensión arterial y la dislipemia son dianas terapéuticas de los protocolos de tratamiento y prevención de las complicaciones vasculares derivadas.

En los últimos años se ha focalizado la atención en el papel de la alimentación en la prevención de la macroangiopatía diabética, no solo por el control de la glucemia, sino por la importancia del estrés oxidativo en la patogénesis de estas complicaciones (véanse apartados anteriores) y el contenido en **compuestos antioxidantes** de

algunos tipos de alimentos (Beeraka et al., 2022). Se ha comprobado que la **dieta mediterránea** es la más adecuada para cumplir esta función, habiéndose demostrado que es capaz de prevenir la aparición de diabetes tipo 2 y de eventos cardiovasculares relacionados con la diabetes mellitus, tal y como ha demostrado el macroestudio PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea) (Estruch et al., 2006). Este estudio, en todas sus vertientes, incorporó y demostró a la evidencia clínica algo que ya se intuía pero que faltaba por demostrar con hechos concretos: la importancia de la dieta en la prevención de la enfermedad cardiovascular (cardíaca, cerebral y periférica), coadyuvando de forma importante a las medidas terapéuticas de tipo farmacológico (Martínez-González et al., 2015).

Una aportación muy importante del estudio PREDIMED fue la incorporación del aceite de oliva virgen extra (AOVE) como elemento fijo en la dieta seguida por los pacientes, basado en la importancia de este aceite en la dieta mediterránea, siendo la principal fuente de grasas en este tipo de alimentación. La importancia del AOVE en la enfermedad cardiovascular comenzó, a nivel humano, al comprobar que la ingesta de 40-50 mL diarios de AOVE reducía la capacidad de oxidación de la LDL en voluntarios sanos, correlacionándose directamente con el contenido en fenoles del AOVE utilizado (Hernández et al., 2015). Es por ello por lo que se ha centrado la atención del efecto del AOVE en estos compuestos.

1.5. ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA COMO FUENTE DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

1.5.1. Concepto

Según el Consejo Oleícola Internacional, el aceite de oliva virgen extra es *“todo aceite de oliva virgen apto para el consumo en la forma en que se obtiene, cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,8 gramos por 100 gramos y cuyas demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la Norma del COI (COI/T.15/NC n° 3); dicha norma hace referencia a que en la obtención del aceite virgen solo se utilizan procedimientos mecánicos o físicos con condiciones térmicas controladas”*.

1.5.2. Composición

En términos generales, dependiendo de diversos factores fisicoquímicos y procedimentales de las aceitunas, se distinguen los siguientes grupos de compuestos (Figura 1.18.):

- Fracción saponificable. Es la parte grasa propiamente dicha y constituye el 98-99% del total de la composición del AOVE; la forman ácidos grasos libres esterificados y triglicéridos. El principal componente es el ácido graso monoinsaturado ácido oleico (C18:1), que constituye el 53-85% del total de ácidos grasos del AOVE, según el tipo de aceituna de donde provenga. Otros ácidos grasos, como los poliinsaturados, están en muy poca proporción (Gimeno et al., 2002).

- Fracción insaponificable. Son los denominados compuestos minoritarios o menores, debido a que solo constituyen el 1-2% del total de la composición química del AOVE. Son moléculas no glicéridas de origen variado (Figura 1.16.) y entre ellos destacan los compuestos fenólicos, que son los que se han relacionado preferentemente con los efectos beneficiosos del AOVE (De Santis et al., 2019). A nivel bioquímico son los principales responsables del efecto antioxidante del AOVE, entre otras acciones, como son la antiinflamatoria, antiproliferativa y citoprotectora (Santangelo et al., 2018; Romani et al., 2019).

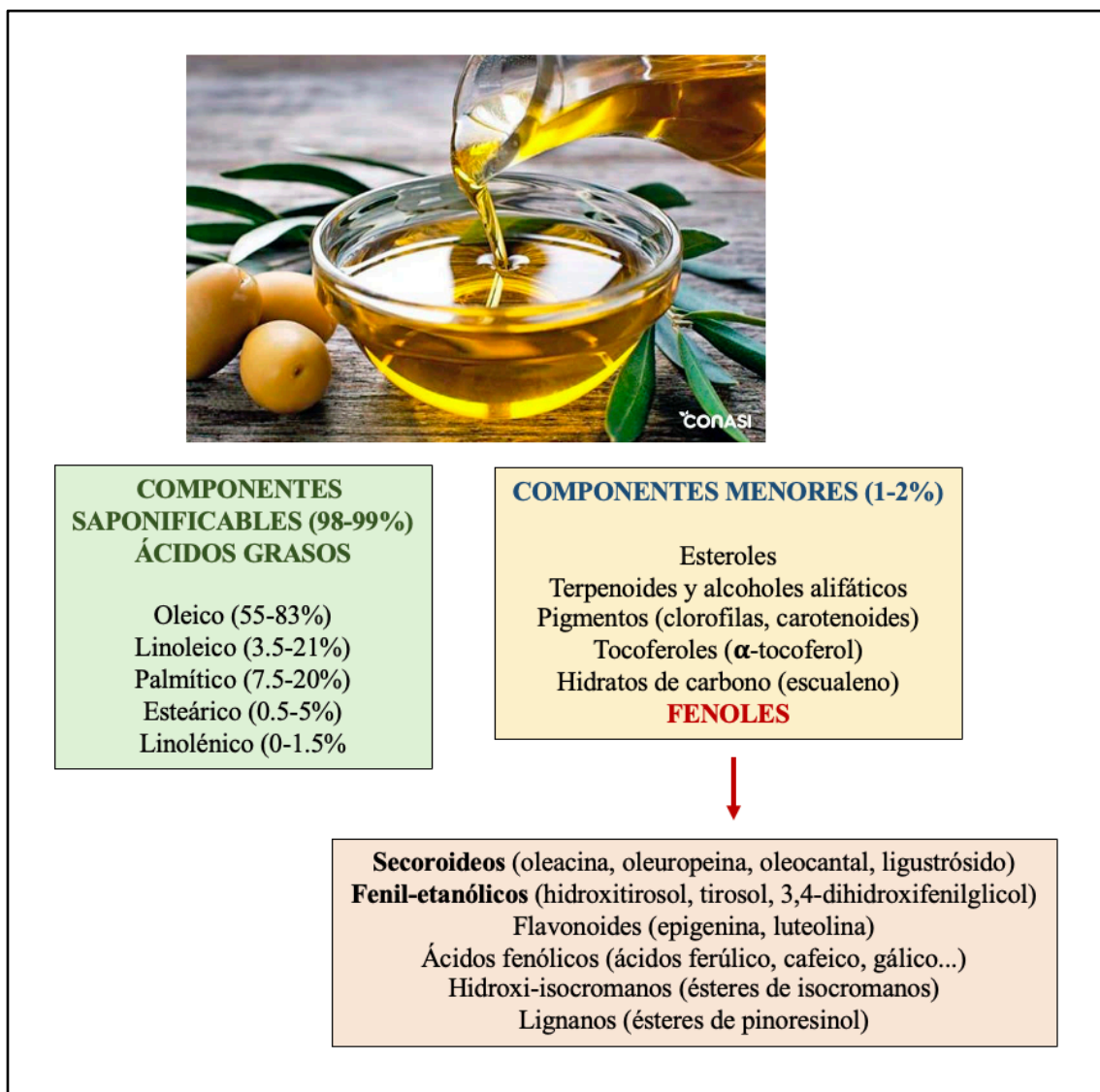


Figura 1.18. Principales componentes del aceite de oliva virgen extra (figura de elaboración propia).

1.5.3. Compuestos polifenólicos con actividad sobre el sistema cardiovascular

El conjunto de fenoles presentes en el AOVE es amplio y variado, pero solo se han podido demostrar efectos a nivel cardiovascular para algunos de ellos. No obstante, logran explicar la práctica totalidad de los efectos beneficiosos del AOVE, ya sea de forma aislada (López-Villodres et al., 2016) o asociados entre sí (De La Cruz et al., 2021). A continuación, se resumen algunas características de los principales fenoles del AOVE a este nivel.

1.5.3.1. Hidroxitirosol

Este compuesto (3,4-dihidroxi-fenyl-etanol) es el fenol más abundante en el AOVE, estando presente en forma libre o esterificada (acetato de hidroxitirosilo) o como un éster glucósido de hidroxitirosol y ácido elenólico (oleuropeina) (Fernández-Poyatos et al., 2021). Cuando se administra AOVE, al llegar al intestino delgado, las formas esterificadas de hidroxitirosol se liberan y dejan el compuesto libre, repitiéndose este hecho una vez absorbidos en el torrente sanguíneo (Karković et al., 2019).

Se ha demostrado para hidroxitirosol un amplio espectro de efectos saludables en diversos sistemas orgánicos: cardiovascular, renal, neurológico, microbiológico e incluso a nivel anticanceroso; todos estos efectos se han relacionado con su demostrada acción antioxidante y antiinflamatoria, ya sea de forma directa o a través de mecanismos antioxidantes y/o antiinflamatorios endógenos (Ditano-Vázquez et al., 2019; Echeverría et al., 2017; Robles-Almazán et al., 2018; Rodríguez-Morató et al., 2015).

A nivel cardiovascular, se ha demostrado que hidroxitirosol reduce la concentración sérica de diversos biomarcadores cardiovasculares relacionado con su efecto antioxidante fundamentalmente (López-Villodres et al., 2016), así como que ejerce un efecto sinérgico con otros fenoles del AOVE en cuanto a su prevención del daño vascular en la diabetes mellitus (De La Cruz et al., 2021). Asimismo, se ha demostrado que hidroxitirosol ejerce un efecto protector en la disfunción endotelial (Vijakumaran et al., 2023) y previene de las lesiones aterogénicas en modelos experimentales (Hara et al., 2023). Otro efecto importante a nivel de prevención cardiovascular es su capacidad de inhibir la función plaquetaria, tanto *in vitro* (González-Correa et al., 2009; Reyes et al., 2013) como tras su administración oral a animales de experimentación (González-Correa et al., 2008; López-Villodres et al., 2016; Muñoz-Marín et al., 2013).

En un estudio en humanos, la administración de AOVE enriquecido con hidroxitirosol a pacientes con enfermedad coronaria crónica, mejora diversos parámetros de función endotelial y cardíaca (Ikonomides et al., 2023). Por último, se ha demostrado un efecto reductor de la hipertensión arterial en modelos

experimentales de hipertensión arterial inducida o como parte del síndrome metabólico (Franco-Ávila et al., 2023; Pastor et al., 2021).

1.5.3.2. Tirosol

Tirosol (2-(4-hidroxifenil)-etanol, alcohol p-hidroxifenílico) es otro fenol presente en el AOVE y, al igual que hidroxitirosol, se encuentra en forma libre o formando parte de complejos moleculares esterificados (Madureira et al., 2022).

Hay evidencias experimentales que demuestran que tirosol puede ejercer un papel importante en el tratamiento de la hipertensión arterial, aterosclerosis, enfermedad coronaria crónica, insuficiencia cardíaca crónica y síndrome metabólico (resistencia a la insulina y obesidad), a través de la modulación de la expresión del antígeno CD14 y la inhibición de la inflamación (Madureira et al., 2022).

A pesar de ejercer un efecto antioxidante cuantitativamente menor que el mostrado por hidroxitirosol, tirosol posee una capacidad de concentrarse en el citoplasma celular, obteniendo así una mayor concentración que en el medio extracelular, de ahí que se postule que *in vivo* tenga más efecto antioxidante que en condiciones *in vitro* (Sakavitsi et al., 2022).

Por último, en relación con el sistema cardiovascular, se ha demostrado que tirosol ejerce un efecto hemorreológico a través de un descenso de la viscosidad sanguínea, incrementando el flujo sanguíneo tisular, por ejemplo, en la circulación cerebral (Samuel et al., 2008).

1.5.3.3. Oleocantal

Es un derivado dialdehídico del ácido decarboximetil elenólico unido a tirosol. La mayor parte de los estudios publicados hacen referencia a un efecto neuroprotector de oleocantal, si bien existen algunas evidencias sobre acciones a nivel cardiovascular.

En primer lugar, oleocantal inhibe diversas actividades enzimáticas relacionadas con la inflamación, como la ciclooxigenasa tipo 2 o la óxido nítrico sintasa inducible,

ambas relacionadas también con los procesos de inflamación vascular (Beauchamp et al., 2005; Iacono et al., 2010).

Otro aspecto importante se deriva de un estudio en el que se correlaciona directamente la capacidad de inhibición de la agregación plaquetaria con el contenido en oleocantal de diversos tipos de AOVE administrados (Agrawal et al., 2017).

1.5.3.4. 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG)

Es un fenol químicamente muy parecido al hidroxitirosol, diferenciándose solo en un grupo hidroxílico. Está presente no solo en el AOVE, sino también en la hoja del olivo y en la aceituna (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012). Presenta un mecanismo de acción muy similar al de hidroxitirosol, destacando su efecto antioxidante y antiinflamatorio (Aparicio-Soto et al., 2015; Fernández-Prior et al., 2021).

Centrándonos en sus efectos a nivel cardiovascular, DHFG inhibe la función plaquetaria *in vitro*, mostrando además un efecto sinérgico con hidroxitirosol a este nivel (de Roos et al., 2011; Rubio-Senent et al., 2015); este mismo efecto se ha demostrado tras su administración oral a animales diabéticos (Rodríguez-Pérez et al., 2021, 2023).

En un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1, DHFG previno parcialmente algunas de las complicaciones vasculares que acontecen en la diabetes mellitus, tales como la retinopatía (Rodríguez-Pérez et al., 2022), macroangiopatía (De La Cruz et al., 2021) y nefropatía (Rodríguez-Pérez et al., 2023). En todos estos casos, el efecto protector de DHFG se correlacionó directamente con su efecto antioxidante, antiinflamatorio e inhibidor del funcionalismo plaquetario.

El principal grupo de fenoles presentes en el aceite de oliva son los derivados de los fenoles secoiridoides (oleuropeína y ligustrósido), que dan lugar a las formas dialdeídicas, como son la oleaceina y el oleocantal y otros derivados que se forman en la fase de batido y molienda enzimáticamente y que por su carácter más lipófilo pasan preferentemente al aceite.

1.5.4. Tipos de aceite de oliva

En términos generales, el aceite de oliva es un aceite vegetal obtenido del fruto del olivo (*Olea europaea*), denominado aceituna u oliva. En la actualidad, disponemos de cuatro categorías o tipos de aceite de oliva en el mercado (Reglamento (CE) N° 1019/2002) (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002).

- Aceite de oliva virgen

Es el zumo oleoso de las aceitunas, separado de los otros componentes del fruto. Su nombre proviene del árabe “*az-zeit*”, que significa “jugo de aceituna”. Se obtiene a partir de la manipulación mecánica y física de la aceituna, mediante mecanismos que no alteren el aceite.

Este tipo de aceite de oliva se puede clasificar en tres categorías, dependiente de diferentes características:

- a) Aceite de oliva virgen extra. Acidez natural igual o menor a 0,8 gramos por cada 100 gramos (0,8°), característica que le proporciona un sabor exquisito, siendo reconocido como el aceite de mayor calidad. Se obtiene directamente de aceitunas en buen estado mediante procedimientos mecánicos, con sabor y olor exquisitos y libre de defectos (mediana de defectos = 0 y la mediana de frutado >0).
- b) Aceite de oliva virgen. Acidez menor o igual a 2°. Sigue los mismos parámetros de calidad que el aceite de oliva virgen extra en cuanto a método de obtención, presentando pequeñas alteraciones que no son apenas percibidas en cuando a catalogación sensorial (mediana de defectos <3,5 y mediana de frutado >0).
- c) Aceite de oliva virgen lampante. Acidez superior a 2°, con sabor “defectuoso”, siendo considerado el peor de los aceites de oliva vírgenes. No se puede consumir en la forma que se produce, debe pasar antes por un proceso de refinado. A penas tiene sabor ni color. Sirve para componer otros aceites (aceite de oliva refinado), pero no se comercializa por él mismo.

- Aceite de oliva

Aceite de oliva a base de aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen o virgen extra, distinto del aceite lampante, ya que es el obtenido a partir del refinado de los aceites defectuosos (no alcanzan los parámetros de calidad del aceite de oliva virgen ni del aceite de oliva virgen extra). En su proceso de elaboración se utilizan procesos químicos o térmicos de limpieza de aromas, sabores y colores, por lo que pierde el distintivo de “virgen”. Tiene una acidez no superior a 1°.

- Aceite de oliva refinado

Aceite de oliva obtenido con el refino de aceites de oliva vírgenes, con una acidez no superior a 0,3°. No comercializado por su ausencia de sabor y color, pero que, mezclado con aceite de oliva virgen o virgen extra puede pasar a comercializarse como aceite de oliva, como ya hemos comentado.

- Aceite de orujo de oliva

Igual que el aceite de oliva, es un aceite de composición, formado por aceite de orujo refinado enriquecido con aceite de oliva virgen o virgen extra. La acidez no puede ser superior a 1°. El aceite de orujo que se utiliza proviene de la refinación del aceite de orujo crudo, obtenido mediante la extracción con disolventes orgánicos del subproducto graso de la elaboración del aceite de oliva, es decir, el orujo de la aceituna.

En la Figura 1.19. y 1.20. se representa gráficamente los distintos tipos de aceites de oliva según el procesamiento de las aceitunas.

1.5.5. Elaboración del aceite de oliva virgen extra

1.- La recolección

Este punto consiste en derribar o recolectar la aceituna del árbol. Respecto a los tiempos, suele empezar a recolectarse entre octubre y diciembre (según las condiciones climáticas) hasta incluso febrero o marzo (con la llamada rebusca, periodo en el que personas sin relación de propiedad con las fincas recogen las

aceitunas que los propietarios no han recogido). Un aspecto importante es recoger el fruto justo cuando llega a su maduración correcta (existen opiniones contradictorias al respecto, pero en los últimos años se ha demostrado científicamente que la máxima calidad del zumo de la aceituna no coincide con la plena madurez del fruto). Son varios los métodos utilizados a la hora de su recolecta, siempre intentando evitar que se dañe la aceituna durante el proceso, siendo los más importantes:

. La vibración: consiste en agitar de forma mecánica el árbol para que así caiga el fruto.

. El vareo: método más tradicional y hoy en día todavía utilizado. Se realiza golpeando con varas de unos tres metros de largo de plástico (antiguamente de madera) las ramas del árbol.

Antes de hacer esto, deben haberse colocado los mantones debajo del olivo para que el fruto caiga sobre ellos.

Otro aspecto importante es separar las aceitunas recogidas directamente del árbol (frutos de vuelo), que serían las que se recogen con los métodos de vibración y vareo, de los recogidos del suelo que han caído de forma natural, dado que la calidad del aceite de ambos frutos varía de forma significativa.

2.- El transporte

Tras su recolección, las aceitunas deben ser transportadas a la almazara para obtener la mayor calidad en el producto final. Esto supone que el tiempo corre en nuestra contra y por tanto no ha de ser en un periodo mayor de 24 horas para así conservar todas las propiedades de la aceituna. Aquí ya se debe de tener en cuenta una correcta separación de las aceitunas sanas de las enfermas, transportándose por separado, y en cualquier caso se tratan de manera adecuada, sin amontonar para evitar que se calienten y fermenten.

3.- Selección de las aceitunas

Antes de comenzar el proceso de extracción, las aceitunas se depositan en la almazara según sus características para así destinar las mejores a la elaboración de aceite de

oliva virgen extra. Dentro de las almazaras hay líneas dedicadas a aceitunas de buena o mala calidad, en función de su selección. Estas líneas darán mejor o peor zumo según la calidad del fruto con las que trabajen.

4.- Limpieza y lavado

Los frutos pueden llegar a la almazara mezclados con tierra, hojas, piedras ...Si es necesario este proceso, primero se eliminan hojas y ramas a través de una corriente de aire, eliminando las partículas menos pesadas. Después se lavan las aceitunas con agua a temperatura ambiente para quitar los restos de tierra y piedras. Para un correcto tratamiento de estas, hemos de tener en cuenta una correcta rotación del agua de lavado (circulación continua y en sentido contrario al que llevan los frutos).

5.- Molturación

En este paso se rompe y tritura la aceituna entera (incluyendo el hueso) para hacer el proceso más fácil. El objetivo es liberar las pequeñas partículas de aceite que hay en el interior del fruto, desgarrando las membranas celulares y dejando en libertad los glóbulos de aceite que, junto con el agua de los tejidos del fruto, crean una pasta. Hoy en día, los molinos que más se utilizan son metálicos, con martillos metálicos que golpean las aceitunas rompiendo sus estructuras, pero años atrás, el modo de trituración era a través de molinos de piedra movidos por animales o tracción mecánica, aplastando las aceitunas mediante giros y pisos sucesivos.

6.- Batido de la masa

Una vez triturada la aceituna, se obtiene una pasta que es batida posteriormente, mediante un sistema de paletas adecuadas y a una temperatura entre 25 y 35° para así favorecer la salida del aceite agrupando las partículas de aceite de gotitas. De esta forma, se separa mejor el aceite del agua que contiene el fruto y también, de la parte sólida u orujo (piel, pulpa y hueso roto), a través de un proceso físico. Tres aspectos críticos en este apartado son la limpieza, común a todas las etapas, el tiempo de batido, que influye en la disminución de fenoles y disolución de pigmentos y la temperatura del batido, que no debe ser alta para no perder las propiedades organolépticas del producto y para no acelerar los procesos de oxidación.

7.- Centrifugación

Posiblemente el avance más importante en la historia del aceite de oliva. Tradicionalmente se conseguía la separación de la fase líquida de la sólida por medio de prensas hidráulicas. En la actualidad, la pasta obtenida del proceso de molturación y batido se introduce en una centrifugadora para así separar completamente el aceite, el agua y el orujo. Esta máquina es cilíndrica y gira a una gran velocidad, separando los componentes por diferencia de densidad. La fuerza centrífuga empuja las partículas más pesadas a la pared interior del rotor, siendo arrastradas hacia un extremo. Finalmente, son extraídas por localizaciones diferentes del aceite.

Los líquidos, aceite y fase acuosa, son enviados al exterior por conductos diferentes.

De este modo, se obtienen tres componentes: de la fase sólida obtenemos el orujo (piel de la aceituna, pulpa agotada y restos de hueso) y de la fase líquida obtenemos el agua de vegetación y el aceite.

En este punto, podemos diferenciar dos tipos de centrifugadoras, de dos fases, donde se extrae el alpeorujo (orujo y alpechín mezclado) y el aceite, y de tres fases, donde se obtienen los tres componentes anteriores separados (orujo, agua de vegetación y aceite).

El método más utilizado es el de dos fases, utilizando el centrifugado horizontal o decanter. La pasta, tal como sale de la batidora, pasa al decanter que tiene en su interior separadores centrífugos horizontales. El sistema de “dos fases” se llama así porque separa el aceite por un lado y el ALPERUJO (orujo y agua) por otro. La centrífuga horizontal o decanter es un cilindro horizontal, ahusado por uno de sus extremos, que contiene en su interior un sinfín (espiral) que se encarga de hacer entrar la pasta, obtenida en la batidora, en su interior. El decanter separa el aceite de la pasta mediante la fuerza centrífuga, aprovechando la altísima velocidad de rotación y el diferente peso específico de las diversas fases a separar (el aceite y el alperujo). La fuerza centrífuga hace que el orujo (el avellano o **hueso de la aceituna** troceado) mezclado con el agua de lavado, se acumule en la parte ahusada del cilindro y de ahí, a través de una válvula, sale al exterior. La misma fuerza centrífuga arrastra el aceite

al extremo opuesto debido al diferente peso específico de este. Desde el decanter el aceite pasa a la centrífuga vertical. La pasta precisa del añadido de agua a una temperatura aproximada de 26° C para facilitar la centrifugación. Cuanta más cantidad de agua de vegetación contengan las olivas, se necesitará añadir menor cantidad de agua. Del separador centrífugo horizontal o decanter sale el aceite a la centrífuga vertical o separador centrífugo.

8.- Decantación

El aceite obtenido se pasa por pequeños decantadores para provocar una desaireación y también la decantación de las partículas más pesadas, entre ellas el agua, que provoca la centrifugación, y posteriormente pasa a recipientes donde se efectúa la clasificación por calidad para ser almacenado según sus características.

9.- Almacenamiento y conservación

Este es el paso final pero no menos importante ya que, en su conjunto, el proceso de elaboración es una cadena que vela por la calidad del producto. Cualquier fallo en una etapa, puede hacer que la calidad del producto no sea la esperada. Por tanto, la conservación del aceite en condiciones adecuadas es primordial para que al llegar al consumidor aun preserve todas sus propiedades. Los depósitos de almacenamiento deben seguir una serie de pautas, como estar hechos de materiales inertes (como el acero inoxidable), impermeables e inatacables para que éste no penetre y sea absorbido por el aceite. En general, se debe evitar materiales que hagan que el aceite se oxide.

En este punto, además de la limpieza, la temperatura también es un factor a tener en cuenta, siendo la temperatura óptima para la conservación del aceite entre 15 y 18°, con condiciones mínimas de luminosidad.

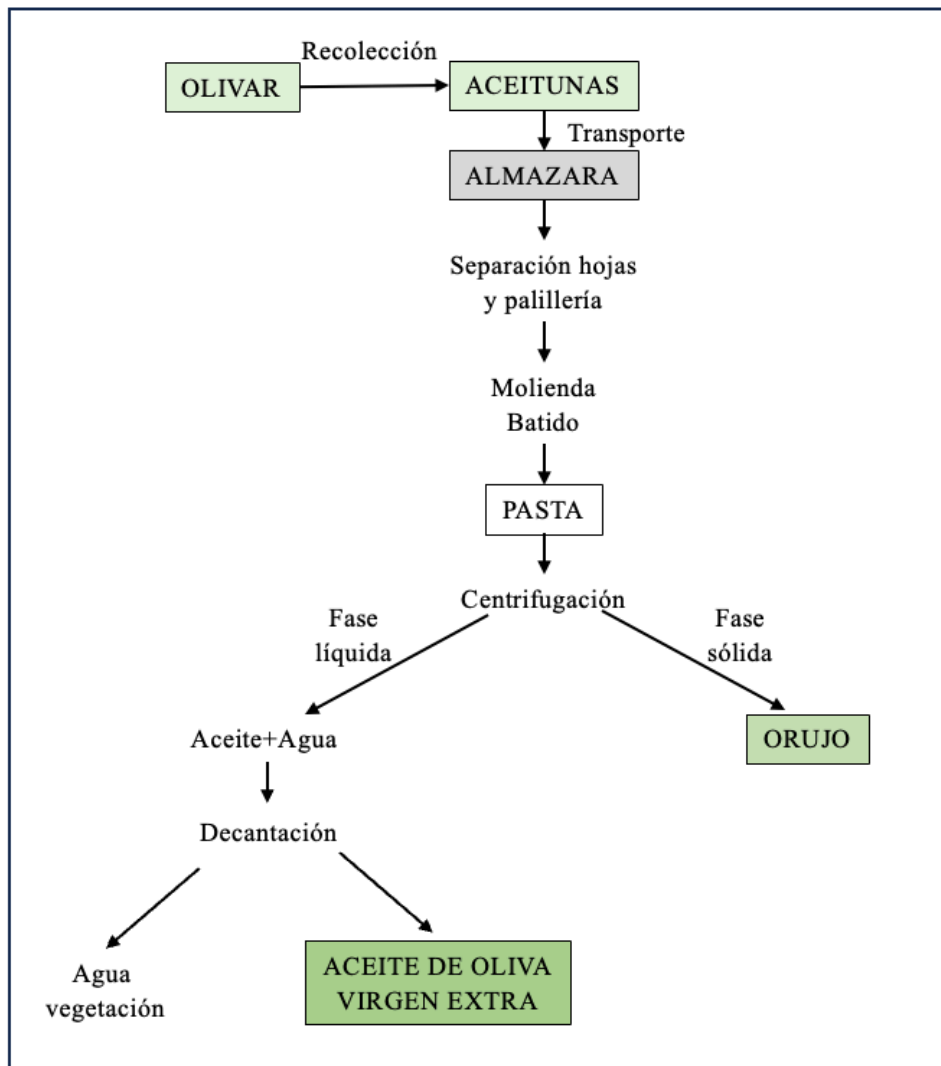


Figura 1.19. Esquema de elaboración propia del método tradicional de obtención del aceite de oliva virgen extra (AOVE).

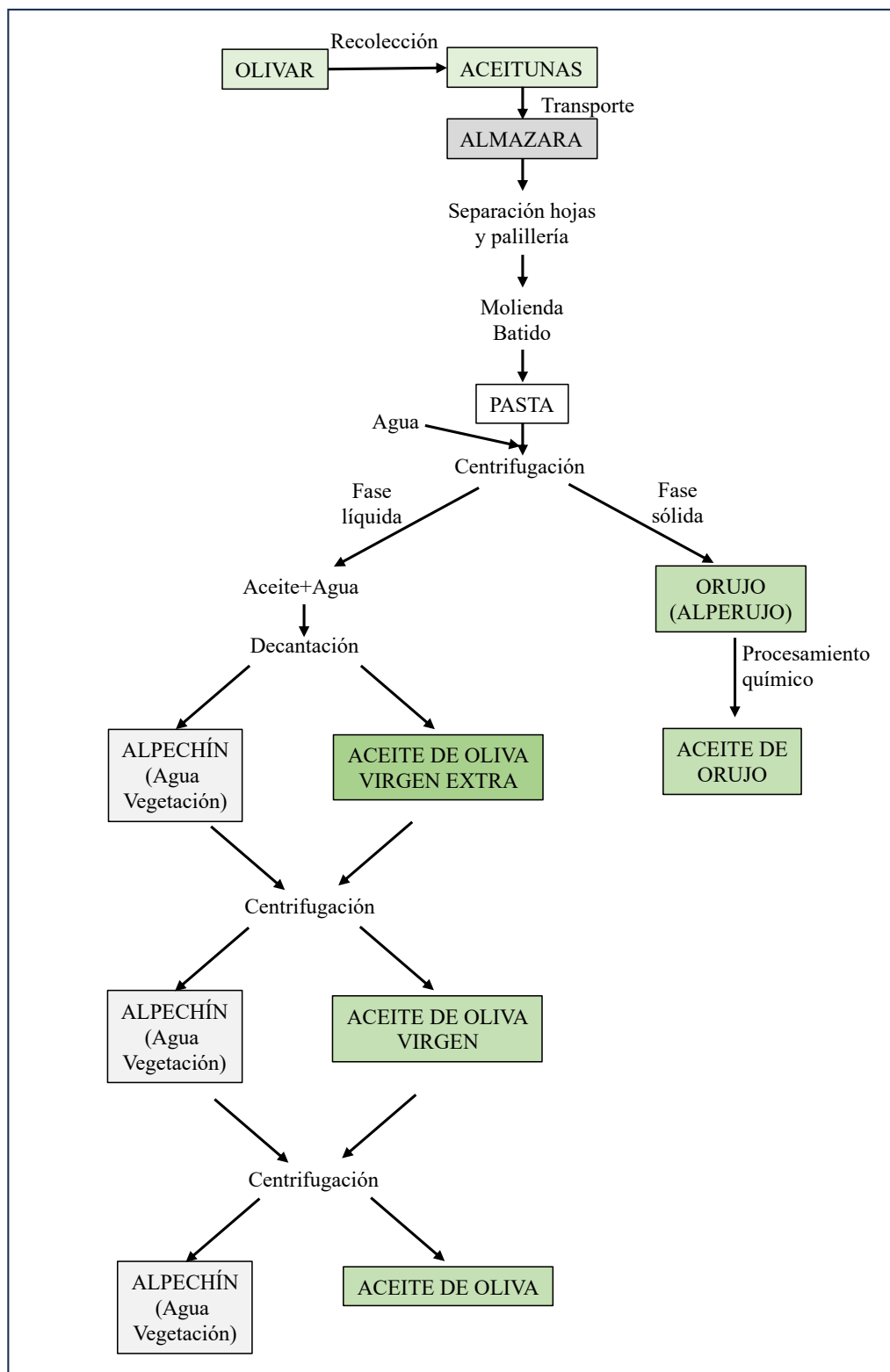


Figura 1.20. Esquema de elaboración propia del método actual de obtención de aceites de oliva.

1.5.6. Elaboración del aceite de oliva refinado

A diferencia de cómo se obtiene el aceite de oliva virgen (métodos físicos y tras ellos se puede utilizar para el consumo inmediato), el aceite de oliva refinado, como su nombre indica, precisa de procesos de refinado para poder alcanzar la calidad exigida.

El término refinar hace referencia al proceso de purificación para que los aceites de menor calidad puedan mejorar ésta y puedan ser utilizados con fines alimentarios y esto se consigue mediante la aplicación de varios procesos físico-químicos, que consisten básicamente en la adición de ciertos compuestos químicos (ácido fosfórico, ácido cítrico, hidróxido sódico, etc.), acompañados de procesos de calentamiento y destilación al vapor, consiguiendo así las características “deseadas”, como acidez más baja, sabor y olor suaves, aspecto limpio, color atractivo, estabilidad frente a la oxidación e idoneidad para freír. En muchos de estos aceites refinados, se llevan a cabo procesos de hidrogenación, con el objetivo de modificar la temperatura de fusión de las grasas que contiene, para que el aceite tenga un aspecto más denso o incluso sólido a temperatura ambiente.



JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

Un hecho aceptado por toda la comunidad científica y clínica es la importancia del control de la glucemia en el esquema de prevención de las complicaciones de la diabetes mellitus. Es necesaria la concienciación de los pacientes sobre la necesidad de mantener un perfil glucémico lo más cercano a la normalidad en todo momento, si bien eso es muy difícil en la práctica. Básicamente se postula una triada de acciones diarias para lograr este objetivo:

- Medidas farmacológicas: insulina en la diabetes mellitus tipo 1 y antidiabéticos (orales o subcutáneos) en la tipo 2.
- Ejercicio físico moderado, no solo como integrante de las medidas de control de la glucemia, sino como aspecto importante en la prevención de las complicaciones cardiovasculares.
- Alimentación adecuada, intentando coordinar la ingesta de diversos tipos de alimentos con el ajuste de la medicación y el gasto energético del ejercicio físico.

No obstante, ese equilibrio no es la tónica general en el conjunto de la población que padece diabetes mellitus, a pesar de la labor de los equipos de educación diabetológica que intentan concienciar a los pacientes de la necesidad de estos cuidados continuos. Por ello, conociendo la fisiopatología de las complicaciones vasculares y las consecuencias que acontecen en la diabetes mellitus, se podría implementar el esquema preventivo con algunas medidas adicionales, por ejemplo, el planteamiento del uso de diversos componentes alimentarios que se postulan como importantes en la protección cardiovascular, como son los compuestos antioxidantes naturales, habida cuenta de la importancia del estrés oxidativo en la génesis y evolución de la vasculopatía diabética, tanto macro como microangiopática, así como en sus consecuencias tisulares (Beeraka et al., 2022).

Enumeraremos a continuación una secuencia de hechos demostrados que nos oriente hacia el núcleo de nuestra investigación

- √ El estudio PREDIMED ha demostrado que la adherencia a una dieta mediterránea cumple dos de los objetivos planteados en el párrafo anterior: control glucémico, con disminución de la incidencia de diabetes mellitus (sobre todo la tipo 2) (Salas-Salvadó et al., 2011), y un descenso en la incidencia de enfermedad cardiovascular (coronaria, cerebral y periférica) (Estruch et al., 2006), incluyendo una disminución de la incidencia de eventos microangiopáticos (Valle-Hita et al., 2022).
- √ El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es la principal fuente grasa de la dieta mediterránea, siendo el componente dietético que mayor contenido en compuestos antioxidantes posee en el conjunto de dicho tipo de alimentación (De Santis et al., 2019).
- √ Si bien el contenido en ácidos grasos, principalmente el ácido oleico, tiene un valor importante, es reconocido que son los compuestos polifenólicos los que mayor peso específico tienen en la explicación del efecto antioxidante, antiinflamatorio y, en definitiva, de su acción beneficiosa en la prevención de la enfermedad vascular (Romani et al., 2019; Santangelo et al., 2018).
- √ Algunos de estos compuestos fenólicos han demostrado efectos a nivel de las vías fisiopatológicas de la vasculopatía diabética, tales como hidroxitirosol (Ditano-Vazquez et al., 2019; Echeverría et al., 2017; López-Villodres et al., 2016; Robles-Almazán et al., 2018; Rodríguez-Morató et al., 2015), tirosol (Sajadimajd et al., 2023), oleuropeina (Nekooeian et al., 2014), oleocantal (Seidita et al., 2022) o 3,4-dihidroxi-fenilglicol (De La Cruz et al., 2021; de Roos et al., 2011).
- √ Asimismo, las vías de daño tisular, por ejemplo, en el tejido cerebral, presentan muchos puntos en común con la fisiopatología de la vasculopatía diabética, aunándose el daño directo de la diabetes sobre la bioquímica cerebral y el producido por la isquemia derivada de un fallo vascular causado por la hiperglucemia mantenida (Cobley et al., 2018; González-Correa et al., 2006; Silva-Rodrigues et al., 2020).
- √ A nivel cerebral, el AOVE y los principales fenoles que contiene, han demostrado un efecto neuroprotector en modelos experimentales de diabetes mellitus, fundamentalmente por su efecto antioxidante y antiinflamatorio (De La Cruz et al., 2010; Reyes et al., 2017).



- √ Se ha demostrado a nivel experimental, que la asociación entre diversos fenoles del AOVE ejerce un efecto sinérgico en la prevención de las complicaciones microangiopáticas y macroangiopáticas de la diabetes mellitus (De La Cruz et al., 2021, 2021a; Rodríguez-Pérez et al., 2022).
- √ Esta asociación de fenoles se encuentra en la naturaleza en las aceitunas, permaneciendo presentes en el AOVE, habiéndose demostrado su efecto beneficioso en el tema que nos ocupa (estudio EUROLIVE -Gimeno et al, 2002- y PREDIMED -Estruch et al., 2006).

2.2. HIPÓTESIS

A la vista de este razonamiento, cabría plantearse la posibilidad de procesar las aceitunas de forma diferente o complementaria al protocolo estándar para obtener AOVE, con una finalidad doble: incrementar el aprovechamiento del fruto del olivo y obtener aceites con un contenido en fenoles que pudiera incluso mejorar el del propio AOVE.

2.3. OBJETIVOS

Basándonos en los postulados anteriores, nos planteamos el presente estudio con los siguientes objetivos:

2.3.1. Objetivo principal

Analizar el posible efecto de dos aceites derivados de las aceitunas (aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas y aceite de semillas de los huesos de aceitunas), comparándolos con el aceite de oliva virgen extra, sobre diversos biomarcadores relacionados con la macroangiopatía y sobre el tejido cerebral sometido a hipoxia-reoxigenación, en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1.

2.3.2. Objetivos secundarios

- 2.3.2.1. Valorar la naturaleza de las modificaciones que estos aceites puedan ejercer sobre las principales vías fisiopatológicas de daño vascular y en tejido cerebral en la diabetes.
- 2.3.2.2. Comprobar si se produce una prevención del daño morfológico vascular acontecido en la diabetes mellitus.

2.3.2.3. Analizar la posible correlación entre parámetros en tejido cerebral con las modificaciones observadas sobre los biomarcadores vasculares.

METODOLOGÍA



3. METODOLOGÍA

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio preclínico en el que se realiza un modelo experimental en ratas de diabetes mellitus similar a la tipo I humana. En este modelo se ha demostrado, como en estudios previos, que se reproducen las principales complicaciones de la diabetes mellitus, siendo las de tipo vascular las que son objeto de este trabajo (De La Cruz et al., 2021; López-Villodres et al., 2016).

Todos los animales se utilizaron de acuerdo con la vigente legislación española para el cuidado, uso y alojamiento de los animales (EDL 2013/80847. BOE-A-2013-6271). Se siguieron las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH publicación No. 86-23, revisada en 1985), así como la Ley Española de Protección de Animales, en los casos aplicables.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética para el Uso de Animales de la Universidad de Málaga (Ref. CEUMA31-2018-A) y la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía (Ref. 9/07/2019/124).

3.2. COMPUESTOS DEL ESTUDIO

Se han utilizado tres tipos de aceites, todos ellos procedentes de la aceituna variedad Picual, obtenidas y procesadas en la empresa Emilio Vallejo S.A. (Torredonjimeno, Jaén, España). El procedimiento seguido desde la recolección de la aceituna variedad Picual es el siguiente (Figura 3.1.):

3.2.1. Aceite de oliva virgen extra (AOVE)

Se ha obtenido de aceitunas variedad Picual enteras mediante el sistema de extracción en frío en dos fases, que es el método utilizado más comúnmente en España (Lozano-Castellón et al., 2022). El proceso incluye: separación de hojas y palillería, molienda, batido, prensado de la pasta obtenida, lavado con agua, decantación y obtención final del AOVE. Este procedimiento se realizó en la empresa Emilio Vallejo S.A. (Torredonjimeno, Jaén, España).

3.2.2. Aceite de semilla (AS)

Se obtuvo mediante extracción mecánica por prensado en frío tras la fragmentación y secado de las semillas de hueso de aceituna y la fase de secado, tal y como se describe en la patente 2389816 (Olmo-García et al., 2011): *“Para la obtención industrial de este aceite de pepita de hueso de aceituna, partiendo de huesos enteros de aceituna obtenidos por cualquier sistema de deshuesado, el procedimiento es el siguiente: en una primera etapa se clasifican por tamaños, en una segunda etapa se llevan a una partidora de hueso la cual parte el hueso sin dañar la pepita, en una tercera etapa se llevan a una separadora clasificadora la cual separa las pepitas o almendras de la cáscara, en una cuarta etapa se pasan a través de una clasificadora de visión artificial la cual desecha todas las pepitas defectuosas, en una quinta etapa las pepitas se someten a un suave secado para dejarlas con la humedad necesaria para su procesamiento posterior, en una sexta etapa se someten a un prensado en frío en una prensa continua, en una séptima etapa se procede al filtrado del aceite obtenido”*.

Este procedimiento se realizó en la empresa Acer Campestres S.L. (Castillo de Locubín, Jaén, España).

3.2.3. Aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas

Para obtener este aceite, las aceitunas son limpiadas, deshuesadas y posteriormente deshidratadas a una temperatura no superior a 40°C. Finalmente, la pulpa deshidratada se centrifuga en continuo para obtener el aceite final. El procedimiento se describe en la patente WO 2013/030426 A1 (Olmo-García et al., 2014), publicada posteriormente en una revista científica (Olmo-García et al., 2019). Tal y como se describe textualmente en la patente: *“... comprende las siguientes etapas: (a) obtención de pulpa de aceitunas; (b) deshidratación de la pulpa de aceituna, dando lugar a pulpa de aceituna deshidratada; (c) molienda de la pulpa de aceituna deshidratada, dando lugar a polvo seco de aceituna deshidratada; (d) obtención de aceite de oliva a partir del polvo seco de aceituna deshidratada”*.

Este procedimiento se realizó en la empresa Acer Campestres S.L. (Castillo de Locubín, Jaén, España).

El análisis cuantitativo de los componentes químicos presentes en cada uno de los aceites utilizados se realizó en el Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla, España) con el siguiente método:

Las muestras de aceite se extrajeron en fase líquida para obtener un extracto de cada una de ellas, sobre el que se realizaron los ensayos de actividad *in vitro*, mediante extracciones consecutivas con metanol: agua y posterior concentración al vacío.

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

Los fenoles se extrajeron en fase líquida para obtener un extracto de cada uno de ellos sobre el que posteriormente se realizaron los ensayos de actividad *in vitro*. Para ello, se pesaron 140 g de aceite en una balanza y se introdujeron en un vaso de precipitados que contenía 280 mL de una solución de metanol: agua en una proporción de 80:20 (v/v). A continuación, la mezcla se trituró en una batidora digital Ultra Turrax IKA T25 durante 60 segundos a 1000 rpm. A continuación, las dos fases se separaron mediante centrifugación durante 20 minutos a 21°C y 3000 rpm en una centrífuga Sorvall RT 6000 D. La fase líquida se midió en un tubo de ensayo para determinar el volumen ocupado. Esta operación se repitió con la muestra sólida resultante de la primera extracción. Los dos extractos obtenidos de cada muestra de aceite se mezclaron, se filtraron a través de papel de filtro y finalmente se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Los fenoles individuales se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPL). El sistema utilizado fue un Hewlett-Packard 1100 con una columna C-18 (Mediterránea SEA 18, Teknokroma, 250 mm x 4,6 mm, i.d. 5 μm) y un detector de matriz de diodos (DAD), utilizando las longitudes de onda de 254, 280 y 340 nm, con válvulas de inyección automáticas Rheodyne (bucle de 20 μL). La fase móvil A fue agua Milli-Q acidificada con ácido tricloroacético al 0,01 % y acetonitrilo utilizando el

siguiente gradiente durante un tiempo total de ejecución de 55 min: 95 % A inicialmente, 75 % A en 30 min, 50 % A en 45 min, 0 % A en 47 min, 75 % A en 95 min y 95 % A en 52 min hasta completar la ejecución. La cuantificación se realizó por integración de los picos a diferentes longitudes de onda en función de los compuestos, con referencia a calibraciones realizadas con patrones externos.

El ácido tricloroacético y el atetonitrilo de grado HPLC se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Deisenhofer, Alemania). El hidroxitirosol, el 3,4-dihidroxifenilglicol, la oleuropeína y sus derivados se obtuvieron de Extrasynthese (Lyon Nord, Geney, Francia). El tirosol se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza) y el agua ultrapura se obtuvo utilizando un sistema de agua Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA).

Tabla 3.1. Composición del aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD) administrados a los animales de experimentación.

	AOVE	AS	ADD
Acidez (%)	0,12	37,26	0,12
Peróxidos (mEqO ₂ /kg)	8,2	3,1	12,9
K270	0,16	1,39	0,19
K232	1,88	3,23	1,47
Delta K	<0,01	0,02	<0,01
Etil oleate (mg/kg)	7	4506	5
Ceras (mg/kg)	34	335	59
Ácidos grasos			
Mirístico (%)	0,01	0,04	0,01
Palmítico (%)	12,24	9,86	13,62
Palmitoleico (%)	1,10	0,26	1,22
Margárico (%)	0,05	0,09	0,05
Margaroleico (%)	0,08	0,07	0,07
Estearico (%)	3,47	2,87	2,62
Oleico (%)	76,60	68,52	77,47
Linoleico (%)	4,95	16,34	3,29
Linolénico (%)	0,71	0,29	0,82
Araquidónico (%)	0,39	0,56	0,40
Eicosanoico (%)	0,20	0,55	0,22
Benénico (%)	0,10	0,30	0,11
Lignocérico (%)	0,05	0,15	0,07
Esteroles totales (mg/kg)	1367	2653	1528

Colesterol (%)	<0,1	0,3	0,1
Brasicasterol (%)	<0,1	<0,1	<0,1
Estigmasterol (%)	0,6	1,8	1,1
β-Sitosterol (%)	94,6	90,1	94,9
D7-Estigmasterol (%)	0,3	1,6	0,3
Eritrodiol+Uvaol (%)	1,0	1,1	3,6
Ácidos triterpénicos totales (mg/Kg)	75,40	113,64	913,74
Oleanólico (mg/kg)	22,26	41,02	402,35
Maslínico (mg/Kg)	53,14	72,62	498,14
Ursólico (mg/kg)	<5,00	<5,00	13,25
Pigmentos de clorofila (mg/Kg)	23,63	8,16	26,25
Pigmentos carotenoides (mg/Kg)	7,69	9,33	8,12
Escualeno (mg/100g)	440	9	664
Tocoferoles (mg/Kg)	342	11	394
Fenoles totales (ppm)	703±11	530±5,6	689±39
3,4-dihidroxifenilglicol	1,07	0,215	-
Hidroxitirosol	5,825	29,8	8,88
Tirosol	1,9	22,755	14,04
Vanillina	-	-	-
Ácido vanílico	-	3,13	-
Acetato de hidroxitirosol	-	-	26,24
Nuzenida	-	14,26	4,46
Derivados de oleuropeina 1	-	26,76	-
Derivados de oleuropeina 2	36,52	23,82	22,66
Derivados Ligustrósidos	49,46	-	49,42
Sum	94,775	120,74	125,7
Potencial de hidroxitirosol (ppm)	25	45	30
% aproximado del potencial de hidroxitirosol	0,0025	0,0045	0,0030

3.3. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se ha utilizado un total de 50 ratas de la cepa Wistar, adquiridas por el Centro de Experimentación Animal (CECA) de la Universidad de Málaga. El peso inicial de los animales fue de 200-220 g, y quedaron estabuladas en el CECA durante un periodo de cuarentena de 14 días. Pasado este tiempo, los animales fueron identificados y estabulados de forma individual durante la duración completa del estudio. El animal diabético debe mantener unas condiciones de estabulación e higiene ideales para evitar

cualquier problema o sufrimiento innecesario. En todo momento se controló la ingesta de agua (no restringida) así como el alimento (no restringido), con la finalidad de evaluar si acontecían cambios en los hábitos alimentarios relacionados con la condición de diabetes o la administración de los aceites en estudio.

Durante el proceso de identificación los animales se asignaron aleatoriamente a los distintos grupos experimentales, constituyéndose cada uno de ellos con 10 animales.

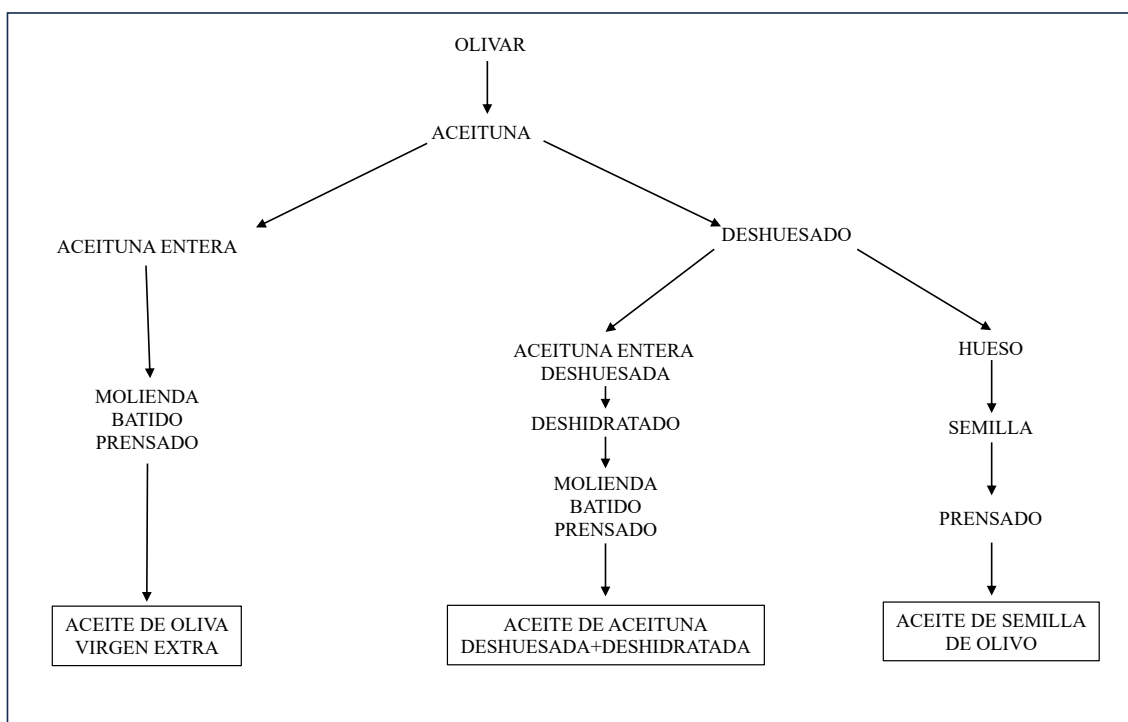


Figura 3.1. Esquema del procedimiento de obtención de los tres tipos de aceites utilizados en el estudio.

3.4. GRUPOS EXPERIMENTALES

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

- **Ratas controles sanas o no diabéticas (RND)**. Sirvieron de control de las variables determinadas en condiciones de normoglucemia. Los procedimientos de administración de cualquier tipo de sustancias solo difirieron respecto al resto de grupos en que en este caso se administraba suero fisiológico como placebo.

- **Ratas controles diabéticas (RD).** A estos animales se les indujo la diabetes experimental (véase más adelante), no se le administró ninguno de los aceites de estudio, tan solo insulina, con la finalidad de reducir la mortalidad por hiperglucemias demasiado elevadas.

- **Ratas diabéticas tratadas.** Una vez que se comprobó la presencia de diabetes en cada animal, se le administraron los aceites motivo de estudio:

- **Aceite de oliva virgen extra**, en una dosis de 0.5 mL/kg/día, mediante canulación orogástrica, durante dos meses.

- **Aceite de semilla**, en una dosis de 0.5 mL/kg/día, mediante canulación orogástrica, durante dos meses.

- **Aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas**, en una dosis de 0.5 mL/kg/día, mediante canulación orogástrica, durante dos meses.

Cada uno de los aceites se administraron una vez al día, siempre a la misma hora, durante 2 meses, incluido el día del final del seguimiento y obtención de las muestras biológicas.

3.4.1. Inducción de la diabetes mellitus experimental

La diabetes mellitus se indujo mediante la administración de estreptozotocina (40 mg/Kg) en una única dosis intraperitoneal. La estreptozotocina es un antibiótico que provoca la destrucción de las células β de los islotes pancreáticos y se utiliza experimentalmente para producir un modelo de diabetes mellitus de tipo 1 (Furman, 2021).

Se catalogó como animal diabético aquel cuya glucosa en sangre, medida con un glucosímetro FreeStyle (Laboratorios Abbot S.A., Madrid, España) utilizando sangre procedente de la vena safena, fue de 200 mg/dL durante dos días seguidos. Para disminuir la mortalidad de los animales diabéticos debida a cifras demasiado altas de glucosa en sangre, se administraron 4-6 UI/día, vía subcutánea, de un análogo de insulina de acción prolongada (Levemir®, Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca).

3.5. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Una vez finalizados los dos meses de seguimiento, se obtuvieron las muestras de orina, que se recogieron durante 24 h en jaulas metabólicas (Tecniplast S.p.A., Buguggiate, Italia). Después de centrifugar las muestras a 3500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se dividieron en alícuotas y se congelaron a -80°C.

Posteriormente, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico, vía intraperitoneal (40 mg/kg), extrayendo su sangre mediante punción de la bifurcación de las arterias ilíacas. A continuación, se procedió a la decapitación de los animales.

Se obtuvieron las siguientes muestras biológicas de cada animal:

- **Orina**, tal y como se ha descrito en el párrafo anterior.
- **Sangre**. Parte de la sangre se recogió en tubos con anticoagulante (citrato sódico 3.8%, en proporción 1:10) Parte de la muestra sanguínea se vertió en tubos con resina, sin anticoagulación, con la finalidad de que se formase suero. Se centrifugaron las muestras sanguíneas a 4000 rpm durante 10 min, y se separó el suero resultante, alicuotando las muestras y congelándolas a -80°C hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas.
- **Segmentos de aorta**. se obtuvo un segmento de la aorta abdominal 0,5 cm anterior a la bifurcación de las arterias femorales.
- **Cerebro**. Una vez colocada la cabeza del animal en una placa refrigerada con hielo, se diseccionó la piel y el tejido muscular de la zona occipital, procediendo al decalotaje óseo. Tras seccionar los huesos temporales, se levantó el hueso y quedó expuesto el cerebro en su totalidad.

3.5.1. Modelo experimental de hipoxia-reoxigenación

Se separaron el cerebelo y el tronco encéfalo, obteniendo del resto de tejido cerebral cortes transversales de 1 mm con un vibratomo (Campden Instruments, San Francisco, California, Estados Unidos).

- Período A: Los cortes se incubaron en un buffer cuya composición fue (mmol/L): 100 NaCl, 0.05 KCl, 24 NaHCO₃, 0.55 KH₂PO₄, 0.005 CaCl₂, 2 MgSO₄, 9.8 glucosa (pH 7.4), con perfusión continua de una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ (Alphagaz MIX. Air Liquide. España). Este periodo tiene una duración de 30 minutos.
- Período B: El tejido cerebral se incubó en un buffer cuya composición (mmol/L) fue igual que la utilizada en el periodo A, pero exento de glucosa y se añadió 3 mmol/L de CaCl₂ y 0.001 mmol/L de MgSO₄. En este paso, se utilizó una perfusión continua de una mezcla de 95% de N₂ y 5% de CO₂ (Alphagaz N₂. Air Liquide. España), lo que simulaba las condiciones de hipoxia. Este periodo cuenta con una duración de 20 minutos.
- Período C: Los cortes cerebrales se incubaron en un buffer similar al del periodo B, pero con glucosa (9.8 mmol/L) y perfundidos con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ durante 120 minutos. Este paso corresponde a la reoxigenación.

El buffer empleado en cada una de las etapas se sometió, previo a su uso, a una oxigenación o nitrogenación (según proceda) continua durante 45 minutos.

Las muestras cerebrales fueron analizadas al finalizar el modelo completo. Posteriormente, estas muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a una temperatura de -80°C. Todas las variables analíticas fueron determinadas antes de los 7 días desde que las muestras fueron almacenadas.

3.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Describiremos las características principales de las técnicas realizadas atendiendo a su agrupación conceptual, tal y como describiremos en la sección posterior de Resultados.

La mayor parte de las determinaciones se han realizado utilizando kits comerciales, unos colorimétricos y otros de enzimo-inmunoensayo (ELISA). Los kits de inmunoensayo enzimático de 11-deshidrotromboxano B₂, 3-nitrotirosina y 6-ceto-prostaglandina F₁α (6-ceto-PGF₁α) proceden de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE. UU.). El inmunoensayo enzimático de 8-isoprostano y los kits colorimétricos de capacidad

antioxidante total fueron de Cell Biolabs, Inc. (Arjons Drive, San Diego, CA, EE. UU.). Los kits de inmunoensayo enzimático de VCAM-1, mieloperoxidasa (MPOx) y lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) provenían de Abyntek Biopharma, S.L. (Vizcaya, Bilbao, España). Los kits de concentración de glutatión y actividad de glutatión peroxidasa y los kits de inmunoensayo enzimático de 8-hidroxi 2 desoxiguanosina, fueron de Abcam plc (Cambridge, CB2 0AX, Reino Unido). El colágeno se obtuvo de Menarini Diagnóstica (Barcelona, España). Todos los demás reactivos provenían de Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO, EE. UU.).

3.6.1. Analítica sérica estándar, incluyendo perfil hepático, renal y lipídico

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

Se determinaron todas las variables atendiendo a las instrucciones de los kits utilizados en el autoanalizador. Estas determinaciones fueron las siguientes:

- Variables de bioquímica general, hepática y renal

- Glucosa
- Proteínas totales (PT)
- Albúmina
- Creatinina
- Aspartato aminotransferasa (AST)
- Alanina aminotransferasa (ALT)
- Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)
- Fosfatasa alcalina (FA)

- Variables de perfil lipídico

- Colesterol total

- Colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*)
- Colesterol HDL (*High Density Lipoprotein*)
- Triglicéridos (TGC)

3.6.2. Variables iniciales de la vasculopatía

- Lipoproteína de baja densidad oxidada en suero (oxLDL), molécula que se oxida por radicales libres en las primeras fases de la vasculopatía diabética. Se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Mieloperoxidasa (MPOx), índice de activación leucocitaria. Se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Molécula de adhesión vascular VCAM-1, índice de activación endotelial en situación inicial de inflamación vascular. Se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.3. Variables de inflamación vascular: estrés oxidativo y nitrosativo

3.6.3.1. VARIABLES OXIDATIVAS

- Peroxidación lipídica, a través de la determinación de productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), cuyo principal representante es el malondialdehído (MDA). Se utilizó un kit comercial colorimétrico con detección a 532 nm, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Producción global de compuestos oxidantes, a través de la determinación de 8-isoprostanos urinarios, compuestos derivados de la interacción de los radicales libres con el ácido araquidónico, produciendo una peroxidación de este ácido graso, que forma 8-epi-PGF_{2α} (8-isoprostanos) sin intervención enzimática alguna (Costabile et al., 2015). Se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Daño de ADN producido por radicales libres, a través de la determinación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina. Se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Producción de peroxinitritos, para valorar el estrés nitrosativo, es decir, la formación de radicales libres derivados del óxido nítrico (RNO). Estos radicales nitrán al aminoácido tirosina en proporción 1:1, formando 3-nitrotirosina. Se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.3.2. VARIABLES ANTIOXIDANTES

- Capacidad antioxidante total (TAC), como índice de la capacidad de una muestra para ejercer una defensa antioxidante utilizando todos sus mecanismos de inhibición de los radicales libres. El ensayo TAC se basa en la reducción de Cu^{++} a Cu^+ mediante antioxidantes como el ácido úrico y la reacción con un cromógeno, determinando la absorbancia a 490 nm, mediante kit colorimétrico comercial.

- Concentración de glutatión reducido (GSH), principal tripéptido que usa el organismo como almacén de un sistema antioxidante cuantitativamente importante. Se utilizó un test comercial colorimétrico, cuyas instrucciones se siguieron para la obtención de las concentraciones de GSH.

- Actividad glutatión peroxidasa (GSHpx), enzima que oxida al SHG en GSSG, consumiendo NADPH, el cual interactúa con los radicales libres disminuyendo su capacidad oxidante. Se utilizó un test comercial colorimétrico basado en un método de cinética espectrofotométrica.

3.6.4. VARIABLES DE ESTIMULACIÓN TROMBOGÉNICA

- Agregometría plaquetaria. La capacidad de las plaquetas para agregarse se cuantificó mediante un agregómetro de impedancia eléctrica en sangre total (Chrono-Log 540, Chrono-Log Corp., Haverton, PA, EEUU.), utilizando colágeno (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como inductor de la agregación plaquetaria. Se cuantificó la máxima intensidad de agregación plaquetaria (I_{max}) a los 10 min de añadir el colágeno.

- Producción de tromboxano. En la orina se detecta la presencia de un metabolito estable del tromboxano A_2 , el 11-dehidro-tromboxano B_2 , producto de la formación global de este prostanoide en el todo el organismo. Se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Producción de prostaciclina. En la orina se detecta la presencia de un metabolito estable de la prostaciclina, la 6-keto-prostaglandina $F_{1\alpha}$, producto de la formación global de este prostanoide en el todo el organismo. Se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.5. Repercusión morfológica vascular de la macroangiopatía

El estudio morfométrico se realizó en el segmento aórtico que va desde la bifurcación de las arterias renales hasta 1 cm hacia arriba. El segmento vascular se fijó con paraformaldehído 10% durante 48 horas, procediéndose al método estándar de inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 mm, los cuales se sometieron a una tinción con hematoxilina y eosina.

Las muestras se examinaron con un microscopio óptico digitalizado. El análisis morfométrico se realizó con el programa informático Visilog v. 6.3 con licencia del Servicio Central de Ayuda a la Investigación de la Universidad de Málaga (SCAI).

De cada muestra arterial, se analizaron 10 secciones elegidas al azar de 5 a 7 portaobjetos. En cada sección cuantificamos las variables, área de la luz (AL) y área de toda la sección arterial (AT). El área de la pared arterial (APV) se calculó de la siguiente manera:

$$APV = AT - AL$$

Además, se usaron secciones aórticas teñidas para contar el número de núcleos de células de músculo liso en la túnica media. La imagen se segmentó en una nueva imagen binaria, con el color negro representando los núcleos. Se calculó el número de núcleos celulares dentro de cuatro campos de aproximadamente $10.000 \mu\text{m}^2$ a 0° , 90° , 180° y 270° en cada sección.

3.6.6. Variables de daño cerebral tras un modelo de hipoxia-reoxigenación

- Valoración de muerte celular. Se cuantificó en el sobrenadante de los cortes cerebrales sometidos a hipoxia-reoxigenación, a través de la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), mediante test comercial colorimétrico (Roche Applied Science. Barcelona, España) que se basa en la capacidad de la LDH para realizar el paso de piruvato a ácido láctico, cuantificándolo espectrofotométricamente a 490 nm.

- Variables de estrés oxidativo y nitrosativo. Los cortes de cerebro se homogeneizaron en un buffer salino con una concentración de fosfato 50 mM (pH 7.0), en proporción 1/15 (w/v). Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se alicuotó, congelando las alícuotas a -80°C hasta que fueron utilizadas para la cuantificación de las distintas variables de estrés oxidativo y nitrosativo. Los métodos utilizados son los mismos que los descritos en las muestras de suero:

- Peroxidación lipídica: productos de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS)
- Daños de ADN por radicales libres: 8-hidroxi-2-desoxiguanosina
- Producción de peroxinitritos: 3-nitrotirosina
- Capacidad antioxidante total del tejido cerebral (TAC)
- Niveles de glutatión reducido (GSH) y actividad de glutatión peroxidasa (GSHpx)

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos en el texto, tablas y figuras se expresan como media \pm desviación estándar (DE) de 10 animales. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico para ciencias sociales ver. 29.0 (SPSS Co., Chicago, IL, EE. UU.). Se utilizaron análisis de varianza unidireccionales seguidos de transformación de Bonferroni y pruebas t de Student para datos no apareados. En todos los casos se asumió significación estadística a un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

Expondremos los resultados obtenidos atendiendo a un orden didáctico, siguiendo las fases fisiopatológicas de la macroangiopatía diabética, expuestas en la introducción de esta tesis. Para ello, seguiremos el siguiente orden esquemático:

4.1. Parámetros zoométricos básicos.

4.2. Analítica sérica estándar, incluyendo perfil hepático, renal y lipídico.

4.3. Variables iniciales de la vasculopatía: mieloperoxidasa leucocitaria, proteínas adhesivas endoteliales y LDL oxidada.

4.4. Variables de inflamación vascular, centrándonos en el estrés oxidativo y nitrosativo.

4.5. Variables de estimulación trombogénica, como índice de disfunción endotelial y estimulación plaquetaria: agregación plaquetaria y producción de tromboxano y de prostaciclina.

4.6. Repercusión morfológica vascular de la macroangiopatía.

4.7. Variables de daño cerebral tras un modelo de hipoxia-reoxigenación.

En cada caso expondremos los cambios observados por la diabetes mellitus experimental y los posibles efectos de la administración de los aceites utilizados sobre todas las variables cuantificadas.

4.1. PARÁMETROS ZOOMÉTRICOS BÁSICOS

En la Tabla 4.1. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a tres parámetros zoométricos básicos (peso corporal al finalizar el periodo de seguimiento, comida y bebida ingeridas diariamente a lo largo de dicho periodo), así como la diuresis diaria.

En la Figura 4.1. se representa gráficamente el efecto del modelo experimental de diabetes tipo 1 en dichos parámetros y en la Figura 4.2. el efecto que produjo la administración de los tres tipos de aceite utilizados.

Los animales diabéticos mostraron una menor tasa ganancial de peso corporal, así como una mayor ingesta de comida y bebida. La administración de los aceites, si bien muestra tendencias, en ningún caso llegan a la significancia estadística.

Tabla 4.1. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a los parámetros zoométricos de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CND	CD	AOVE	AS	ADD
Peso corporal (g)	450 \pm 6.1	343 \pm 16.0*	376 \pm 31.0 ^a	317 \pm 7.9	335 \pm 30.0
Comida ingerida (g/día)	18.7 \pm 2.1	28.3 \pm 4.4*	21.3 \pm 2.9	22.4 \pm 0.8	24.3 \pm 4.6
Bebida ingerida (mL/día)	37.9 \pm 14.4	105 \pm 45.0*	80.8 \pm 22.8	75.5 \pm 19.5	80.8 \pm 15.2
Diuresis (mL/día)	15.6 \pm 1.3	34.3 \pm 3.2*	17.1 \pm 1.9 ⁺	15.9 \pm 2.6 ⁺	17.9 \pm 11.7 ⁺

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

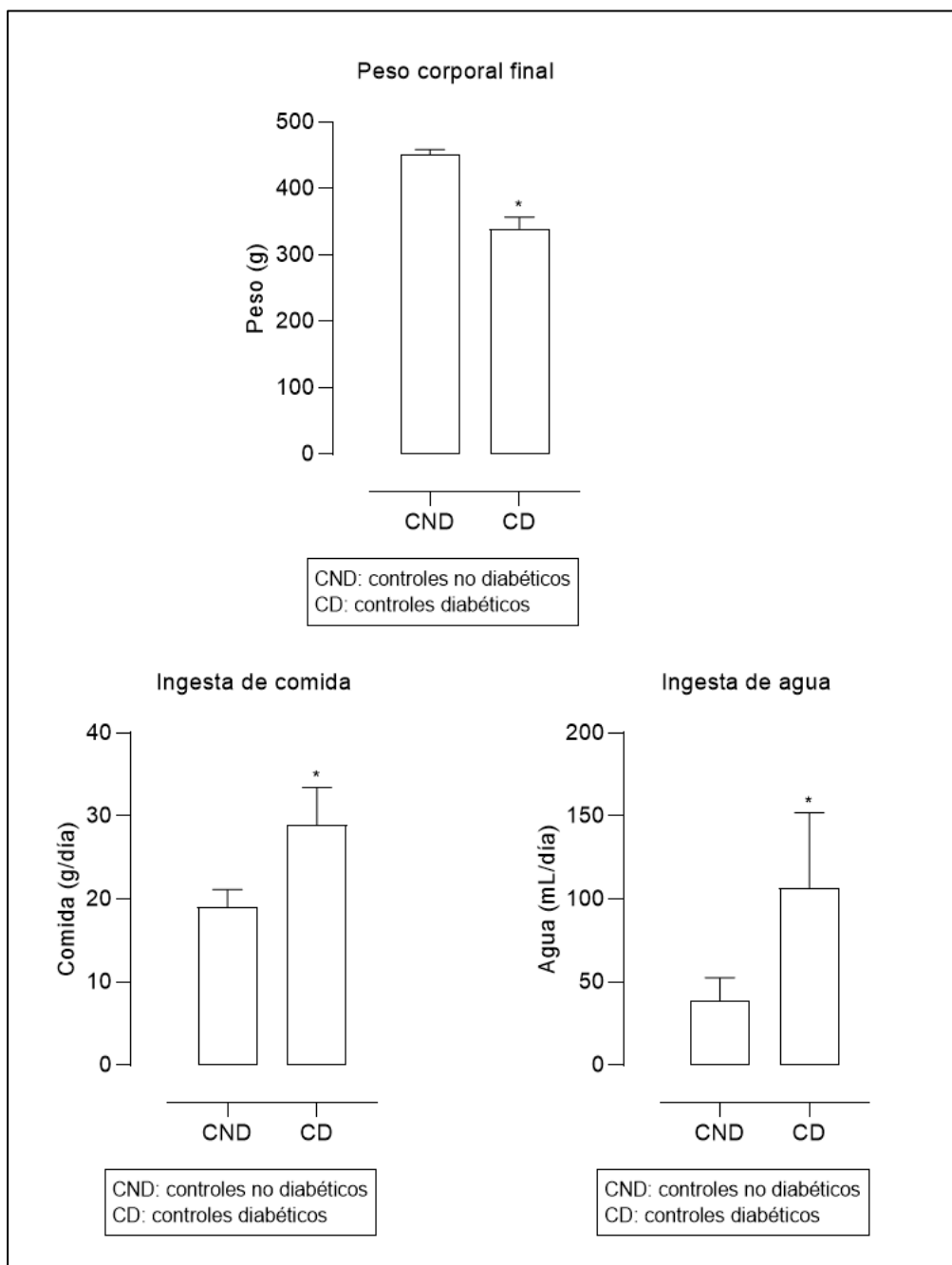


Figura 4.1. Valores medios (media \pm desviación estándar) del peso corporal, comida y bebida ingeridas durante el periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

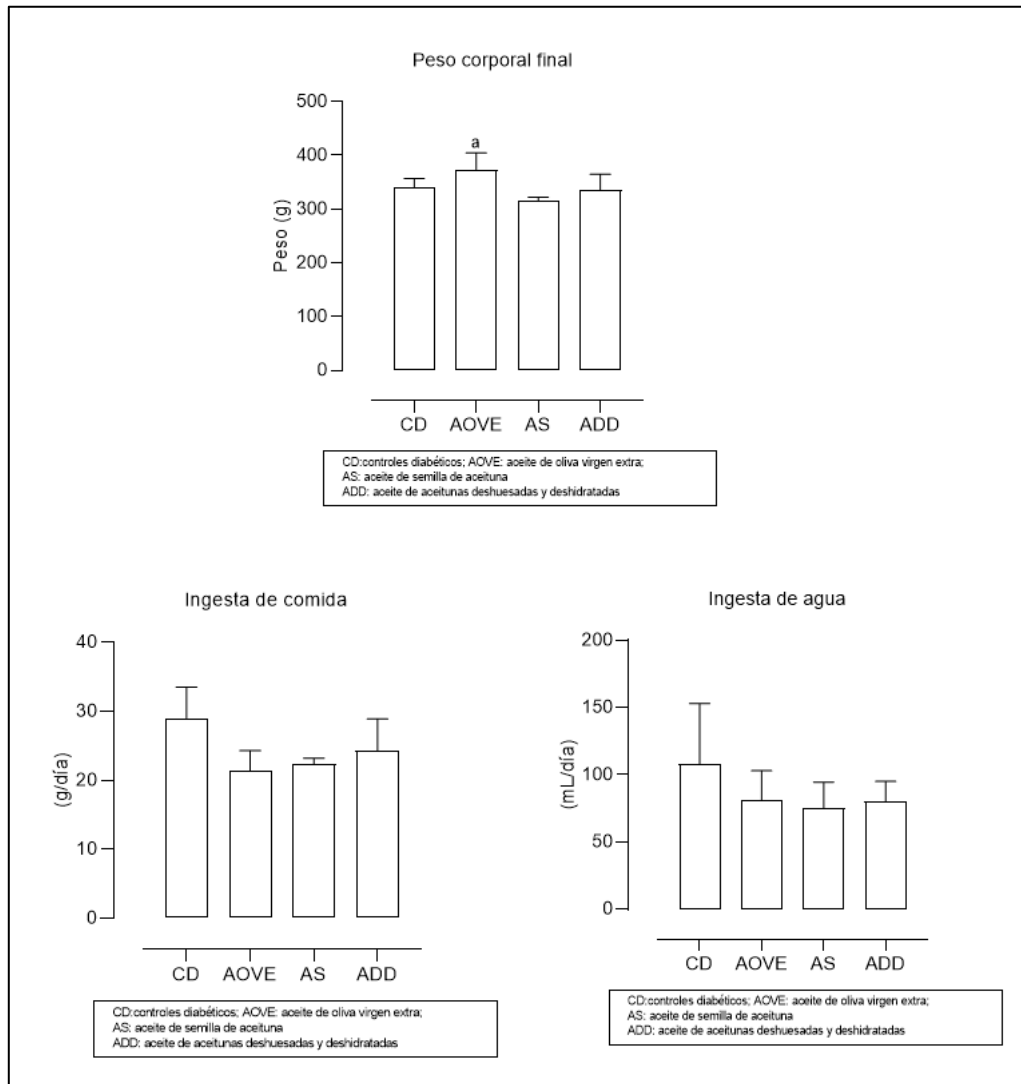


Figura 4.2. Valores medios (media \pm desviación estándar) del peso corporal, comida y bebida ingeridas durante el periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). ^a $p < 0.05$ respecto a AS.

4.2. VARIABLES ANALÍTICAS SÉRICAS

En la Tabla 4.2. y 4.3. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables analíticas séricas del perfil glucídico (glucemia), proteico (creatinina, proteínas totales y albúmina), hepático (transaminasas -aspartato y alanina aminotransferasa-, gamma-glutamyl transpeptidasa y fosfatasa alcalina) y lipídico (colesterol total y sus fracciones LDL y HDL, y triglicéridos).

En las Figuras 4.3., 4.4., 4.6. y 4.8. se representa gráficamente el efecto del modelo experimental de diabetes tipo 1 en dichos parámetros y en las Figuras 4.3., 4.5., 4.7. y 4.9. el efecto que produjo la administración de los tres tipos de aceite utilizados.

Los animales diabéticos mostraron un desequilibrio en casi todas estas variables, en primer lugar, una clara hiperglucemia, la cual no es modificada por ninguno de los tratamientos administrados, así como un estado hipercolesterolémico que solo corrige la administración de AOVE. Por otro lado, la diabetes mellitus provoca un incremento de todas las variables hepáticas analizadas, frenando este perfil los aceites utilizados, sobre todo en lo referente a las enzimas aspartato aminotransferasa y gamma glutamil transpeptidasa.

Tabla 4.2. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables analíticas séricas generales de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CND	CD	AOVE	AS	ADD
Glucosa (mg/dL)	86.4 \pm 5.2	452 \pm 9.4*	538 \pm 103	499 \pm 99.0	481 \pm 104
Creatinina (mg/dL)	0.3 \pm 0.01	0.7 \pm 0.03*	0.6 \pm 0.06 ⁺	0.6 \pm 0.07 ⁺	0.5 \pm 0.04 ⁺
Proteínas (g/dL)	5.5 \pm 0.1	5.3 \pm 0.2	5.5 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2
Albúmina (g/dL)	1.5 \pm 0.06	1.4 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1	1.4 \pm 0.08	1.3 \pm 0.06
AST (U/L)	83.1 \pm 4.3	111 \pm 10.3*	60.0 \pm 19.1 ⁺	73.4 \pm 9.4 ⁺	57.8 \pm 15.7 ⁺
ALT (U/L)	50.9 \pm 11.5	84.3 \pm 5.9*	66.4 \pm 25.0	59.5 \pm 34.1	63.7 \pm 14.6
GGT (U/L)	1.0 \pm 0.1	2.3 \pm 0.4*	1.3 \pm 0.4 ⁺	1.2 \pm 0.4 ⁺	1.4 \pm 0.5 ⁺
Fosfatasa alcalina (U/L)	73.9 \pm 11.8	283 \pm 6.0*	254 \pm 20.3	208 \pm 42.2 ⁺	235 \pm 14.9

*p < 0.05 respecto a CND; ⁺p < 0.05 respecto a CD

AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa

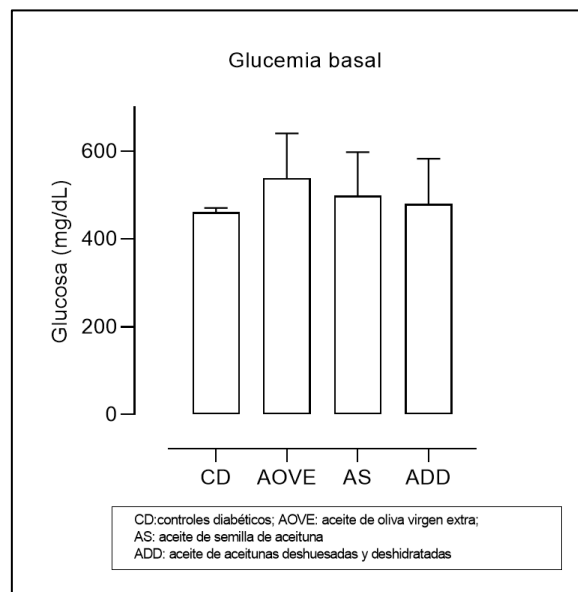
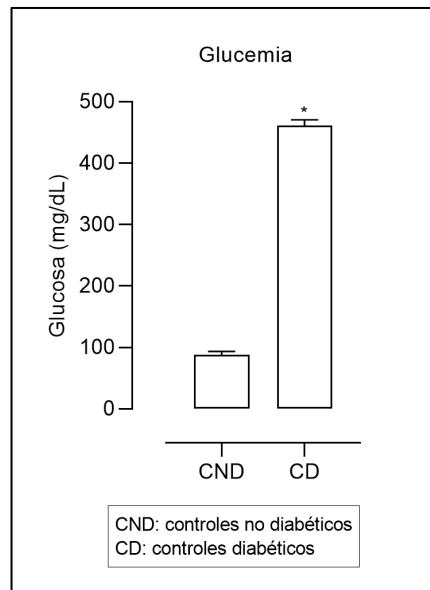


Figura 4.3. Valores medios (media \pm desviación estándar) del perfil glucídico (glucosa sanguínea) al final del periodo de seguimiento en los animales no diabéticos controles (CND), diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

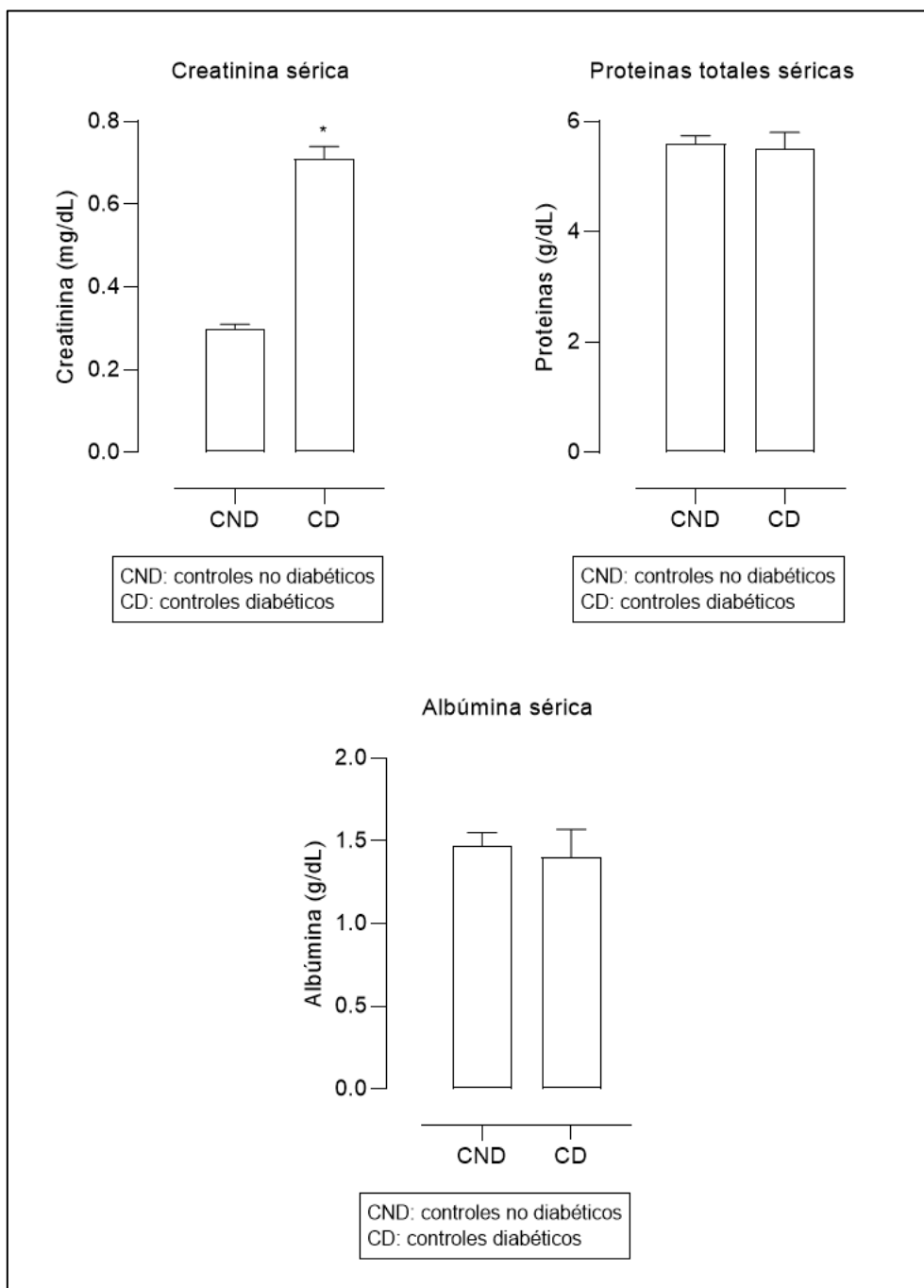


Figura 4.4. Valores medios (media \pm desviación estándar) del perfil proteico al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

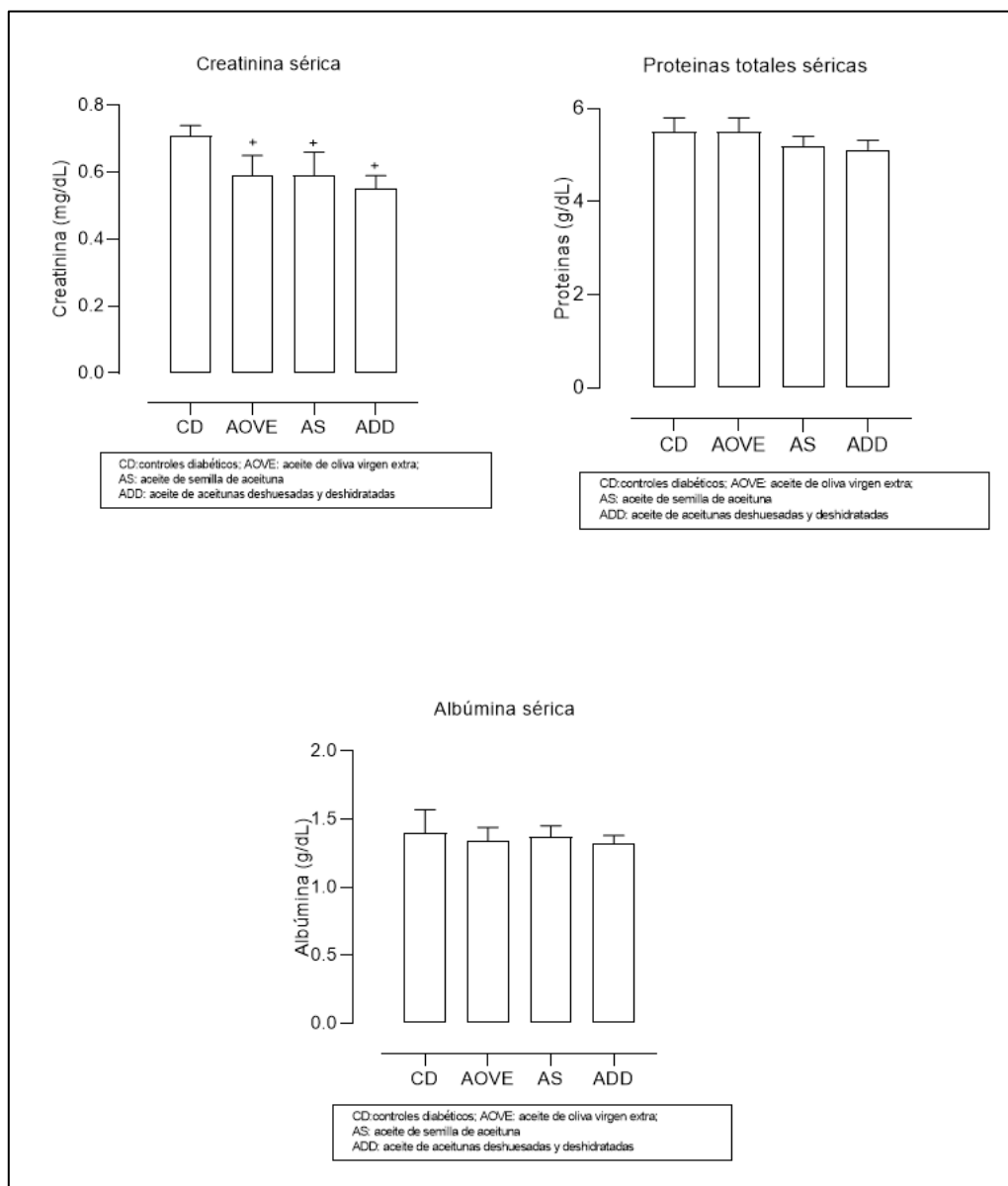


Figura 4.5. Valores medios (media \pm desviación estándar) del perfil proteico al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

⁺p < 0.05 respecto a CD.

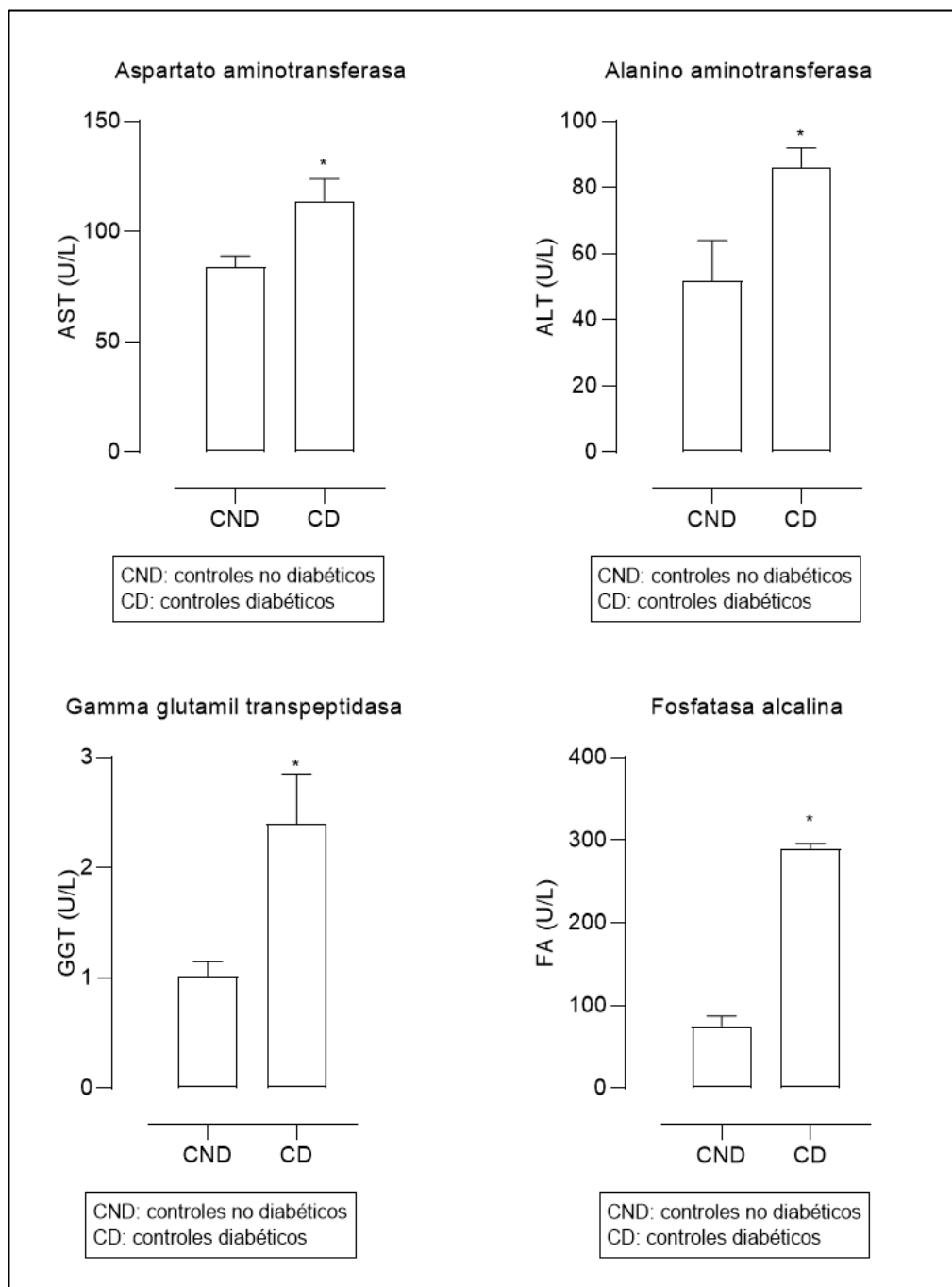


Figura 4.6. Valores medios (media \pm desviación estándar) del perfil hepático al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

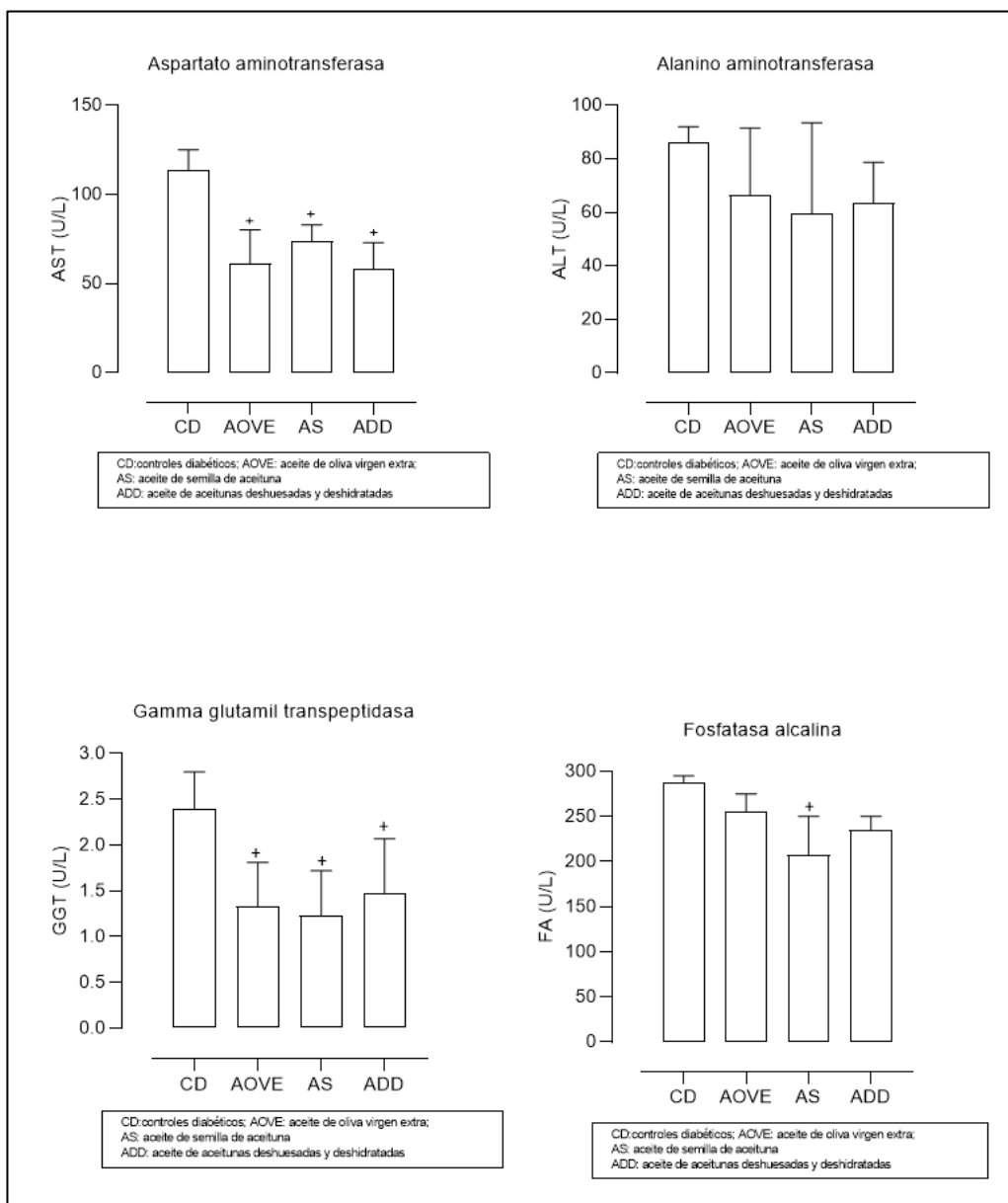


Figura 4.7. Valores medios (media \pm desviación estándar) del perfil hepático al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

⁺p < 0.05 respecto a CD.

Tabla 4.3. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes al perfil lipídico de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CND	CD	AOVE	AS	ADD
Colesterol total (mg/dL)	55.5 \pm 8.9	75.6 \pm 3.6*	63.0 \pm 1.9 ⁺	73.3 \pm 2.6	60.0 \pm 5.7 ⁺
LDL colesterol (mg/dL)	18.7 \pm 1.2	37.1 \pm 4.8*	21.6 \pm 2.6 ⁺	24.3 \pm 2.3 ⁺	18.7 \pm 1.3 ⁺
HDL colesterol (mg/dL)	18.9 \pm 3.9	17.7 \pm 1.6	24.9 \pm 2.0 ⁺	25.9 \pm 1.7 ⁺	29.3 \pm 3.3 ⁺
Triglicéridos (mg/dL)	53.9 \pm 11.5	130 \pm 6.9*	95.5 \pm 3.1 ⁺	103 \pm 5.7 ⁺	70.8 \pm 5.3 ⁺ ^a

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

LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad

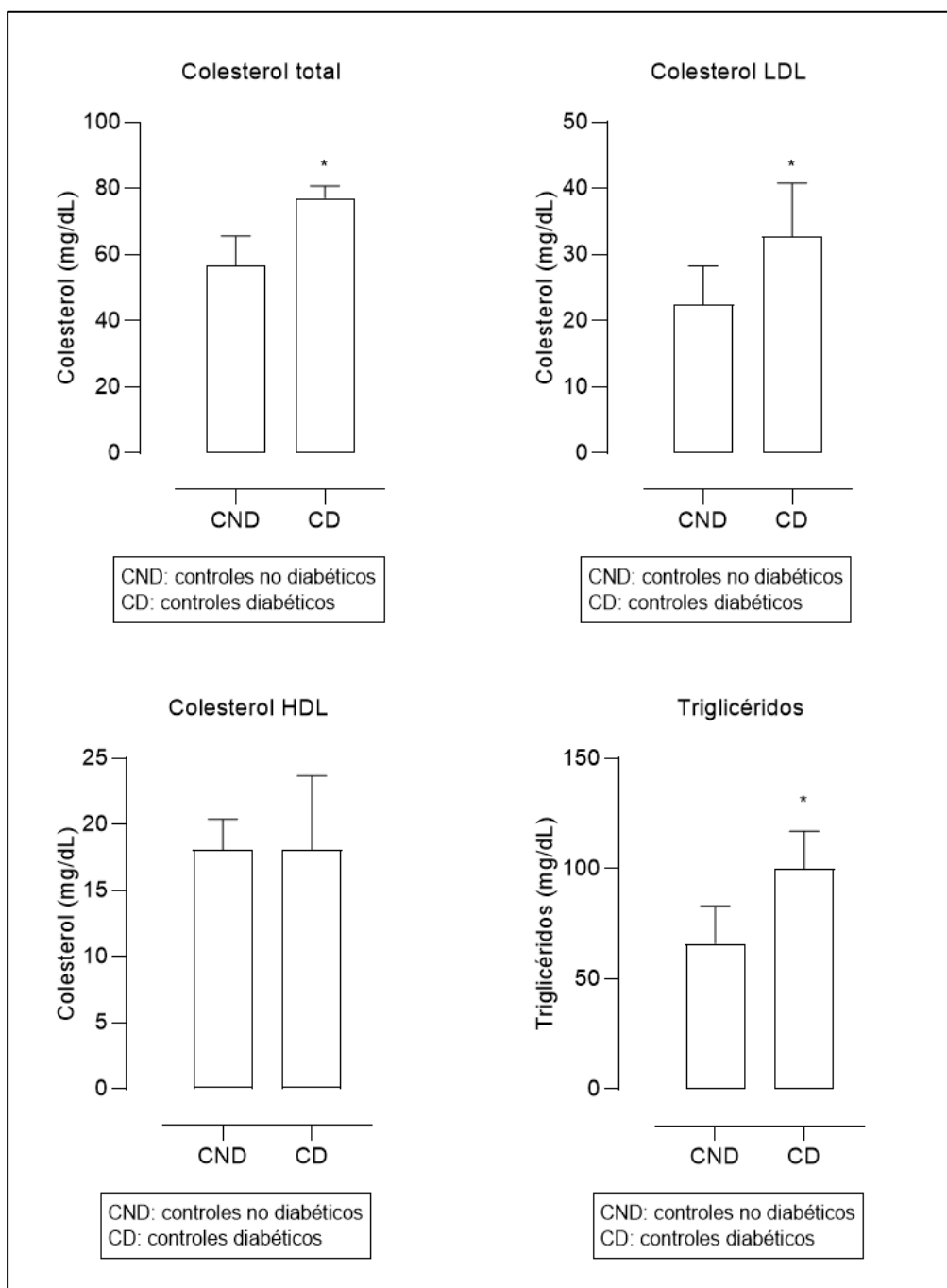


Figura 4.8. Valores medios (media \pm desviación estándar) del perfil lipídico al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

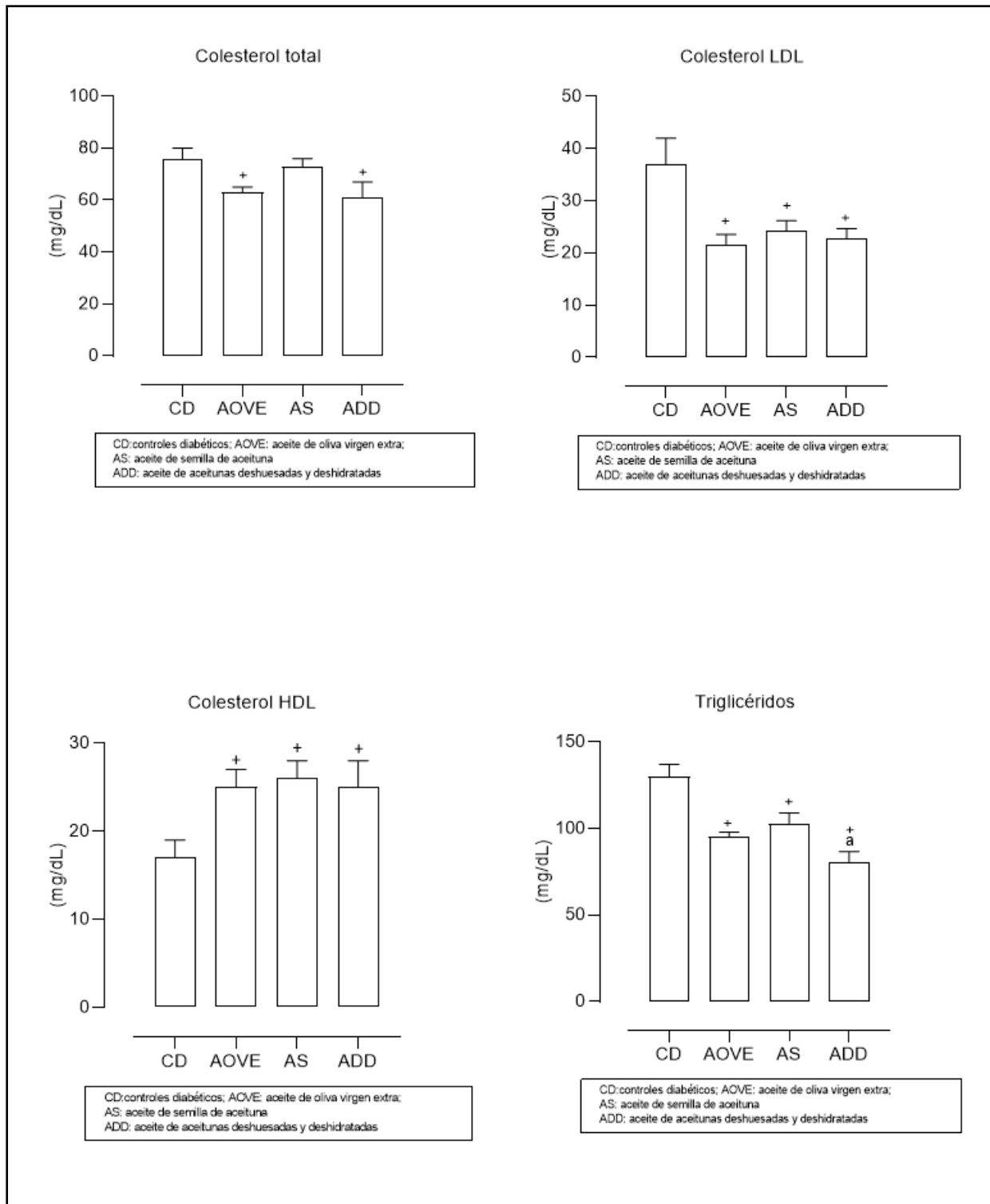


Figura 4.9. Valores medios (media \pm desviación estándar) del perfil lipídico al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

⁺p < 0.05 respecto a CD.

4.3. VARIABLES INICIALES DE LA VASCULOPATÍA

En la tabla 4.4. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables iniciales de la vasculopatía (mieloperoxidasa, VCAM-1 y LDL oxidada).

En la Figura 4.10. se representa gráficamente el efecto del modelo experimental de diabetes tipo 1 en dichos parámetros y en la Figura 4.11. el efecto que produjo la administración de los tres tipos de aceite utilizados.

Los animales diabéticos mostraron un incremento significativo de todas estas variables. La administración de los tres tipos de aceite produjo una disminución de las variables mieloperoxidasa y LDL oxidada (disminución estadísticamente significativa). Los animales tratados con AOVE y ADD, también redujeron significativamente los valores de VCAM-1.

Tabla 4.4. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables séricas de la primera fase de vasculopatía de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CND	CD	AOVE	AS	ADD
MPOx (ng/mL)	0.7 \pm 0.07	2.7 \pm 0.2*	1.6 \pm 0.4 ⁺	1.9 \pm 0.1 ⁺	1.8 \pm 0.1 ⁺
VCAM-1 (ng/mL)	4.8 \pm 0.7	7.6 \pm 0.7*	4.7 \pm 1.3 ^{+,a}	7.2 \pm 0.4	5.2 \pm 1.1 ^{+,a}
oxLDL (ng/mL)	140 \pm 20.2	257 \pm 10.5*	214 \pm 11.9 ⁺	227 \pm 10.7 ⁺	202 \pm 18.3 ⁺

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

MPOx: mieloperoxidasa; VCAM-1: molécula de cito-adhesión vascular tipo 1; oxLDL: lipoproteína de baja densidad oxidada

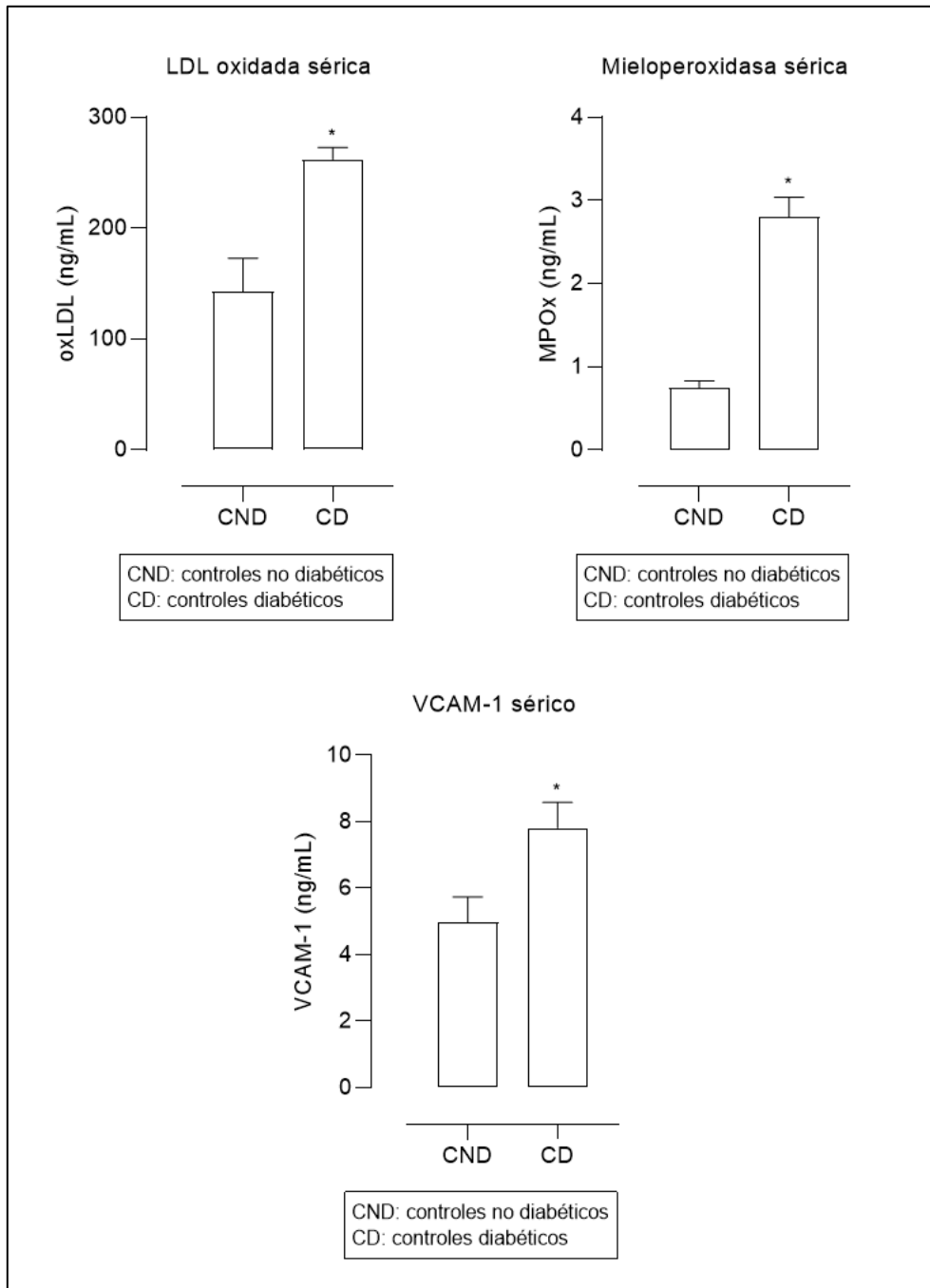


Figura 4.10. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables iniciales del proceso de vasculopatía al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

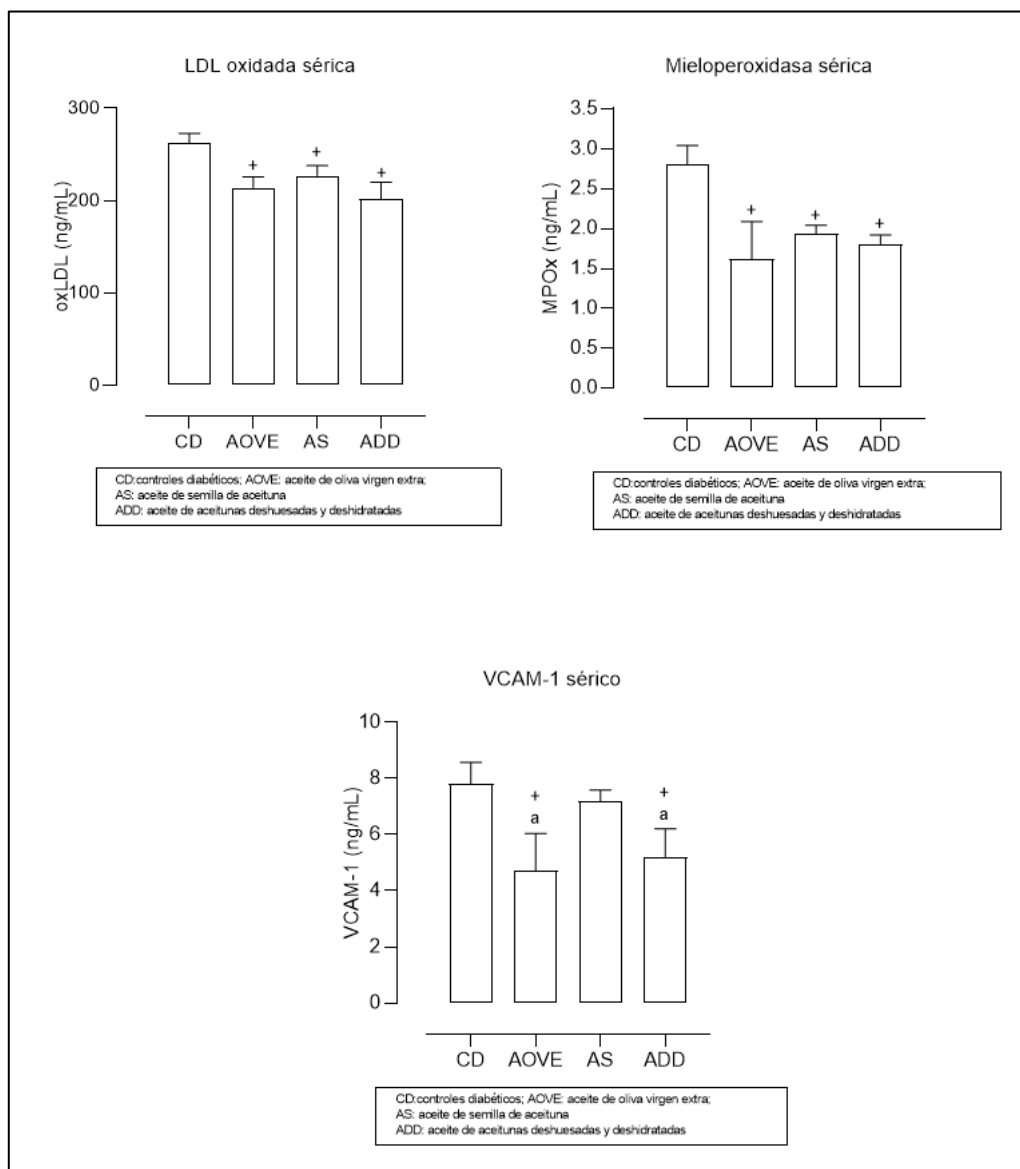


Figura 4.11. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables iniciales del proceso de vasculopatía al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). ⁺p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS.

4.4. VARIABLES DE INFLAMACIÓN VASCULAR: ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

En la Tabla 4.5. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables relacionadas con el estrés oxidativo y nitrosativo. Se muestran parámetros de estimulación oxidativa (peróxidos lipídicos, daño de ADN causado por radicales libres, 8-isoprostanos y 3 nitrotirosina) y otros que definen la capacidad defensiva antioxidante del organismo (capacidad antioxidante total, glutatión reducido y actividad glutatión peroxidasa).

En las Figuras 4.12. y 4.14. se representa gráficamente el efecto del modelo experimental de diabetes tipo 1 en dichos parámetros y en las Figuras 4.13. y 4.15. el efecto que produjo la administración de los tres tipos de aceite utilizados.

La diabetes mellitus experimental produce un claro estrés oxidativo y nitrosativo, incrementándose significativamente todos los parámetros oxidativos (2.1 veces los peróxidos lipídicos, 1.6 veces la producción de daño de ADN, 7.3 veces la concentración urinaria de 8-isoprostanos y 4.4. veces la de peroxinitritos) y disminuyendo los que definen la defensa antioxidante (25.6% de reducción de la capacidad antioxidante total, 27.8% de reducción en los niveles de glutatión reducido y 72.1% de reducción en la actividad glutatión peroxidasa).

Los aceites administrados redujeron las concentraciones de productos oxidativos e incrementaron la defensa antioxidante.

Tabla 4.5. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables séricas de estrés oxidativo y nitrosativo de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CND	CD	AOVE	AS	ADD
TBARS (nmol/mg prot)	4.0 \pm 0.8	8.6 \pm 0.7*	3.7 \pm 0.9 ⁺	4.9 \pm 0.5 ⁺	1.7 \pm 0.3 ^{+,b}
8-OH-dG (ng/mL)	15.5 \pm 0.4	25.3 \pm 1.6*	3.6 \pm 0.8 ^{+,a}	6.3 \pm 0.9 ⁺	1.3 \pm 0.2 ^{+,a}
8-isoprostanos (ng/mg creat.)	6.4 \pm 0.5	47.1 \pm 0.6*	14.0 \pm 0.8 ⁺	13.4 \pm 0.5 ⁺	14.8 \pm 0.8 ⁺
3-nitrotirosina (pg/mL)	14.2 \pm 0.9	61.9 \pm 3.4*	43.8 \pm 1.2 ⁺	44.2 \pm 0.8 ⁺	39.8 \pm 2.2 ⁺
TAC (U/mL)	17.1 \pm 0.5	12.7 \pm 0.7*	14.9 \pm 1.6 ⁺	15.7 \pm 1.5 ⁺	15.6 \pm 0.5 ⁺
GSH (nmol/mL)	121 \pm 7.5	87.7 \pm 6.7*	94.8 \pm 3.1	92.1 \pm 3.1	123 \pm 2.0 ⁺
GSHpx (nmol/min/mL)	26.8 \pm 1.0	7.5 \pm 1.2*	17.0 \pm 3.0 ⁺	15.9 \pm 2.6 ⁺	24.7 \pm 2.2 ^{+,b}

*p < 0.05 respecto a CND; ⁺p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS; ^bp < 0.05 respecto a AS y AOVE

TBARS: productos de reacción con ácido tiobarbitúrico (peróxidos lipídicos); 8-OH-dG: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina; TAC: actividad antioxidante total; GSH: glutatión reducido; GSHpx: actividad glutatión peroxidasa; creat.: creatinina urinaria.

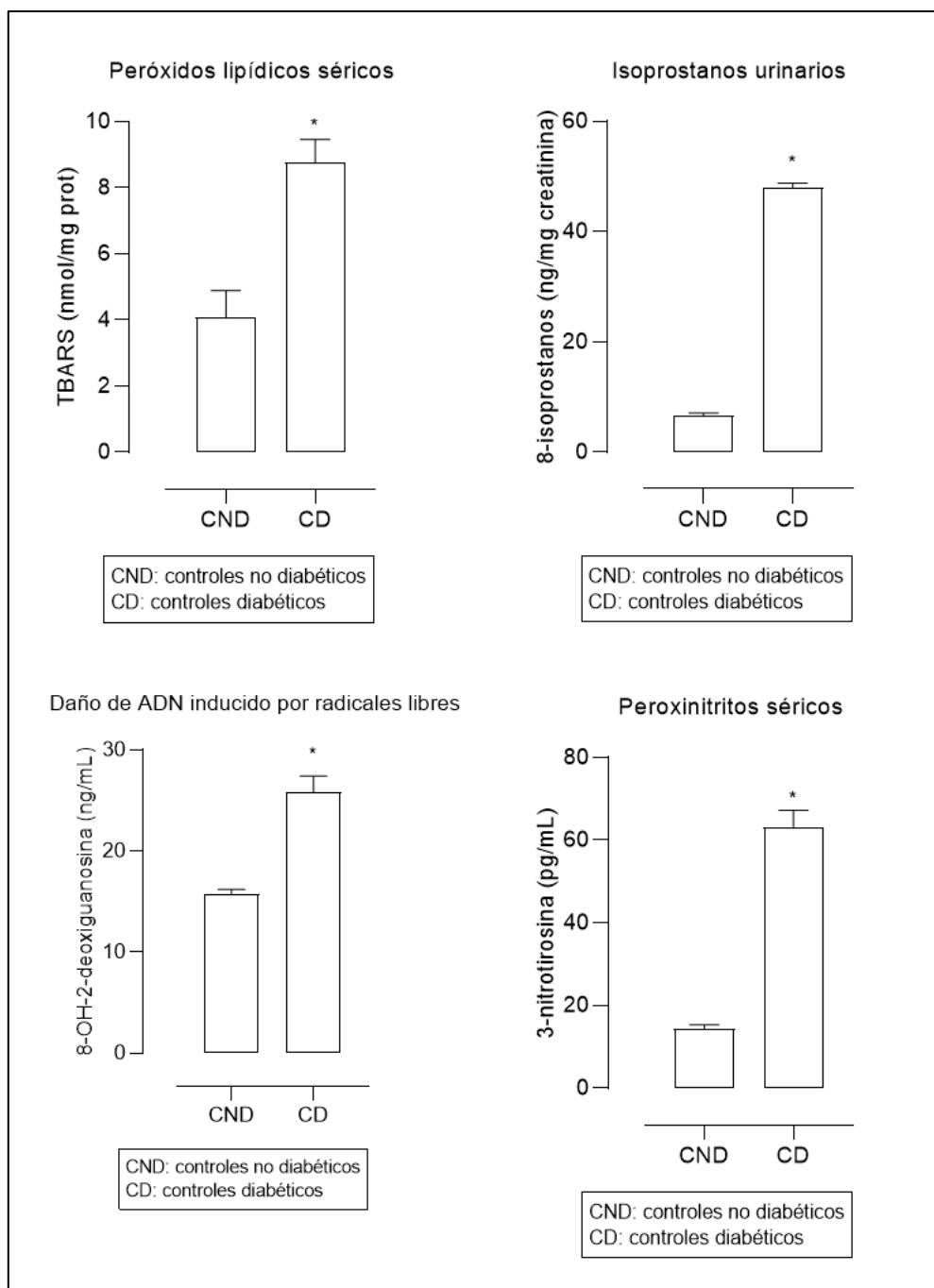


Figura 4.12. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables oxidativas y nitrosativas al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

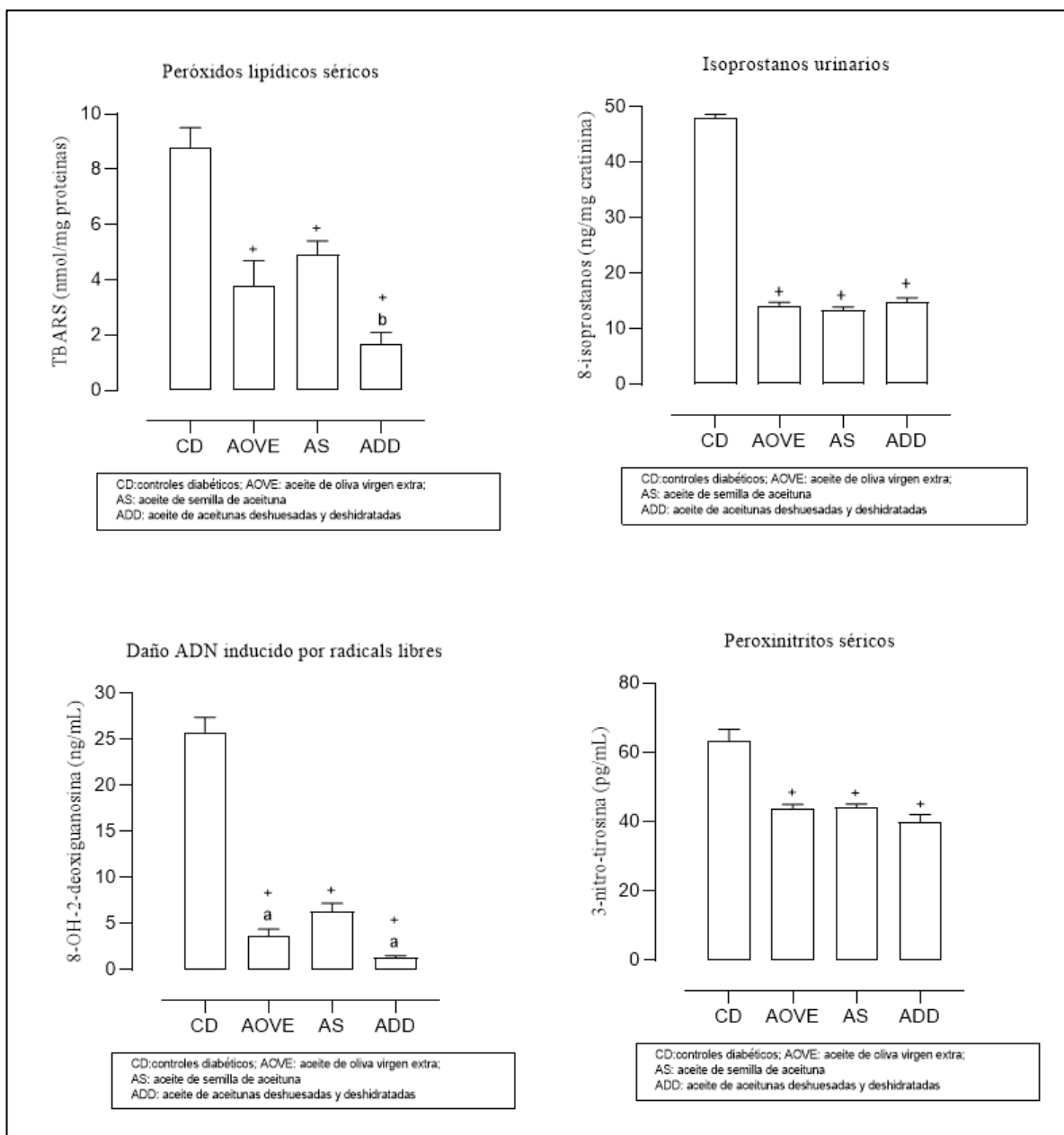


Figura 4.13. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables oxidativas y nitrosativas al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). ⁺p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS; ^bp < 0.05 respecto a AS y AOVE.

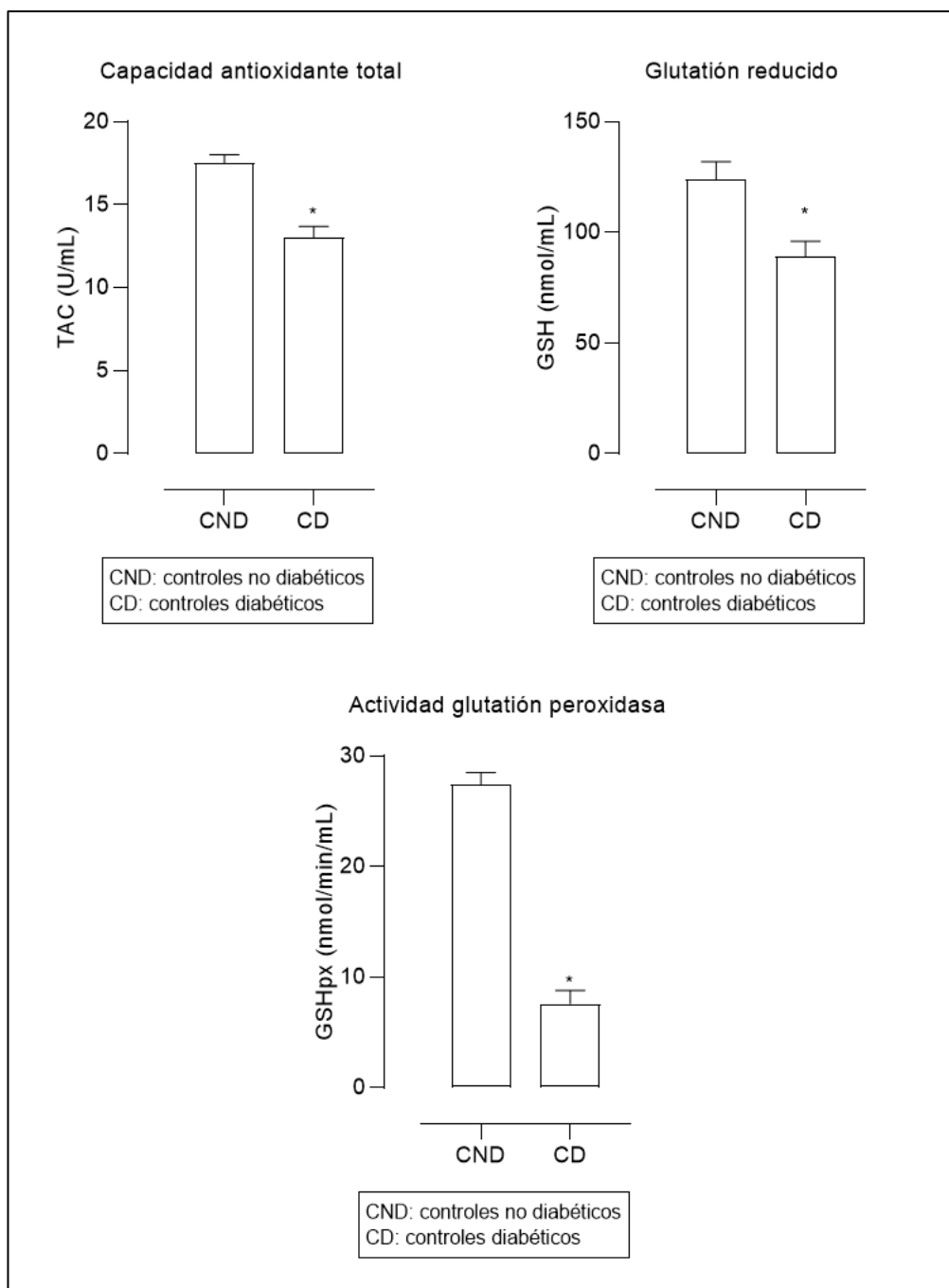


Figura 4.14. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables antioxidantes al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

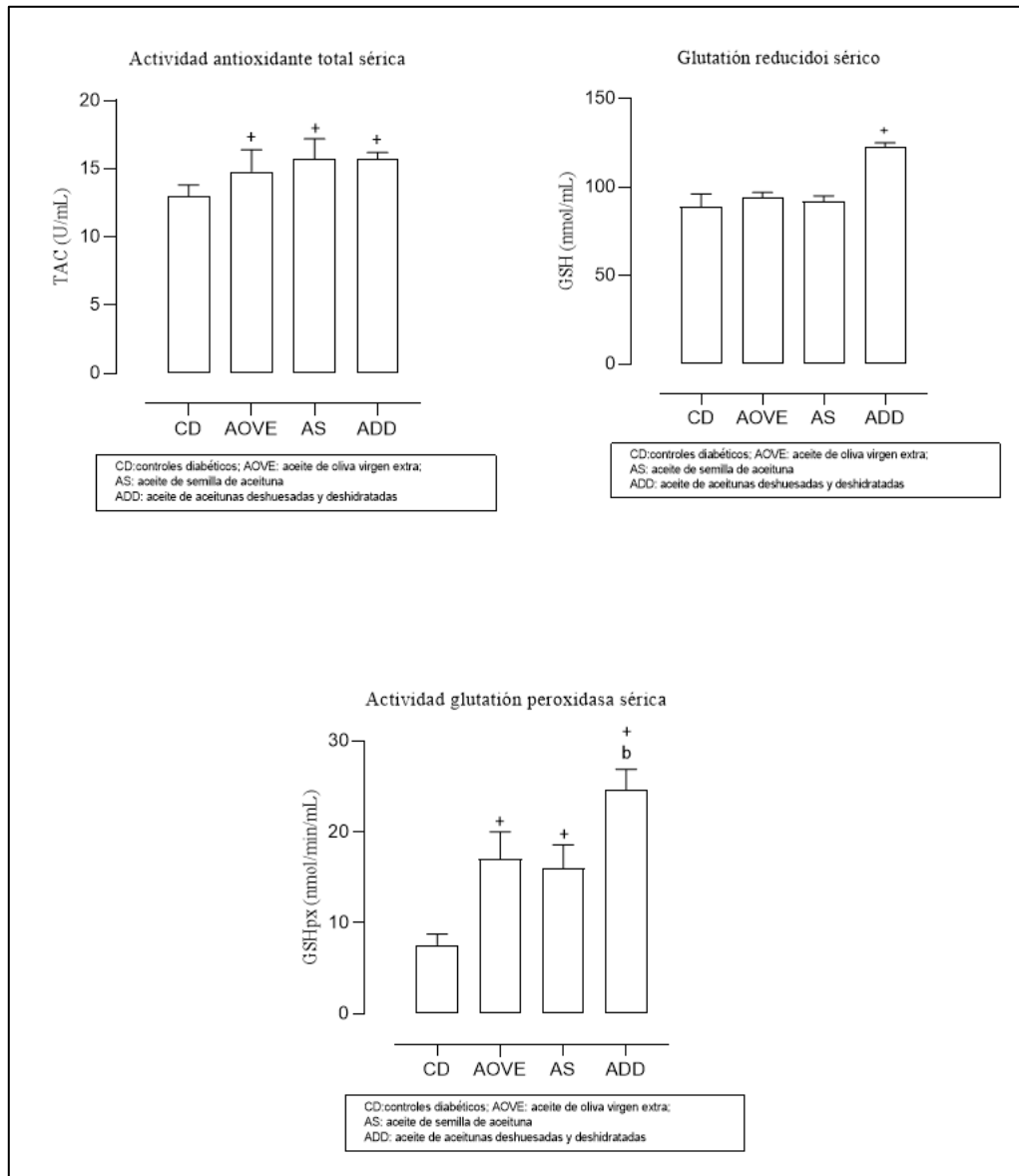


Figura 4.15. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables antioxidantes al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). ⁺p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS; ^bp < 0.05 respecto a AS y AOVE.

4.5. VARIABLES DEL ESTADO TROMBOGÉNICO

En la Tabla 4.6. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables relacionadas con una activación trombogénica derivada de un estado de hiperglucemia mantenida y una disfunción endotelial subsecuente. Como variables protrombóticas se muestra la capacidad agregante de las plaquetas inducidas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno y la producción plaquetaria de tromboxano B_2 . Como variable antitrombótica se muestran los resultados obtenidos en la producción global de prostaciclina, a través de la cuantificación urinaria de su principal metabolito, la 6-keto-prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$.

En la Figura 4.16. se representa gráficamente el efecto del modelo experimental de diabetes tipo 1 en dichos parámetros y en la Figura 4.17. el efecto que produjo la administración de los tres tipos de aceite utilizados.

Los animales diabéticos muestran un claro desequilibrio en estas variables, incrementándose la capacidad agregante de las plaquetas 2.1 veces respecto a lo cuantificado en los animales normoglucémicos, la producción de tromboxano B_2 2.8 veces y reduciéndose en un 58.8% la producción de 6-keto-prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$.

Todos los aceites administrados disminuyen los parámetros pro-trombóticos y reducen en gran medida la pérdida de producción de prostaciclina causada por la diabetes mellitus, destacando el efecto del aceite de aceituna deshuesada y deshidratada.

Tabla 4.6. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables relacionadas con la trombogénesis de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CND	CD	AOVE	AS	ADD
Imax (ohms)	12.0 \pm 0.9	25.7 \pm 2.5*	14.9 \pm 1.6 ⁺	20.1 \pm 1.3 ⁺	15.7 \pm 2.9 ⁺
TxB2 (pg/mg creat.)	3.9 \pm 1.3	11.1 \pm 0.9*	6.5 \pm 1.2 ⁺	9.1 \pm 1.5 ⁺	4.9 \pm 0.8 ^{+,a}
6-keto-PGF1 α (pg/mg creat.)	16.4 \pm 0.7	6.7 \pm 0.9*	10.5 \pm 0.8 ⁺	9.8 \pm 0.8 ⁺	14.8 \pm 2.4 ^{+,b}

*p < 0.05 respecto a CND; ⁺p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS; ^bp < 0.05 respecto a AS y AOVE

Imax: intensidad máxima de agregación plaquetaria en sangre total inducida con colágeno; TxB2: tromboxano B2 urinario; 6-keto-PGF1 α : 6-keto-prostaglandina F1 α urinaria; creat.: creatinina urinaria.

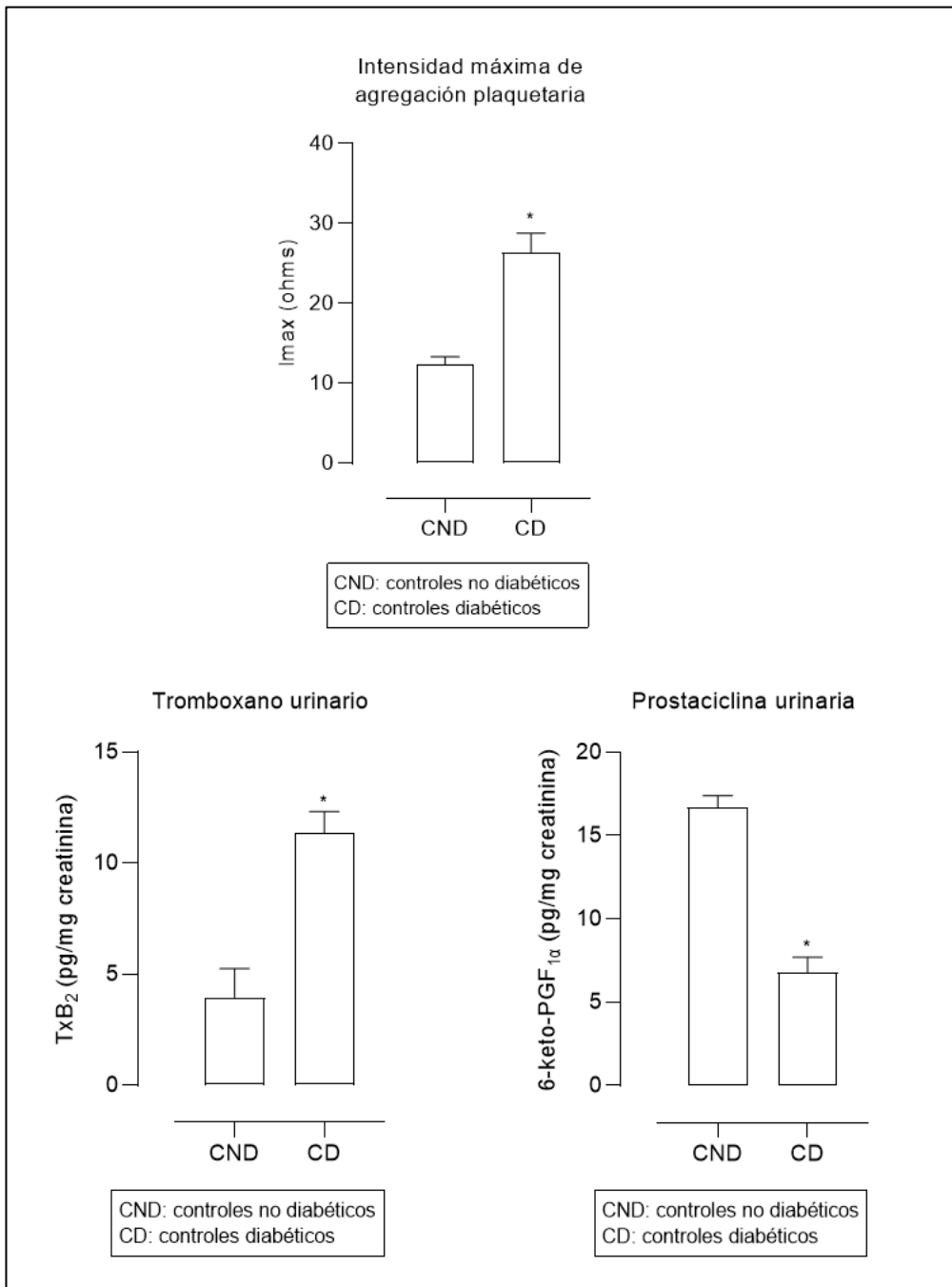


Figura 4.16. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables del estado protrombótico al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

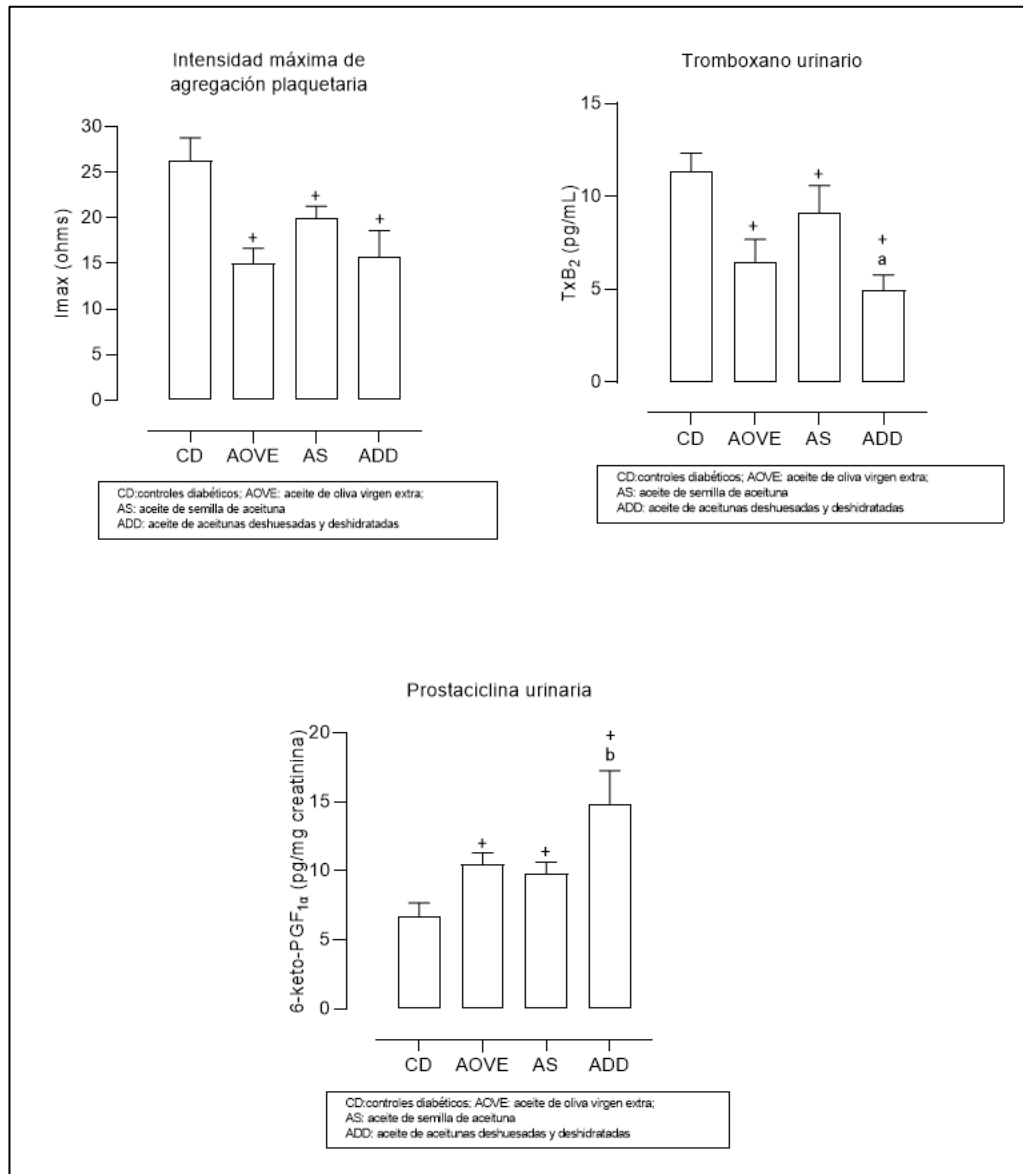


Figura 4.17. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables del estado protrombótico al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). ⁺p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS; ^bp < 0.05 respecto a AS y AOVE.

4.6. MORFOMETRÍA DE LA PARED VASCULAR AÓRTICA

En la Tabla 4.7. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables relacionadas con las repercusiones morfológicas de la pared arterial. Se muestran los valores morfométricos obtenidos al determinar el grosor medio de la pared arterial aórtica y el recuento de células musculares lisas en la capa media de dicha arteria.

En las Figura 4.18. se muestran ejemplos representativos de algunas muestras de cada uno de los grupos estudiados. En la Figura 4.19. se representa gráficamente el efecto del modelo experimental de diabetes tipo 1 en dichos parámetros y en la Figura 4.20. el efecto que produjo la administración de los tres tipos de aceite utilizados.

En los animales diabéticos se cuantificó un incremento en el grosor de la pared arterial (38.6%) y una proliferación de fibras musculares (31.1%). Los aceites utilizados frenaron en engrosamiento global de la pared vascular y evitaron la proliferación de células musculares lisas vasculares.

Tabla 4.7. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables morfológicas aórticas de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CND	CD	AOVE	AS	ADD
Grosor pared (μm)	104 \pm 5.6	144 \pm 3.0*	114 \pm 4.1 ⁺	115 \pm 5.5 ⁺	117 \pm 10.1 ⁺
Células fml ($\text{N} \times 10^5 / \mu\text{m}^2$)	40.3 \pm 2.1	52.9 \pm 2.7*	38.7 \pm 0.9 ⁺	40.7 \pm 1.3 ⁺	38.7 \pm 1.6 ⁺

*p < 0.05 respecto a CND; ⁺p < 0.05 respecto a CD

fml: capa muscular, fibras musculares lisas

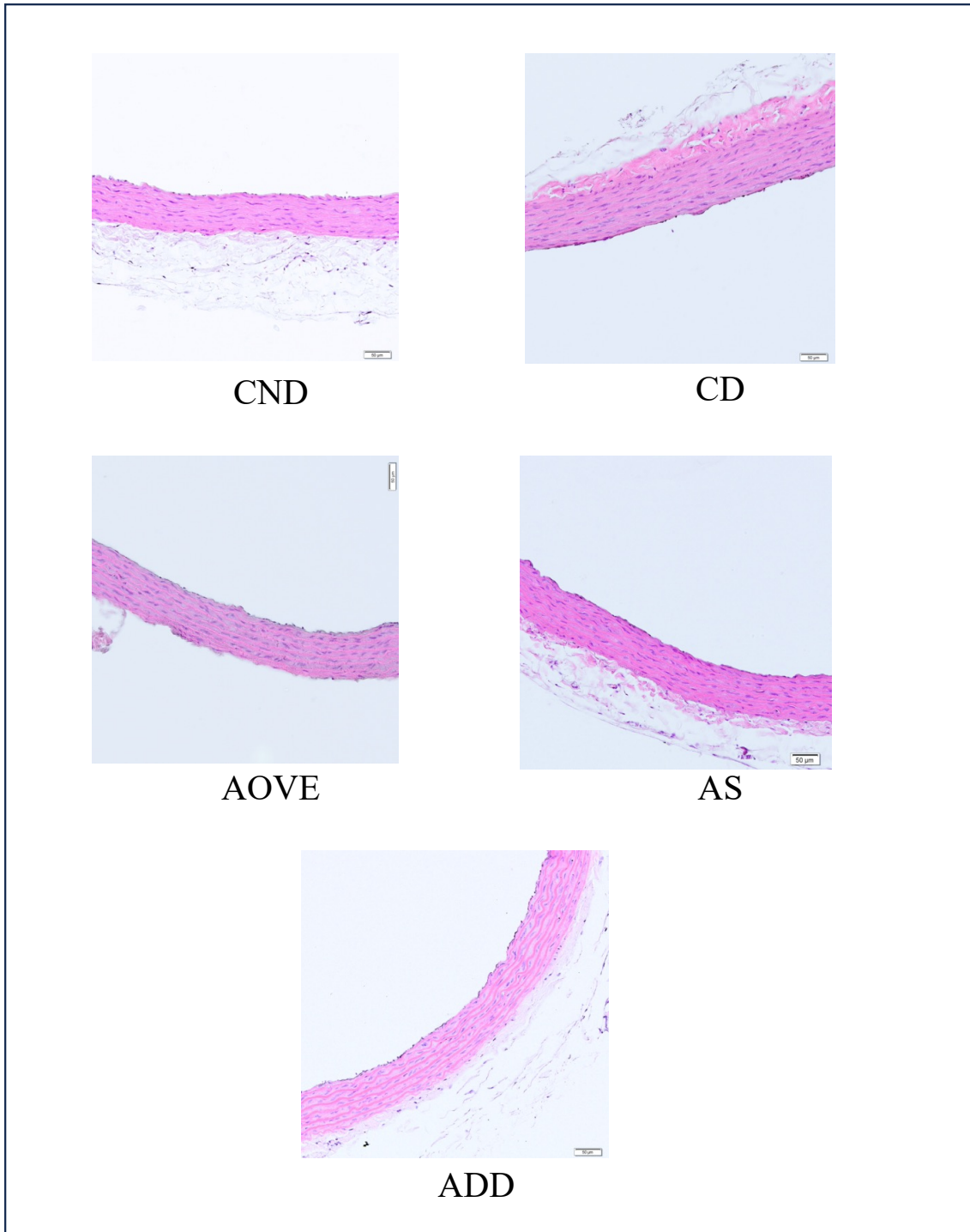


Figura 4.18. Imágenes representativas de muestras histológicas de aorta al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). Hematoxilina-eosina (X20).

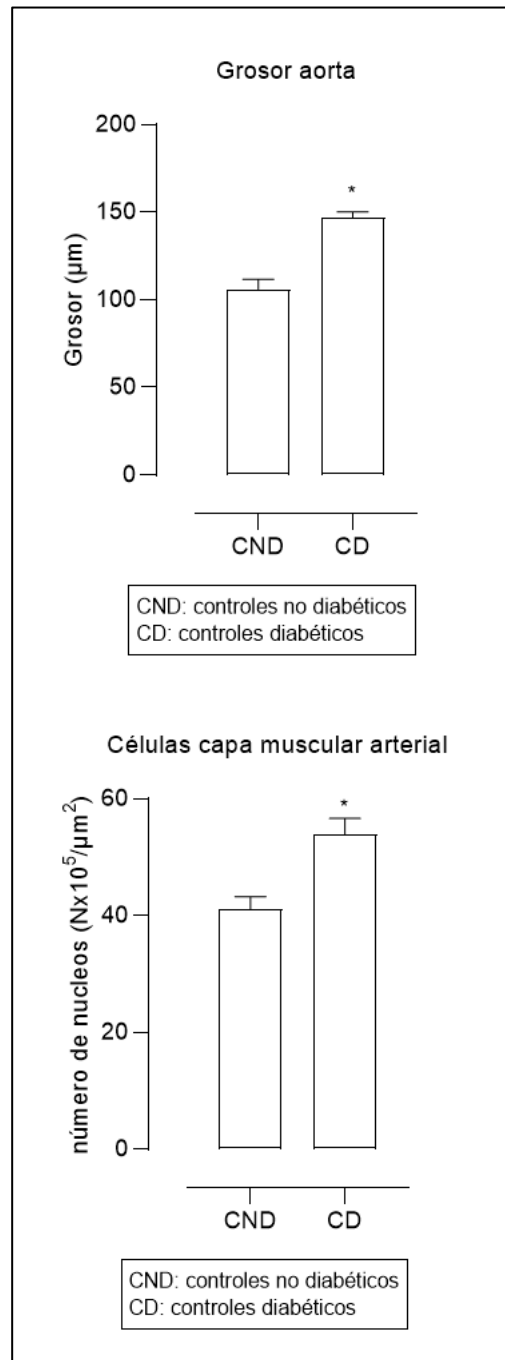


Figura 4.19. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables morfométricas de los segmentos arteriales de aorta al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

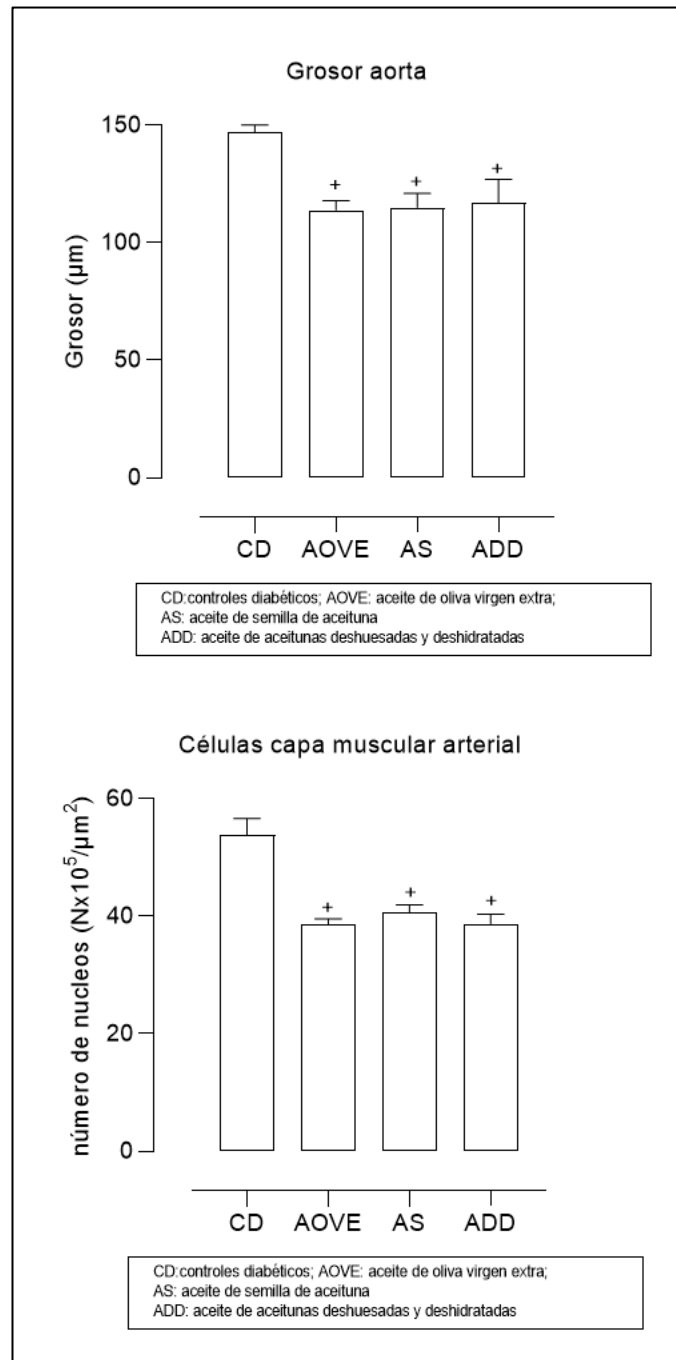


Figura 4.20. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables morfométricas vasculares aórticas al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). ⁺p < 0.05 respecto a CD.

4.7. VARIABLES DE DAÑO CEREBRAL TRAS UN MODELO DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

En la Tabla 4.8. se muestran los valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables relacionadas con el daño producido en cortes cerebrales de las ratas integrantes del estudio, sometidos a un modelo de hipoxia-reoxigenación. Se muestra un parámetro de muerte celular (lactato deshidrogenasa) y diversos componentes de estrés oxidativo y nitrosativo, ya sean prooxidantes (peróxidos lipídicos, daño de ADN inducido por radicales libres y peroxinitritos) o antioxidantes (actividad antioxidante total, glutatión reducido y actividad glutatión peroxidasa), al final del periodo de reoxigenación.

En las Figuras 4.21., 4.22. y 4.24. se muestran gráficamente el efecto del modelo experimental de diabetes tipo 1 en dichos parámetros y en las Figuras 4.21., 4.23. y 4.25. el efecto que produjo la administración de los tres tipos de aceite utilizados.

El modelo experimental de hipoxia-reoxigenación cerebral produce un 76.6% más muerte celular en los animales diabéticos que en los normoglucémicos, reduciéndose con los tres aceites, si bien destaca el de aceitunas deshuesadas y deshidratadas. Asimismo, todos los parámetros de estrés oxidativo y nitrosativo se desequilibran significativamente en mayor medida en los animales diabéticos, mostrando un re-equilibrio tras la administración de los aceites utilizados.

Tabla 4.8. Valores medios (media \pm desviación estándar) correspondientes a las variables de muerte celular y estrés oxidativo y nitrosativo en cerebro tras el modelo de hipoxia-reoxigenación, de los animales controles no diabéticos (CND), controles diabéticos (CD) y animales diabéticos tratados con 0.5 mL/kg de peso de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de la aceituna (AS) o aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

Variable	CND	CD	AOVE	AS	ADD
LDH (U/mL)	7.4 \pm 0.7	13.1 \pm 0.3*	8.3 \pm 1.1 ⁺	10.1 \pm 0.9 ⁺	6.3 \pm 0.9 ^{+,a}
TBARS (nmol/0.1 g tejido)	731 \pm 102	1676 \pm 263*	364 \pm 38.1 ⁺	603 \pm 49.4 ⁺	324 \pm 32.5 ⁺
8-OH-dG (ng/0.1 g tejido)	136 \pm 15.6	564 \pm 32.5*	171 \pm 7.3 ⁺	183 \pm 5.3 ⁺	167 \pm 2.2 ⁺
3-nitrotirosina (pg/0.1 g tejido)	101 \pm 9.8	246 \pm 12.2*	156 \pm 7.5 ⁺	166 \pm 2.7 ⁺	109 \pm 9.1 ^{+,a}
TAC (U/0.1 g tejido)	731 \pm 20.2	499 \pm 50.0*	739 \pm 13.7 ^{+,b}	629 \pm 54.9 ⁺	759 \pm 27.6 ^{+,b}
GSH (nmol/0.1 g tejido)	248 \pm 38.3	85.9 \pm 1.4*	118 \pm 3.7 ⁺	121 \pm 1.8 ⁺	125 \pm 3.2 ^{+,c}
GSHpx (nmol/min/0.1 g tejido)	83.2 \pm 3.2	49.4 \pm 4.2*	81.6 \pm 2.1 ⁺	86.7 \pm 2.8 ⁺	87.0 \pm 2.2 ⁺

*p < 0.05 respecto a CND; ⁺p < 0.05 respecto a CD; ^ap < 0.05 respecto a AS; ^bp < 0.05 respecto a AS y AOVE; ^cp < 0.05 respecto a AOVE

LDH: lactato deshidrogenasa; TBARS: productos de reacción con ácido tiobarbitúrico (peróxidos lipídicos); 8-OH-dG: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina; TAC: actividad antioxidante total; GSH: glutatión reducido; GSHpx: actividad glutatión peroxidasa; creat.: creatinina urinaria.

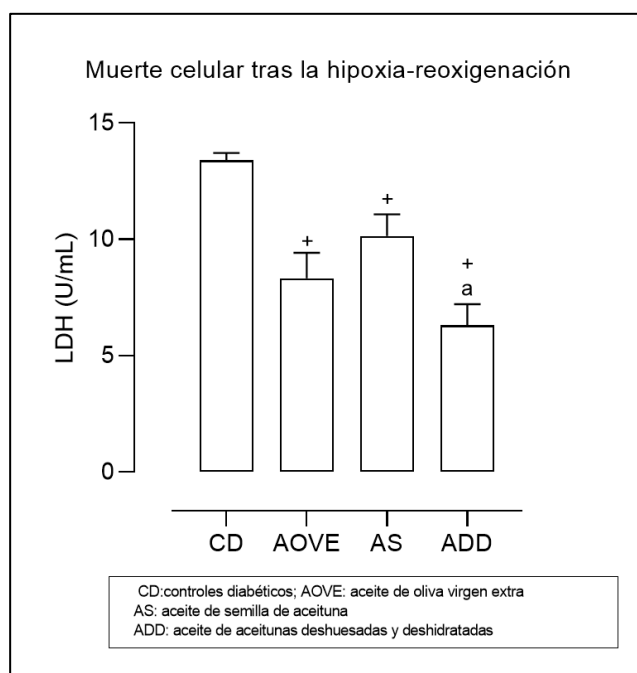
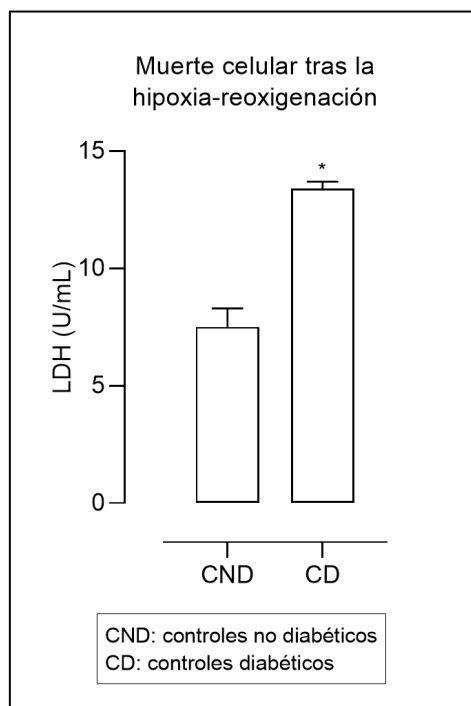


Figura 4.21. Valores medios (media \pm desviación estándar) de lactato deshidrogenasa en el modelo de hipoxia-reoxigenación cerebral, al final del periodo de seguimiento en los animales no diabéticos controles (CND), diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD).

* $p < 0.05$ respecto a CND; ⁺ $p < 0.05$ respecto a CD; ^a $p < 0.05$ respecto a AS.

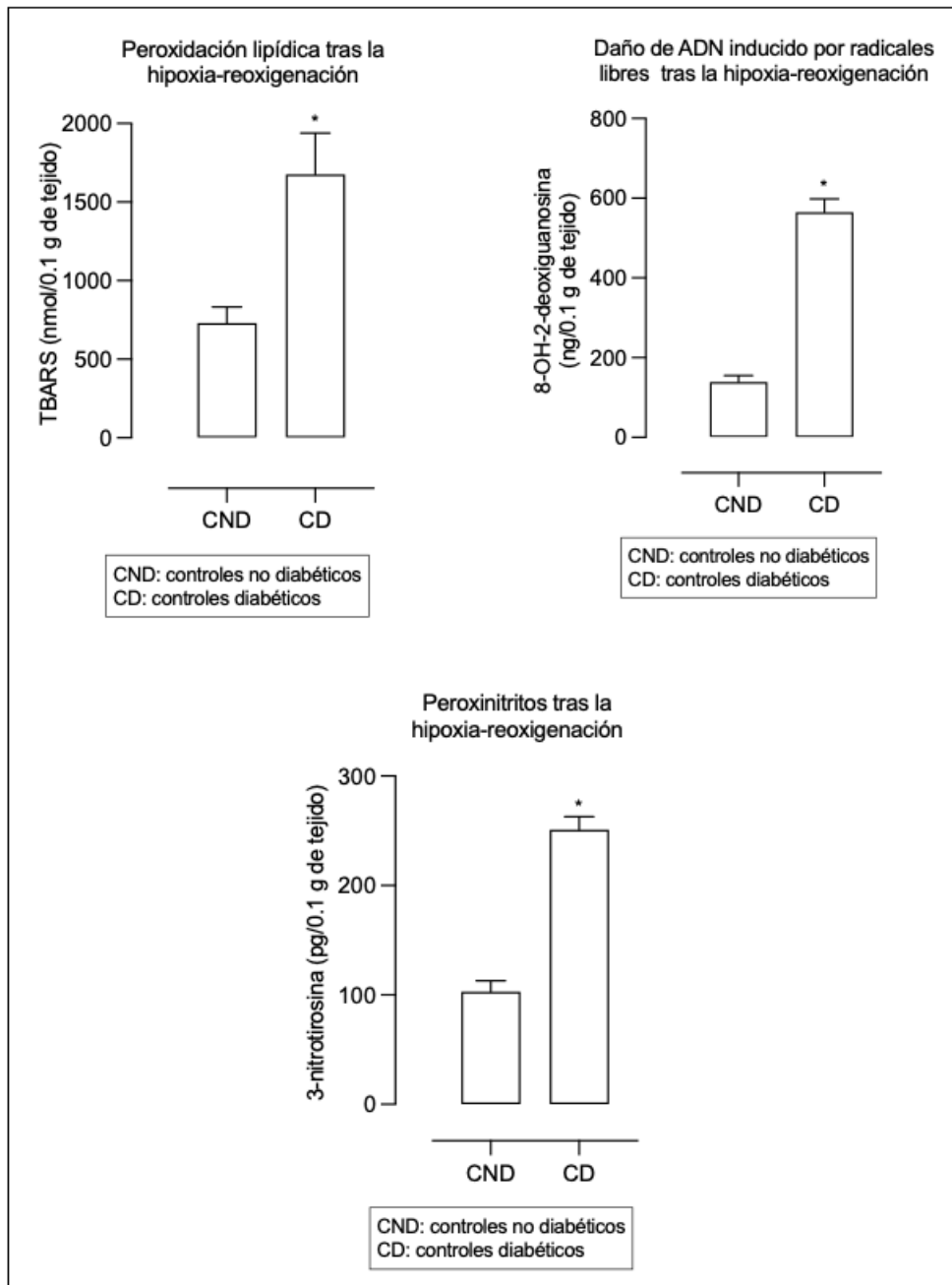


Figura 4.22. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables oxidantes tras el modelo de hipoxia-reoxigenación cerebral, al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD). * $p < 0.05$ respecto a CND.

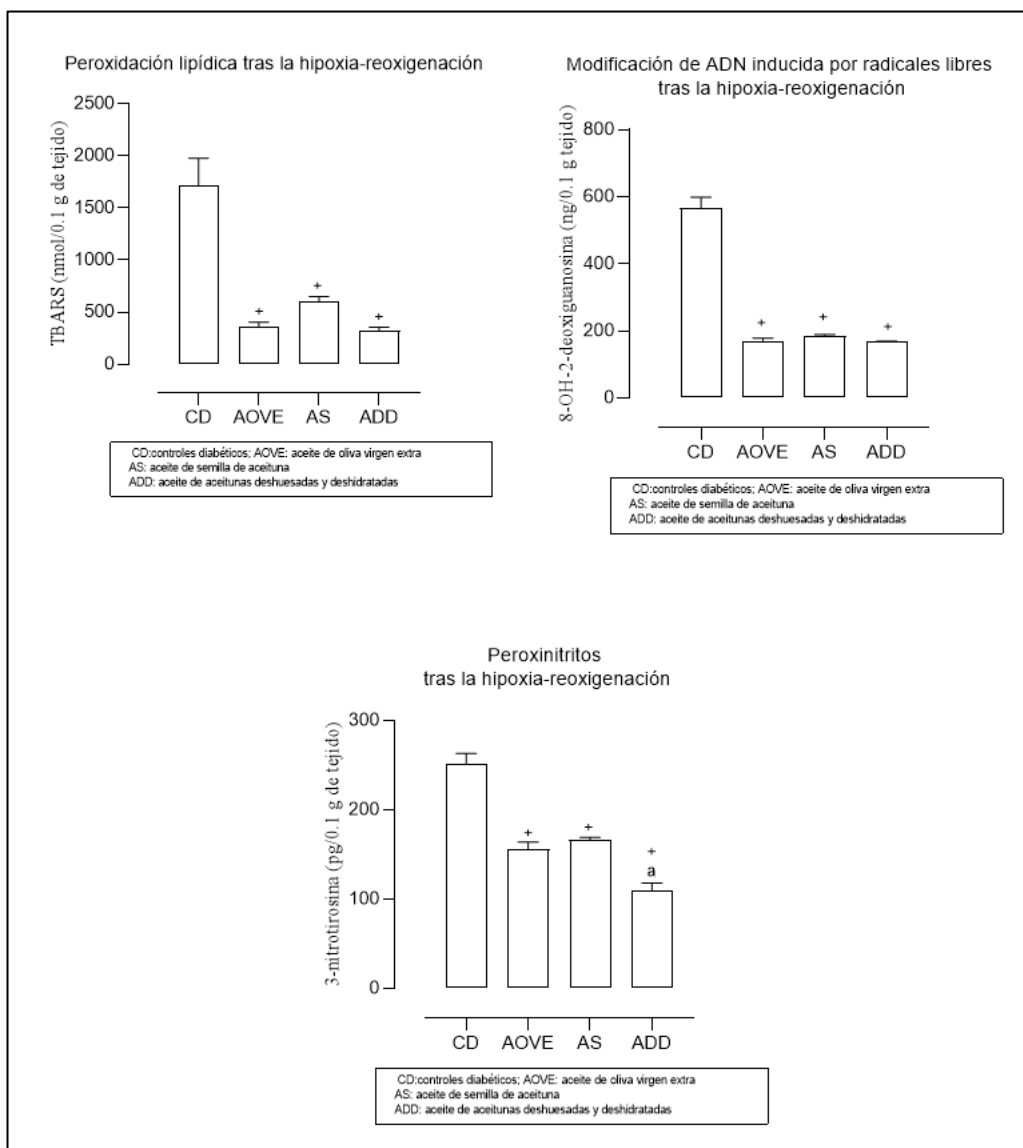


Figura 4.23. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables oxidativas tras el modelo de hipoxia-reoxigenación cerebral, al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). ⁺p < 0.05 respecto a CD.

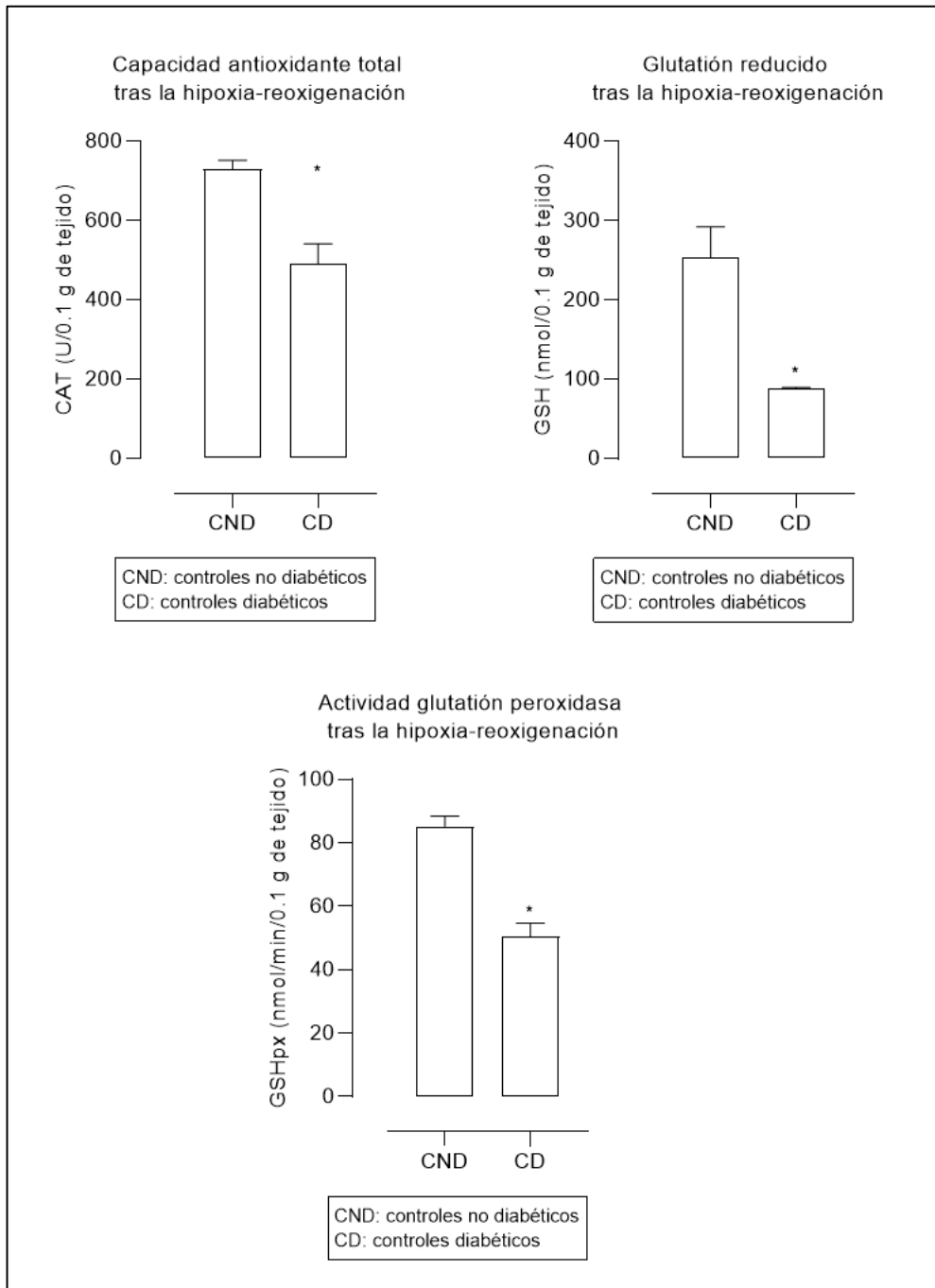


Figura 4.24. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables antioxidantes tras el modelo de hipoxia-reoxigenación cerebral, al final del periodo de seguimiento en los animales controles no diabéticos (CND) y controles diabéticos (CD).

* $p < 0.05$ respecto a CND.

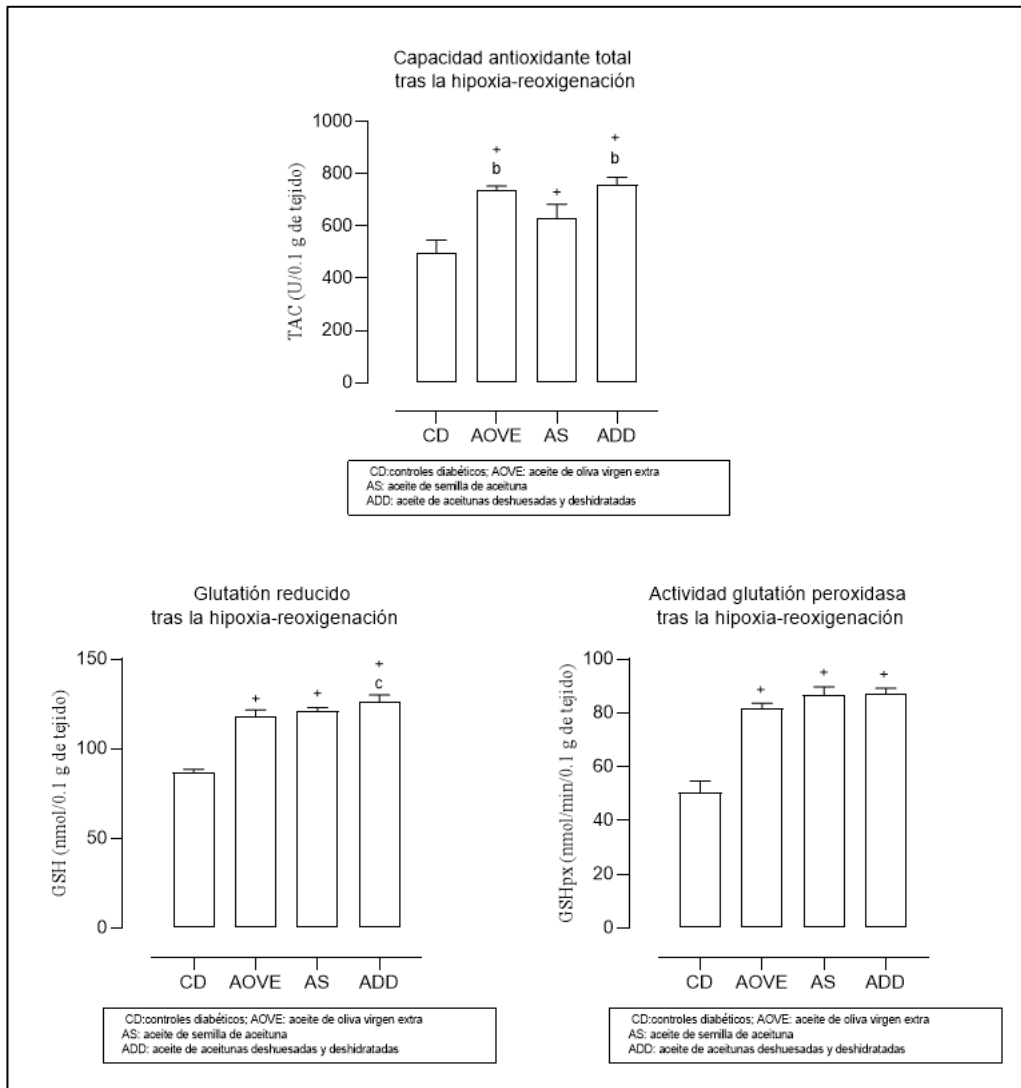


Figura 4.25. Valores medios (media \pm desviación estándar) de las variables antioxidantes tras el modelo de hipoxia-reoxigenación cerebral, al final del periodo de seguimiento en los animales diabéticos controles (CD) y en los diabéticos tratados con 0.5 mL/día p.o. de aceite de oliva virgen extra (AOVE), aceite de semilla del hueso de las aceitunas (AS) y aceite de aceituna deshuesada y deshidratada (ADD). ⁺p < 0.05 respecto a CD.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

Podemos destacar dos conceptos generales derivados del análisis de los resultados obtenidos en este estudio, valorando algunos biomarcadores relacionados con la fisiopatología vascular en un modelo experimental de diabetes mellitus: (1) el aceite obtenido de las semillas de aceitunas variedad Picual (AS) presenta unos efectos muy similares al AOVE en la mayoría de las variables determinadas; (2) la deshidratación de la pulpa de las aceitunas variedad Picual deshuesadas, muestra un mayor efecto que AOVE y AS en algunas variables relacionadas con la inflamación vascular (VCAM-1), el desequilibrio hemostático (tromboxano y prostaciclina) y el estrés oxidativo (peróxidos lipídicos, 8-OH-2-doxiguanosine y actividad glutatión-peroxidasa). Esta visión general requiere un análisis interpretativo más detallado, lo cual realizaremos a continuación.

Los resultados obtenidos con la administración de AOVE a los animales diabéticos coinciden plenamente con experimentos previos de nuestro grupo de investigación en el mismo modelo experimental de diabetes mellitus, referente a biomarcadores cardiovasculares y de daño isquémico cerebral (De La Cruz et al., 2010; González-Correa et al., 2007). Tanto en estos trabajos como en el presente estudio se confirman los efectos beneficiosos del AOVE en situaciones de daño vascular, fundamentalmente en un sentido de prevención de fenómenos de inflamación vascular, estrés oxidativo, desequilibrio de factores pro y antitrombóticos y de daño cerebral derivado de la isquemia. Al usar los otros dos tipos de aceites se debe esperar que, al menos, presenten un efecto similar al de AOVE y, a ser posible, mejorarlo en algunos aspectos.

Plantaremos la discusión de los resultados obtenidos atendiendo a tres apartados secuenciales: influencia del modelo experimental, valoración del efecto de los aceites utilizados y una aproximación sobre qué componentes de estos aceites podrían ser los responsables de dichos efectos.

5.1. INFLUENCIA DEL MODELO EXPERIMENTAL EN LAS VARIABLES DETERMINADAS

El modelo de diabetes experimental empleado en este estudio es uno de los más utilizados en los trabajos de investigación que hacen referencia a las complicaciones vasculares de

la diabetes mellitus, sobre todo la tipo 1 (Martín-Carro et al., 2023; Pandey et al., 2023). En este modelo, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que se alteran las principales vías bioquímicas que están implicadas en la fisiopatología de la enfermedad vascular en la diabetes (Jebari-Benslaiman et al., 2022), corroborándose en el presente estudio:

- *Perfil lipídico*. Se ha comprobado un incremento significativo de los niveles séricos de colesterol total, fundamentalmente debido a su fracción LDL, así como de los niveles séricos de triglicéridos (Tabla 4.3. y Figura 4.8.). Por lo tanto, el primer escalón del proceso vascular se encuentra alterado en el modelo experimental.

- *Perfil renal*. En el presente estudio se ha confirmado un incremento de la creatinina sérica, que unido a un descenso en el aclaramiento de creatinina (Rodríguez-Pérez et al., 2021) marca un perfil de daño renal, es decir, la presencia de una nefropatía diabética (Tabla 4.2. y Figura 4.4.).

- *Perfil hepático*. En el modelo experimental utilizado en este estudio se ha cuantificado una elevación significativa del conjunto de enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT y fosfatasa alcalina (Tabla 4.2. y Figura 4.6.) en los animales diabéticos. Está descrito este perfil bioquímico, especialmente en la diabetes tipo 2, pero también se relaciona con la tipo 1 como índice de inflamación del tejido hepático y de un estrés oxidativo tisular (Rafaqat et al., 2023), hechos ambos que acontecen en otros tejidos en la diabetes tipo 1, como el sistema cardiovascular, riñón y tejido nervioso (López-Villodres et al., 2016; Reyes et al., 2017).

- *Variables iniciales de la vasculopatía*. El modelo experimental produce un incremento de mieloperoxidasa (MPOx), proteínas adhesivas endoteliales (VCAM-1) y LDL oxidada (oxLDL) (Tabla 4.4. y Figura 4.10.). Estas variables indican un estado de activación del inicio del proceso de vasculopatía, sobre todo a nivel de un mayor estado de adhesión de monocitos a la capa endotelial arterial, una activación leucocitaria general y un proceso de estrés oxidativo, una de cuyas dianas es la LDL. Es reconocido que este es el punto clave para el inicio de la inflamación en el tejido arterial (Jebari-Benslaiman et al., 2022).

- *Estrés oxidativo y nitrosativo*. Todos los parámetros de estrés oxidativo y nitrosativo están alterados en los animales diabéticos, mostrando un incremento de las variables que

indican un estado prooxidante y una disminución de las variables antioxidantes (Tabla 4.5. y Figuras 4.12. y 4.14.) Estos resultados indican que los vasos sanguíneos de los animales diabéticos tienen una actividad oxidativa que favorece la estimulación del resto de vías implicadas en la vasculopatía diabética (López-Villodres et al., 2016; Reyes et al., 2017; Rodríguez-Pérez et al., 2021).

- *Estado trombogénico.* Los animales diabéticos presentan una agregabilidad de las plaquetas y una síntesis de tromboxano mayor que los animales normoglucémicos, paralelamente a una menor producción de prostaciclina (Tabla 4.6. y Figura 4.16). Este perfil indica que estos animales tienen un mayor riesgo de aparición de un evento trombótico, lo cual confirma lo que se conoce a este nivel en la macroangiopatía de la diabetes mellitus (Brand-Miller et al., 2009).

- *Alteración morfológica de la pared arterial.* Dos son las modificaciones morfológicas descritas en la vasculopatía diabética: incremento del grosor de la pared arterial y proliferación de las fibras musculares lisas. Ambas variables se encuentran incrementadas en los animales diabéticos, lo cual indica que este modelo experimental reproduce todas las fases de la patogénesis de la vasculopatía arterial en la diabetes, incluido el daño morfológico (Tabla 4.7. y Figuras 4.18. y 4.19.).

- *Alteración en el tejido cerebral.* Más allá de las lesiones bioquímicas y morfológicas arteriales, en el modelo experimental de diabetes mellitus utilizado también se producen unas modificaciones en el tejido cerebral que lo hacen más vulnerable ante una injuria isquémica (González-Correa et al., 2006). En los animales diabéticos se produce una mayor tasa de muerte celular tras el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación cerebral, acompañado de un mayor incremento del estrés oxidativo y nitrosativo en tejido nervioso (Tabla 4.8. y Figuras 4.21., 4.22. y 4.24.).

Por lo tanto, en el modelo experimental utilizado en este estudio existe una clara disfunción bioquímica y morfológica vascular, todo ello compatible con los eventos descritos para la vasculopatía diabética, así como una mayor sensibilidad tisular ante el daño isquémico cerebral, órgano diana de dicha macroangiopatía, sobre todo de tipo isquémico.

En la Tabla 5.1. mostramos una visión de los cambios porcentuales obtenidos en los animales diabéticos controles respecto a los normoglucémicos, agrupando las variables en bloques conceptuales de tipo fisiopatológico. Así, consideraremos los siguientes apartados: perfil hepático, lipídico, mediadores iniciales de la vasculopatía, variables de estrés oxidativo y nitrosativo, disbalance trombogénico, modificación morfológica arterial y variables cerebrales tras el modelo experimental de anoxia-reoxigenación. Somos conscientes de que este es un análisis cualitativo, a pesar de mostrar valores de cambio, si bien nos puede orientar sobre los diferentes aspectos del proceso de macroangiopatía diabética y daño tisular consiguiente.

Tabla 5.1. Medias de cambio porcentual de los distintos bloques temáticos de origen fisiopatológico en la vasculopatía diabética, producidos por la diabetes experimental (CD), respecto a los animales normoglucémicos (CND).

Grupos de variables	% en CD respecto a CND
Perfil hepático	128
Perfil lipídico	67.4
Inicio proceso vasculopatía	136
Estrés oxidativo y nitrosativo	199
Disbalance trombogénico	119
Cambios morfológicos	34.5
Variables en tejido cerebral tras el modelo de hipoxia-reoxigenación	122

5.2. MODIFICACIONES CAUSADAS POR LA ADMINISTRACIÓN DE LOS ACEITES

En términos generales, los tres tipos de aceites utilizados modifican los biomarcadores de cada una de las fases reconocidas de la vasculopatía diabética. No hay estudios en la bibliografía con los que comparar nuestros resultados de aceite de semilla o aceite de

aceituna deshuesada y deshidratada, si bien sí existen múltiples estudios sobre los efectos del aceite de oliva virgen extra.

Al igual que en el apartado anterior (efectos producidos por el modelo experimental de diabetes mellitus), analizaremos los resultados obtenidos con los aceites. En primer lugar, debemos tener en cuenta que es un estudio preventivo, es decir, los aceites se administraron antes incluso de inducir la diabetes mellitus, por lo que la aplicación al ser humano sería equivalente a un uso de estos aceites en situación de salud, es decir, realizando una prevención primaria del proceso vascular diabético.

- Perfil glucémico.

Ninguno de los tres aceites modifica significativamente los niveles séricos de glucosa. Por lo tanto, los cambios observados en el resto de las variables relacionadas con la vasculopatía diabética no podemos atribuirlos a una mejora del perfil glucémico, sino a efectos directos de sus componentes sobre los mecanismos que controlan y definen dichos mecanismos. Esta misma ausencia de efecto sobre las cifras de glucemia confirman datos previos en el mismo modelo experimental utilizado (De La Cruz et al., 2010; González-Correa et al., 2007). En estudios realizados en humanos, la relación entre AOVE y control de la glucemia se refieren a diabetes mellitus tipo 2, en el sentido de retrasar el uso de fármacos antidiabéticos orales (Basterra-Gortari et al., 2019), centrándose en la diabetes mellitus tipo 1 solo en una reducción del pico de hiperglucemia postprandial (Bozzetto et al., 2019).

Respecto a la participación de algún o algunos componentes del AOVE en las modificaciones del perfil glucémico, se han realizado algunos estudios con hidroxitirosol, si bien solo se observaron reducciones de las cifras de glucemia en modelos experimentales de diabetes tipo 2 (Poudyal et al., 2017) o en estudios preliminares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Binou et al., 2023), no observándose cambios en modelos de diabetes tipo 1 (López-Villodres et al., 2016; Rodríguez-Pérez et al., 2021).

Los tres aceites utilizados muestran una concentración total de fenoles muy similar entre ellos (Tabla 3.1.), significándose el aceite de semilla como el que mayor concentración de hidroxitirosol presenta, si bien no podemos olvidar que el modelo experimental

utilizado reproduce una diabetes tipo 1 en humanos, de ahí que no se pueda atribuir a esta diferencia ningún cambio en el perfil glucémico de los animales.

- Perfil lipídico.

Si bien las cifras de colesterol total no se llegan a normalizar tras la administración de los aceites utilizados, observamos que se “equilibra” la ratio LDL/HDL, en el sentido de disminuir las cifras de LDL colesterol y aumentar las de HDL colesterol (Tabla 4.3. y Figura 4.9.) asimismo, la ratio triglicéridos/HDL colesterol también tiende a reequilibrarse. Si calculamos estos cocientes, obtenemos los siguientes resultados medios:

Tabla 5.2. Ratio LDL/HDL colesterol y TGC/HDL colesterol en los distintos grupos experimentales.

Grupos	LDL/HDL colesterol	TGC/HDL colesterol
Controles no diabéticos	0.98	2.85
Controles diabéticos	2.09	7.34
Diabéticos + AOVE	0.86	3.83
Diabéticos + AS	0.93	3.97
Diabéticos + ADD	0.93	3.32

La modificación de los niveles de estos lípidos, especialmente los de LDL colesterol, son muy importantes en la evolución de la diabetes mellitus y de sus complicaciones, sobre todo las macroangiopáticas (Kelsey et al., 2022; Sheng et al., 2022), de ahí la importancia del efecto de la administración de estos aceites en los animales diabéticos, y en mayor medida del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas.

- Perfil hepático.

El incremento de los marcadores de daño hepático causado por la diabetes experimental es frenado por la administración de los aceites utilizados, siendo cuantitativamente muy similar el efecto observado para los tres. Así, el aceite de oliva virgen extra redujo (en su

conjunto) en un 31.6% las actividades enzimáticas que definen un daño hepático, el aceite de semilla lo hizo en un 29.6% y el de aceitunas deshuesadas y deshidratadas en un 33.1%.

El daño hepático que acontece en la diabetes mellitus se ha relacionado con un componente inflamatorio y de estrés oxidativo (Rafaqat et al., 2023). Al presentar estos aceites un efecto antioxidante y antiinflamatorio, podemos hipotetizar que de esta forma se frenaría el daño en el tejido hepático derivado de la diabetes mellitus experimental.

Se ha demostrado que en la diabetes mellitus tipo 2, la administración de aceite de oliva virgen extra con un alto contenido en fenoles (577 mg/kg) reduce los biomarcadores de daño hepático a través de una mejora del metabolismo glucídico en el hígado (Santangelo et al., 2016). En el presente estudio se reproduce una diabetes mellitus tipo 1, por lo cual no se podría asumir este mecanismo, a pesar de usar tres tipos de aceites con un contenido total de fenoles en el rango de la citada publicación: 703 mg/kg para AOVE, 530 mg/kg para AS y 689 mg/kg para ADD.

Respecto a la diabetes mellitus tipo 1, se ha demostrado en un modelo experimental similar al utilizado en este estudio, que la administración preventiva de aceite de oliva virgen extra mejora las alteraciones bioquímicas de daño hepático y el patrón morfológico del hígado, a través de un estímulo de proteínas antiinflamatorias endógenas en tejido hepático (Balamash et al., 2018).

Se han descrito efectos hepatoprotectores a diversos componentes presentes en los aceites utilizados, tales como el ácido maslínico (Mkhwanazi et al., 2014), ácido oleanólico (Gamede et al., 2019) o los fenoles en su conjunto presentes en el AOVE (Santangelo et al., 2016). En el presente estudio, estos compuestos triterpénicos se encuentran en mayor proporción en el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas, si bien el efecto sobre las enzimas hepáticas es similar entre los tres tipos de aceite, por lo que no podemos adjudicar, al menos en nuestro modelo experimental, a estos compuestos el efecto sobre estos biomarcadores de daño hepático. Sin embargo, el contenido total de fenoles sí es similar entre ellos, por lo que podríamos postular que podría ser el conjunto de fenoles (con posibles efectos sinérgicos entre ellos) los responsables de este perfil, posiblemente derivado de su efecto antiinflamatorio y antioxidante, como analizaremos posteriormente.

- *Variables iniciales de la vasculopatía.*

En la fisiopatología de la vasculopatía diabética, si bien no hay un orden didáctico exacto, podemos establecer como alteraciones iniciales la activación de proteínas adhesivas endoteliales (VCAM-1), activación leucocitaria (MPOx) y oxidación de LDL colesterol (oxLDL), que depende en gran medida del estrés oxidativo (véase en el apartado siguiente).

Ya comentamos que en nuestro modelo experimental estos biomarcadores están significativamente elevados en los animales diabéticos controles respecto a los sanos. La administración de los aceites utilizados disminuye este incremento en los animales diabéticos, si bien el aceite de semilla mostró un menor efecto proporcional respecto a los otros dos. En términos generales, AOVE redujo estos tres biomarcadores en un 33.1%, AS en un 17.1% y ADD en un 30.2%.

En el mismo modelo experimental utilizado en este estudio, se ha demostrado que la administración de hidroxitirosol y/o 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) disminuyen la concentración sérica de estos biomarcadores, relacionando este efecto con su acción antioxidante (De La Cruz et al., 2021; López-Villodres et al., 2016). Sin embargo, el contenido de hidroxitirosol es similar en el aceite de semilla y en el de aceituna deshuesada y deshidratada, por lo que, para adjudicar a estos fenoles el efecto sobre estos biomarcadores, el perfil debería ser similar, sin embargo, no lo es. Si observamos el contenido en fenoles totales, sí se aprecia que el perfil de efectos es similar al del contenido de estos compuestos en su conjunto, de ahí que volvemos a pensar que ese contenido total podría ser importante a la hora de explicar el efecto de estos aceites sobre los biomarcadores cardiovasculares determinados.

No encontramos datos en la bibliografía que apoyen la importancia de los ácidos triterpénicos en esta fase de la vasculopatía diabética; de todas formas, si eso fuese así, el aceite derivado de aceitunas deshuesadas y deshidratadas debería destacar ostensiblemente con un mayor efecto, hecho que no se aprecia en nuestro estudio.

Por lo tanto, los tres tipos de aceites frenan esta primera fase de la vasculopatía diabética experimental, presentando un menor efecto el aceite de semilla respecto a los otros dos.

- *Estrés oxidativo y nitrosativo.*

Ya describimos en la introducción de esta tesis que el estrés oxidativo participa en todas las fases de la vasculopatía diabética, siendo causa y a la vez consecuencia del resto de vías fisiopatológicas que participan en el desarrollo de estas complicaciones de la diabetes mellitus (Demirci-Çekiç, 2022), relacionándose con las modificaciones bioquímicas producidas por una hiperglucemia mantenida, el proceso de inflamación vascular y la regulación de las complicaciones trombóticas e isquémicas tisulares; en todos esos casos, el estrés oxidativo es inducido por el resto de vías y, a su vez, estas son estimuladas por el estrés oxidativo (An et al., 2023) (Figuras 1.6. y 1.16.).

El estrés oxidativo que se cuantifica en los animales diabéticos es inhibido, no anulado, por los tres aceites utilizados, si bien el aceite de aceituna deshuesada y deshidratada presenta un mayor efecto proporcional en la mayor parte de las variables que definen el estrés oxidativo, no mostrando esta diferencia a nivel del estrés nitrosativo (Tabla 4.5. y Figuras 4.13. y 4.15). Si realizamos los datos medios considerados por bloques conceptuales de variables, obtenemos la siguiente tabla respecto a los porcentajes de cambio obtenidos con los tres aceites:

Tabla 5.3. Porcentajes de cambio en las variables oxidativas y antioxidantes séricas de los tres tipos de aceites utilizados.

	%inhibición variables oxidativas	%incremento variables antioxidantes	% de cambio total
AOVE	71.3	16.6	44.3
AS	64.0	18.1	41.1
ADD	82.1	28.2	64.9

(AOVE: aceite de oliva virgen extra; AS: aceite de semilla; ADD: aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas)

Está ampliamente demostrado el efecto antioxidante del aceite de oliva virgen extra, tanto en modelos animales (Rossi et al., 2017) como en humanos (Cicero et al., 2008; Oliveras-López et al., 2013), postulándose como mecanismo fundamental que explica el beneficio

de este aceite en la prevención de eventos cardiovasculares (Basterra-Gortari et al., 2019; Estruch et al., 2006; Martínez-González et al., 2015).

Respecto a la responsabilidad de los componentes del AOVE, y por ende de los otros dos aceites, fundamentalmente se centra en los denominados componentes menores, sobre todo los de naturaleza polifenólica. En este sentido, hidroxitirosol es quizás el que mayor atención recibe como compuesto antioxidante por excelencia del AOVE (Bertelli et al., 2020; Echeverría et al., 2017; Pastor et al., 2021; Peyrol et al., 2017; Tejada et al., 2017). En el mismo modelo experimental de diabetes utilizado en el presente estudio, se ha confirmado el efecto antioxidante de este compuesto fenólico, así como su relación con la citoprotección en diversos tejidos (De La Cruz et al., 2010, 2021a, López-Villodres et al., 2016; Rodríguez-Pérez et al., 2021). Otros fenoles, como el 3'-4'-dihidroxifenilglicol (DHFG) también ha mostrado un efecto antioxidante en este modelo experimental, pero cuantitativamente menos que hidroxitirosol (Rodríguez-Pérez et al., 2022).

Otros compuestos relacionados con el efecto antioxidante del AOVE son los triterpénicos: ácido oleanólico (De Stefani et al., 2022), maslínico (Márquez-Martín et al., 2006) y ursólico (Fu et al., 2023); en estos casos el efecto antioxidante, siendo importante, es proporcionalmente menor al de hidroxitirosol.

Reproducimos a continuación la concentración de estos compuestos en los tres aceites utilizados (mg/kg), tomado de la Tabla 3.1.:

Tabla 5.4. Contenido de fenoles y triterpenos de los tres aceites utilizados.

	AOVE	AS	ADD
Fenoles totales	703.5	530.0	689.4
Hidroxitirosol total	94.8	120.7	125.7
DHFG	1.1	0.2	---
Tirosol	1.9	22.7	14.0
Triterpenos totales	75.4	113.6	913.7
Ácido oleanólico	22.3	41.0	402.3
Ácido maslínico	53.1	72.6	498.1
Ácido ursólico	< 5.0	< 5.0	13.2

(AOVE: aceite de oliva virgen extra; AS: aceite de semilla; ADD: aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas; DHFG: 3'-4'-dihidroxifenilglicol)

El contenido total de fenoles no varía en gran medida entre los tres aceites, por lo que no podríamos adjudicar el mayor efecto antioxidante del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas. No obstante, los fenoles, durante la deshidratación, se esterifican uniéndose a ácidos grasos formando por ejemplo derivados esterificados entre el hidroxitirosol y los ácidos grasos como el oleico, en lo que serían oleatos de hidroxitirosilo, lo cual puede mejorar la biodisponibilidad del hidroxitirosol,

Sin embargo, si observamos el contenido en derivados triterpénicos, podríamos valorar la hipótesis de considerar a estos compuestos como los principales responsables proporcionalmente importantes de dicho efecto.

En un estudio realizado en voluntarios sanos se ha demostrado que la administración de un aceite de oliva virgen extra enriquecido con compuestos triterpénicos (ácido oleoico y ácido maslínico) e igual contenido en fenoles totales que el aceite de oliva virgen extra muestra un mayor efecto inhibitor de la excreción urinaria de 8-isoprostanos y 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (Sánchez-Rodríguez et al., 2019). En el presente estudio hemos comprobado que la administración del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas

(con un mayor contenido en compuestos triterpénicos y similar de fenoles totales) presenta un efecto antioxidante global mayor que los otros dos tipos de aceites.

Estos resultados no anulan la importancia de los fenoles en el efecto antioxidante de estos aceites, ya que se ha demostrado que existe una potenciación entre los compuestos citados anteriormente (fenoles entre sí y con oleocantal) (De La Cruz et al., 2021, 2021a; Rodríguez-Pérez et al., 2022, 2023).

Respecto al estrés nitrosativo, ya comentamos en la introducción de este trabajo que está íntimamente relacionado con la presencia de radicales libres derivados del oxígeno (estrés oxidativo), sobre todo en situaciones como la diabetes mellitus (Islam, 2017) (Figura 1.14.). El aceite de oliva virgen extra ha demostrado un efecto inhibitor del estrés nitrosativo, relacionado con su composición en fenoles (Lama et al., 2017). En este sentido, se ha demostrado que hidroxitirosol inhibe la formación de 3-nitrotirosina en un modelo de diabetes igual al utilizado en este estudio (De La Cruz et al., 2021; Rodríguez-Pérez et al., 2021, 2022, 2023), así como en modelos *in vitro* con neuronas (Schaffer et al., 2007) o con células renales hipóxicas (Martínez-Lara et al., 2016). Respecto a otros componentes del AOVE, se ha demostrado este mismo efecto con 3',4'-dihidroxifenilglicol en tejido renal de *animales* diabéticos (Rodríguez-Pérez et al., 2023).

- *Estado trombogénico.*

Si bien el estado trombogénico es más complejo que las tres variables que hemos determinado en este estudio, podemos establecer un perfil básico de la mayor capacidad de los animales diabéticos para la formación de un trombo arterial. Así, la diabetes experimental incrementa la activación de las plaquetas y la producción de tromboxano, mientras disminuye la vascular de prostaciclina (Tabla 4.6. y Figura 4.16.). En estas condiciones, la administración de los tres tipos de aceites intenta re-equilibrar este proceso, en el sentido de disminuir la agregación plaquetaria y la producción de tromboxano, así como frenar la inhibición de la síntesis de prostaciclina (Tabla 4.6. y Figura 4.17.). La acción sobre plaquetas y producción de tromboxano es superior para el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas, siendo estas diferencias incluso más ostensibles para la producción vascular de prostaciclina, llegando a evitar casi completamente el descenso originado por la diabetes.

Tabla 5.5. Porcentajes de cambio en la capacidad trombogénica de los tres tipos de aceites utilizados.

	%inhibición agregación plaquetaria	%inhibición tromboxano	%incremento prostaciclina	%de cambio total
AOVE	43.1	42.4	52.2	45.7
AS	23.7	19.9	42.9	29.0
ADD	56.2	56.2	116	70.7

(AOVE: aceite de oliva virgen extra; AS: aceite de semilla; ADD: aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas)

Ya era conocido desde hace más de dos décadas que la administración de aceite de oliva virgen extra en modelos experimentales de aterogénesis disminuía la capacidad agregante de las plaquetas (incrementada en estos modelos experimentales), así como en algunos estudios puntuales en humanos (De La Cruz et al., 2000; López-Miranda et al., 2007; Pérez-Jiménez et al., 2006). Este efecto antiplaquetario se ha atribuido a los fenoles presentes en el AOVE. Se ha demostrado que la administración de un aceite de oliva enriquecido en fenoles reduce la agregabilidad de las plaquetas en mayor medida que un aceite con contenido bajo en dichos compuestos (Priora et al., 2008); por otra parte, el uso de algunos de estos fenoles aislados o en asociación (De La Cruz et al., 2021; De Roos et al., 2011), han demostrado un efecto antiagregante plaquetario que, en algunos casos (acetato de hidroxitirosol) se asemeja al efecto del propio ácido acetilsalicílico (González-Correa et al., 2008, 2009). Al ser el contenido de fenoles similar en los tres aceites, hemos de suponer que el efecto antiplaquetario esté presente con todos ellos, como se puede observar en la tabla 5.5.

Una explicación al mayor efecto proporcional del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas puede encontrarse en las modificaciones encontradas en la producción de prostanoïdes (tromboxano y prostaciclina). El cociente tromboxano/prostaciclina es conocido clásicamente como un parámetro a tener en cuenta a la hora de explicar los fenómenos trombóticos arteriales (Hishinuma et al., 2001). Si calculamos este cociente en los animales integrantes del presente estudio, tenemos los siguientes resultados:

Tabla 5.6. Cociente prostaciclina/tromboxano en los distintos grupos experimentales.

Grupos	6-keto-PGF _{1α} /TxB ₂
Controles no diabéticos	4.20
Controles diabéticos	0.60
Diabéticos + AOVE	1.61
Diabéticos + AS	1.08
Diabéticos + ADD	2.99

Estos valores nos indican que en los animales diabéticos hay un desequilibrio prostanoide a favor de un estado proagregante plaquetario y vasoconstrictor, lo cual es reducido por la administración de los tres tipos de aceites, si bien el de aceitunas deshuesadas y deshidratadas muestra un reequilibrio mayor, lo cual podría explicar su mayor efecto sobre la agregación plaquetaria.

El efecto del AOVE también ha sido adjudicado a los fenoles de su composición, habiéndose demostrado un efecto inhibitor de la ciclooxigenasa plaquetaria con hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y 3',4'-dihidroxifenilglicol (De La Cruz et al., 2021; González-Correa et al., 2008, 2009).

- Alteración morfológica de la pared arterial.

Las modificaciones morfológicas de la pared arterial en el desarrollo de la vasculopatía diabética son más bien una consecuencia que una causa del proceso trombótico-isquémico, ya que es un hecho derivado del proceso binomial inflamatorio y prooxidante (Marchio et al., 2019).

Los tres aceites utilizados disminuyen en igual proporción las variables morfológicas determinadas. Se ha demostrado que, en este mismo modelo experimental de diabetes mellitus, la administración de hidroxitirosol y/o 3',4'-dihidroxifenilglicol produce un efecto similar al determinado en el presente trabajo (De La Cruz et al., 2021; López-Villodres et al., 2016). Respecto a los ácidos triterpénicos, el ácido oleanólico ha

demostrado un efecto antiproliferativo en cultivos de fibras musculares vasculares *in vitro* (Han et al., 2017). No obstante, si comparamos estos efectos con la composición de los tres tipos de aceites, debemos inclinarnos por dar importancia al contenido total de fenoles.

- Alteración en el tejido cerebral.

La macroangiopatía diabética afecta a los mismos órganos que la enfermedad vascular aterosclerótica en personas no diabéticas, es decir, corazón, cerebro y extremidades. La diabetes mellitus es un proceso metabólico que no solo afecta a los vasos sanguíneos, sino que interfiere con la fisiología de los órganos y sistemas, además de las lesiones acontecidas en el sector vascular. Los biomarcadores analizados hasta ahora en el presente estudio se relacionan con posibles eventos trombótico-isquémicos que pudieran presentarse en pacientes diabéticos con un mal control de su glucemia, por lo que nos pareció interesante estudiar el efecto de los aceites utilizados en esas modificaciones tisulares, en concreto en tejido cerebral, con el fin de investigar si pudieran modificar las alteraciones ocurridas y que ejercieran un efecto protector no solo a nivel vascular, sino también tisular.

En el modelo experimental realizado en tejido cerebral está ampliamente demostrado que se reproducen los mecanismos de daño que acontecen en un paciente que sufriera un ictus isquémico (Hermann et al., 2019). Por otra parte, se ha demostrado que en ratas diabéticas el daño cerebral producido en este modelo de hipoxia-reoxigenación es mayor que en los animales no diabéticos (González-Correa et al., 2006). En el presente estudio hemos confirmado este resultado, ya que en los animales diabéticos el flujo de LDH (muerte celular) fue un 76.8% mayor que en los animales normoglucémicos (Tabla 4.8. y Figura 4.21.). En esta mayor tasa de daño cerebral participan prácticamente los mismos mecanismos que originan y mantienen la vasculopatía diabética, a excepción de variables estrictamente arteriales, como las proteínas adhesivas o las variables trombogénicas; sin embargo, se repite el perfil descrito en el suero, respecto al estrés oxidativo y nitrosativo, de gran importancia para explicar los eventos tisulares a nivel cerebral en el modelo experimental utilizado (Cabrerizo et al., 2013). En el presente estudio, las variables de estrés oxidativo y nitrosativo presentaron valores que llegaron a ser un 131% mayores en los animales diabéticos, hecho que coincide con los datos conocidos sobre la importancia

del estrés oxidativo en la aparición de las lesiones tisulares en los casos de ictus isquémico (Orellana-Urzúa et al., 2020).

La administración de los aceites utilizados en el presente estudio frena el mayor flujo de LDH presente en los animales diabéticos: un 37.8% con AOVE, un 24.5% con aceite de semilla y un 52.9% con aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas. El efecto neuroprotector del AOVE ha sido ampliamente demostrado (Amel et al., 2016; Conde et al., 2019; Rabiei et al., 2013; Silva et al., 2023, entre otros). Concretamente en el mismo modelo experimental utilizado en este estudio, se ha demostrado que AOVE previene del daño cerebral isquémico en animales diabéticos, fundamentalmente debido a su efecto antioxidante y antiinflamatorio (De La Cruz et al., 2010).

Básicamente se ha adjudicado al contenido en fenoles del AOVE su acción neuroprotectora, por lo que podríamos aplicar este mismo planteamiento a los otros dos aceites (Angeloni et al., 2017; Boronat et al., 2023). En este sentido se ha descrito un efecto neuroprotector al hidroxitirosol (González-Correa et al., 2008; Reyes et al., 2017; Romero-Márquez et al., 2022; Schaffer et al., 2007; Zheng et al., 2015), el cual se relaciona directamente con su acción antioxidante, postulándose un efecto activador de Nrf2 y que este sea el que facilite la síntesis de enzimas antioxidantes (Martínez-Huélamo et al., 2017); no obstante, incluso en condiciones *in vitro* se aprecia este efecto neuroprotector (De La Cruz et al., 2021a; González-Correa et al., 2008), situación en la que no transcurre tiempo suficiente para realizar este mecanismo intermedio que requiere tiempos prolongados. Otros fenoles del AOVE que han demostrado un efecto neuroprotector son el tirosol (De La Cruz et al., 2015; Plotnikov & Plotnikova, 2021) y el 3',4'-dihidroxifenilglicol (Rodríguez-Pérez et al., 2022). Otros componentes del AOVE han demostrado un efecto neuroprotector, como el ácido oleanólico (Chen et al., 2023; Gudoityte et al., 2021) o el maslínico (He et al., 2022).

El estrés oxidativo presente en el tejido cerebral de los animales diabéticos tras el modelo de hipoxia-reoxigenación se inhibe de una forma muy similar al sérico tras la administración de los aceites, es decir, un mayor efecto antioxidante del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas, así como un ligero mayor efecto de AOVE sobre el aceite de semilla. Si aceptamos la importancia del efecto antioxidante en el neuroprotector de los componentes de los aceites, se podría explicar así el mayor efecto

neuroprotector del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas, al igual que ocurría con los biomarcadores séricos comentados anteriormente.

Tabla 5.7. Porcentajes de cambio en las variables oxidativas y antioxidantes a nivel cerebral de los tres tipos de aceites utilizados.

	%inhibición variables oxidativas	%incremento variables antioxidantes	%de cambio total	%inhibición LDH
AOVE	61.6	48.3	52.6	37.8
AS	55.3	45.7	46.7	24.3
ADD	69.4	55.7	61.1	52.9

(AOVE: aceite de oliva virgen extra; AS: aceite de semilla; ADD: aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas)

Al discutir los resultados obtenidos a nivel sérico, postulábamos que estas diferencias podrían deberse al mayor contenido de compuestos triterpénicos en el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas, ya que la composición en fenoles totales es muy similar en los tres aceites utilizados. Concretamente, se ha descrito un efecto neuroprotector de ácido maslínico en situación experimental de isquemia, a través de una mejora del metabolismo glucídico cerebral (Xu & Sun, 2010) y una estimulación de la vía molecular Akt/GSK-3 β que activaría la sinaptogénesis y la regeneración neuronal post isquémica (Qian et al., 2015). Respecto al ácido oleanólico, se ha relacionado su efecto neuroprotector en la isquemia cerebral con un efecto antioxidante a nivel de la barrera hematoencefálica y un efecto modulador de las acciones de la neuroglia (Shi et al., 2021) y, al igual que el ácido maslínico, estimula la vía molecular Akt/GSK-3 β (Lin et al., 2021). Respecto al ácido ursólico, se ha demostrado que en situaciones de isquemia cerebral produce una neuroprotección a través de una modulación de la microglía (Qiu et al., 2023) y una activación de Nrf2 y por ende de los sistemas antioxidantes cerebrales (Li et al., 2013).

5.3. UNA VISIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El modelo experimental utilizado en el presente estudio reproduce todos y cada uno de los pasos de la fisiopatología de la vasculopatía diabética humana, desde la presencia de factores de riesgo evidentes (hiperglucemia e hiperlipidemia), pasando por la fase inicial de inflamación vascular (proteínas adhesivas, mieloperoxidasa, LDL oxidada), la activación del estrés oxidativo y nitrosativo, la consecuencia de la disfunción endotelial y activación plaquetaria (agregabilidad plaquetaria, tromboxano y prostaciclina), la base morfológica de los cambios acontecidos en la pared arterial y la mayor sensibilidad cerebral a un proceso probable de isquemia derivado de la vasculopatía.

Desde un punto de vista general, la administración de los tres tipos de aceites utilizados (AOVE, de semilla y de aceitunas deshuesadas y deshidratadas) frena todos los pasos de la vasculopatía diabética experimental y sus consecuencias, destacando su capacidad antioxidante, tanto en suero como en el propio tejido cerebral. Es decir, la administración de un aceite muy rico en fenoles (superior a los utilizados en la bibliografía, definidos como “alto contenido en fenoles”) y derivados triterpénicos (superior a los utilizados en la bibliografía, definidos como “alto contenido en triterpenos totales”) (Sánchez-Rodríguez et al., 2019) puede prevenir, al menos en parte, el desarrollo de la vasculopatía diabética experimental.

En segundo lugar, comparando entre ellos los resultados obtenidos, siempre teniendo en cuenta al AOVE como referencia establecida en la prevención de eventos cardiovasculares, podemos establecer los siguientes hechos:

- El aceite de semilla mostró un menor efecto que AOVE en las variables inflamatorias iniciales y en las denominadas como trombogénicas, siendo su efecto similar al de AOVE en el resto de las variables.
- El aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas presentó un mayor efecto que AOVE en su capacidad antioxidante, reguladora de la trombogénesis y del daño cerebral ante la hipoxia-reoxigenación, consiguiendo una menor tasa de muerte celular cerebral (53% frente a un 38% del AOVE).

Es decir, el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas parece influir más sobre aquellos procesos en los que el estrés oxidativo juega un papel más predominante.

En tercer lugar, aunque no hemos realizados experimentos directos, podríamos hipotetizar sobre la responsabilidad de los componentes de estos aceites que pudieran explicar las diferencias cuantitativas de efectos entre ellos. Básicamente se ha relacionado a los compuestos polifenólicos y a los triterpénicos con la protección cardiovascular del AOVE. Al analizar la composición de estos compuestos en los tres tipos de aceites, observamos que la cantidad total de fenoles no difiere en gran medida (703 mg/kg en AOVE, 530 mg/kg en aceite de semilla y 689 mg/kg en aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas), por lo que podrían tener estos compuestos un papel importante en los resultados finales obtenidos, además de lo demostrado para ellos en la bibliografía (véanse los párrafos anteriores de esta discusión), pero no explican por sí solos las diferencias encontradas entre ellos. Sin embargo, el contenido en triterpenos totales sí podría orientarnos en este sentido, ya que el aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas posee unas cantidades muy superiores a los otros dos (913 mg/kg, frente a 113 mg/kg en el aceite de semilla y 75 mg/kg en el AOVE). Estos compuestos triterpénicos podrían ser responsables del mayor efecto antioxidante del aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas, incluso podríamos postular un posible efecto sinérgico con los fenoles, como se ha demostrado previamente con hidroxitirosol y oleocantal (De La Cruz et al., 2021).

En definitiva, este estudio ha servido para confirmar que diversos subproductos de la aceituna, con el fin de un mejor aprovechamiento de la industria olivarera, pueden asegurar un efecto cardiosaludable, al menos como el demostrado para el AOVE, incluso en algunos aspectos pudiendo ofrecer ventajas adicionales al mismo.



CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

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

1. La administración de aceite de oliva virgen extra, aceite de semilla de aceitunas o aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas, en un modelo experimental de diabetes mellitus similar a la tipo 1 en humanos, modifica la mayor parte de los biomarcadores de vasculopatía diabética.
2. Los tres tipos de aceites reducen todas las fases de la vasculopatía diabética: estrés oxidativo y nitrosativo, activación leucocitaria y de proteínas adhesivas, desequilibrio tromboxano/prostaciclina y función plaquetaria.
3. Los tres tipos de aceites disminuyen el daño cerebral y las vías bioquímicas que lo producen, inducido en un modelo de hipoxia-reoxigenación en los animales diabéticos.
4. El aceite de aceitunas deshuesadas y deshidratadas produjo un efecto mayor que los otros dos tipos de aceites en todas las vías bioquímicas y de daño vascular y cerebral analizadas, pudiendo ser debido a su alto contenido en derivados triterpénicos.



BIBLIOGRAFÍA



Agrawal K, Melliou E, Li X, Pedersen TL, Wang SC, Magiatis P, Newman JW, Holt RR. Oleocanthal-rich extra virgin olive oil demonstrates acute anti-platelet effects in healthy men in a randomized trial. *J Funct Foods*. 2017 Sep;36:84-93.

Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Dec 7;12(12):2032-2045.

Amel N, Wafa T, Samia D, Yousra B, Issam C, Cheraif I, Attia N, Mohamed H. Extra virgin olive oil modulates brain docosahexaenoic acid level and oxidative damage caused by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in rats. *J Food Sci Technol*. 2016 Mar;53(3):1454-1464.

American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022 Jan 1;45(Suppl 1):S17-S38.

An Y, Xu BT, Wan SR, Ma XM, Long Y, Xu Y, Jiang ZZ. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol*. 2023 Sep 2;22(1):237.

Angeli F, Verdecchia P, Reboldi G. Aprocintan, A Dual Endothelin Receptor Antagonist Under Development for the Treatment of Resistant Hypertension. *Cardiol Ther*. 2021 Dec;10(2):397-406.

Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, Hrelia S. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 25;18(11):2230.

Aparicio-Soto M, Sánchez-Fidalgo S, González-Benjumea A, Maya I, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C. Naturally occurring hydroxytyrosol derivatives: hydroxytyrosyl acetate and 3,4-dihydroxyphenylglycol modulate inflammatory response in murine peritoneal macrophages. Potential utility as new dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2015 Jan 28;63(3):836-846.

Azul L, Leandro A, Boroumand P, Klip A, Seiça R, Sena CM. Increased inflammation, oxidative stress, and a reduction in antioxidant defense enzymes in perivascular adipose tissue contribute to vascular dysfunction in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2020 Jan;146:264-274.

Balamash KS, Alkreathy HM, Al Gahdali EH, Khoja SO, Ahmad A. Comparative Biochemical and Histopathological Studies on the Efficacy of Metformin and Virgin Olive Oil against Streptozotocin-Induced Diabetes in Sprague-Dawley Rats. *J Diabetes Res*. 2018 Nov 18;2018:4692197.

Barnes JA, Eid MA, Creager MA, Goodney PP. Epidemiology and Risk of Amputation in Patients with Diabetes Mellitus and Peripheral Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Aug;40(8):1808-1817.

Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol*. 2018 Apr;14:618-625.

Basterra-Gortari FJ, Ruiz-Canela M, Martínez-González MA, Babio N, Sorlí JV, Fito M, Ros E, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Estruch R, Serra-Majem L, Pinto X, González JI, Bulló M, Castañer O, Alonso-Gómez Á, Forga L, Arós F; PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean Eating Plan on the Need for Glucose-Lowering Medications in Participants with Type 2 Diabetes: A Subgroup Analysis of the PREDIMED Trial. *Diabetes Care*. 2019 Aug;42(8):1390-1397.

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*. 2005 Sep 1;437(7055):45-46.

Beeraka NM, Tomilova IK, Batrak GA, Zhaburina MV, Nikolenko VN, Sineelnikov MY, Mikhaleva LM. Recent Insights into the Nutritional Antioxidant Therapy in Prevention and Treatment of Diabetic Vascular Complications: A Comprehensive Review. *Curr Med Chem*. 2022;29(11):1920-1935.

Bertelli M, Kiani AK, Paolacci S, Manara E, Kurti D, Dhuli K, Bushati V, Miertus J, Pangallo D, Baglivo M, Beccari T, Michelini S. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *J Biotechnol*. 2020 Feb 10;309:29-33.

Binou P, Stergiou A, Kosta O, Tentolouris N, Karathanos VT. Positive contribution of hydroxytyrosol-enriched wheat bread to HbA_{1c} levels, lipid profile, markers of inflammation and body weight in subjects with overweight/obesity and type 2 diabetes mellitus. *Eur J Nutr*. 2023 Aug;62(5):2165-2176.

Blair TA, Frelinger AL 3rd. Platelet surface marker analysis by mass cytometry. *Platelets*. 2020 Jul 3;31(5):633-640.

Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002 Sep;5(5):561-568.

Boronat A, Serreli G, Rodríguez-Morató J, Deiana M, de la Torre R. Olive Oil Phenolic Compounds' Activity against Age-Associated Cognitive Decline: Clinical and Experimental Evidence. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Jul 22;12(7):1472.

Boyer F, Vidot JB, Dubourg AG, Rondeau P, Essop MF, Bourdon E. Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:534873.

Bozzetto L, Alderisio A, Clemente G, Giorgini M, Barone F, Griffio E, Costabile G, Vetrani C, Cipriano P, Giacco A, Riccardi G, Rivellese AA, Annuzzi G. Gastrointestinal effects of extra-virgin olive oil associated with lower postprandial glycemia in type 1 diabetes. *Clin Nutr*. 2019 Dec;38(6):2645-2651.

Brand-Miller J, Dickinson S, Barclay A, Allman-Farinelli M. Glycemic index, glycemic load, and thrombogenesis. *Semin Thromb Hemost*. 2009 Feb;35(1):111-118.

Cabrerizo S, De La Cruz JP, López-Villodres JA, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the inhibition of oxidative stress and

inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *J Nutr Biochem*. 2013 Dec;24(12):2152-2157.

Carrizzo A, Izzo C, Oliveti M, Alfano A, Virtuoso N, Capunzo M, Di Pietro P, Calabrese M, De Simone E, Sciarretta S, Frati G, Migliarino S, Damato A, Ambrosio M, De Caro F, Vecchione C. The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 28;19(10):2968.

Chen C, Ai Q, Shi A, Wang N, Wang L, Wei Y. Oleanolic acid and ursolic acid: therapeutic potential in neurodegenerative diseases, neuropsychiatric diseases and other brain disorders. *Nutr Neurosci*. 2023 May;26(5):414-428.

Chen R, Ovbiagele B, Feng W. Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology, Pharmaceuticals and Outcomes. *Am J Med Sci*. 2016 Apr;351(4):380-386.

Chen X, Sun-Waterhouse D, Yao W, Li X, Zhao M, You L. Free radical-mediated degradation of polysaccharides: Mechanism of free radical formation and degradation, influence factors and product properties. *Food Chem*. 2021 Dec 15;365:130524.

Cicero AF, Nascetti S, López-Sabater MC, Elosua R, Salonen JT, Nyyssönen K, Poulsen HE, Zunft HJ, Kieseewetter H, de la Torre K, Covas MI, Kaikkonen J, Mursu J, Koenbick C, Bäuml H, Gaddi AV; EUROLIVE Study Group. 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*. 2008 Apr;27(2):314-320.

Clyne AM. Endothelial response to glucose: dysfunction, metabolism, and transport. *Biochem Soc Trans*. 2021 Feb 26;49(1):313-325.

Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol*. 2018 May;15:490-503.

Conde C, Escribano BM, Luque E, Feijóo M, Caballero-Villarraso J, Valdelvira ME, Ochoa-Sepúlveda JJ, Lillo R, Paz E, Santamaría A, Agüera E, Túnez I. Extra-Virgin Olive Oil Modifies the Changes Induced in Non-Nervous Organs and Tissues by Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Models. *Nutrients*. 2019 Oct 14;11(10):2448.

Costabile G, Della Pepa G, Bozzetto L, Annuzzi G, Vetrani C, Giacco R, Della Corte G, Conte FS, Di Marino L, Rivellese AA. Urine 8-isoprostane in relation to adiposity and insulin resistance in individuals at high cardiometabolic risk. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015 May;13(4):187-191.

Dai Y, Shao C, Piao Y, Hu H, Lu K, Zhang T, Zhang X, Jia S, Wang M, Man S. The mechanism for cleavage of three typical glucosidic bonds induced by hydroxyl free radical. *Carbohydr Polym*. 2017 Dec 15;178:34-40.

De La Cruz JP, Del Río S, Arrebola MM, López-Villodres JA, Jebrouni N, González-Correa JA. Effect of virgin olive oil plus acetylsalicylic acid on brain slices damage after hypoxia-reoxygenation in rats with type 1-like diabetes mellitus. *Neurosci Lett*. 2010 Mar 3;471(2):89-93.

De La Cruz JP, Pérez de Algaba I, Martín-Aurioles E, Arrebola MM, Ortega-Hombrados L, Rodríguez-Pérez MD, Fernández-Prior MÁ, Bermúdez-Oria A, Verdugo C, González-Correa JA. Extra Virgin Oil Polyphenols Improve the Protective Effects of Hydroxytyrosol in an *In vitro* Model of Hypoxia-Reoxygenation of Rat Brain. *Brain Sci.* 2021a Aug 26;11(9):1133.

De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, Reyes JJ, Benitez-Guerrero A, Espartero JL, González-Correa JA. Differences in the Neuroprotective Effect of Orally Administered Virgin Olive Oil (*Olea europaea*) Polyphenols Tyrosol and Hydroxytyrosol in Rats. *J Agric Food Chem.* 2015 Jul 1;63(25):5957-5963.

De La Cruz Cortés JP, Vallejo-Carmona L, Arrebola MM, Martín-Aurioles E, Rodríguez-Pérez MD, Ortega-Hombrados L, Verdugo C, Fernández-Prior MÁ, Bermúdez-Oria A, González-Correa JA. Synergistic Effect of 3',4'-Dihydroxifenilglicol and Hydroxytyrosol on Oxidative and Nitrosative Stress and Some Cardiovascular Biomarkers in an Experimental Model of Type 1 Diabetes Mellitus. *Antioxidants (Basel).* 2021 Dec 13;10(12):1983.

De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martín-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thromb Res.* 2000 Nov 15;100(4):305-315.

Demirci-Çekiç S, Özkan G, Avan AN, Uzunboy S, Çapanoğlu E, Apak R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal.* 2022 Feb 5;209:114477.

De Roos B, Zhang X, Rodriguez Gutierrez G, Wood S, Rucklidge GJ, Reid MD, Duncan GJ, Cantlay LL, Duthie GG, O'Kennedy N. Anti-platelet effects of olive oil extract: *in vitro* functional and proteomic studies. *Eur J Nutr.* 2011 Oct;50(7):553-562.

De Santis S, Cariello M, Piccinin E, Sabbà C, Moschetta A. Extra Virgin Olive Oil: Lesson from Nutrigenomics. *Nutrients.* 2019 Sep 4;11(9):2085.

De Stefani C, Vasarri M, Salvatici MC, Grifoni L, Quintela JC, Bilia AR, Degl'Innocenti D, Bergonzi MC. Microemulsions Enhance the *In vitro* Antioxidant Activity of Oleanolic Acid in RAW 264.7 Cells. *Pharmaceutics.* 2022 Oct 19;14(10):2232.

Diabetes Atlas de la FID. Octava edición 2017. 2017;150. Available from: www.diabetesatlas.org

Diario Oficial de las Comunidades Europeas. REGLAMENTO (CE) No 1019/2002 DE LA COMISIÓN de 13 de junio de 2002 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. 14.6.2002. L 155/27.

Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049.

Ditano-Vázquez P, Torres-Peña JD, Galeano-Valle F, Pérez-Caballero AI, Demelo-Rodríguez P, Lopez-Miranda J, Katsiki N, Delgado-Lista J, Alvarez-Sala-Walther LA.

The Fluid Aspect of the Mediterranean Diet in the Prevention and Management of Cardiovascular Disease and Diabetes: The Role of Polyphenol Content in Moderate Consumption of Wine and Olive Oil. *Nutrients*. 2019 Nov 19;11(11):2833.

Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Hydroxytyrosol and Cytoprotection: A Projection for Clinical Interventions. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 28;18(5):930.

Edmonds M. Vascular disease in the lower limb in type 1 diabetes. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2019 Feb 13;8(1):39-46.

ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL, Kahan S, Khunti K, Leon J, Lyons SK, Perry ML, Prahalad P, Pratley RE, Seley JJ, Stanton RC, Gabbay RA, on behalf of the American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*. 2023 Jan 1;46(Suppl 1):S19-S40.

Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, Fiol M, Gómez-Gracia E, López-Sabater MC, Vinyoles E, Arós F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Sáez G, Ros E; PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 Jul 4;145(1):1-11.

Fernández-Poyatos MDP, Llorent-Martínez EJ, Ruiz-Medina A. Effect of Ripening on the Phenolic Composition and Mineral Content of Three Varieties of Olive Fruits. *Foods*. 2021 Feb 9;10(2):380.

Fernández-Prior Á, Bermúdez-Oria A, Millán-Linares MDC, Fernández-Bolaños J, Espejo-Calvo JA, Rodríguez-Gutiérrez G. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Purified from Table Olive Effluents. *Foods*. 2021 Jan 22;10(2):227.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d.

Fox CS. Cardiovascular disease risk factors, type 2 diabetes mellitus, and the Framingham Heart Study. *Trends Cardiovasc Med*. 2010 Apr;20(3):90-95.

Franco-Ávila T, Moreno-González R, Juan ME, Planas JM. Table olive elicits antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *J Sci Food Agric*. 2023 Jan 15;103(1):64-72.

Fu Y, Liu T, He S, Zhang Y, Tan Y, Bai Y, Shi J, Deng W, Qiu J, Wang Z, Chen Y, Jin Q, Xie M, Wang J. Ursolic acid reduces oxidative stress injury to ameliorate experimental autoimmune myocarditis by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Front Pharmacol*. 2023 Jul 21;14:1189372.

Fuentes E, Palomo I. Regulatory mechanisms of cAMP levels as a multiple target for antiplatelet activity and less bleeding risk. *Thromb Res*. 2014 Aug;134(2):221-226.

Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc.* 2021 Apr;1(4):e78.

Gamede M, Mabuza L, Ngubane P, Khathi A. Plant-derived oleanolic acid ameliorates markers associated with non-alcoholic fatty liver disease in a diet-induced pre-diabetes rat model. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019 Oct 1;12:1953-1962.

Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):620-636.

Gimeno E, Fitó M, Lamuela-Raventós RM, Castellote AI, Covas M, Farré M, de La Torre-Boronat MC, López-Sabater MC. Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Feb;56(2):114-120.

González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *Int J Mol Sci.* 2023 May 27;24(11):9352.

González-Correa JA, Arrebola MM, Cansino AL, Muñoz-Marín J, Ruiz-Villafranca D, Guerrero A, de la Cuesta FS, De La Cruz JP. Effects of hypoxia reoxygenation in brain slices from rats with type 1-like diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006 Sep-Oct;22(5):390-400.

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 Apr;101(8):1157-1164.

González-Correa JA, Muñoz-Marín J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, López-Villodres JA, De La Cruz JP. Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids.* 2007 Oct;42(10):921-929.

González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J Agric Food Chem.* 2008 Sep 10;56(17):7872-7876.

Gudoityte E, Arandarcikaite O, Mazeikiene I, Bendokas V, Liobikas J. Ursolic and Oleanolic Acids: Plant Metabolites with Neuroprotective Potential. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 27;22(9):4599.

Han Y, Jiang Q, Wang Y, Li W, Geng M, Han Z, Chen X. The anti-proliferative effects of oleanolic acid on A7r5 cells-Role of UCP2 and downstream FGF-2/p53/TSP-1. *Cell Biol Int.* 2017 Dec;41(12):1296-1306.

Hara T, Fukuda D, Ganbaatar B, Pham PT, Aini K, Rahadian A, Suto K, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Sata M. Olive mill wastewater and hydroxytyrosol inhibits atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Heart Vessels.* 2023 Nov;38(11):1386-1394.

Hartley A, Haskard D, Khamis R. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerosis - Novel insights and future directions in diagnosis and therapy. *Trends Cardiovasc Med.* 2019 Jan;29(1):22-26.

Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr.* 2004 Aug;36(4):341-346.

He Y, Wang Y, Yang K, Jiao J, Zhan H, Yang Y, Lv D, Li W, Ding W. Maslinic Acid: A New Compound for the Treatment of Multiple Organ Diseases. *Molecules.* 2022 Dec 9;27(24):8732.

Henning RJ. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2018 Nov;14(6):491-509.

Hermann DM, Popa-Wagner A, Kleinschnitz C, Doepfner TR. Animal models of ischemic stroke and their impact on drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2019 Mar;14(3):315-326.

Hernández Á, Remaley AT, Farràs M, Fernández-Castillejo S, Subirana I, Schröder H, Fernández-Mampel M, Muñoz-Aguayo D, Sampson M, Solà R, Farré M, de la Torre R, López-Sabater MC, Nyssönen K, Zunft HJ, Covas MI, Fitó M. Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial. *J Nutr.* 2015 Aug;145(8):1692-1697.

Hishinuma T, Tsukamoto H, Suzuki K, Mizugaki M. Relationship between thromboxane/prostacyclin ratio and diabetic vascular complications. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001 Oct;65(4):191-196.

Iacono A, Gómez R, Sperry J, Conde J, Bianco G, Meli R, Gómez-Reino JJ, Smith AB 3rd, Gualillo O. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis Rheum.* 2010 Jun;62(6):1675-1682.

Iba T, Levy JH. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost.* 2018 Feb;16(2):231-241.

Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:656-662.

Ikonomidis I, Katogiannis K, Chania C, Iakovis N, Tsoumani M, Christodoulou A, Brinia E, Pavlidis G, Thymis J, Tsilivarakis D, Kountouri A, Korakas E, Lambadiari V, Triposkiadis F, Skaltsounis L, Tseti I, Iliodromitis EK, Andreadou I. Association of hydroxytyrosol enriched olive oil with vascular function in chronic coronary disease. *Eur J Clin Invest.* 2023 Jul;53(7):e13983.

Instituto Nacional de Estadística. 2020.

https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 2022 Reports. <https://diabetesatlas.org/>

Isaev NK, Stelmashook EV, Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Lozier ER, Doludin YV, Silachev DN, Zorov DB. Role of acidosis, NMDA receptors, and acid-sensitive ion channel 1a (ASIC1a) in neuronal death induced by ischemia. *Biochemistry (Mosc)*. 2008 Nov;73(11):1171-1175.

Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res*. 2017 Jan;39(1):73-82.

Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandenbroeck K, Benito-Vicente A, Martín C. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 20;23(6):3346.

Jin Q, Ma RCW. Metabolomics in Diabetes and Diabetic Complications: Insights from Epidemiological Studies. *Cells*. 2021 Oct 21;10(11):2832.

Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023 Oct;97(10):2499-2574.

Juutilainen A, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Type 2 diabetes as a "coronary heart disease equivalent": an 18-year prospective population-based study in Finnish subjects. *Diabetes Care*. 2005 Dec;28(12):2901-2907.

Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979 May 11;241(19):2035-2038.

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

Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2018 Jan 1;25(1):27-39.

Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol*. 2018 Aug 31;17(1):121.

Kelsey MD, Nelson AJ, Green JB, Granger CB, Peterson ED, McGuire DK, Pagidipati NJ. Guidelines for Cardiovascular Risk Reduction in Patients with Type 2 Diabetes: JACC Guideline Comparison. *J Am Coll Cardiol*. 2022 May 10;79(18):1849-1857.

Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV, Saini AK. Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Sep 15:5245308.

Kirkman MS, Mahmud H, Korytkowski MT. Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2018 Mar;47(1):81-96.

Lama A, Pirozzi C, Mollica MP, Trinchese G, Di Guida F, Cavaliere G, Calignano A, Mattace Raso G, Berni Canani R, Meli R. Polyphenol-rich virgin olive oil reduces insulin resistance and liver inflammation and improves mitochondrial dysfunction in high-fat diet fed rats. *Mol Nutr Food Res.* 2017 Mar;61(3).

Lau LH, Lew J, Borschmann K, Thijs V, Ekinci EI. Prevalence of diabetes and its effects on stroke outcomes: A meta-analysis and literature review. *J Diabetes Investig.* 2019 May;10(3):780-792.

Leslie RD. United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS): what now or so what? *Diabetes Metab Res Rev.* 1999 Jan-Feb;15(1):65-71.

Li L, Zhang X, Cui L, Wang L, Liu H, Ji H, Du Y. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 2013 Feb 25;1497:32-39.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):317-325.

Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc.* 2018 Aug;117(8):662-675.

Lin K, Zhang Z, Zhang Z, Zhu P, Jiang X, Wang Y, Deng Q, Lam Yung KK, Zhang S. Oleonic Acid Alleviates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury via Regulation of the GSK-3 β /HO-1 Signaling Pathway. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021 Dec 21;15(1):1.

Lopez-Miranda J, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Jimenez-Gómez Y, Fuentes F, Ruano J, Marin C. Olive oil and the haemostatic system. *Mol Nutr Food Res.* 2007 Oct;51(10):1249-1259.

López-Villodres JA, Abdel-Karim M, De La Cruz JP, Rodríguez-Pérez MD, Reyes JJ, Guzmán-Moscoso R, Rodríguez-Gutierrez G, Fernández-Bolaños J, González-Correa JA. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *J Nutr Biochem.* 2016 Nov;37:94-100.

Lozano-Castellón J, López-Yerena A, Domínguez-López I, Siscart-Serra A, Fraga N, Sámano S, López-Sabater C, Lamuela-Raventós RM, Vallverdú-Queralt A, Pérez M. Extra virgin olive oil: A comprehensive review of efforts to ensure its authenticity, traceability, and safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2022 May;21(3):2639-2664.

Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglul, Wiklund O; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020 Jan 1;41(1):111-188.



Madonna R, Pieragostino D, Balistreri CR, Rossi C, Geng YJ, Del Boccio P, De Caterina R. Diabetic macroangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches with focus on high glucose-mediated vascular damage. *Vascul Pharmacol*. 2018 Feb 6;S1537-1891(17):30322-1.

Madureira J, Margaça FMA, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR, Verde SC, Barros L. Applications of bioactive compounds extracted from olive industry wastes: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2022 Jan;21(1):453-476

Mahmood T, Fahim MF, Ahsan S, Qidwai U, Memon MS. Ocular Complications Associated with Diabetes and The Risk Of Sustainable Blindness; A Real World Analysis. *J Pak Med Assoc*. 2023 Jul;73(7):1453-1456.

Makhoul S, Walter E, Pagel O, Walter U, Sickmann A, Gambaryan S, Smolenski A, Zahedi RP, Jurk K. Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets. *Nitric Oxide*. 2018 Jun 1;76:71-80.

Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Jul 1:8563845.

Márquez Martín A, de la Puerta Vázquez R, Fernández-Arche A, Ruiz-Gutiérrez V. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radic Res*. 2006 Mar;40(3):295-302.

Martín-Carro B, Donate-Correa J, Fernández-Villabrille S, Martín-Vírgala J, Panizo S, Carrillo-López N, Martínez-Arias L, Navarro-González JF, Naves-Díaz M, Fernández-Martín JL, Alonso-Montes C, Cannata-Andía JB. Experimental Models to Study Diabetes Mellitus and Its Complications: Limitations and New Opportunities. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 18;24(12):10309.

Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E; PREDIMED INVESTIGATORS. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015 Jul-Aug;58(1):50-60.

Martínez-Huélamo M, Rodríguez-Morató J, Boronat A, de la Torre R. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants (Basel)*. 2017 Sep 26;6(4):73.

Martínez-Lara E, Peña A, Calahorra J, Cañuelo A, Siles E. Hydroxytyrosol decreases the oxidative and nitrosative stress levels and promotes angiogenesis through HIF-1 independent mechanisms in renal hypoxic cells. *Food Funct*. 2016 Jan;7(1):540-548.

Maruhashi T, Higashi Y. Pathophysiological Association between Diabetes Mellitus and Endothelial Dysfunction. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Aug 18;10(8):1306.

Mauersberger C, Hinterdobler J, Schunkert H, Kessler T, Sager HB. Where the Action Is-Leukocyte Recruitment in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Jan 11;8:813984.

Mitchell JA, Kirkby NS, Ahmetaj-Shala B, Armstrong PC, Crescente M, Ferreira P, Lopes Pires ME, Vaja R, Warner TD. Cyclooxygenases and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2021 Jan;217:107624.

Mkhwanazi BN, Serumula MR, Myburg RB, Van Heerden FR, Musabayane CT. Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on kidney function. *Ren Fail.* 2014 Apr;36(3):419-431.

Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Dec;11(12):937-957.

Moreira DM, da Silva RL, Vieira JL, Fattah T, Lueneberg ME, Gottschall CA. Role of vascular inflammation in coronary artery disease: potential of anti-inflammatory drugs in the prevention of atherothrombosis. *Inflammation and anti-inflammatory drugs in coronary artery disease.* *Am J Cardiovasc Drugs.* 2015 Feb;15(1):1-11.

Muñoz-Marín J, De la Cruz JP, Reyes JJ, López-Villodres JA, Guerrero A, López-Leiva I, Espartero JL, Labajos MT, González-Correa JA. Hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives inhibit platelet activation after oral administration to rats. *Food Chem Toxicol.* 2013 Aug;58:295-300

Murphy RC, Fahy E. Isoprostane nomenclature: more suggestions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010 Feb-Mar;82(2-3):69-70.

Naaman SC, Bakris GL. Diabetic Nephropathy: Update on Pillars of Therapy Slowing Progression. *Diabetes Care.* 2023 Sep 1;46(9):1574-1586.

Naito R, Miyauchi K. Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Int Heart J.* 2017 Aug 3;58(4):475-480.

Nekoeian AA, Khalili A, Khosravi MB. Oleuropein offers cardioprotection in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension. *Indian J Pharmacol.* 2014 Jul-Aug;46(4):398-403.

Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res.* 2022 Mar;387(3):391-398.

Ni L, Shaik R, Xu R, Zhang G, Zhe J. A Microfluidic Sensor for Continuous, in Situ Surface Charge Measurement of Single Cells. *ACS Sens.* 2020 Feb 28;5(2):527-534.

Oliveras-López MJ, Molina JJ, Mir MV, Rey EF, Martín F, de la Serrana HL. Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr.* 2013 Sep-Oct;57(2):234-242.

Olmo-García L, Monasterio RP, Sánchez-Arévalo CM, Fernández-Gutiérrez A, Olmo-Peinado JM, Carrasco-Pancorbo A. Characterization of New Olive Fruit Derived Products Obtained by Means of a Novel Processing Method Involving Stone Removal and Dehydration with Zero Waste Generation. *J Agric Food Chem.* 2019 Aug 21;67(33):9295-9306.

Olmo-García, L., Olmo-Peinado, J.M, Ruiz-Rueda. Olive subproduct and procedure for obtaining the olive. 2011 (ES2389816A1).

Orellana-Urzúa S, Rojas I, Líbano L, Rodrigo R. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des.* 2020;26(34):4246-4260.

Pandey S, Chmelir T, Chottova Dvorakova M. Animal Models in Diabetic Research- History, Presence, and Future Perspectives. *Biomedicines.* 2023 Oct 20;11(10):2852.

Pastor R, Bouzas C, Tur JA. Beneficial effects of dietary supplementation with olive oil, oleic acid, or hydroxytyrosol in metabolic syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Free Radic Biol Med.* 2021 Aug 20;172:372-385.

Pérez-Jiménez F, Lista JD, Pérez-Martínez P, López-Segura F, Fuentes F, Cortés B, Lozano A, López-Miranda J. Olive oil and haemostasis: a review on its healthy effects. *Public Health Nutr.* 2006 Dec;9(8A):1083-1088.

Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Dec;9(6):771-779.

Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, Heinemann L, Schleicher E. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2019 Dec;127(S 01):S1-S7.

Peyrol J, Riva C, Amiot MJ. Hydroxytyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Nutrients.* 2017 Mar 20;9(3):306.

Pinto RS, Minanni CA, de Araújo Lira AL, Passarelli M. Advanced Glycation End Products: A Sweet Flavor That Embitters Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 22;23(5):2404.

Plotnikov MB, Plotnikova TM. Tyrosol as a Neuroprotector: Strong Effects of a "Weak" Antioxidant. *Curr Neuropharmacol.* 2021;19(4):434-448.

Poudyal H, Lemonakis N, Efentakis P, Gikas E, Halabalaki M, Andreadou I, Skaltsounis L, Brown L. Hydroxytyrosol ameliorates metabolic, cardiovascular and liver changes in a rat model of diet-induced metabolic syndrome: Pharmacological and metabolism-based investigation. *Pharmacol Res.* 2017 Mar;117:32-45.

Priora R, Summa D, Frosali S, Margaritis A, Di Giuseppe D, Lapucci C, Ieri F, Pulcinelli FM, Romani A, Franconi F, Di Simplicio P. Administration of minor polar compound-enriched extra virgin olive oil decreases platelet aggregation and the plasma concentration of reduced homocysteine in rats. *J Nutr.* 2008 Jan;138(1):36-41.

Qian Y, Huang M, Guan T, Chen L, Cao L, Han XJ, Huang L, Tang X, Li Y, Sun H. Maslinic acid promotes synaptogenesis and axon growth via Akt/GSK-3 β activation in cerebral ischemia model. *Eur J Pharmacol.* 2015 Oct 5;764:298-305.

Qiu L, Wang Y, Wang Y, Liu F, Deng S, Xue W, Wang Y. Ursolic Acid Ameliorated Neuronal Damage by Restoring Microglia-Activated MMP/TIMP Imbalance *in vitro*. *Drug Des Devel Ther*. 2023 Aug 22;17:2481-2493.

Quast MJ, Wei J, Huang NC, Brunder DG, Sell SL, Gonzalez JM, Hillman GR, Kent TA. Perfusion deficit parallels exacerbation of cerebral ischemia/reperfusion injury in hyperglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997 May;17(5):553-559.

Rabiei Z, Bigdeli MR, Rasouljan B. Neuroprotection of dietary virgin olive oil on brain lipidomics during stroke. *Curr Neurovasc Res*. 2013 Aug;10(3):231-237.

Rafaqat S, Sattar A, Khalid A, Rafaqat S. Role of liver parameters in diabetes mellitus - a narrative review. *Endocr Regul*. 2023 Sep 16;57(1):200-220.

Reyes JJ, De La Cruz JP, Muñoz-Marin J, Guerrero A, Lopez-Villodres JA, Madrona A, Espartero JL, Gonzalez-Correa JA. Antiplatelet effect of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. *Eur J Nutr*. 2013 Mar;52(2):591-599.

Reyes JJ, Villanueva B, López-Villodres JA, De La Cruz JP, Romero L, Rodríguez-Pérez MD, Rodríguez-Gutierrez G, Fernández-Bolaños J, González-Correa JA. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetes Mellitus. *J Agric Food Chem*. 2017 Jun 7;65(22):4378-4383.

Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, Ramirez-Tortosa M. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res Int*. 2018 Mar;105:654-667.

Rodríguez-Gutiérrez G, Duthie GG, Wood S, Morrice P, Nicol F, Reid M, Cantlay LL, Kelder T, Horgan GW, Fernández-Bolaños Guzmán J, de Roos B. Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats--a proteomics and network analysis approach. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Jul;56(7):1137-1147.

Rodríguez-Morató J, Xicota L, Fitó M, Farré M, Dierssen M, de la Torre R. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2015 Mar 13;20(3):4655-4680.

Rodríguez-Pérez MD, López-Villodres JA, Arrebola MM, Martín-Aurioles E, Fernández-Prior Á, Bermúdez-Oria A, Ríos MC, De La Cruz JP, González-Correa JA. Nephroprotective Effect of the Virgin Olive Oil Polyphenol Hydroxytyrosol in Type 1-like Experimental Diabetes Mellitus: Relationships with Its Antioxidant Effect. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Nov 8;10(11):1783.

Rodríguez-Pérez MD, Pérez de Algaba I, Martín-Aurioles E, Arrebola MM, Ortega-Hombrados L, Verdugo C, Fernández-Prior MÁ, Bermúdez-Oria A, De La Cruz JP, González-Correa JA. Neuroprotective Effect of 3',4'-Dihydroxyphenylglycol in Type-1-like Diabetic Rats-Influence of the Hydroxytyrosol/3',4'-dihydroxyphenylglycol Ratio. *Nutrients*. 2022 Mar 8;14(6):1146.

Rodríguez-Pérez MD, Santiago-Corral L, Ortega-Hombrados L, Verdugo C, Arrebola MM, Martín-Aurioles E, Fernández-Prior MÁ, Bermúdez-Oria A, De La Cruz JP, González-Correa JA. The Effect of the Extra Virgin Olive Oil Minor Phenolic Compound 3',4'-Dihydroxyphenylglycol in Experimental Diabetic Kidney Disease. *Nutrients*. 2023 Jan 11;15(2):377.

Rojo-Martínez G, Valdés S, Soriguer F, Vendrell J, Urrutia I, Pérez V, Ortega E, Ocón P, Montanya E, Menéndez E, Lago-Sampedro A, González-Frutos T, Gomis R, Goday A, García-Serrano S, García-Escobar E, Galán-García JL, Castell C, Badía-Guillén R, Aguilera-Venegas G, Girbés J, Gaztambide S, Franch-Nadal J, Delgado E, Chaves FJ, Castaño L, Calle-Pascual A. Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort di@bet.es study. *Sci Rep*. 2020 Feb 17;10(1):2765.

Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, Bernini R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*. 2019 Aug 1;11(8):1776.

Romero-Márquez JM, Navarro-Hortal MD, Jiménez-Trigo V, Muñoz-Ollero P, Forbes-Hernández TY, Esteban-Muñoz A, Giampieri F, Delgado Noya I, Bullón P, Vera-Ramírez L, Battino M, Sánchez-González C, Quiles JL. An Olive-Derived Extract 20% Rich in Hydroxytyrosol Prevents β -Amyloid Aggregation and Oxidative Stress, Two Features of Alzheimer Disease, via SKN-1/NRF2 and HSP-16.2 in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Mar 25;11(4):629.

Rossi M, Caruso F, Kwok L, Lee G, Caruso A, Gionfra F, Candelotti E, Belli SL, Molasky N, Raley-Susman KM, Leone S, Filipký T, Tofani D, Pedersen J, Incerpi S. Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. Chemical and biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet. *PLoS One*. 2017 Dec 28;12(12):e0189341.

Rubio-Senent F, de Roos B, Duthie G, Fernández-Bolaños J, Rodríguez-Gutiérrez G. Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *Eur J Nutr*. 2015 Dec;54(8):1287-1295.

Russell JW, Zilliox LA. Diabetic neuropathies. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2014; 20 (5 Peripheral Nervous System Disorders):1226-1240.

Sajadimajd S, Deravi N, Forouhar K, Rahimi R, Kheirandish A, Bahramsoltani R. Endoplasmic reticulum as a therapeutic target in type 2 diabetes: Role of phytochemicals. *Int Immunopharmacol*. 2023 Jan;114:109508.

Santangelo C, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Filardi T, Fogliano V, D'Archivio M, Giovannini C, Lenzi A, Morano S, Masella R. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *J Endocrinol Invest*. 2016 Nov;39(11):1295-1301.

Sakavitsi ME, Breynaert A, Nikou T, Lauwers S, Pieters L, Hermans N, Halabalaki M. Availability and Metabolic Fate of Olive Phenolic Alcohols Hydroxytyrosol and Tyrosol in the Human GI Tract Simulated by the *In vitro* GIDM-Colon Model. *Metabolites*. 2022 Apr 26;12(5):391.

Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J, Estruch R, Covas MI, Corella D, Arós F, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E; PREDIMED Study Investigators. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care*. 2011 Jan;34(1):14-19.

Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Paul D, Maulik N. Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat *in vivo* model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity. *J Agric Food Chem*. 2008 Oct 22;56(20):9692-9698.

Sanchez-Rodriguez E, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Calleja MA, Espejo-Calvo JA, Gil-Extremera B, de la Torre R, Fito M, Covas MI, Vilchez P, Alche JD, Martinez de Victoria E, Gil A, Mesa MD. Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients*. 2019 Mar 6;11(3):561.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, De Sanctis P, Giovannini C, D'Archivio M, Masella R. Anti-inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(1):36-50.

Sasaki H, Kawamura N, Dyck PJ, Dyck PJB, Kihara M, Low PA. Spectrum of diabetic neuropathies. *Diabetol Int*. 2020 Jan 8;11(2):87-96.

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 Jun 27;55(13):5043-5049.

Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014 May 19;24(10):R453-462.

Schnitzler JG, Dallinga-Thie GM, Kroon J. The Role of (Modified) Lipoproteins in Vascular Function: A Duet Between Monocytes and the Endothelium. *Curr Med Chem*. 2019;26(9):1594-1609.

Seidita A, Soresi M, Giannitrapani L, Di Stefano V, Citarrella R, Mirarchi L, Cusimano A, Augello G, Carroccio A, Iovanna JL, Cervello M. The clinical impact of an extra virgin olive oil enriched mediterranean diet on metabolic syndrome: Lights and shadows of a nutraceutical approach. *Front Nutr*. 2022 Aug 4;9:980429.

Sen P, Demirdal T, Emir B. Meta-analysis of risk factors for amputation in diabetic foot infections. *Diabetes Metab Res Rev*. 2019 Oct;35(7):e3165.

Sheng CS, Miao Y, Ding L, Cheng Y, Wang D, Yang Y, Tian J. Prognostic significance of visit-to-visit variability, and maximum and minimum LDL cholesterol in diabetes mellitus. *Lipids Health Dis.* 2022 Feb 10;21(1):19.

Shi YJ, Sun LL, Ji X, Shi R, Xu F, Gu JH. Neuroprotective effects of oleanolic acid against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Exp Neurol.* 2021 Sep;343:113785.

Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes.* 2017 May;9(5):434-449.

Shichiri M, Kishikawa H, Ohkubo Y, Wake N. Long-term results of the Kumamoto Study on optimal diabetes control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2000 Apr;23 Suppl 2:B21-9.

Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, Murphy MP, Yamamoto M, Winterbourn C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Jul;23(7):499-515.

Silva P, Rodríguez-Pérez M, Gómez-Torres Ó, Burgos-Ramos E. Olive oil and wine as source of multi-target agents in the prevention of Alzheimer disease. *Nutr Res Rev.* 2023 Jun;36(1):140-154.

Silva-Rodrigues T, de-Souza-Ferreira E, Machado CM, Cabral-Braga B, Rodrigues-Ferreira C, Galina A. Hyperglycemia in a type 1 Diabetes Mellitus model causes a shift in mitochondria coupled-glucose phosphorylation and redox metabolism in rat brain. *Free Radic Biol Med.* 2020 Nov 20;160:796-806.

Singh LP, Cheng DW, Kowluru R, Levi E, Jiang Y. Hexosamine induction of oxidative stress, hypertrophy and laminin expression in renal mesangial cells: effect of the antioxidant alpha-lipoic acid. *Cell Biochem Funct.* 2007 Sep-Oct;25(5):537-550.

Singh A, Kukal S, Kanojia N, Singh M, Saso L, Kukreti S, Kukreti R. Lipid mediated brain disorders: A perspective. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2023 Aug;167:106737.

Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, Gachet C, Conley PB, Goodman SG, Roe MT, Kuliopulos A, Moliterno DJ, French PA, Steinhubl SR, Becker RC; 2008 Platelet Colloquium Participants. G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Apr;29(4):449-457.

Soares CLR, Wilairatana P, Silva LR, Moreira PS, Vilar Barbosa NMM, da Silva PR, Coutinho HDM, de Menezes IRA, Felipe CFB. Biochemical aspects of the inflammatory process: A narrative review. *Biomed Pharmacother.* 2023 Oct 26;168:115764.

Sun B, Luo Z, Zhou J. Comprehensive elaboration of glycemic variability in diabetic macrovascular and microvascular complications. *Cardiovasc Diabetol.* 2021 Jan 7;20(1):9.

Tejada S, Pinya S, Del Mar Bibiloni M, Tur JA, Pons A, Sureda A. Cardioprotective Effects of the Polyphenol Hydroxytyrosol from Olive Oil. *Curr Drug Targets*. 2017;18(13):1477-1486.

Torné L MAM. Neuropatía diabética. In: *Complicaciones Crónicas de la Diabetes Mellitus Formación de Postgrado Universidad de Barcelona*. Barcelona. 2019

Ueki K, Sasako T, Okazaki Y, Miyake K, Nangaku M, Ohashi Y, Noda M, Kadowaki T; J-DOIT3 Study Group. Multifactorial intervention has a significant effect on diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2021 Jan;99(1):256-266.

Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis*. 2018 Jun;71(6):884-895.

Valle-Hita C, Díaz-López A, Becerra-Tomás N, Martínez-González MA, Ruiz-García V, Corella D, Goday A, Martínez JA, Alonso-Gómez AM, Wärnberg J, Vioque J, Romaguera D, López-Miranda J, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Serra-Majem L, Cano-Ibáñez N, Tur JA, Rubín-García M, Pintó X, Delgado-Rodríguez M, Matía-Martín P, Vidal J, Mas-Fontao S, Daimiel L, Ros E, Toledo E, Sorlí JV, Roca C, Abete I, Moreno-Rodríguez A, Crespo-Oliva E, Candela-García I, Morey M, García-Rios A, Casas R, Fernández-García JC, Santos-Lozano JM, Diez-Espino J, Ortega-Azorín C, Comas M, Zulet MA, Sorto-Sánchez C, Ruiz-Canela M, Fitó M, Salas-Salvadó J, Babio N. Prospective associations between a priori dietary patterns adherence and kidney function in an elderly Mediterranean population at high cardiovascular risk. *Eur J Nutr*. 2022 Sep;61(6):3095-3108.

Vieira-Potter VJ, Karamichos D, Lee DJ. Ocular Complications of Diabetes and Therapeutic Approaches. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3801570.

Vijakumaran U, Shanmugam J, Heng JW, Azman SS, Yazid MD, Haizum Abdullah NA, Sulaiman N. Effects of Hydroxytyrosol in Endothelial Functioning: A Comprehensive Review. *Molecules*. 2023 Feb 16;28(4):1861.

Walther J, Kirsch EM, Hellwig L, Schmerbeck SS, Holloway PM, Buchan AM, Mergenthaler P. Reinventing the Penumbra - the Emerging Clockwork of a Multi-modal Mechanistic Paradigm. *Transl Stroke Res*. 2023 Oct;14(5):643-666.

Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 17;2:16012.

Xu L, Sun H. Pharmacological manipulation of brain glycogenolysis as a therapeutic approach to cerebral ischemia. *Mini Rev Med Chem*. 2010 Oct;10(12):1188-1193.

Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X, Luo S, Li Z, Liu P, Han J, Harding IC, Ebong EE, Cameron SJ, Stewart AG, Weng J. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacol Rev*. 2021 Jul;73(3):924-967.

Yang M, Huo X, Miao Z, Wang Y. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Inhibitor Tirofiban in Acute Ischemic Stroke. *Drugs*. 2019 Apr;79(5):515-529.

Yang Z, Tan TE, Shao Y, Wong TY, Li X. Classification of diabetic retinopathy: Past, present and future. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Dec 16;13:1079217.

Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, Yuan Q, Yu H, Xu W, Xie X. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol*. 2019 Jan;20:247-260.

Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9060143.

Zhang J. Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Rev Cardiovasc Med*. 2022 Feb 22;23(2):73.

Zhang X, Sivaprasad S, Ting DSW. Editorial: Ocular complications associated with diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Apr 3;14:1193522.

Zheng A, Li H, Xu J, Cao K, Li H, Pu W, Yang Z, Peng Y, Long J, Liu J, Feng Z. Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of db/db mice: role of AMP-activated protein kinase activation. *Br J Nutr*. 2015 Jun 14;113(11):1667-1676.

Zhou Y, Khan H, Xiao J, Cheang WS. Effects of Arachidonic Acid Metabolites on Cardiovascular Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 6;22(21):12029.

ANEXOS



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

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





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Vicerrectorado de Investigación y Transferencia
Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga
(CEUMA)

INFORME Nº: 69
ANEXO VIII

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

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

DECLARA:

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

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

2. Que tiene una duración de:

3 Años

36 Meses

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

Apellidos: González Correa

Nombre: Jose Antonio

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

Fecha acreditación: (26/07/2006)

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

Bulevard Louis Pasteur, 32

29010 Málaga. MÁLAGA

Tel.:

Correo E.:



Pabellón de Gobierno, planta 3ª. Campus El Ejido. 29071. Tel.: 952 13 42 04
E-mail: ceuma@uma.es

Página 1 | 4





INFORME Nº: 69

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

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

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

Reunión 37ª del 12/05/2018

Acta Nº 37 del 12/05/2018

Y

Reunión 40ª del 31/08/2018

Acta Nº 40 del 31/08/2018

Nº expediente 31-2018-A

6. Que el proceso de evaluación ha sido transparente, se ha realizado de modo imparcial, pudiendo integrar la opinión de partes independientes (según el apartado 3 del artículo 34 del RD 53/2013).

7. Que ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.

8. Que basándose en la documentación presentada por el investigador responsable se ha realizado la siguiente EVALUACIÓN:

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

Favorable

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

Favorable





INFORME N°: 69

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

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

Evaluación: **Favorable**

Clasificación: Moderado

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

Favorable

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

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

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

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

Motivación de la evaluación retrospectiva:

No procede

Resultado:

X No

Periodo de realización (en caso afirmativo): No procede

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

No procede





INFORME Nº: 69

CONFIRMO:

1. Que el proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación del mismo.

2. Que el proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, por lo anteriormente expuesto, se clasifica como:

Proyecto Tipo II

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

FAVORABLE

OBSERVACIONES:

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

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

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





INFORME CEUMA Nº 460

ANEXO IX

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

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

DECLARA:

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

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

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

Investigador responsable: D. Jose Antonio González Correa.

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

3 Años

36 Meses

3. Que se llevará a cabo por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 del RD 53/2013 bajo supervisión responsable.

4. Que se realiza en un centro usuario autorizado, salvo autorización del órgano competente.

5. Que se realizará de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

6. Que se tomarán las medidas adecuadas para minimizar el sufrimiento animal una vez conseguida la finalidad de los procedimientos.

7. Que ha sido revisado de acuerdo a la normativa vigente.

8. Que el centro donde se lleva a cabo el proyecto posee programas de aclimatación y aprendizaje adecuados para los animales según los procedimientos y la duración del proyecto.





INFORME CEUMA Nº 460

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

Reunión 37ª del 12/05/2018

Acta Nº 37 del 12/05/2018

Y

Reunión 40ª del 31/08/2018

Acta Nº 40 del 31/08/2018

10. Que basándose en las declaraciones anteriormente expuestas

CONFIRMO:

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

FAVORABLE

OBSERVACIONES:

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

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

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



JUNTA DE ANDALUCÍA

S A L I D A	JUNTA DE ANDALUCÍA C. AGRICOL., GANAD., PESCA Y D.E.
	201999900478818 - 15/07/2019
	Registro Asesor SV. SANIDAD ANIMAL SEVILLA

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

Fecha: 11/07/2019

Ref.: SSA/SIS/MD/jv

Asunto: Rem. Resolución
experimentación.

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

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

JEFE DEL SERVICIO DE SANIDAD ANIMAL.

Fdo: Manuel Fernández Morente.



Tabletilla, s/l
Teléfono 95 5032000
41071 - Sevilla

Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	MANUEL FERNANDEZ MORENTE	FECHA	12/07/2019
ID. FIRMA	640xu765PFIRMA0v0&np1g16+Nf:z2D	PÁGINA	1/1

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

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

ANTECEDENTES DE HECHO

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

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

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

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

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

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

FUNDAMENTOS DE DERECHO

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

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

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

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



Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://es050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/ Código:640xu691PFIRMA16P//EuaES+Qd6Kx.			
FIRMADO POR	MANUEL GOMEZ GALERA	FECHA	10/07/2019
ID. FIRMA	640xu691PFIRMA16P//EuaES+Qd6Kx	PÁGINA	1/3



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

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

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

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

RESUELVO

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

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

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

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

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

EL DIRECTOR GENERAL

Fdo.: Manuel Gómez Galera.



Código:640xu691PFIRMA16P//EuaES+0d6Kx			
Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	MANUEL GOMEZ GALERA	FECHA	10/07/2019
ID. FIRMA	640xu691PFIRMA16P//EuaES+0d6Kx	PÁGINA	3/3



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

Esta investigación ha sido financiada por:

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



ANEXO III: Autorización para el uso de figuras e imágenes.

A quien corresponda,

Yo, Inmaculada Pérez de Algaba Fuentes, con DNI número _____, FEA de Análisis Clínicos del Hospital Público de Montilla, distrito Sanitario Área Sanitaria Sur de Córdoba del Servicio Andaluz de Salud, autorizo a D^a Laura Iserte Terrer para utilizar la Figura 1.17. (Esquema de las tres fases del proceso de isquemia-reperusión cerebral) en el documento que elabora como memoria de Tesis Doctoral. La citada figura aparece en mi tesis doctoral titulada: Estudio del efecto neuroprotector de la asociación de polifenoles del aceite de oliva virgen extra, elaborada bajo la dirección de los profesores José Antonio González Correa y José Pedro de la Cruz Cortés, e inscrita en el Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud de la Universidad de Málaga (defendida el 21 de septiembre de 2023, disponible en el repositorio RIUMA).

En Málaga a 28 de agosto de 2024



ANEXO IV: Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral.

JP de la Cruz, L Iserte Terrer, MD Rodríguez Pérez, L Ortega Hombrados, A Sánchez Tévar, MM Arrebola Ramírez, A Fernández Prior, C Verdugo Cabello, JA Espejo Calvo, JA González Correa. Effects of Some Olive Fruits-Derived Products on Oxidative Stress and Cardiovascular Biomarkers on Experimental Diabetes Mellitus. *Antioxidants* 2024, 13, 1127. <https://doi.org/10.3390/antiox13091127>



Article

Effects of Some Olive Fruits-Derived Products on Oxidative Stress and Cardiovascular Biomarkers on Experimental Diabetes Mellitus

José Pedro De La Cruz ¹, Laura Iserte-Terrer ¹, María Dolores Rodríguez-Pérez ^{1,*}, Laura Ortega-Hombrados ¹, Ana María Sánchez-Tévar ¹, María Monsalud Arrebola-Ramírez ², María África Fernández-Prior ³, Cristina Verdugo-Cabello ¹, Juan Antonio Espejo-Calvo ⁴ and José Antonio González-Corra ¹

- ¹ Departamento de Farmacología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina—IBIMA Plataforma BIONAND, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29590 Málaga, Spain; jpcruz@uma.es (J.P.D.L.C.); laura.iserte@uma.es (L.I.-T.); hombrados@uma.es (L.O.-H.); amstevar@uma.es (A.M.S.-T.); cristinaverdugocabello@uma.es (C.V.-C.); correa@uma.es (J.A.G.-C.)
- ² UGC Laboratorio Clínico, Hospital de la Axarquía, AGSEMA, 29740 Málaga, Spain; mariam.arrebola.sspa@juntadeandalucia.es
- ³ Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de la Grasa, 41013 Sevilla, Spain; mafprior@ig.csic.es
- ⁴ Tecnofood I+D+i Soluciones S.L., Instituto para la Calidad y Seguridad Alimentaria (ICSA), 18320 Granada, Spain; jaespejo@hotmail.com
- * Correspondence: loladoc@uma.es



Citation: De La Cruz, J.P.; Iserte-Terrer, L.; Rodríguez-Pérez, M.D.; Ortega-Hombrados, L.; Sánchez-Tévar, A.M.; Arrebola-Ramírez, M.M.; Fernández-Prior, M.Á.; Verdugo-Cabello, C.; Espejo-Calvo, J.A.; González-Corra, J.A. Effects of Some Olive Fruits-Derived Products on Oxidative Stress and Cardiovascular Biomarkers on Experimental Diabetes Mellitus. *Antioxidants* **2024**, *13*, 1127. <https://doi.org/10.3390/antiox13091127>

Academic Editor: Evangelos Zoidis

Received: 7 August 2024

Revised: 9 September 2024

Accepted: 16 September 2024

Published: 18 September 2024



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

Abstract: The aim of this study is to assess the possible effect of olive seed oil (OSO) and destoned and dehydrated olive oil (DDOO), in comparison with extra-virgin olive oil (EVOO), on some cardiovascular biomarkers in an experimental model of diabetes mellitus. Diabetic animals showed evident alterations in biomarkers involved in the evolution of diabetic vasculopathy, marked by increases in biomarkers that favor vascular damage, which was between 1.5 and five times as many as those in non-diabetic animals, and a smaller number of biomarkers that protect against such damage (25–75% less than in healthy controls) was observed. The three oils administered decreased the concentration of biomarkers of vascular damage (35–45% in the serum lipid profile, 15–40% in early biomarkers of vascular inflammation and 20–60% in platelet aggregation and in thromboxane/prostacyclin imbalance). The greatest effect was by the antioxidant, both in the inhibition of lipid peroxidation and in the increase of glutathione. DDOO showed a significantly greater effect on oxidative stress and on thromboxane/prostacyclin imbalance than those shown by OSO and EVOO. This greater effect may possibly be explained by its higher triterpenoid content (913 mg/kg, compared to 113 mg/kg in OSO and 75 mg/kg in EVOO). We conclude, in the light of the results of this study, that these oils meet two basic conditions: they could improve the yield of the olive industry, and they equal, and may even increase, the beneficial effects of EVOO on cardiovascular disease.

Keywords: olive oil; diabetes mellitus; vascular complications; oxidative stress

1. Introduction

Olive oil is the main product obtained from olives, and its production and marketing are the mainstay of the olive sector. The production and quality of olive oil have improved in recent decades with the development of whole-olive—including the stone—milling procedures in continuous centrifuges (two and three phases) that have replaced the traditional pressing process [1].

The main environmental and economic problem is the enormous number of by-products that originate in the production of oil. Approximately 5 kg of olives generate 1 L



