



Programa de Doctorado en CIENCIAS DE LA SALUD

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

Efecto sinérgico del 3',4'-dihidroxifenilglicol e hidroxitirosol sobre el estrés oxidativo, nitrosativo y biomarcadores cardiovasculares en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1

Leticia Vallejo Carmona

Málaga, marzo 2022

DIRECTORES:

José Antonio González Correa y José Pedro de la Cruz Cortés



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Leticia Vallejo Carmona

 <https://orcid.org/0000-0001-9601-4906>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

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

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

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



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

D./Dña LETICIA VALLEJO CARMONA

Estudiante del programa de doctorado CIENCIAS DE LA SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: EFECTO SINÉRGICO DEL 3',4'-DIHIDROXIFENILGLICOL E HIDROXITIROSOL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO Y BIOMARCADORES CARDIOVASCULARES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

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

DECLARO QUE:

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

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

En Málaga, a 07 de MARZO de 2022

 Fdo.: LETICIA VALLEJO CARMONA Doctorando/a	 Fdo.: MARÍA ROSA IGLESIAS PARRA Tutor/a
 Fdo.: JOSE ANTONIO GONZÁLEZ CORREA Y JOSÉ PEDRO DE LA CRUZ CORTÉS Director/es de tesis	





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA. Departamento de Farmacología y Pediatría

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

CERTIFICAN:

Que Dña. LETICIA VALLEJO CARMONA ha obtenido y estudiado personalmente bajo
nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral, titulada:
“Efecto sinérgico del 3’,4’-dihidroxifenilglicol e hidroxitirosol sobre el estrés oxidativo,
nitrosativo y biomarcadores cardiovasculares en un modelo experimental de diabetes
mellitus tipo 1”, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que la
suscriben revisado su tesis y estando conformes para ser juzgada; y que la publicación
que avala la misma no ha sido utilizada en Tesis anteriores.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente
certificado en Málaga, a 07 de marzo de 2022.



J.A. González Correa



J.P. de la Cruz Cortés

En estas líneas quiero mostrar mi agradecimiento a las personas que de una u otra forma me han ayudado a crecer como persona, ciudadana e investigadora y han contribuido a hacer posible este proyecto de investigación.

A Dios por permitirme el privilegio de estar viva, saludable y bendecida, para realizar esta etapa de mi vida

A los Doctores y preceptores el **Dr. José Antonio González Correa** y el **Dr. José Pedro de la Cruz Cortes**, por su apoyo incondicional, por guiarme con paciencia en este proceso de aprendizaje. Por estar siempre cerca, por enseñarme lo que es el trabajo bien realizado, la profesionalidad y la calidad personal. Gracias por acogerme en el Departamento de Farmacología como si fuera de la casa. A la **Dra. María Dolores Rodríguez Pérez**, por su ayuda, mentoría incondicional y por llevarme de la mano en todo el proceso.

Agradezco a mi familia, sobre todo mis hijos **Javier Brunet- Vallejo**, **Brett Brunet-Vallejo** y **Bryan Brunet Vallejo**, mis hijastros, **Virgilio Brunet Rodríguez** y **Héctor Brunet Rodríguez**, mis hermanos y cuñadas, **José M. Vallejo**, **Héctor m. Vallejo**, **Sonia Colon** y **Shirley Rodríguez** por su apoyo incondicional y soportarme en los momentos buenos y no tan buenos. A mis amigos, compañeros y hermanos incondicionales, el **Dr. Joaquín Reyes**, **Jan González**, **Esther Carro (mi mano derecha)**, **Aiken Nelson**, **Jeany Marie**, **Tatiana**, **Andrea**, **Glenda**, **Robert**, **Angelica**, **Ida**, **Genny**, **Juana (Belky)**, la **Dra. Lourdes Maldonado**, el **Dr. Carlos Padín** y la **Dra. Vionette Sánchez** por el gran apoyo incondicional y nunca dejarme caer cuando más los necesite. A **José Martínez** y su familia por su amor, cariño y apoyo incondicional.

Gracias a cada persona que sembró en mi la semilla del amor por lo que soy y lo que hago con mis pacientes cada día, en especial a la memoria de mi difunto esposo y maestro **Virgilio Brunet Cardona**, que siempre creyó en mí, en mi potencial y me lo recordó todos los días durante 22 años, sé que donde quieras que estés celebras mis logros.

A uno y cada uno de ustedes..... GRACIAS.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Conceptos generales sobre la diabetes mellitus	1
1.2. Complicaciones de la diabetes mellitus	3
1.3. Mecanismos generales de daño vascular en la diabetes mellitus	7
1.4. Esquema fisiopatológico de la macroangiopatía diabética	12
1.5. Aspectos generales del estrés oxidativo	17
1.6. Dieta mediterránea como fuente de compuestos antioxidantes	19
1.7. Aceite de oliva virgen extra como fuente de polifenoles	22
1.8. Hidroxitirosol y enfermedad cardiovascular	26
1.9. Planteamiento general del tema de investigación, justificación e hipótesis de estudio	30
2. Objetivos	33
3. Metodología	35
3.1. Material	35
3.2. Diseño del estudio	36
3.3. Técnicas analíticas	39
3.3.1. Muestras	39
3.3.2. Bioquímica sérica	39
3.3.3. Agregometría plaquetaria	40
3.3.4. Concentración de eicosanoides en orina	40
3.3.5. Estrés oxidativo y nitrosativo	41
3.3.6. Otros biomarcadores cardiovasculares	42
3.3.7. Análisis morfométrico aórtico	42
3.4. Análisis estadístico	44
4. Resultados	45
4.1. Resultados de las variables zoométricas	45
4.2. Resultados de las variables metabólicas	49
4.3. Resultados de las variables de estrés oxidativo y nitrosativo	53
4.4. Resultados de las variables cardiovasculares	59
4.5. Resultados de las variables morfométricas de la pared aórtica	65
5. Discusión	69

6. Conclusiones	77
7. Bibliografía	79
8. Anexos	97



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. CONCEPTOS GENERALES SOBRE LA DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es la enfermedad endocrina predominante en los países desarrollados, ya sea como entidad propia o integrando el cada vez más prevalente síndrome metabólico. La evolución de la diabetes mellitus contempla dos aspectos fundamentales: el propio proceso metabólico, sobre todo en cuanto a los daños producidos por incrementos manifiestos de los niveles de glucemia (coma hiperosmolar, cetoacidosis metabólica), y las complicaciones a largo plazo que una hiperglucemia mantenida puede ocasionar en distintos tejidos, principalmente a nivel cardiovascular y por ende, a los tejidos irrigados por los vasos sanguíneos.

Clásicamente se define a la diabetes mellitus como “un estado crónico de hiperglucemia que a veces se acompaña de síntomas (sed intensa, orina profusa, adelgazamiento, estupor, coma y muerte en ausencia de tratamiento efectivo); aunque a menudo estos síntomas son menos severos o faltan”. Este estado hiperglucémico se debe fundamentalmente a dos posibles mecanismos, no excluyentes entre sí, y que definen los dos grandes tipos de cuadros clínicos diabéticos:

- Una parte de los enfermos que padecen diabetes mellitus (5-7%), debido a un proceso estrictamente autoinmune, sufren una pérdida de las células beta de los islotes de Langerhans, por lo que dejan de producir insulina. Al faltar la principal hormona hipoglucemiante del organismo, toman más protagonismo las distintas vías hiperglucemiantes fisiológicas, por lo que el resultado final es un estado de hiperglucemia mantenida. Se define a este estado metabólico como DIABETES MELLITUS TIPO 1.

- Otra parte de enfermos que padecen diabetes mellitus, la gran mayoría (90-95%) producen insulina adecuadamente, pero el problema se encuentra en los tejidos donde esta ejerce sus efectos hipoglucemiantes: estos reducen su sensibilidad a la hormona, por lo que no puede ejercer sus acciones destinadas a reducir los niveles sanguíneos de glucosa, es decir, se produce una resistencia a la insulina, a pesar de existir niveles incluso superiores a lo fisiológico. Se define a este estado metabólico como DIABETES MELLITUS TIPO 2.

También es preciso considerar algunos tipos de diabetes mellitus, más marginales en cuanto a prevalencia, como son los estados pre-diabéticos o la diabetes gestacional. También hay que considerar a la diabetes mellitus tipo MODY, que es una diabetes de la edad madura que se presenta en el joven, es decir, pacientes que por su edad tenderían a padecer la tipo 1, pero que se identifica en ellos la tipo 2; la hiperglucemia en estos pacientes suele ser más moderada que en la tipo 1 o 2, pero de evolución más inconstante. A pesar de ello, estos tipos constituyen en su conjunto un 5-6% del total de pacientes diabéticos.

Un reciente estudio (Rojo-Martínez et al., 2020) ha estimado la incidencia de diabetes, ajustada por edad, sexo y forma de detección de la diabetes, en 11,6 casos/1.000 personas-año. Esto quiere decir que cada año aparecen alrededor de 386.000 nuevos casos de diabetes en la población adulta; los principales factores de riesgo que se han identificado asociados al desarrollo de diabetes son la presencia de prediabetes, la edad, el sexo masculino, la obesidad central, el incremento de peso y la historia familiar de diabetes.

Respecto a los datos de prevalencia en España, la Base de Datos Clínicos de Atención Primaria (2020) estableció que, en 2020, 3.07 millones de españoles padecían alguno de los tipos de diabetes mellitus, es decir, el 6.8% de la población total (7.5% en hombres y 6.8% en mujeres); el 3.4% de los pacientes padecían diabetes mellitus tipo 1 y el 96.6% el tipo 2. Otros países, como EEUU, ofrecen cifras de prevalencia del 10% de la población, padeciendo el tipo 2 el 98% de los pacientes (aproximadamente 31.4 millones de habitantes).

Por último, la mortalidad a causa de la diabetes mellitus va inherentemente ligada a sus complicaciones cardiovasculares. Así, el Instituto Nacional de Estadística (2020) recogió la cifra de 119.853 muertes en 2020 por enfermedad cardiovascular (24.3% del total de muertes), estando diagnosticados de diabetes mellitus el 85% de los fallecidos por esta causa. Estas cifras fueron un 17.1% mayores que las recogidas en 2019. Por lo tanto, es importante conocer estas complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus, además de por la incidencia y prevalencia de las mismas, por la alta tasa de mortalidad que presentan.

1.2. COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

Un mantenimiento de cifras de hiperglucemia en el tiempo afecta a diversos órganos y sistemas, pero en todos los casos pasan por una afectación del sistema vascular, independientemente de una afectación tisular directa que agrava aún más el proceso. En términos generales, esta afectación va a depender del tipo de control de la glucemia que realice el paciente, ya que un muy buen control puede evitar al máximo la aparición de algunas o todas estas complicaciones. No obstante, la realidad es bien distinta, ya que este exhaustivo control debe realizarse a diario y durante toda la vida; por ese motivo, se calcula que a partir de los 10-15 años de evolución de la diabetes, el 75-80% de los pacientes presentan alguna de estas complicaciones, en mayor o menor medida de intensidad.

Se distinguen dos grandes tipos de vasculopatías como complicación crónica de la diabetes mellitus.

a) MACROANGIOPATÍA DIABÉTICA.

Consiste en la afectación de los grandes vasos sanguíneos y no difiere en nada de la enfermedad cardiovascular estándar, es decir la que acontece independientemente del factor de riesgo que la promueva. Es decir, la diabetes mellitus actúa como un potenciador de la aparición de la inflamación vascular y la arteriosclerosis, de ahí que la consecuencia final sea un proceso isquémico trombótico, fundamentalmente a nivel coronario (síndrome coronario agudo), cerebral (ictus isquémico) y/o periférico (claudicación intermitente).

En términos generales, la diabetes mellitus tipo 2 es subsidiaria de presentar en su evolución algún tipo de macroangiopatía, en mayor medida que el tipo 1. Se calcula que la diabetes, independientemente del resto de factores de riesgo que habitualmente van asociados (hipertensión, hipercolesterolemia, obesidad, etc.) incrementa en 2-4 veces la posibilidad de aparición de un síndrome coronario agudo, ictus cerebral isquémico o muerte por causa cardiovascular (Green, 2014).

b) MICROANGIOPATÍA DIABÉTICA

Afecta a los pequeños vasos arteriales y capilares, aparece con mayor frecuencia en la diabetes mellitus tipo 1. Está ligada a un buen control de la glucemia, dependiendo su

aparición más o menos tardía y más o menos intensa, a dicho control. Es un proceso patognomónico de diabetes mellitus y afecta principalmente a tres sistemas orgánicos:

- Neuropatía diabética

Se denomina también neuropatía periférica diabética. Es un grupo de trastornos con fisiopatología muy complicada que interrumpe los sistemas nerviosos somático y autónomo (Singh et al., 2014). Consiste en una polineuropatía sensitivo-motora simétrica causada por cambios metabólicos y microvasculares vinculados a la hiperglucemia crónica y factores de riesgo cardiovascular (Tsfaye, 2011).

Afecta tanto a diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. Los síntomas más frecuentes son: dolor, parestesia y la pérdida sensorial, si bien es asintomática casi en el 50% de los casos (Tsfaye, 2011). Afectan a casi el 50 % de los pacientes diabéticos tipo 2 y es causa de una disminución más o menos intensa de la calidad de vida de quien la padece.

La neuropatía diabética se clasifica en dos tipos: neuropatía focal y neuropatía difusa. A diferencia de la neuropatía focal, que es poco común, la polineuropatía sensoriomotora y la neuropatía autonómica diabética (ambas de carácter difuso), son mucho más comunes y típicamente progresivas (Kaur et al., 2014).

La base fisiopatológica de la neuropatía diabética se centra en anomalías vasculares inducidas por hipoxia, como el engrosamiento de la membrana basal de los capilares y la hiperplasia endotelial. Obviamente, estas lesiones son debidas a una hiperglucemia crónica, que produce una hiperactividad de la vía de los polioles, lo que da como resultado una disminución del mioinositol (Yan, 2018), la vía de los AGE (Simran et al., 2019), la vía de la diacilglicerol-proteínquinasa C (DAG/PKC), así como la vía de la hexosamina, lo que conduce a un estado de estrés oxidativo que resulta en daño neuronal y una reducción del flujo sanguíneo neuronal (Singh et al., 2020).

- Retinopatía diabética

Es la microangiopatía más frecuente en la población diabética. Si bien es más frecuente en la diabetes mellitus tipo 1, aparece en ambos tipos, si bien con características algo distintas.

La retinopatía diabética es la causa directa más frecuente de ceguera en el mundo desarrollado (Forbes & Cooper, 2013). Los pacientes con retinopatía diabética grave tienen una calidad de vida reducida, así como un bienestar físico, mental y social disminuido, lo que requiere el uso de numerosos recursos sanitarios (Fenwick et al., 2011). Alrededor de 28 millones de personas en todo el mundo sufren de retinopatía que amenaza la vista, 93 millones sufren de retinopatía diabética, 21 millones sufren de edema macular diabético y 17 millones sufren de retinopatía proliferativa (Wong et al., 2066), lo que convierte a la retinopatía diabética en un importante problema económico y de salud pública mundial.

Las formas más frecuentes de lesión retiniana condicionan el tipo de retinopatía clínica.

- Retinopatía diabética no proliferativa, con etapas leve, moderada y grave. Se caracteriza por la aparición de microaneurismas, microangiopatía capilar, hemorragias parenquimatosas, engrosamiento de la membrana basal, lesiones microvasculares, exudados duros y anomalías venosas.
- Retinopatía diabética proliferativa. Es la etapa avanzada de la retinopatía diabética; se asocia a neovascularización, hemorragias prerretinianas o vítreas, desprendimiento de retina y proliferación fibrovascular (Wong et al., 2008).

La diabetes prolongada, la hiperglucemia crónica y la hipertensión son los tres aspectos principales favorecedores de la retinopatía diabética (Cheung et al., 2010).

La respuesta inflamatoria de la vasculatura retiniana puede ser causada por una variedad de estímulos, que incluyen: hiperglucemia, altas concentraciones de citocinas y quimiocinas circulantes o vítreas, factores de crecimiento, AGE y especies reactivas de oxígeno (Al-Kharashi et al., 2018; Santiago et al., 2018). Por lo tanto, la evidencia respalda que la inflamación crónica es un factor crucial en el desarrollo de la retinopatía diabética, particularmente en sus primeras etapas (Shafabakhsh et al., 2019).

Al igual que en la neuropatía diabética, la hiperglucemia crónica aumenta el estrés oxidativo al aumentar los AGE, la producción y activación de PKC y el aumento de la vía de los polioles y vías de hexosamina (Tarr et al., 2013). Aumento del estrés oxidativo, combinado con niveles reducidos de glutatión (GSH), induce la producción de mediadores inflamatorios, la ruptura de la barrera hematorretiniana, la muerte de los pericitos y, por lo tanto, el aumento de la permeabilidad vascular.

Además, el aumento del estrés oxidativo altera la retina diabética a través de la peroxidación lipídica severa, daño oxidativo del ADN, oxidación de proteínas, inducción de inflamación y aumenta la expresión de factores de crecimiento como VEGF (Kowluru & Chan, 2013).

Se ha demostrado que la hipoxia retiniana estimula la producción de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento proangiogénicos en la retinopatía diabética. Esto contribuye al desarrollo de la enfermedad al promover el crecimiento descontrolado de nuevos vasos sanguíneos, el aumento de la permeabilidad vascular y la pérdida de células de la retina (Arden & Sivaprasad, 2011).

- Nefropatía diabética

Es una pérdida parcial de la función renal asociada con síndrome nefrótico, glomérulo esclerosis, albuminuria crónica, tasa de filtración glomerular reducida, hipertensión y retención de líquidos (Blickle et al., 2007). Clínicamente, la nefropatía diabética se asocia con albuminuria elevada (>300 mg/día), validada al menos dos veces, con 3 a 6 meses de diferencia. Alrededor del 20-40% de las personas con diabetes corren el riesgo de sufrir insuficiencia renal.

En los seres humanos, la albuminuria diabética se asocia con el desarrollo de características histopatológicas distintivas, incluido el engrosamiento de la membrana basal glomerular y la expansión mesangial. La progresión de la albuminuria y la insuficiencia renal conduce a la esclerosis del glomérulo, la hialinosis arteriolar y la fibrosis tubulointersticial (Mauer et al., 1992).

La nefropatía diabética progresa a través de cinco etapas (Mogensen, 1999):

- Etapa I: hiperfiltración hipertrófica.
- Etapa II: quietud fisiopatológica.
- Etapa III: microalbuminuria.
- Etapa IV: insuficiencia renal crónica.
- Etapa V: insuficiencia renal terminal.

Se establece que el 20-30% de los pacientes con diabetes mellitus de aproximadamente 15 años de evolución, presentan microalbuminuria y casi la mitad de ellos desarrollan una

nefropatía real. Después de 20 años de evolución de la diabetes, aproximadamente la mitad de los pacientes desarrollan nefropatía y el 15% de ellos evolucionan hacia una etapa terminal de insuficiencia renal.

La hiperglucemia crónica induce las mismas vías bioquímicas citadas en la neuropatía y retinopatía diabética. La activación de múltiples cascadas de transducción de señales conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios y profibróticos, lo que cambia la hemodinámica intrarrenal. Estos factores contribuyen al cambio en la estructura y las funciones del riñón, como la alteración de la permeabilidad glomerular, la hiperfiltración glomerular, el engrosamiento de la membrana basal glomerular, la síntesis de matriz mesangial y, en última instancia, provocan la esclerosis del glomérulo y la fibrosis intersticial, que dan como resultado la apoptosis, pérdida de podocitos y disminución de la fracción de filtrado glomerular (Sagoo & Gnudi, 2020).

1.3. MECANISMOS GENERALES DE DAÑO VASCULAR EN LA DIABETES MELLITUS

Desde un punto de vista didáctico, podemos establecer diversas etapas en el desarrollo de cualquiera de los tipos de vasculopatía diabética, las cuales son progresivas, es decir, una lleva a la siguiente, lo cual nos lleva a considerar un hecho evidente: si se frena o bloquea una de ellas, se retrasa, evita o alivia la siguiente. Estas etapas se adaptan mejor a la macroangiopatía, presentando muchos puntos en común con la microangiopatía, si bien esta se ve influenciada por factores propios de los órganos afectados (retina, nervios periféricos y riñón).

1.3.1. Primera etapa: cambios en las vías bioquímicas intracelulares

La hiperglucemia prolongada es claramente el elemento clave que da lugar a todas las alteraciones involucradas en el desarrollo de la vasculopatía diabética. Las altas concentraciones de glucosa en sangre conducen a cambios importantes en el metabolismo celular, entre los que destacan: activación de la vía de los polioles, activación de la vía del diacilglicerol-proteína quinasa C, estimulación del estrés oxidativo celular y cambios en la estructura y función de las macromoléculas mediante la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE) (Paul & Katare, 2020). Estas alteraciones bioquímicas explican la mayoría de las lesiones celulares que aparecen en la vasculopatía diabética, especialmente las lesiones iniciales en el endotelio de los vasos sanguíneos,

que conducen a la disfunción endotelial (Paul & Katare, 2020). Aunque estas alteraciones se describen por separado, en realidad están interrelacionadas entre sí.

Vía de los polioles

En tejidos que no requieren insulina para la captación de glucosa celular (riñón, retina, tejido nervioso y células endoteliales), la vía glucolítica se ve superada en la hiperglucemia prolongada. Esto favorece la formación de sorbitol y fructosa a través de la activación de la aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa; como resultado, la relación NADH/NAD⁺ aumenta. (Singh et al., 2021). El desequilibrio crea un ambiente pseudohipóxico de fundamental importancia para ciertas alteraciones intracelulares. La activación de la vía de los polioles se relaciona con otras alteraciones, como el aumento del estrés oxidativo celular, el aumento de la síntesis de prostaglandinas y la disminución de la producción de óxido nítrico (Federici & Lauro, 2005).

Vía del diacilglicerol-proteína quinasa C (DAG-PKC)

Los niveles altos de glucosa estimulan la síntesis de novo de DAG, un potente estimulador de la PKC (Croce & Soulage, 2013). Otras vías también contribuyen al aumento de la PKC en la diabetes, por ejemplo, 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 (Idris & Donelli, 2006).

Formación de productos finales de glicación avanzada (AGE)

La glucosa se puede unir de forma no enzimática a grupos amino libres de proteínas y lípidos, un proceso que da lugar a AGE, que pueden acumularse en las células durante períodos prolongados (Sarma & Roy, 2022). La formación de AGE se acelera en la diabetes mellitus, en proporción directa a la concentración de glucosa en sangre. La autooxidación de la glucosa y los AGE producen cantidades excesivas de radicales libres y pueden reaccionar con la matriz extracelular y una variedad de proteínas celulares, cuya función se ve alterada por lo tanto (Sarma & Roy, 2022). Además, los AGE interactúan con receptores específicos y estimulan la liberación de citocinas y la expresión de NFκB, además de liberar factores de crecimiento en el endotelio e inhibir la producción de NO (Kim et al., 2021). Otro efecto de los AGE es aumentar la sensibilidad de los vasos

sanguíneos a los radicales libres, y al daño que estos causan al ADN nuclear (Sarma & Roy, 2022).

Estrés oxidativo

Se dice que una célula sufre estrés oxidativo cuando la formación de especies reactivas al oxígeno supera la capacidad de defensa antioxidante celular. Esto puede suceder cuando se forman muchos radicales libres, cuando las defensas antioxidantes endógenas (principalmente el sistema de glutatión) están dañadas o, con mayor frecuencia, cuando ambos eventos coinciden. El exceso de glucosa conduce a la autooxidación, con la formación resultante de aniones hidroxílicos (Teshima et al., 2014). Además, casi todas las actividades antioxidantes endógenas disminuyen en la diabetes (Azul et al, 2020). La producción excesiva de radicales libres puede dañar cualquier estructura celular, incluida la membrana (peroxidación de lípidos), las proteínas (polimerización anómala) y el núcleo (ADN dañado) (Demirci-Çekiç et al, 2022). Los radicales libres también pueden reaccionar con el óxido nítrico (NO) para formar peroxinitritos, que causan incluso más daño que los aniones hidroxilo (Yoon et al., 2021). Se demostró que 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 (Sarma & Roy, 2022).

1.3.2. Segunda etapa: disfunción endotelial

Las diferentes vías bioquímicas que se alteran en la diabetes mellitus tienen un punto de interacción, el endotelio, donde provocan una alteración de sus funciones, denominándose a este hecho disfunción endotelial, que se encuentra en el centro de muchas lesiones vasculares.

El endotelio es el principal órgano antitrombótico y el principal regulador del flujo sanguíneo tisular. Cuando acontece el fenómeno de disfunción endotelial, se alteran ambas funciones, produciendo un desequilibrio en la circulación sanguínea y por ende, en los órganos irrigados por los vasos afectados.

Alteración de la función antitrombótica

Esta función del endotelio se produce debido a la liberación de sustancias antiagregantes plaquetarias (prostaciclina, ADPasa y NO), sustancias anticoagulantes (trombomodulina

y sustancias similares a la heparina) y estimuladores de la fibrinólisis (activador tisular del plasminógeno o tPA) (Neubauer & Zieger, 2021). Estas funciones están alteradas en la diabetes mellitus, y muchos estudios informaron un aumento de la activación plaquetaria en la fase plasmática de la coagulación, junto con una actividad fibrinolítica deficiente (Bryk-Wiązania & Undas, 2021; Maruhashi & Higashi, 2021). Estos cambios tienden a favorecer un estado protrombótico en los pacientes con diabetes, situación que conduce a su vez a una mayor incidencia de accidentes isquémicos en estos pacientes (Maruhashi & Higashi, 2021).

Alteración de la función de regulación alterada del flujo sanguíneo

Los mediadores vasoconstrictores endoteliales por excelencia son las endotelinas (ET). En las células endoteliales se sintetizan y liberan por la acción de múltiples factores (factores de crecimiento, citoquinas, trombina e insulina, entre otros) y son controladas negativamente por prostaciclina, NO y heparina, entre otras sustancias (Imig, 2020; Jamwal & Sharma, 2018). El subtipo ET-1 interactúa con receptores de membrana específicos en la fibra muscular lisa vascular (ETA y ETB), y esto desencadena un efecto vasoconstrictor (Angeli et al., 2021).

De los factores vasodilatadores, los que merecen más atención son la prostaciclina y el NO. Ambos mediadores se producen en la célula endotelial y tienen una vida media muy corta; sus efectos, por tanto, se sienten en las células que están en contacto directo con el endotelio. La prostaciclina se forma a partir del ácido araquidónico mediante la participación de la ciclooxygenasa, para formar endoperóxidos cíclicos, como ocurre en las plaquetas. La principal diferencia entre la síntesis de prostaciclina en las plaquetas y en el endotelio es que la primera implica la tromboxano sintetasa, que produce tromboxano A₂ (TxA₂, un potente vasoconstrictor y agregante plaquetario), mientras que la segunda implica la prostaciclina sintetasa (un potente vasodilatador y antiagregante plaquetario) (Zhou et al., 2021). Debido al origen bioquímico compartido, pero a los efectos opuestos de los dos prostanoides, se acepta que un equilibrio apropiado de tromboxano plaquetario/prostaciclina vascular es fundamental para la interacción fisiológica entre las plaquetas y la pared vascular (Mitchell et al., 2021). Además, la síntesis de eicosanoides en un ambiente rico en radicales libres de oxígeno, como ocurre en la diabetes mellitus, favorece la producción de subproductos como los isoprostanos, que tienen efectos vasoconstrictores (Imig, 2020).

El óxido nítrico se forma a partir del aminoácido L-arginina mediante la participación de la enzima NO-sintasa (NOS). Hay dos formas principales de NOS, forma constitutiva e inducible (Elfering et al., 2002). La NOS constitutiva (cNOS), que depende del calcio, forma pequeñas cantidades de NO (en el rango nanomolar) constantemente. Se han identificado dos formas diferentes de cNOS: endotelial (ecNOS) y neuronal (ncNOS). La NOS inducible (iNOS) normalmente no se expresa en células humanas, sino que se activa solo tras la estimulación por citocinas. Esta isoenzima forma NO en grandes cantidades (rango micromolar) en ráfagas (Elfering et al., 2002). Se cree que el NO producido por cNOS está involucrado en funciones fisiológicas, mientras que el producido por iNOS participa en mecanismos fisiopatológicos, especialmente cuando la concentración de radicales libres en el ambiente es alta (como ocurre en la diabetes mellitus) (Pérez-Torres et al., 2021). Esto lleva a la formación de peroxinitritos, radicales libres que son altamente dañinos para las células (Pérez-Torres et al., 2021).

Debido a que la vida media del NO es muy corta, los efectos de esta molécula se ven solo en las células más cercanas al sitio de síntesis. La prostaciclina se une a receptores de membrana específicos vinculados a una proteína G que estimula la adenilciclasa. Esto, a su vez, aumenta los niveles de AMPc en la fibra muscular lisa vascular y en las plaquetas (en el caso de la síntesis de células endoteliales). El óxido nítrico se difunde fácilmente a través de las membranas y estimula directamente la guanil ciclasa en las células del músculo liso vascular, lo que aumenta el contenido de cGMP. Los dos nucleótidos cíclicos son responsables de la vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria que se observa en respuesta a la prostaciclina y el NO (Golshiri et al., 2020).

Entre las alteraciones descritas en la diabetes se encuentran una disminución en la síntesis y el funcionamiento de la prostaciclina (Shi & Vanhoutte, 2017) y un aumento en la actividad de la iNOS (Pérez-Torres et al., 2020). Estos cambios, junto con el aumento de la producción de radicales libres (Cohen & Tong, 2010) y el aumento de la agregación plaquetaria (Nicolas et al., 2021), conducen a un entorno vascular que favorece la reducción del flujo sanguíneo tisular y la tendencia a la formación de trombosis intravasculares (Nicolas et al., 2021).

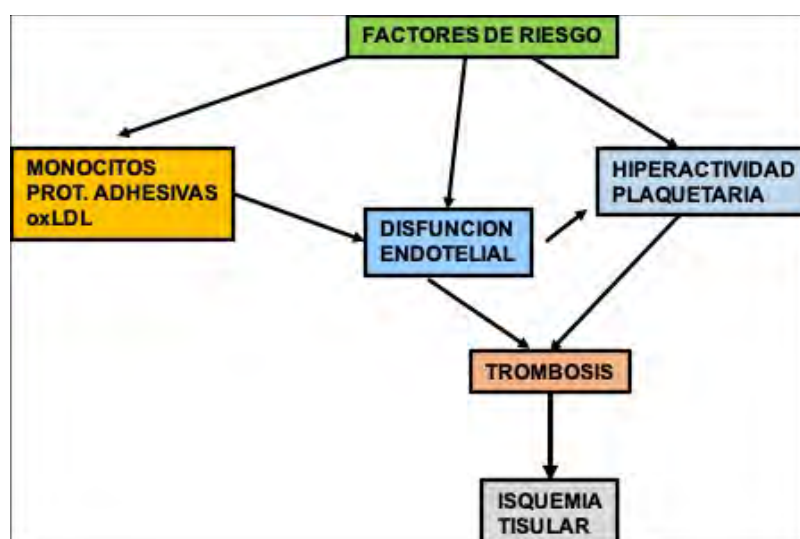
1.3.3. Tercera etapa: fallo de la función vascular

La disfunción endotelial, conduce a una función antitrombótica deficiente (prostaciclina, NO, tPA), junto con la estimulación de la función plaquetaria, puede favorecer los fenómenos isquémicos.

Los tres territorios más frecuentes en cuanto a la aparición de eventos trombóticos en la diabetes mellitus son: vasos coronarios, cerebrales y arterias de las extremidades inferiores. De hecho, son éstas las patologías que muestran una mayor incidencia y prevalencia en la población afecta de diabetes mellitus que en la no diabética.

1.4. ESQUEMA FISIOPATOLÓGICO DE LA MACROANGIOPATÍA DIABÉTICA

El apartado anterior describe los eventos principales generales de la vasculopatía diabética, si bien se aplica casi en su totalidad a la microangiopatía específica de la diabetes mellitus. A continuación, se describe un esquema general de lo que ocurre en un paciente diabético, a nivel arterial, desde sus inicios hasta la aparición de un evento isquémico. Ya se ha constatado anteriormente que la macroangiopatía diabética no es diferente del proceso de enfermedad vascular general, aunque todos los pasos de esta evolución están incrementados en la diabetes mellitus. Un esquema general del proceso de vasculopatía macroangiopática se muestra en la siguiente figura.



1.4.1. El efecto silencioso de la hiperglucemia mantenida

Unas cifras altas de glucosa en sangre mantenidas en el tiempo ejercen un efecto bioquímico consistente en un desequilibrio de diversas vías intracelulares (véase apartado anterior). Una de las primeras alteraciones reconocidas en este proceso es la activación de la NADPH-oxidasas (NOX) debido a altas concentraciones de glucosa, tanto en neutrófilos como en la propia célula endotelial (Gorin & Block, 2013). Cuando el oxígeno interacciona con el sistema de la NOX, se forman aniones superóxidos, primer paso de la producción de especies reactivas de oxígeno o radicales libres derivados del oxígeno (Brown et al., 2021).

Pero la hiperglucemia no solo afecta a esta molécula generadora de radicales superóxidos, sino que a la vez comienza a estimular la actividad de las plaquetas y los leucocitos, produciendo unas consecuencias fundamentales:

- La actividad agregante de las plaquetas comienza a estar incrementada (Li et al., 2021).
- Las proteínas adhesivas de los leucocitos (ICAM-1, VCAM-1) se expresan con más facilidad, lo cual facilita el acercamiento e interacción de estas células con el endotelio vascular (Vecchié et al., 2019).

Por otra parte, en un ambiente rico en glucosa, las células endoteliales se hacen más permeables a moléculas que habitualmente no traspasan la barrera endotelial. Tal es el caso de la lipoproteína de baja densidad para el colesterol (LDL), la cual comienza a introducirse en el interior de la pared vascular (Mundi et al., 2018).

Es importante destacar que, a pesar de estas alteraciones, el paciente con diabetes no presenta aún síntomas relacionados con su sistema cardiovascular, si bien este comienza a sensibilizarse para un daño progresivo, en el caso de no controlar las cifras de glucemia adecuadamente.

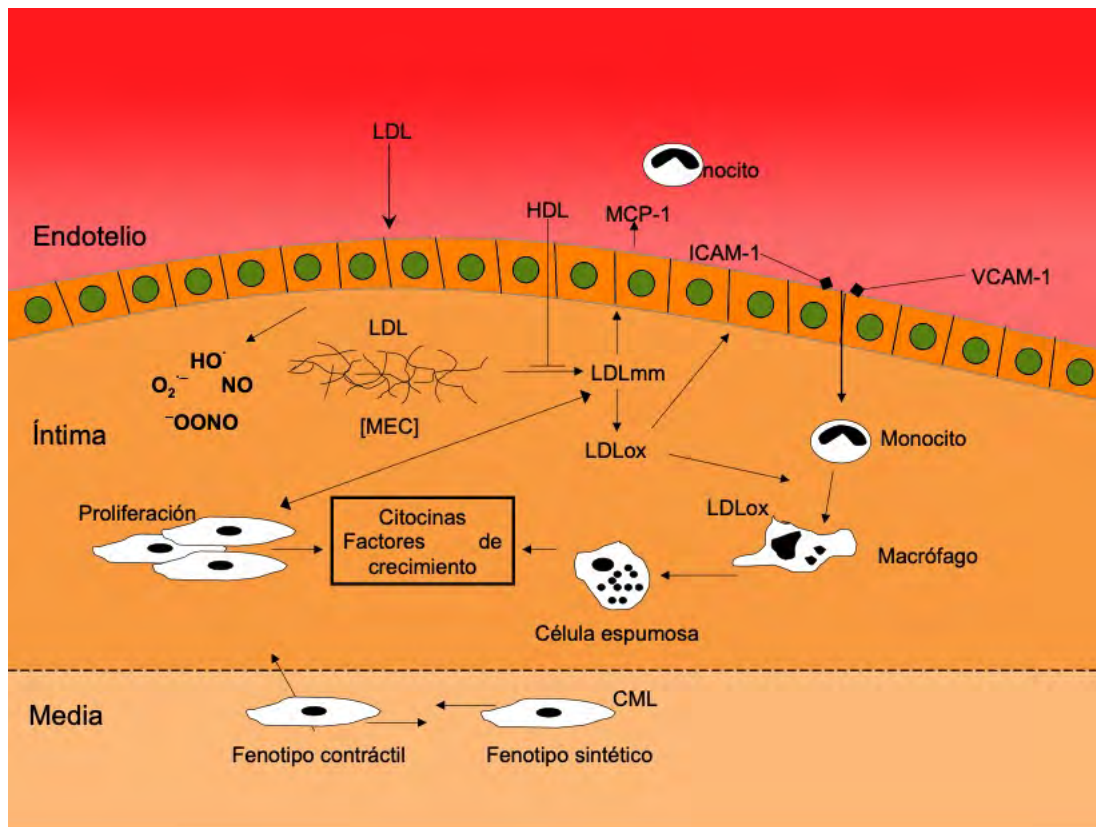


Figura 1.1. Esquema general de los procesos de inflamación vascular

1.4.2. Las arterias comienzan a inflamarse

Llega un momento evolutivo en el proceso de la vasculopatía, en el que la matriz subendotelial se ve ocupada por distintos elementos no habituales en condiciones fisiológicas (Fan & Watanabe, 2022):

- Los leucocitos, que se activan en el espesor tisular se convierten en macrófagos.
- Los radicales libres, derivados de la activación de la NOX.
- Moléculas de colesterol LDL que interaccionan con los radicales libres y se oxidan, transformándose en LDL oxidada (LDLox).

Este escenario evoluciona hacia otro nuevo, caracterizado por los siguientes eventos bioquímicos y celulares. Se unen los radicales libres derivados de la acción de la NOX y los producidos en los macrófagos activados, ejerciendo sus efectos nocivos en varias direcciones:

- Activación en los propios macrófagos de los factores nucleares que inducen la síntesis de mediadores inflamatorios (interleucinas y citocinas).
- Incremento de la tasa de oxidación de las moléculas de colesterol LDL.

A su vez, a modo de cascada de activaciones, se inicia un círculo de activación entre estas vías, incrementando cada vez más la producción de mediadores inflamatorios, radicales libres y LDLox. Esto origina una situación de inflamación vascular, en la que se producen dos consecuencias principales:

- En capas más profundas de la pared arterial, se estimula la proliferación de fibras musculares lisas y por ende, un engrosamiento de la pared vascular (Takahishi et al., 2021).
- En la capa más superficial, en el endotelio, tanto la agresión bioquímica y celular desde el torrente sanguíneo, como la interna, debida a los radicales libres y mediadores inflamatorios, producen una clara disfunción endotelial (Csiszar et al., 2008).

En esta fase, el paciente diabético sigue sin mostrar sintomatología alguna relacionada con el proceso vascular que se está desarrollando en sus arterias.

1.4.3. Fallo de la defensa endotelial

El daño endotelial, consecuencia de la interacción con elementos sanguíneos y de la propia pared vascular, se hace cada vez más intenso, comenzando a producirse déficits de todas sus funciones (Véase apartado 3.2.).

Los radicales libres y los mediadores inflamatorios interactúan fundamentalmente a tres niveles bioquímicos:

- Los radicales libres inhiben la actividad endotelial de la prostaciclín-sintetasa, disminuyendo la vida media y la cantidad de prostaciclina formada, disminuyendo así un elemento antiplaquetario y vasodilatador fisiológico (Folli et al., 2011).
- Los aniones superóxidos (primeros radicales libres formados) reaccionan con el óxido nítrico (NO) endotelial, formando radicales libres derivados de NO o peroxinitritos, compuestos muy oxidantes y que ejercen un efecto contrario al propio NO, es decir, las acciones vasodilatadoras y antiagregantes plaquetarias del NO se convierten en

vasoconstrictoras y pro-agregantes plaquetarias del peroxinitrito (Pérez-Torres et al., 2020).

- Los mediadores inflamatorios, además de facilitar la proliferación de células musculares lisas de la capa media de las arterias y la formación de más radicales libres en los macrófagos infiltrados en la pared vascular, facilitan la expresión de la isoforma inducible de la NO sintasa (iNOS), la cual produce NO en cantidades micromolares (en condiciones fisiológicas, la forma constitutiva de la NOS -cNOS- produce NO en concentraciones nanomolares). Al producirse tanto NO, se incrementa la reacción con los aniones superóxidos y por lo tanto, la formación de mayores cantidades de peroxinitritos (McDaniel et al, 1996).

Por lo tanto, se reducen considerablemente dos factores importantísimos de defensa endotelial, ambos vasodilatadores y antiagregantes plaquetarios. En esta fase los pacientes apenas presentan algún signo de lo que está ocurriendo en sus arterias, como mucho, una elevación de su presión arterial.

1.4.4. La batalla final

Es entonces cuando puede aparecer el evento que lleve al paciente a urgencias de un hospital. La isquemia debida a la formación de un trombo, consecuencia de una falta de defensa antitrombótica endotelial y una exacerbación de los factores protrombóticos sanguíneos, condiciona el proceso. La consecuencia: síndrome coronario agudo, ictus cerebral isquémico o enfermedad arterial periférica.

Ya se ha comentado en apartados anteriores que estos eventos isquémicos cardiovasculares son más frecuentes en los pacientes con diabetes mellitus que en la población no diabética. Lo importante es que estos mecanismos son secuenciales, de forma que la actuación sobre alguno de los escalones descritos puede frenar la evolución hacia los siguientes.

En este sentido, una de las primeras alteraciones bioquímicas consiste en la formación de radicales libres, así como participan en casi todos los estados del proceso vascular, de ahí que se haya puesto el foco en intentar frenar la formación y/o los efectos nocivos de estos radicales libres. Es por ello que se describen brevemente algunos aspectos generales de

los que se denomina estrés oxidativo, consecuencia directa de la aparición de estos radicales libres.

1.5. ASPECTOS GENERALES DEL ESTRÉS OXIDATIVO

En todas las células de nuestro organismo se están formando radicales libres de forma continua, pero asimismo, existen mecanismos que intentan captarlos, anularlos y/o destruirlos. Ese equilibrio entre mecanismos oxidantes y antioxidantes se denomina estatus oxidativo celular.

Cuando hay un exceso de producción de radicales libres y/o un déficit en los sistemas antioxidantes endógenos, predominan los primeros y se establece un incremento de las oxidaciones celulares, produciendo diversos daños bioquímicos y biológicos. En este caso se habla de un estrés oxidativo.

Un radical libre es cualquier molécula que en su orbital atómico más externo tiene un electrón desapareado, ya sea por la entrada o la cesión de uno de ellos. Cualquier molécula puede convertirse en radical libre, si bien las de menor tamaño son más susceptibles. Es por ello, que el oxígeno es posiblemente la principal diana para los electrones procedentes de otras moléculas. De hecho, en la propia respiración celular, un 5% del oxígeno se convierte en radical libre. Otras fuentes de electrones son: radiaciones, oxidaciones/reducciones de otras moléculas, situaciones de hipoxia/reoxigenación tisular, etc. (Dan et al., 2022).

Una vez que un electrón entra en la molécula de oxígeno, se convierte en un anión superóxido, el cual es rápidamente dismutado por la enzima superóxido dismutasa, que transforma al anión superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual no es propiamente dicho un radical libre, pero es una molécula altamente tóxica celular. Para defender a dichas células del efecto del peróxido de hidrógeno, existen dos mecanismos enzimáticos que lo inactivan/transforman: catalasa (lo convierte en agua) y glutatión peroxidasa (oxida al glutatión reducido con el peróxido de hidrógeno) (He et al, 2017).

En determinadas situaciones patológicas, entre ellas la diabetes mellitus, existe un exceso de producción de aniones superóxidos y una reducción de los mecanismos antioxidantes, fundamentalmente el sistema del glutatión, de ahí que se acumule el peróxido de

hidrógeno y, en presencia de hierro, se forme otro radical libre, el anión hidroxílico, mucho más reactivo y tóxico que el superóxido (Lushchak, 2014).

Los radicales libres buscan el equilibrio atómico, de ahí que reaccionen con cualquier molécula cercana para oxidarla y así recobrar la paridad electrónica. En una célula pueden reaccionar con las siguientes moléculas:

- Lípidos, principalmente los de las membranas biológicas, transfiriendo el electrón de más y formando sucesivos radicales libres lipídicos, hasta llegar a aldehídos sin capacidad de transferir más electrones. Este proceso se denomina peroxidación lipídica (Gaschler & Stockwell, 2017).
- Hidratos de carbono, formando carbonilos proteicos, que son moléculas de carbohidratos desnaturalizadas (Bora et al., 2021).
- Proteínas, destruyendo polímeros y desestructurando su función arquitectónica, así como interfiriendo con las enzimas para modificar sus funciones (Dröge, 2002).
- Ácidos nucleicos, generando bases anómalas que alteran el código de ADN para la síntesis proteica (Dizdaroglu & Jaruga, 2012).
- Óxido nítrico, sobre todo cuando este se encuentra en altas concentraciones, formando el radical peroxinitrito que, a su vez, es altamente reactiva con el resto de moléculas (Radi, 2018)

Por cualquiera de estos mecanismos, se altera la función celular, tanto morfológica como funcionalmente, alterando la fisiología de las células e incluso llevándolas a la muerte. Pues bien, en la diabetes mellitus y más concretamente en los vasos sanguíneos de los pacientes diabéticos, se han descrito estas alteraciones en mayor medida que en personas no diabéticas (Luc et al., 2019; Zhang et al., 2020; Zou et al., 2004).

Como ya comentamos anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los primeros eventos en el desarrollo de la vasculopatía diabética, así como en casi todos los pasos de su evolución. Por ello, se ha postulado que la administración de compuestos antioxidantes pudiera ser útil, además del control de la glucosa, en el retraso de las complicaciones vasculares de la diabetes, así como en su intensidad y consecuencias (Paneni et al., 2013).

La principal fuente de compuestos antioxidantes es la alimentación, sobre todo la denominada dieta mediterránea, de ahí que revisaremos algunos aspectos de este tipo de alimentación.

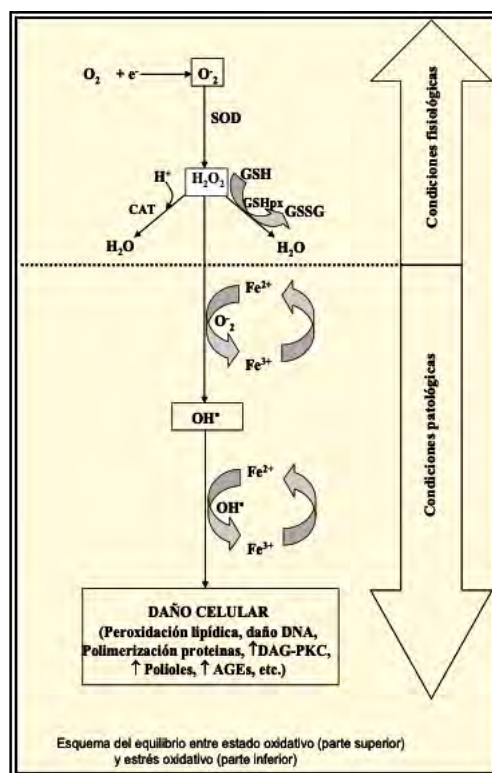


Figura 1.2. Esquema general de formación/destrucción de radicales libres

1.6. DIETA MEDITERRÁNEA COMO FUENTE DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

La dieta mediterránea (DietMed) es una de las más ampliamente descritas y evaluada en la literatura científica. Se han acumulado una gran cantidad de evidencias que demuestran una asociación inversa entre la adherencia a DietMed y un menor riesgo de mortalidad por todas las causas, enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2, algunos cánceres específicos y trastornos cognitivos (Dinu et al., 2018). Estas propiedades beneficiosas podrían explicarse por los demostrados efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antitrombóticos, antineoplásicos e hipolipemiantes de los componentes bioactivos de la DietMed (Serra-Majem et al, 2019).

El patrón dietético general de la DietMed contiene los siguientes elementos:

- Altas cantidades de frutas, verduras, nueces, legumbres, pescado, cereales, incluidos los integrales.
- El aceite de oliva virgen extra (AOVE) como principal fuente de grasa.
- Ingesta moderada de alcohol preferiblemente en forma de vino tinto.
- Bajas cantidades de productos lácteos, así como carnes rojas y procesadas.

Vegetales

En una DietMed tradicional, el énfasis está en los alimentos estacionales cultivados en el campo. Esto incluye ensaladas frescas, tomates, berenjenas, pepinos, repollo, rúcula, rábanos, ajo, cebolla, espinaca y lechuga. Las verduras son las fuentes más importantes de compuestos fenólicos (principalmente flavonoides) en la DietMed. Las verduras se caracterizan por muchos otros nutrientes, incluyendo fibra dietética, potasio, vitamina A, vitamina C, vitamina K, cobre, magnesio, vitamina E, vitamina B6, ácido fólico, hierro, tiamina, niacina y colina (Hoffman & Gerber, 2013).

Legumbres

Las legumbres que se consumen habitualmente en una dieta mediterránea incluyen garbanzos, lentejas, y judías blancas. Los principales ingredientes de las legumbres son proteínas, fibra, fitoesteroles, ácido fólico, vitamina B6, flavonas y varios minerales (Hoffman & Gerber, 2013).

Frutas

Las frutas que se consumen con frecuencia en una dieta mediterránea incluyen frutas cítricas, como naranjas y granadas, bayas, higos, uvas y frutas “naranjas” (por ejemplo, albaricoques, melocotones, nectarinas y melones). Entre muchos otros nutrientes, las frutas proporcionan fibra dietética, potasio y vitamina C, pero también flavonoides y terpenos (Hoffman & Gerber, 2013).

Frutos secos

Los frutos secos comúnmente consumidos incluyen pistachos, almendras, cacahuetes, avellanas y nueces. Las nueces son una rica fuente de ácidos grasos monoinsaturados y

poliinsaturados, incluido el ácido linoleico y linolénico, fenoles, flavonoides, isoflavonoides, fitoesteroles y ácido fítico, vitamina E, vitamina B2, ácido fólico y fibra, así como minerales y oligoelementos como magnesio, fósforo, potasio, cobre y selenio (Hoffman & Gerber, 2013).

Cereales

Este grupo de alimentos incluye arroz, avena, pan, cereales, galletas saladas y pasta. Los cereales integrales son una fuente de nutrientes como fibra dietética, hierro, zinc, manganeso, ácido fólico, magnesio, cobre, tiamina, niacina, vitamina B6, fósforo, selenio y riboflavina. En un metanálisis de dosis-respuesta de estudios observacionales prospectivos, un alto consumo de cereales integrales se ha asociado con un menor riesgo de mortalidad por todas las causas, cardiopatía coronaria, insuficiencia cardíaca, diabetes tipo 2 e hipertensión (Bechthold et al., 2019).

Pescados/mariscos

Los principales integrantes de este grupo son: las sardinas, la caballa, los mejillones, el pulpo, las ostras, salmón, lubina, camarones, calamares y atún. Generalmente, se considera que los nutrientes bioactivos más importantes en los pescados, sobre todo en los denominados azules, son los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico). En estudios observacionales prospectivos, la ingesta de pescado/mariscos se ha asociado con menor riesgo de mortalidad por todas las causas, cardiopatía coronaria e insuficiencia cardíaca (Bechthold et al., 2019).

Alcohol

En la DietMed, el alcohol se entiende como vino tinto consumido como parte de una comida (Hoffman & Gerber, 2013). El resveratrol podría ser el ingrediente clave en el vino tinto. Un metanálisis reciente de 83 estudios prospectivos concluyeron que el umbral para el riesgo más bajo de la mortalidad por todas las causas fue de alrededor de 100 g/semana (Wood et al., 2018). No obstante, este consumo sigue siendo discutido.

Aceite de oliva virgen extra (AOVE)

Se considera que el AOVE es un componente clave de la DietMed. Es una fuente de ácidos grasos monoinsaturados y polifenoles (oleuropeína, tirosol, hidroxitirosol, secoiridoides y lignanos) (López-Miranda et al., 2010).

1.7. ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA (AOVE) COMO FUENTE DE POLIFENOLES

En la DietMed, la principal fuente de grasas alimenticias es el AOVE. Desde hace muchos años, el AOVE es considerado una grasa saludable, fundamentado en la gran cantidad de estudios que han demostrado la influencia de la ingesta de este aceite sobre los principales mecanismos implicados en la etiopatogenia de la enfermedad cardiovascular. Así, se ha demostrado efectos beneficiosos en los siguientes puntos (Yubero-Serrano et al., 2019):

- Estrés oxidativo y nitrosativo. La administración de AOVE reduce diversas facetas del estrés oxidativo, como es la peroxidación lipídica, e incrementa algunos mecanismos antioxidantes endógenos, como es el sistema del glutatión. Asimismo, reduce el acúmulo de peroxinitritos en diversas situaciones patológicas, como es en la diabetes mellitus. En voluntarios sanos se ha demostrado una reducción en la capacidad de la LDL para oxidarse (Covas et al., 2006).
- Mediadores inflamatorios. Frenan la expresión de factores nucleares reguladores de la síntesis de interleucinas, como es el caso de NfκB, así como la síntesis y liberación de algunas citosinas.
- Disfunción endotelial. La administración de AOVE reduce el daño endotelial de forma preventiva, evitando en parte el déficit de prostaciclina o de óxido nítrico.
- Metabolismo lipídico. Tiende a incrementar los niveles de colesterol HDL.
- Activación plaquetaria. AOVE reduce la activación de las plaquetas, si bien este efecto se produce con administraciones de cantidades mayores a las recomendadas en una dieta estándar tipo mediterránea.

- Hipercoagulabilidad sanguínea. Se han descrito reducciones del factor tisular, factor VII o fibrinógeno, así como un incremento en la vida media del activador tisular del plasminógeno (TPA) y una inhibición de sus inhibidores (PAI).

Debido a estos mecanismos, entre otros, se ha demostrado que la administración de AOVE en personas con factores de riesgo cardiovasculares, reduce significativamente la aparición de eventos isquémicos en todos los sectores arteriales (coronarias, cerebro, arterias periféricas), además de reducir la incidencia de diabetes mellitus y algunas de sus complicaciones, algunos tipos de cánceres, sobrepeso, etc. (Martínez-González et al, 2015).

El AOVE es una grasa compleja que procede de las aceitunas, de las que existe una gran variedad a lo largo de la cuenca mediterránea, obteniéndose aceites con diferentes porcentajes en sus componentes químicos, si bien estos se repiten en todos ellos. Los principales componentes químicos del AOVE son los siguientes (Jiménez-López et al, 2020):

1.7.1. Ácidos grasos

Los triacilglicerol constituyen una gran parte del aceite comestible y un alto porcentaje de la fracción saponificable está constituida por ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). El principal triacilglicerol detectado en el aceite de oliva es el oleico-oleico-oleico (OOO), que representa aproximadamente la mitad de la porción total de triacilglicerol que se encuentra en el AOVE. Otros triacilglicerol también presentes son palmítico-oleico-oleico (POO), oleico-oleico-linoleico (OOL), palmítico-oleico-linoleico (POL) y esteárico-oleico-oleico (SOO) (Boskou et al., 2006).

7.2. Esteroles

También hay cuatro clases de esterol en el aceite de oliva y se utilizan comúnmente para comprobar su autenticidad porque su presencia está relacionada con la calidad del aceite. Estas cuatro clases son esterol comunes (4-desmetilesterol), 4 α -metilesterol, alcohol triterpénico (4,4-dimetilesterol) y dialcohol triterpénico (Boskou et al., 2006). Los esterol comunes en el AOVE están presentes tanto en forma libre como esterificada. Los principales componentes de esta fracción de esterol son campesterol, β -sitosterol y Δ^5 -Avenasterol [60,61], y en menor cantidad también es posible encontrar

estigmasterol, colesterol, colesterol, brasicasterol, sitostanol, ergosterol, campestanol, Δ^7 -Coletenol, Δ^7 -Avenasterol, Δ^7 -Stigmasterol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^5,24$ -estigmastadienol, $\Delta^5,23$ -estigmastadienol, $\Delta^7,24$ -ergostadienol, $\Delta^7,22$ -ergostadienol, 22,23-dihidrobrassicasterol y 24-metileno-colesterol. El contenido total de esteroides del AOVE varía entre 1000 y 2000 mg/kg. El β -sitosterol es el principal compuesto de la fracción de esteroides con valores entre el 75% y el 90% de la fracción total de esteroides, mientras que el Δ^5 -venasterol tiene valores entre el 5% y el 20%.

1.7.3. Tocoferoles

Tres isoformas de tocoferoles están presentes en el AOVE: α -, β - y γ -tocoferol. El α -tocoferol se encuentra en su forma libre y representa más del 90% de todos los tocoferoles, con rangos de 206 a 270 mg/kg de aceite.

1.7.4. Carbohidratos

Hay dos hidrocarburos principalmente presentes en el aceite de oliva: escualeno y β -caroteno. El escualeno es el último metabolito sintetizado antes de la formación del anillo de esteroides. Este compuesto constituye más del 90% de la fracción hidrocarbonada y es el compuesto más abundante en la materia insaponificable, con concentraciones que oscilan entre 200 y 7500 mg/kg de aceite.

La fracción restante de carbohidratos en el AOVE está compuesta por triterpenos y diterpenos, poliolefinas, isoprenoides, hidrocarburos y n-parafinas.

1.7.5. Pigmentos

Los carotenoides lipofílicos y los pigmentos de clorofila que se encuentran en el aceite de oliva son los responsables de su color característico. La coloración del AOVE es más verde en presencia de aceitunas verdes que tienen un mayor contenido en clorofila mientras que utilizando aceitunas maduras con mayor contenido en carotenoides obtenemos un aceite más amarillento, por lo que el color final es el resultado de las proporciones de estos pigmentos. AOVE tiene una gran variedad de carotenoides y clorofilas, desde β -caroteno, violaxantina, neoxantina, luteína y otras xantofilas a la clorofila a y b, feofitina a y b y otros derivados menores.

7.6. Compuestos fenólicos

El principal grupo de compuestos antioxidantes del AOVE son los fenoles hidrofílicos, Son moléculas de suma relevancia a la hora de determinar la calidad del aceite en cuanto a su sensorialidad, como amargor, picor y estabilidad (Servili et al., 2009), así como sus características organolépticas de aroma y sabor. La estabilidad oxidativa del AOVE no depende sólo de la variedad y calidad de la aceituna sino también del tiempo de recolección, área de cultivo, el grado de insaturación y los niveles de antioxidantes presentes (tocoferoles, fenoles hidrofílicos y carotenos).

Además, factores como el sistema de extracción del aceite y las condiciones de almacenamiento también influyen en la conservación y concentración de estos fenoles (Fernández-Prior et al., 2020).

Los compuestos fenólicos tienen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antitumorales, y también pueden modular la expresión génica para proteger proteínas que intervienen en los mecanismos celulares involucrados en el proceso de inflamación, la resistencia al estrés oxidativo y en el metabolismo de los lípidos (Covas, 20028; Konstantinidou et al., 2010; Romani et al., 2019).

Por tanto, las principales sustancias antioxidantes que se encuentran en el AOVE son compuestos fenólicos polares que se pueden presentar en forma libre, ligada o esterificada. El contenido fenólico total oscila entre 50 y 1000 mg/kg [84], siendo más común en concentraciones entre 100 y 300 mg/kg. Cada AOVE tiene un perfil fenólico, contenido y composición diferente debido a las diferencias antes citadas (Cicerale et al., 2009).

Los compuestos fenólicos que se han descrito en la composición de AOVE son (Jiménez-López et al., 2020):

- Ácidos fenólicos: gálico, salicílico, vaníllico...
- Ácidos hidroxicinámicos: caféico, p-cumárico, ferúlico...
- Alcoholes fenólicos: tirosol, hidroxitirosol.
- Antocianos: cianidin-3-glucósido, cianidín-3-rutenósido.

- Flavonoides: apigenina, quercetina, quercitrina, luteolinam, rutina...
- Flavonoles: catequina, epicatequina.
- Glicósidos: ligtrósido, oleuropeina.

Los compuestos que se encuentran en mayor concentración en AOVE son los alcoholes fenólicos, fundamentalmente el hidroxitirosol. Este compuesto ha sido estudiado ampliamente y muestra un perfil cualitativo de comportamiento muy similar al del AOVE, tanto en su actuación sobre las vías de daño celular, mecanismos antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, etc., como su efecto en procesos patológicos (Bertelli et al., 2020; D'Angelo et al., 2020; Robles-Almazán et al., 2018).

1.8. HIDROXITIRO SOL Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Como decíamos, la mayor parte de los efectos demostrados para hidroxitirosol son superponibles a los descritos para el AOVE. Si consideramos a la enfermedad cardiovascular como una sucesión de eventos que van desde la aparición de factores de riesgo hasta el daño tisular producido por un evento isquémico, podemos aseverar que hidroxitirosol interfiere positivamente en cada una de sus fases. Resumimos a continuación los principales resultados demostrados al respecto.

1.8.1. Factores de riesgo cardiovascular

De los factores de riesgo cardiovascular más frecuentes, posiblemente sea la diabetes mellitus el más estudiado. En este sentido, se ha descrito un efecto antidiabético, hipoglucemiante, obtenido con hidroxitirosol en modelos de diabetes experimental que reproducen la diabetes mellitus tipo 2. Xie et al. (2018) demostraron este efecto en un modelo experimental de ratones con diabetes tipo 2, tras la administración de nicotinato de hidroxitirosol. Jemai et al. (2009) llegaron a conclusiones similares administrando hidroxitirosol y oleuropeina. El mecanismo propuesto para explicar el efecto hipoglucemiante de hidroxitirosol en la diabetes tipo 2 es un incremento hepático del proceso de la glucogenogénesis, posiblemente debido a su demostrado efecto antioxidante (Poudyal et al., 2017).

Otro factor de riesgo cardiovascular, la hipertensión arterial, también puede verse afectado por hidroxitirosol. Así, Lockyer et al. (2017) demostraron que la ingesta de un

compuesto con hidroxitirosol libre y en forma de oleuropeína a pacientes hipertensos, redujo significativamente las cifras tensionales en 2.5 puntos de presión.

Un factor de riesgo, asociado a los dos anteriores, es la hiperlipidemia. En los tres estudios citados anteriormente (Jemai et al., 2009; Lockyer et al., 2017; Xie et al., 2018) se ha demostrado un efecto reductor de los niveles de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos. Estudios realizados en células hepáticas e intestinales han atribuido estos efectos a una disminución en la síntesis y/o secreción de lipoproteínas que contienen apoB (Vidal et al., 2005; Yee et al., 2002).

1.8.2. Inflamación vascular

El proceso de inflamación vascular se inicia por la aparición de un estrés oxidativo que afecta a diversas vías de daño vascular (véase apartado 1.4). Pues bien, todas esas vías son afectadas por hidroxitirosol, en el sentido de frenarlas, ya sea por su efecto antioxidante o por un efecto directo sobre algunas de ellas.

- Estrés oxidativo y nitrosativo

Posiblemente es el mecanismo más estudiado de hidroxitirosol, y por el que se han adjudicado a este compuesto fenólico la mayor parte de sus efectos biológicos. Hidroxitirosol reduce la presencia de especies reactivas de oxígeno tanto a nivel intracelular como extracelular (Robles-Almazan et al., 2018). Este efecto antioxidante es tan importante que en todos los estudios que se realizan con este compuesto fenólico, sea cual sea su objetivo final, siempre se acompaña de un análisis de su capacidad antioxidante en el modelo o situación concreta que se estudie.

Se han postulado diversos mecanismos para explicar su efecto antioxidante, dependiendo del estímulo que origine el estrés oxidativo.

- Acción captadora de los radicales libres formados (“efecto scavenger”). Esto se ha demostrado con las especies reactivas: anión superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso (Granados-Principal et al., 2014).
- Acción estimulante de factores antioxidantes endógenos, tales como: Nrf2, Sirt1 y JNK-p62/SQSTM (Bayram et al., 2012; Zou et al., 2012).

- Acción estimulante directa sobre sistemas antioxidantes endógenos, tales como: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSHpx) y reductasa (GSSGrd); también se ha demostrado un efecto de mantenimiento de los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) en condiciones de estrés oxidativo (Granados-Principal et al., 2012).

A pesar de la unanimidad de los distintos estudios sobre este efecto antioxidante de hidroxitirosol, se ha demostrado que, al igual que ocurre con otros polifenoles, se produce el fenómeno de la hormesis, el cual se podría definir como una inversión del efecto antioxidante hacia uno oxidante, al ir incrementando la concentración/dosis del compuesto (Calabrese, 2018; Forman et al., 2014). Este fenómeno, que se da con multitud de compuestos antioxidantes, se explica por dos motivos posibles (Robles-Almazan et al., 2018):

- Hidroxitirosol capta especies reactivas y se convierte en un radical libre muy débil, pero al incrementar la concentración/dosis, comienza a ejercer un efecto como si fuese una especie reactiva.
- La administración crónica de hidroxitirosol produce una reacción defensiva de la célula, pudiendo activar factores pro-oxidantes intracelulares.

- Adhesión leucocitaria al endotelio

Se ha demostrado que hidroxitirosol frena la expresión génica de síntesis de proteínas adhesivas, tales como VCAM-1 e ICAM-1 (Carluccio et al., 2007), así como su producción en un modelo de diabetes experimental (López-Villodres et al., 2016).

- Oxidación de la LDL

Posiblemente por su efecto antioxidante, se ha demostrado que hidroxitirosol disminuye la cantidad de LDLox formada, tanto en humanos (Covas et al., 2006) como en modelos experimentales de diabetes mellitus (López-Villodres et al 2016).

- Mediadores inflamatorios

Estudios realizados in vitro con células monocíticas humanas THP-1 tratados con lipopolisacáridos para inducir una respuesta inflamatoria, demostraron que hidroxitirosol previene la formación de citoquinas, óxido nítrico por vía inducible, secreción del factor

de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y expresión de ARNm, así como también inhibió la expresión de iNOS y COX-2 (Zhang et al., 2009), mostrando un claro carácter antiinflamatorio a nivel celular.

Se ha demostrado también que hidroxitirosol es capaz de frenar la activación del factor nuclear de las células B activadas (NF- κ B), factor de transcripción relacionado con más de 150 genes, incluyendo los encargados de la síntesis de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-17), quimiocinas y moléculas de adhesión celular, implicadas en las respuestas inflamatorias, contribuyendo a explicar en parte la atenuación de la inflamación vascular promovida por hidroxitirosol (Carluccio et al., 2007; Killeen et al., 2014).

Algunos estudios han demostrado la capacidad de HT para inhibir la ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2, al mismo nivel que en fármacos más consumidos como ibuprofeno y celecoxib (González-Correa et al., 2008; Reyes et al., 2013; Zhang et al., 2009).

1.8.3. Disfunción endotelial

Centrándonos en la función antitrombótica del endotelio y su déficit en algunas circunstancias, como es la diabetes mellitus, se ha demostrado que hidroxitirosol:

- Frena el déficit de producción endotelial de prostaciclina (González-Correa et al., 2008, 2018; López-Villodres et al., 2016; Martínez-González et al., 2008). De esta forma, este compuesto fenólico disminuye el déficit de uno de los principales agentes antiplaquetarios y vasodilatadores endógenos.
- Tiende a incrementar la producción de óxido nítrico, tanto en condiciones in vitro (Serreli et al., 2021), como tras su administración a animales de experimentación (González-Correa et al., 2008; Storniolo et al., 2014)

Por otra parte, se ha demostrado que hidroxitirosol protege el metabolismo de las células endoteliales a través de una protección del estrés mitocondrial inducido por diversos estímulos, como es el inflamatorio (Calabriso et al., 2018).

1.8.4. Activación plaquetaria: Hidroxitirosol y algunos de sus derivados, reducen la agregabilidad de las plaquetas, tanto en condiciones in vitro (de Roos et al., 2011; González-Correa et al., 2008; Zbidi et al., 2011) como ex vivo (González-Correa et al., 2008; López-Villodres et al., 2016).

Este efecto, junto a la reducción de la disfunción endotelial en situaciones de riesgo cardiovascular, como es el caso de la diabetes mellitus, confieren a hidroxitirosol un carácter antitrombótico, al menos desde un punto de vista de prevención de eventos trombótico-isquémicos.

1.8.5. Daño tisular

La última fase de la enfermedad cardiovascular es la producción de daño isquémico tisular en el órgano afectado por la isquemia. En este sentido, es necesario proteger a dicho tejido, sobre todo para que los mecanismos de daño isquémicos no sigan avanzando y afecten al tejido circundante sano.

A nivel coronario está muy protocolizado el esquema de cardioprotección (vasodilatadores coronarios y periféricos, relajantes de la contracción miocárdica, etc.), pero a nivel cerebral, la neuroprotección no se encuentra totalmente dilucidada. Como neuroprotectores se han ensayado multitud de moléculas, si bien ninguna de ellas ha superado con éxito el cociente beneficio/riesgo.

Como el estrés oxidativo está en el centro del daño por isquemia a nivel cerebral, se planteó la posibilidad de utilizar compuestos antioxidantes como posibles neuroprotectores (Carrera et al., 2019). En este sentido, se ha postulado a hidroxitirosol como un posible candidato, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y citoprotectoras, previamente descritas en este texto. Así, se ha comprobado un efecto neuroprotector en modelos experimentales de daño tisular por isquemia (Cabrerizo et al., 2013; De la Cruz et al., 2015; González-Correa et al., 2008; Guerrero et al., 2012).

1.9. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN: JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE ESTUDIO

Una vez demostradas las bondades científicas de la dieta mediterránea, la implicación en ella del aceite de oliva virgen extra y el peso específico que juegan los polifenoles que contiene, desde un punto de vista de salud, se podría plantear un doble objetivo general (Hernández et al., 2021):

- Conseguir un aceite de oliva virgen extra enriquecido en aquellos polifenoles que hayan demostrado un mayor beneficio a nivel de prevención de algunos o todos los estadios de la enfermedad cardiovascular.

- Utilizar estos polifenoles como moléculas aisladas, tratando su uso como si fuese un fármaco.

En ambos casos se plantea la siguiente cuestión: ¿cuál o cuáles polifenoles serían candidatos para estos fines?

Si algo está claro tras los múltiples estudios de prevención cardiovascular en este tema, es que la integración de todos los elementos de la dieta mediterránea presenta efectos inequívocamente positivos (Martínez-González et al., 2015) y que el aceite de oliva virgen extra juega un papel definitivo en estos efectos (Konstantinidou et al., 2010).

Teniendo en cuenta estas aseveraciones, habría que plantear qué compuestos servirían para enriquecer el aceite de oliva virgen extra y mejorar su perfil preventivo cardiovascular. Obviamente el compuesto fenólico hidroxitirosol es el más abundante y sobre el que más estudios se han realizado de forma aislada (Bertelli et al., 2020).

En nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios con este compuesto y algunos de sus derivados (éteres y ésteres) sobre diversos mecanismos implicados en el proceso de enfermedad cardiovascular (véase apartado 4): estrés oxidativo y nitrosativo, función plaquetaria, mecanismos antiplaquetarios de la pared arterial, estado inflamatorio, complicaciones macro y microangiopáticas de la diabetes mellitus y neuroprotección. Estos estudios han sido realizados en condiciones *in vitro* (Cabrerizo et al., 2013; De La Cruz et al., 2015a; González-Correa et al., 2008; Guerrero et al., 2012; Reyes et al., 2013) o *ex vivo* en animales sanos (De La Cruz et al., 2015b; González-Correa et al., 2008; Muñoz-Marín et al., 2013) o en un modelo experimental de diabetes mellitus (González-Correa et al., 2018; López-Villodres et al., 2016; Reyes et al., 2017; Rodríguez-Pérez et al., 2021).

Al comparar los resultados de los estudios en los que se administró hidroxitirosol con aquellos similares en los que se administró aceite de oliva virgen extra en cantidades que contenían dosis equivalentes a las de hidroxitirosol aislado (Cabrerizo et al., 2013; González-Correa et al., 2007), la conclusión podría ser que hidroxitirosol no es el responsable del 100% del efecto del aceite de oliva virgen extra.

Una posible hipótesis podría ser que los demás compuestos polifenólicos ejercieran también un efecto similar al del hidroxitirosol y que completasen así el efecto demostrado

en el aceite completo. Otra posibilidad es que en el aceite de oliva virgen extra se produjese un efecto sinérgico entre los distintos compuestos fenólicos.

Para comprobar esta segunda posibilidad, se realizó un estudio in vitro en cortes cerebrales de rata, evaluando la capacidad neuroprotectora y antioxidante de algunos de los polifenoles más importantes del aceite de oliva virgen extra (hidroxitirosol, tirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol y oleocantal) (De La Cruz et al., 2021). En este estudio se demostró un efecto sinérgico entre hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol. Asimismo, al comparar la mezcla de polifenoles en concentraciones presentes en el aceite de oliva virgen extra con hidroxitirosol solo, el efecto neuroprotector y antioxidante siempre fue mayor con la mezcla que con hidroxitirosol solo (De La Cruz et al., 2021).



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los planteamientos desarrollados en la justificación del estudio y siendo la diabetes mellitus uno de los principales factores de riesgo cardiovascular, nos planteamos el presente estudio con el siguiente objetivo:

- Valorar el posible efecto sinérgico de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol, en proporción similar a la que se encuentra en el aceite de oliva virgen extra, sobre el estrés oxidativo y nitrosativo y sobre algunos biomarcadores cardiovasculares, en un modelo experimental de diabetes mellitus similar al tipo 1 en humanos.



METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

La descripción del apartado de metodología proviene del artículo publicado como aval de la tesis, cuya referencia es: 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. doi: 10.3390/antiox10121983.

Se realiza la presente nota aclaratoria, dado que este apartado está sujeto a pocas variaciones y como advertencia a las posibles coincidencias que pudieran aparecer en el análisis de similitud (plagio) con otras fuentes.

3.1. Material

A continuación, se recoge los materiales y productos utilizados en la realización de la tesis.

Los kits de inmunoensayo enzimático de 11-deshidrotromboxano B2, 3-nitrotirosina y 6-ceto-prostaglandina F1 α (6-ceto-PGF1 α) 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.).

El hidroxitirosol (HT) se aisló por tratamiento hidrotérmico de la fase líquida obtenida del alperujo (un subproducto del sistema de separación de dos fases del aceite de oliva) a 160 °C durante 60 min (Rubio-Senent, F et al. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 1175-1186). El líquido se extrajo por fraccionamiento cromatográfico en dos pasos, con un rendimiento final de 99,6% de pureza referida a materia seca, según el proceso descrito

por Fernández-Bolaños et al. 2002 (*J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6804-6811). Para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el compuesto de tirosol estándar se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza) y HT de Extrasynthese (Lyon Nord, Geney, Francia). Los fenoles se cuantificaron utilizando un sistema de cromatografía líquida Hewlett-Packard 1100 con detector ultravioleta-visible. Se utilizó una columna analítica “Mediterranea sea” C18 (250 x 4,6 mm i.d.; tamaño de partícula = 5 µm) (Teknokroma, Barcelona, España) a temperatura ambiente. El sistema estaba equipado con válvulas de inyección Rheodyne (bucle de 20 µL). Las fases móviles fueron, ácido tricloroacético al 0.01% en agua y acetonitrilo, con el siguiente gradiente durante un tiempo total de flujo de 55 min: 95% inicialmente, 75% a los 30 min, 50% a los 45 min, 0% a los 47 min, 75 % a los 50 min y 95% a los 52 min hasta que se completó el paso. La cuantificación se llevó a cabo por integración de picos a una longitud de onda de 280 nm con referencia a calibraciones obtenidas con estándares externos.

El 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) se obtuvo del subproducto del aceite de oliva mediante un sistema de extracción en dos fases utilizado en las almazaras. El método para purificar DHPG ha sido descrito y patentado por Fernández-Bolaños et al. (2010) (WO2010070168A1). El método se basa en sistemas cromatográficos físicos que permiten la extracción de compuestos naturales sin ningún disolvente orgánico ni reacciones químicas o enzimáticas, obteniendo un grado de pureza superior al 95%, referido a materia seca.

3.2. Diseño del estudio

Los animales fueron ratas Wistar macho adultas de 2 meses de edad (peso corporal 200-250 g). Todas las ratas se utilizaron de acuerdo con la legislación española vigente 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, Junta de Andalucía. y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía (Ref. 9/07/2019/124).

Los animales (10 ratas por grupo) se distribuyeron en siete grupos: 1) ratas no diabéticas de control (NDR) tratadas con solución salina, 2) ratas diabéticas de control (DR) tratadas con solución salina, 3) DR tratadas con 5 mg/kg/día p.o. de HT, 4) DR tratado con 0,5 mg/kg/día p.o. de DHPG, 5) DR tratado con 1 mg/kg/día p.o. de DHPG, 6) DR tratado con 5 mg/kg/día p.o. de HT más 0,5 mg/kg/día p.o. de DHPG y 7) DR tratado con 5 mg/kg/día p.o. de HT más 1 mg/kg/día p.o. de DPG. Estas dosis de cada compuesto se eligieron según el rango de concentraciones descrito en AOVE con diferente contenido en polifenoles (Pedan, V. et al. *Molecules* **2019**, *24*, 2041; Medina, E. et al. *J Agric Food Chem* **2006**, *54*, 4954-4961): de 1/10 a 1/5 (DHPG/HT) según el tipo de aceituna de donde se extraiga el AOVE. extraído y a los efectos demostrados en algunos experimentos ex vivo en ratas sanas y diabéticas (Reyes, J.J. et al. *J Agric Food Chem* **2017**, *65*, 4378-4383; López-Villodres, J.A. et al. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *37*, 94-100).

Se administraron HT y DHPG en el agua de bebida una vez al día durante 7 días antes de inducir la diabetes y continuaron diariamente hasta el final del período diabético (2 meses).

Se indujo diabetes experimental con una única inyección intravenosa de estreptozotocina (50 mg/kg). La concentración de glucosa en sangre se midió poniendo en contacto un glucosímetro FreeStyle (Abbot Laboratories S.A., Madrid, España) con sangre procedente de la vena safena. Se consideró que los animales tenían diabetes si la glucosa en sangre era superior a 200 mg/dL durante 2 días consecutivos. Las ratas del grupo de control no diabético recibieron una única inyección intravenosa de solución salina isotónica y se midió la glucosa en sangre de la misma manera que en los animales diabéticos. Durante el período de tratamiento, los animales diabéticos se trataron con 4 UI/día s.c. de un análogo de insulina basal soluble de acción prolongada (Levemir®, Novo Nordisk España, Madrid, España) para reducir la mortalidad por los niveles elevados de glucosa en sangre. Los animales de control recibieron el mismo volumen de solución salina isotónica s.c.

Al final del segundo mes, todos los animales de cada grupo fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.). Se realizó laparotomía medial para extraer 6 mL de sangre de la aorta abdominal. Como anticoagulante se utilizó citrato de sodio al 3% en una proporción de 1:9. Posteriormente, se obtuvo un segmento de la aorta abdominal 0,5 cm anterior a la bifurcación de las arterias femorales.



Sala Centro de Experimentación Animal de la UMA



Jaula metabólica modular MC de Tecniplast

3.3. Técnicas analíticas

Todas las técnicas se ejecutaron de manera simple ciego, es decir, las personas que realizaron los ensayos desconocían el origen y la naturaleza de las muestras.

3.3.1. Muestras

De cada animal se extrajeron las siguientes muestras:

- Sangre total, recogida en tubos sin anticoagulantes y con gel activador de la coagulación y una muestra recogida en tubo con anticoagulante. Las primeras se centrifugaron a $3500 \times g$ durante 10 min y el sobrenadante se separó y congeló en alícuotas a -80°C hasta la determinación de las variables correspondientes.
- Orina. Las ratas se colocaron individualmente en jaulas metabólicas modulares (Tecniplast S.p.A., Buguggiate, Italia) y se recolectó orina de 24 horas. Se midió la diuresis total, y las muestras se centrifugaron a $3500 \times g$ durante 10 min a 4°C y se congelaron a -80°C en alícuotas hasta realizar las determinaciones analíticas correspondientes.
- Tejido aórtico. Los análisis morfológicos se realizaron en un segmento de aorta desde la división de las arterias renales hasta 1 cm hacia arriba.

3.3.2. Bioquímica sérica

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

- Triglicéridos. Los triglicéridos se convierten en glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipasa. Luego, el glicerol se convierte en glicerol-3-fosfato por la glicerol quinasa, seguido de su conversión por la glicerol-3-fosfato-oxidasa en peróxido de hidrógeno. Se forma un complejo coloreado a partir de peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa. La absorbancia del complejo se mide como una reacción de punto final a 505/694 nm.
- Colesterol total. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol esterasa a colesterol y ácidos grasos libres. El colesterol es transformado por la colesterol oxidasa en presencia de oxígeno para formar peróxido de hidrógeno. Se forma un complejo

coloreado a partir de peróxido de hidrógeno, 4-aminoantipirina y fenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa. La absorbancia del complejo se mide como una reacción de punto final a 505/694 nm.

- Colesterol HDL. El ensayo consta de 2 pasos de reacción distintos:

1. Eliminación de quilomicrones, colesterol VLDL y colesterol LDL por colesterol esterasa y colesterol oxidasa.
2. Medición específica del colesterol HDL después de la liberación del colesterol HDL por el tensioactivo.

La intensidad del tinte de quinoneimina producido en la reacción de Trinder es directamente proporcional a la concentración de colesterol cuando se mide a 596/694 nm.

- Colesterol LDL. El ensayo consta de 2 pasos de reacción distintos:

1. La colesterol esterasa y la colesterol oxidasa eliminan el colesterol, excepto el de las lipoproteínas de baja densidad.
2. La medición específica del colesterol LDL se realiza después de su liberación por detergente en DLDL

3.3.3. Agregometría plaquetaria

La capacidad de agregación de plaquetas en sangre total se probó a 37°C con el método de impedancia eléctrica (agregómetro Chrono-Log 540, Chrono-Log Corp., Haverton, PA, EE. UU.). Se usó colágeno (10 µg/ml) como agente inductor de la agregación. La máxima intensidad de agregación se determinó como la máxima resistencia entre los dos polos del electrodo obtenida 10 min después de la adición del agonista.

3.3.4. Concentración de eicosanoides en orina

Las concentraciones urinarias de 11-dehidro-tromboxano B₂ y 6-keto-prostaglandina F1α se midieron como un índice de la producción global de tromboxano y prostaciclina. Estas determinaciones se realizaron utilizando un kit comercial de inmunoensayo enzimático de acuerdo con los protocolos del fabricante.



Agregómetro de impedancia

3.3.5. Estrés oxidativo y nitrosativo

El malondialdehído es el principal producto de la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS) y se utilizó como índice de la concentración de peróxido lipídico sérico. Se utilizó un kit comercial colorimétrico basado en la reacción con ácido tiobarbitúrico y determinación espectrofotométrica a 532 nm.

El 8-isoprostano urinario se determinó como un índice global de estrés oxidativo (Costabile, G. et al. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2015**, 13, 187-191); las concentraciones séricas de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina se determinaron como un índice de estrés oxidativo/daño al ADN. Ambas determinaciones se realizaron utilizando kits comerciales de inmunoensayo enzimático de acuerdo con los protocolos del fabricante.

La concentración sérica de glutatión, la actividad de glutatión peroxidasa (GSHpx) y la capacidad antioxidante total (TAC) se determinaron como un índice global de defensa antioxidante. La determinación de glutatión se basó en el sistema de reciclaje por DTNB (sustrato de glutatión) y glutatión reductasa. El DTNB y el glutatión reaccionan para generar ácido 2-nitro-5-tiobenzoico que tiene un color amarillo, determinando la absorbancia a 412 nm. La actividad de GSHpx se midió usando un método colorimétrico: GSHpx reduce el hidroperóxido de cumeno mientras oxida GSH a GSSG; el GSSG generado se reduce a GSH con el consumo de NADPH por la glutatión reductasa; la disminución de NADPH se midió a 340 nm en modo cinético. 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.

Las concentraciones séricas de 3-nitrotirosina se determinaron como un índice de formación de peroxinitrito, utilizando un kit de inmunoensayo enzimático comercial de acuerdo con los protocolos del fabricante.

3.3.6. Otros biomarcadores cardiovasculares

La lipoproteína de baja densidad oxidada en suero (oxLDL) se midió como un índice del estado oxidativo causado por los radicales libres. La concentración de mieloperoxidasa (MPOx) se ha determinado como un índice de la activación de leucocitos polimorfonucleares en presencia de mediadores inflamatorios. La molécula de adhesión vascular VCAM-1 refleja la activación endotelial y puede marcar el proceso inflamatorio crónico en el desarrollo de la enfermedad vascular. Estos biomarcadores se cuantificaron con kits comerciales de inmunoensayo enzimático apropiados, de acuerdo con los protocolos del fabricante.

3.3.7. Análisis morfométrico aórtico

Los análisis morfológicos se realizaron en un segmento de aorta desde la división de las arterias renales hasta 1 cm hacia arriba. El tejido extirpado se fijó en paraformaldehído al 10% mediante inmersión total durante 48 horas y se procesó con el método clásico de inclusión en parafina. Las secciones incluidas en parafina se cortaron a 7 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones fueron examinadas bajo un microscopio óptico equipado con un sistema digital. El análisis histomorfométrico 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 (que contenían de 5 a 8 secciones por portaobjetos). En cada sección cuantificamos las variables, área de la luz (AL) y área de toda la sección arterial (AW). El área de la pared arterial (AAW) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{AAW} = \text{AW} - \text{AL}$$

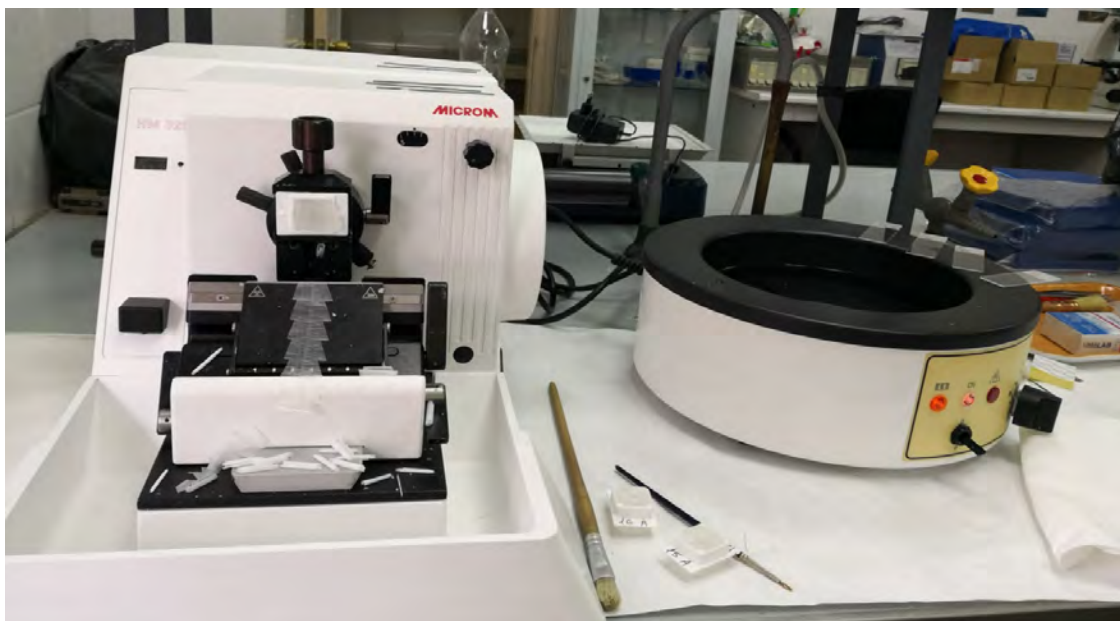
El programa adaptó el área obtenida en cada caso a un círculo, calculando el radio (espesor de pared del vaso -VWT-) de la siguiente manera:

$$VWT^2 = \text{Área}/3.1416$$

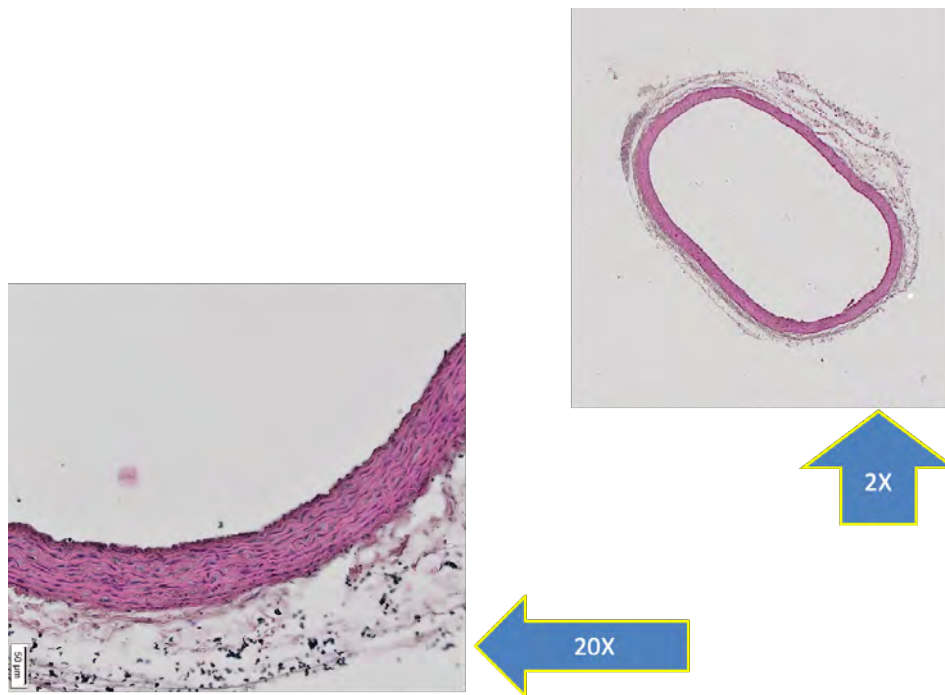
Además, se usaron secciones aórticas teñidas para contar el número de núcleos de células de músculo liso en la túnica media. La imagen se segmentó en una nueva imagen binaria, con el color negro representando los núcleos. Antes del cálculo, se eliminaron los artefactos o partículas más pequeñas que el tamaño predeterminado. A continuación, 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.



Muestras de tejido para inclusión



Microtomo de rotación



Ejemplo de cortes arteriales

3.4. Análisis estadístico

Los datos en el texto, tablas y figuras se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 10 animales. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico para ciencias sociales v. 25.0 (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

4.1. RESULTADOS DE LAS VARIABLES ZOOMÉTRICAS

En la Tabla 4.1. y Figuras 4.1. y 4.2. se muestran los valores medios (media $\pm$ desviación estándar) correspondientes a las variables que definen el estado zoométrico de los animales de experimentación, es decir, peso corporal, ingesta de comida y de bebida diaria.

Los valores mostrados proceden de los animales controles no diabéticos (RND), animales controles diabéticos de dos meses de evolución (RD), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol (HT), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 0.5 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 1 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG, y animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG.

Las variables zoométricas analizadas se modificaron significativamente en los animales diabéticos no tratados. Así, el peso corporal fue mayor que en los animales no diabéticos y mostraron los dos signos fundamentales en la diabetes mellitus tipo 1 en humanos: polidipsia (mayor ingesta de bebida) y polifagia (mayor ingesta de comida). El peso corporal y la ingesta de comida no se modificaron significativamente en ninguno de los grupos con tratamiento, mientras que la ingesta de bebida tendió a reducirse respecto al grupo control diabético, pero no llegó a los valores del grupo no diabético.

Tabla 4.1. Peso corporal, cantidad de comida y bebida diaria (media $\pm$ desviación estándar) en los animales normoglucémicos (RND), controles diabéticos (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT) 5 mg/kg/día (HT-5), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) 0.5 o 1 mg/kg/día (DHPG-0.5, DHPG-1) o su asociación. N = 10 ratas por grupo.

Variable	RND	RD	HT-5	DHPG-0.5	DHPG-1	HT-5+DHPG-0.5	HT-5+DHPG-1
Peso corporal (g)	460 $\pm$ 7.3	347 $\pm$ 17.5 ⁽⁺⁾	358 $\pm$ 20.1	368 $\pm$ 17.8	364 $\pm$ 15.1	368 $\pm$ 23.8	374 $\pm$ 16.2
Ingesta de comida (g/día)	19.5 $\pm$ 2.0	29.5 $\pm$ 3.5 ⁽⁺⁾	24.3 $\pm$ 3.9	28.2 $\pm$ 2.9	23.8 $\pm$ 2.5	24.2 $\pm$ 2.9	27.2 $\pm$ 3.0
Ingesta de bebida (mL/día)	39.5 $\pm$ 5.1	110 $\pm$ 6.9 ⁽⁺⁾	82.7 $\pm$ 13.4	85.0 $\pm$ 9.1	82.5 $\pm$ 10.5	73.7 $\pm$ 10.3	80.7 $\pm$ 9.6

⁺p < 0.05 respecto a RND

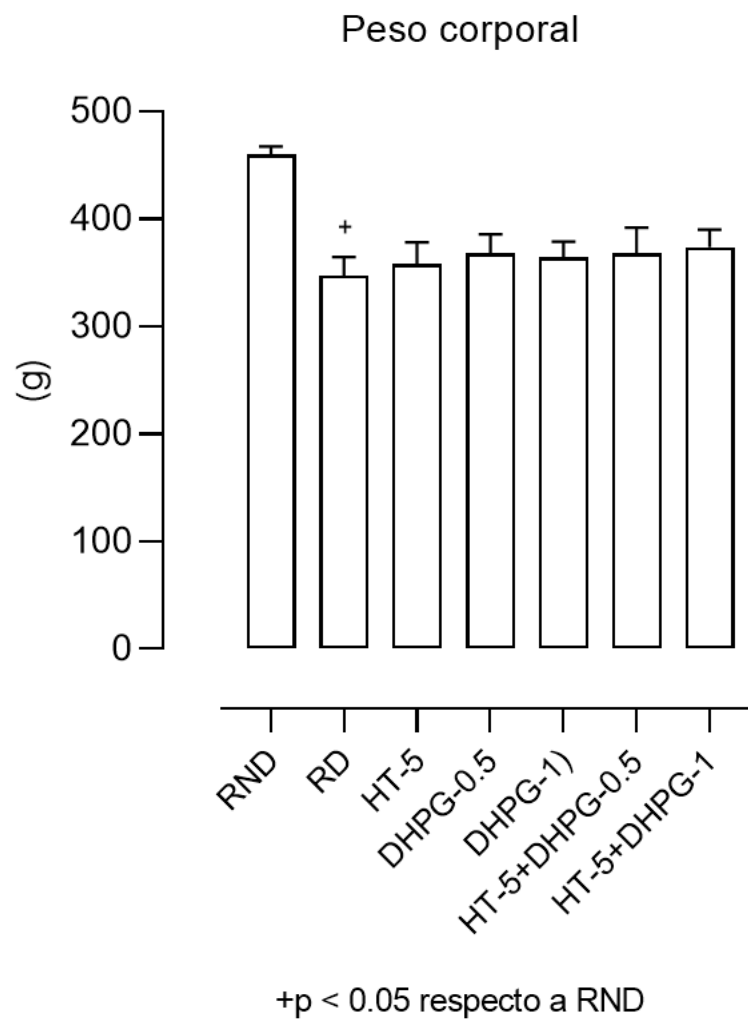


Figura 4.1. Peso corporal al finalizar los dos meses de seguimiento
(Abreviaturas en el enunciado de la tabla 4.1.)

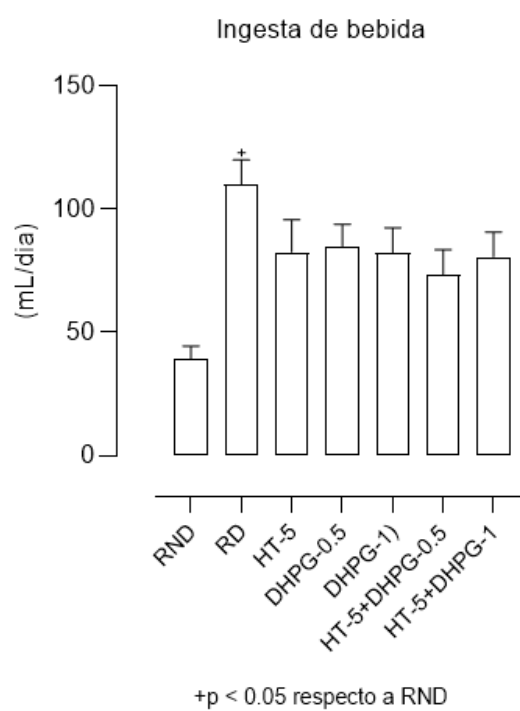
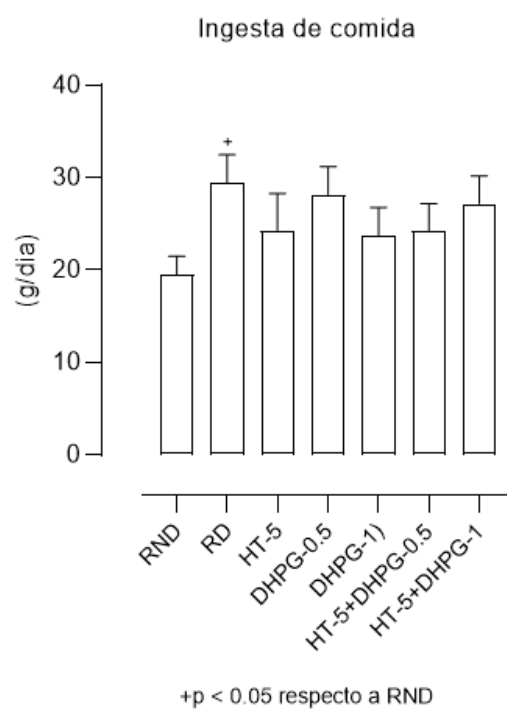


Figura 4.2. Ingesta de comida y bebida
(Abreviaturas en el enunciado de la tabla 4.1.)

4.2. RESULTADOS DE LAS VARIABLES METABÓLICAS

En la Tabla 4.2. y Figuras 4.3. y 4.4. se muestran los valores medios (media $\pm$ desviación estándar) correspondientes a las variables que definen el estado metabólico (glucídico y lipídico) de los animales de experimentación, es decir, glucosa, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos, séricos.

Los valores mostrados proceden de los animales controles no diabéticos (RND), animales controles diabéticos de dos meses de evolución (RD), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol (HT), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 0.5 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 1 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG, y animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG.

La glucosa sanguínea se incrementó significativamente en los animales diabéticos controles, manteniéndose elevada durante todo el periodo de seguimiento (x4.8 respecto a los animales no diabéticos). La administración de HT, DHPG y su asociación no modificó significativamente las cifras de glucosa sanguínea, respecto a los animales controles diabéticos.

Los animales diabéticos mostraron un perfil lipídico alterado respecto a los no diabéticos, si bien solo las cifras de triglicéridos fueron estadísticamente diferentes respecto al grupo no diabético: incremento del colesterol total (36% superior), LDL-colesterol (44% superior) y triglicéridos (55% superior). La administración de HT solo produjo un incremento significativo de los niveles séricos de HDL-colesterol (63% de incremento respecto a los animales diabéticos controles), si bien no alcanzó significación estadística. DHPG no modificó significativamente ninguna de las variables del perfil lipídico. La asociación HT-DHPG (0.5 mg/kg/día) redujo significativamente los niveles de triglicéridos respecto al grupo control diabético y a HT solo.

Tabla 4.2. Variables séricas de glucosa y perfil lipídico (media $\pm$ desviación estándar) en los animales normoglucémicos (RND), controles diabéticos (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT) 5 mg/kg/día (HT-5), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) 0.5 o 1 mg/kg/día (DHPG-0.5, DHPG-1) o su asociación. N = 10 ratas por grupo.

Variable	RND	RD	HT-5	DHPG-0.5	DHPG-1	HT-5+DHPG-0.5	HT-5+DHPG-1
Glucosa (mg/dL)	95,1 $\pm$ 5.3	456 $\pm$ 10.0 ⁽⁺⁾	460 $\pm$ 9.7	384 $\pm$ 32.5	424 $\pm$ 36.7	329 $\pm$ 39.8	420 $\pm$ 10.8
Colesterol total (mg/dL)	57.5 $\pm$ 7.4	78.7 $\pm$ 4.7	68.3 $\pm$ 2.5	75.2 $\pm$ 7.5	71.0 $\pm$ 9.1	70.7 $\pm$ 6.7	72.5 $\pm$ 4.7
Colesterol LDL (mg/dL)	23.2 $\pm$ 5.4	33.5 $\pm$ 5.8	30.1 $\pm$ 7.8	34.0 $\pm$ 6.8	29.2 $\pm$ 6.1	28.2 $\pm$ 7.1	27.7 $\pm$ 4.1
Colesterol HDL (mg/dL)	18.5 $\pm$ 2.4	18.4 $\pm$ 4.8	28.0 $\pm$ 8.1 ^(*)	25.5 $\pm$ 5.4	27.5 $\pm$ 4.4	24.5 $\pm$ 4.1	25.2 $\pm$ 2.8
Triglicéridos (mg/dL)	67.5 $\pm$ 7.7	105 $\pm$ 13.7 ⁽⁺⁾	102 $\pm$ 6.6	108 $\pm$ 6.5	109 $\pm$ 13.5	85.5 $\pm$ 7.8 ^(*,a)	110 $\pm$ 7.4

⁺p < 0.05 respecto a RND; ^{*}p < 0.05 respecto a RD; ^ap < 0.05 respecto a HT-5, DHPG-0.5 and DHPG-1.

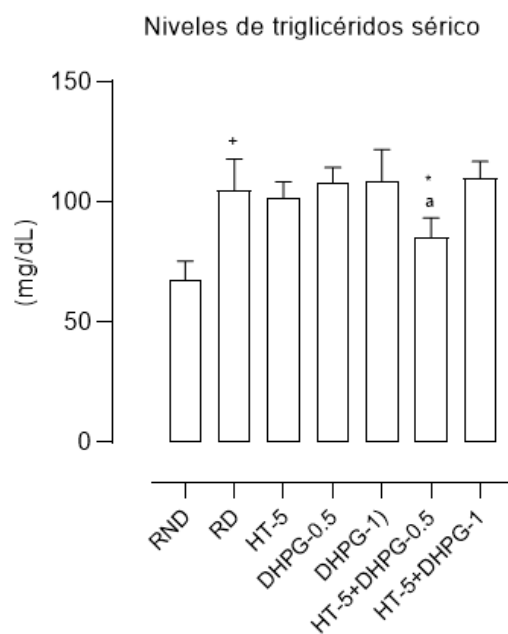
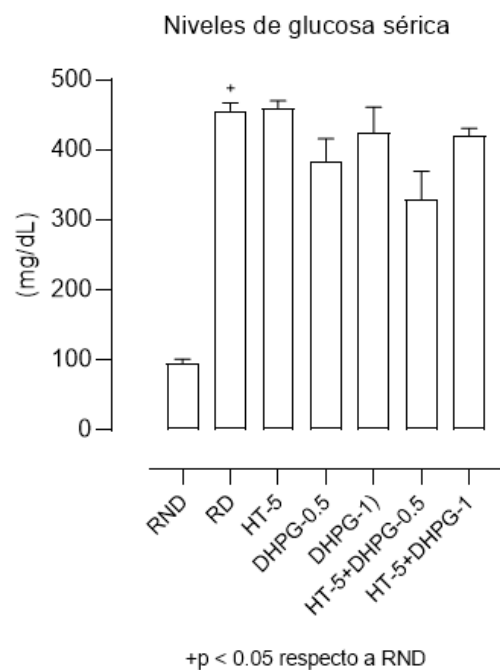


Figura 4.3. Niveles séricos de glucosa y triglicéridos
 (Abreviaturas en el enunciado de la tabla 4.2.)

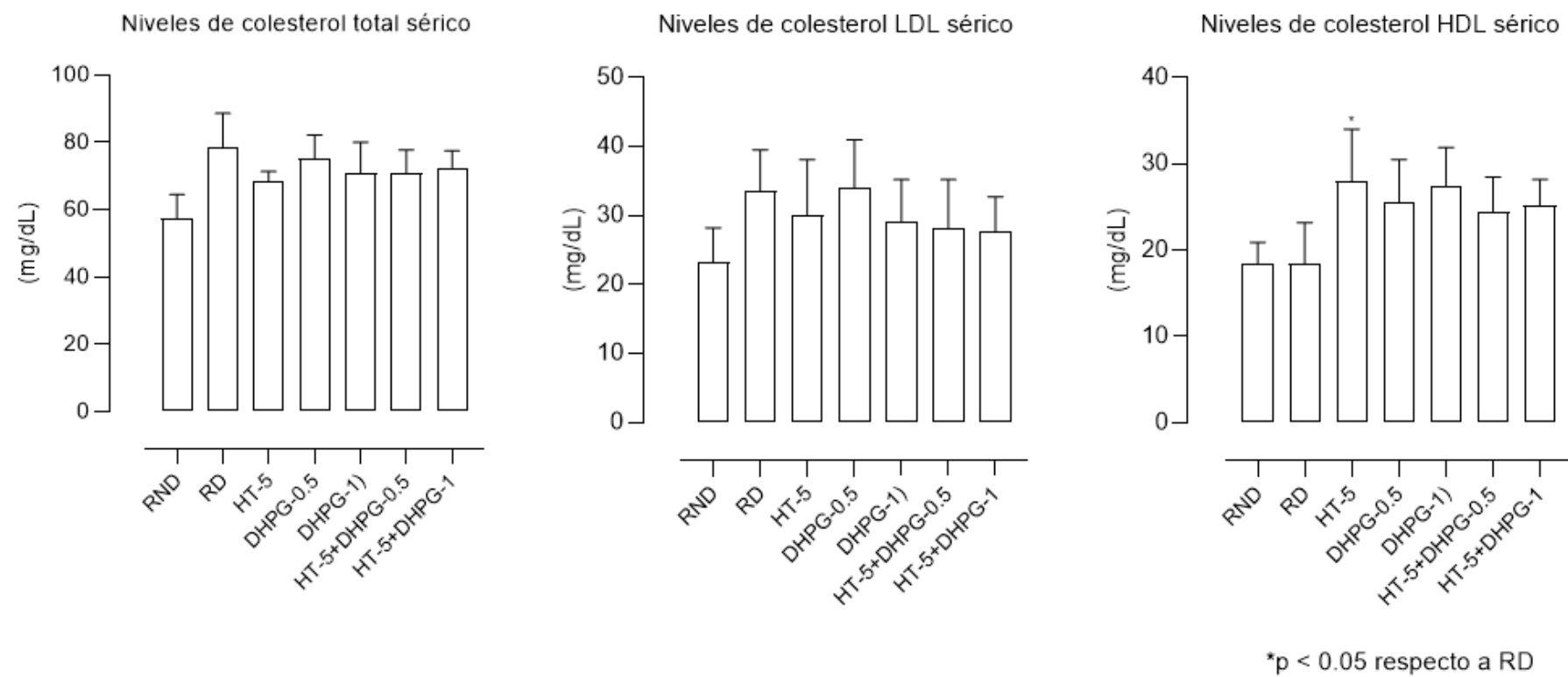


Figura 4.4. Niveles séricos de colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL
(Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.2.)

4.3. RESULTADOS DE LAS VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

En la Tabla 4.3. y Figuras 4.5. a 4.8. se muestran los valores medios (media $\pm$ desviación estándar) correspondientes a las variables que definen el estrés oxidativo y nitrosativo de los animales de experimentación, es decir: peroxidación lipídica, oxidación de LDL, daño de ADN, 8-isoprostanos, glutatión reducido y glutatión peroxidasa, capacidad antioxidante total y 3-nitrotirosina.

Los valores mostrados proceden de los animales controles no diabéticos (RND), animales controles diabéticos de dos meses de evolución (RD), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol (HT), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 0.5 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 1 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG, y animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG.

Respecto a las variables de estrés oxidativo y nitrosativo, los animales diabéticos mostraron un claro perfil de mayor estrés oxidativo y nitrosativo respecto a los animales no diabéticos: mayores niveles de TBARS (x 2.2), oxLDL (76.4%), 8-OHdG (76.2%), 8-isoprostanos urinarios (41.5%), GSHpx (x 2.6) y 3-nitrotirosina (x 3.3), y una reducción en los niveles de GSH (30.9% menores) y TAC (38.8% menores).

La administración de HT mostró un perfil antioxidante claro respecto a los animales diabéticos controles: reducción significativa de TBARS, oxLDL, 8-OHdG, 8 isoprostanos y 3 nitrotirosina e incremento de TAC y GSH. DHPG mostró un perfil de comportamiento similar a HT, pero cuantitativamente menor. El efecto antioxidante de DHPG se vio incrementado en presencia de HT en la reducción de TBARS (DHPG 1 mg/kg/día) oxLDL, oxLDL, 8-isoprostanos (DHPG 1 mg/kg/día), 8-OHdG y 3-nitrotyrosine y en el incremento de GSH.

Tabla 4.3. Variables séricas de estrés oxidativo y nitrosativo (media $\pm$ desviación estándar) en los animales normoglucémicos (RND), controles diabéticos (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT) 5 mg/kg/día (HT-5), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) 0.5 o 1 mg/kg/día (DHPG-0.5, DHPG-1) o su asociación. N = 10 ratas por grupo.

Variable	RND	RD	HT-5	DHPG-0.5	DHPG-1	HT-5+DHPG-0.5	HT-5+DHPG-1
TBARS (nmol/mL)	4.0 $\pm$ 0.8	8.9 $\pm$ 0.7 ⁽⁺⁾	4.7 $\pm$ 0.4 ^(*,c)	6.7 $\pm$ 0.4 ^(*)	6.5 $\pm$ 0.5 ^(*)	5.1 $\pm$ 0.6 ^(*)	2.4 $\pm$ 0.4 ^(*,c)
oxLDL (ng/mL)	14.0 $\pm$ 0.9	24.7 $\pm$ 1.5 ⁽⁺⁾	17.3 $\pm$ 0.5 ^(*)	16.7 $\pm$ 2.3 ^(*)	17.8 $\pm$ 2.1 ^(*)	12.3 $\pm$ 1.3 ^(*,b)	12.0 $\pm$ 0.6 ^(*,b)
8-OHdG (ng/mL)	15.6 $\pm$ 0.6	27.5 $\pm$ 1.5 ⁽⁺⁾	15.5 $\pm$ 1.4 ^(*)	16.5 $\pm$ 1.1 ^(*)	14.9 $\pm$ 1.6 ^(*)	12.2 $\pm$ 2.1 ^(*,a)	15.4 $\pm$ 0.7 ^(*,a)
8-isoprostanos (ng/mg creatinine urinarua)	6.5 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 0.6 ⁽⁺⁾	5.6 $\pm$ 0.6 ^(*)	4.8 $\pm$ 0.7 ^(*)	4.8 $\pm$ 0.8 ^(*,c)	4.2 $\pm$ 0.5 ^(*)	2.8 $\pm$ 0.3 ^(*,e)
GHS (nmol/mL)	131 $\pm$ 5.4	90.4 $\pm$ 7.2 ⁽⁺⁾	114 $\pm$ 4.8 ^(*)	103 $\pm$ 3.5 ^(*)	111 $\pm$ 6.8 ^(*)	140 $\pm$ 5.3 ^(*,f)	132 $\pm$ 4.5 ^(*,f)
GSHpx (nmol/min/mL)	7.0 $\pm$ 0.8	18.7 $\pm$ 1.6 ⁽⁺⁾	10.7 $\pm$ 1.0 ^(*)	13.3 $\pm$ 1.5 ^(*)	15.6 $\pm$ 0.2 ^(*,e)	15.7 $\pm$ 0.5 ^(*,e)	15.6 $\pm$ 0.9 ^(*,e)
TAC (U/mL)	19.8 $\pm$ 0.7	12.1 $\pm$ 0.8 ⁽⁺⁾	17.1 $\pm$ 0.6 ^(*,b)	13.1 $\pm$ 0.6	15.2 $\pm$ 0.8 ^(*)	16.6 $\pm$ 0.5 ^(*)	17.7 $\pm$ 0.4 ^(*,b)
3-nitrotirosina (pg/mL)	1.9 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.4 ⁽⁺⁾	3.5 $\pm$ 0.3 ^(*,d)	5.4 $\pm$ 0.08 ^(*)	4.6 $\pm$ 0.1 ^(*)	2.6 $\pm$ 0.3 ^(*,b)	1.9 $\pm$ 0.09 ^(*,c)

8-OHdG: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina; GSH: glutatión reducido; GSHpx: actividad glutatión peroxidasa; oxLDL: LDL oxidada; TAC: capacidad antioxidante total; TBARS: productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico.

⁺p < 0.05 con respecto a RND; ^{*}p < 0.05 con respecto a RD. ^ap < 0.05 con respecto a DHPG-0.5 ^bp < 0.05 con respecto a DHPG-0.5 y DHPG-1; ^cp < 0.05 con respecto a DHPG-0.5, DHPG-1 y HT-5+DHPG-0.5; ^dp < 0.05 con respecto a DHPG tanto solo como asociado a HT; ^ep < 0.05 con respecto a HT y DHPG-0.5; ^fp < 0.05 con respecto a HT, DHPG-0.5 y DHPG-1.

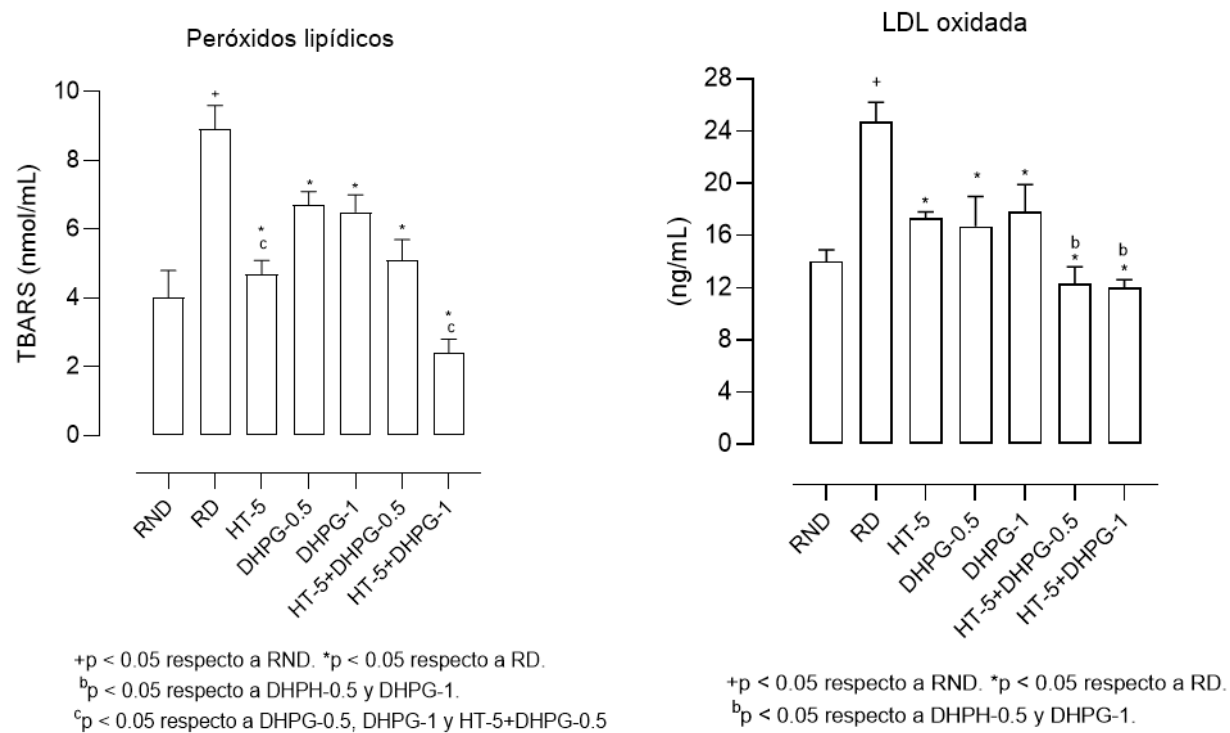
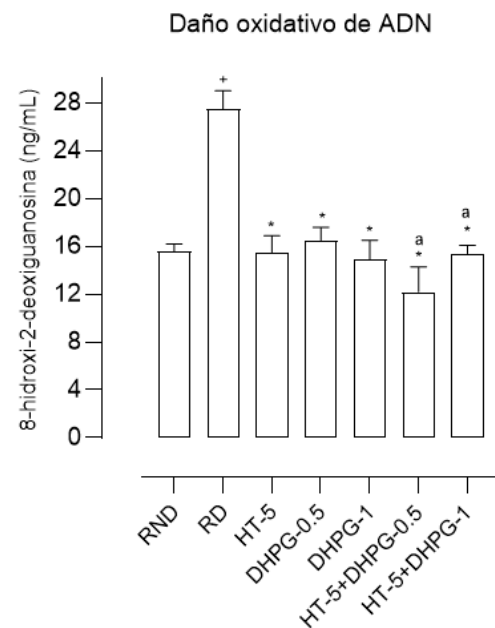
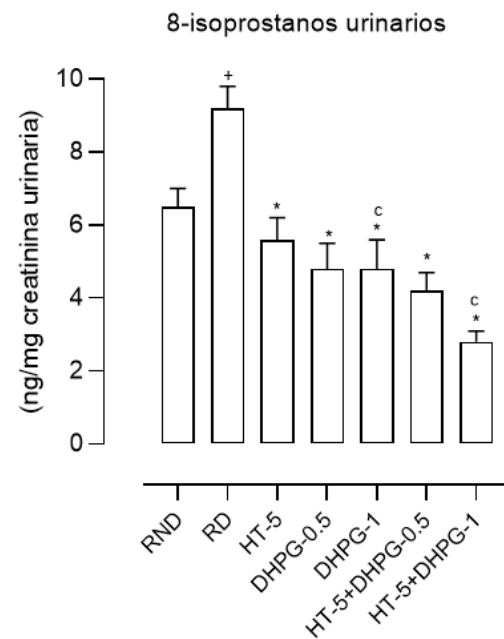


Figura 4.5. Niveles séricos de peróxidos lipídicos y LDL oxidada
 (Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.3.)



+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.
^ap < 0.05 respecto a DHPH-0.5.



+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.
^cp < 0.05 respecto a DHPH-0.5, DHPG-1 y HT-5+DHPG-0.5.

Figura 4.6. Niveles séricos de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina y urinarios de 8-isoprostanos
 (Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.3.)

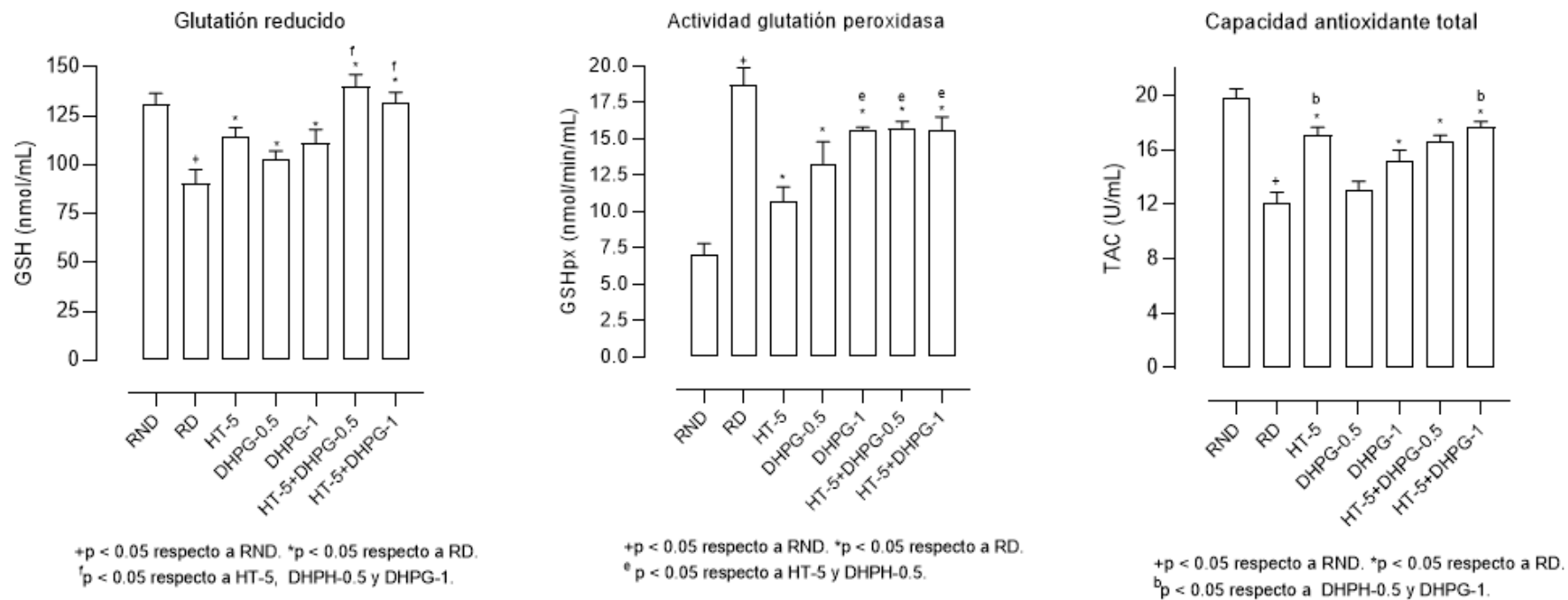
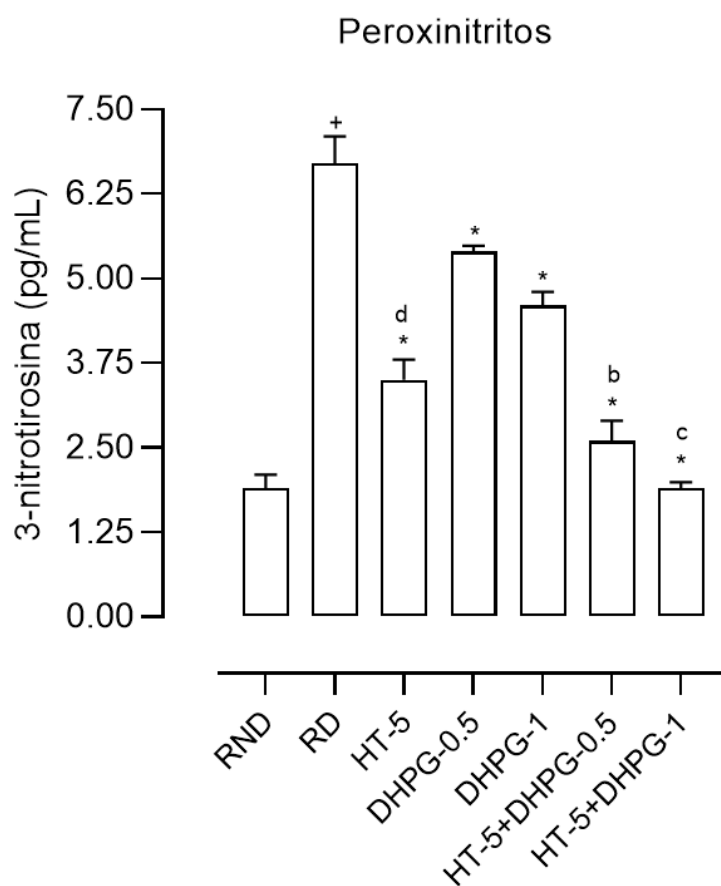


Figura 4.7. Niveles séricos de glutación reducido, actividad glutación peroxidasa y capacidad antioxidante total
 (Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.3.)



+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.
^bp < 0.05 respecto a DHPH-0.5 y DHPG-1. ^cp < 0.05
 respecto a DHPG-0.5, DHPG-1 y HT-5+DHPG-0.5. ^dp
 < 0.05 respecto a DHPG 0.5 y 1 solos o asociados a
 HT-5.

Figura 4.8. Niveles séricos de 3-nitrotirosina
 (Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.3.)

4.4. RESULTADOS DE VARIABLES CARDIOVASCULARES

En la Tabla 4.4. y Figuras 4.9. a 4.11. se muestran los valores medios (media $\pm$ desviación estándar) correspondientes a las diversas variables que definen algunos aspectos de del sistema cardiovascular de los animales de experimentación, es decir: capacidad agregatoria de las plaquetas, producción de tromboxano y prostaciclina, niveles de activación leucocitaria (mieloperoxidasa) y de proteína adhesiva leucocitaria y endotelial (VCAM-1).

Los valores mostrados proceden de los animales controles no diabéticos (RND), animales controles diabéticos de dos meses de evolución (RD), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol (HT), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 0.5 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 1 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG, y animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG.

Respecto a las variables cardiovasculares (Tabla 4.4.), los animales diabéticos controles mostraron alteraciones en todas ellas: incremento de la intensidad máxima de agregación plaquetaria (80.4%), 11-dehidro-TxB₂ (x2.5), mieloperoxidasa (MPOx) (x3.5) y VCAM-1 (x2.0) y reducción de la producción de prostaciclina (6-keto-PGF1 α) (51.4%). La administración de HT redujo las variables denominadas pro-trombóticas (agregación plaquetaria, tromboxano B₂, MPOx y VCAM-1) y frenó la disminución de la producción de prostaciclina. La administración de DHPG a los animales diabéticos redujo significativamente la agregación plaquetaria y VCAM-1 y disminuyó la caída de prostaciclina. La adición de DHPG incrementó el efecto antiplaquetario, inhibidor de la producción de VCAM-1 (1 mg/kg/día) y estimulante de la síntesis de prostaciclina ejercido por HT.

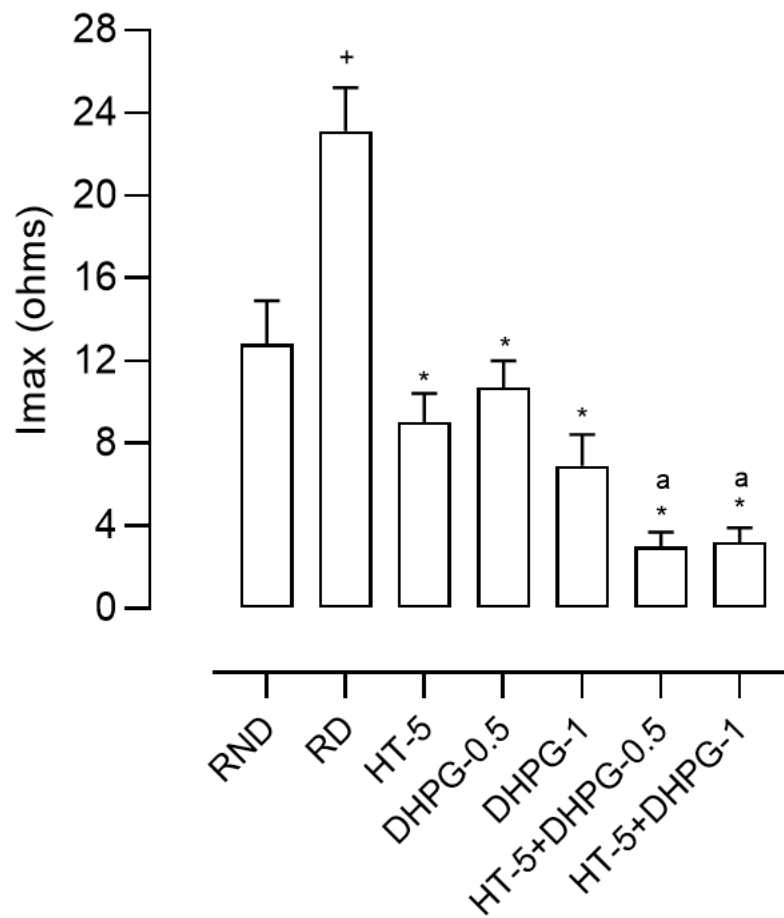
Table 4.4. Variables cardiovasculares (media $\pm$ desviación estándar) en los animales normoglucémicos (RND), controles diabéticos (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT) 5 mg/kg/día (HT-5), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) 0.5 o 1 mg/kg/día (DHPG-0.5, DHPG-1) o su asociación. N = 10 ratas por grupo.

Variable	RND	RD	HT-5	DHPG-0.5	DHPG-1	HT-5+DHPG-0.5	HT-5+DHPG-1
Imax (ohms)	12.8 $\pm$ 2.1	23.1 $\pm$ 2.1 ⁽⁺⁾	8.8 $\pm$ 1.4 ^(*)	10.7 $\pm$ 1.3 ^(*)	6.9 $\pm$ 1.5 ^(*)	3.0 $\pm$ 0.7 ^(*,a)	3.2 $\pm$ 0.7 ^(*,a)
11-dH-TxB ₂ (ng/mg creatinine urinaria)	3.9 $\pm$ 0.9	9.7 $\pm$ 1.1 ⁽⁺⁾	4.4 $\pm$ 1.2 ^(*)	8.9 $\pm$ 1.8	6.8 $\pm$ 0.9	5.6 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 1.6
6-keto-PGF _{1α} (pg/mg creatinine urinaria)	14.0 $\pm$ 1.4	6.8 $\pm$ 1.0 ⁽⁺⁾	10.8 $\pm$ 1.6 ^(*)	11.1 $\pm$ 0.9 ^(*)	13.1 $\pm$ 1.9 ^(*)	16.6 $\pm$ 1.5 ^(*,c)	18.7 $\pm$ 2.8 ^(*,c)
MPOx (ng/mL)	0.8 $\pm$ 0.08	2.5 $\pm$ 0.3 ⁽⁺⁾	0.7 $\pm$ 0.2 ^(*)	0.8 $\pm$ 0.1 ^(*)	0.8 $\pm$ 0.09 ^(*)	0.5 $\pm$ 0.1 ^(*)	0.4 $\pm$ 0.08 ^(*)
VCAM-1 (ng/mL)	4.8 $\pm$ 0.8	9.7 $\pm$ 0.8 ⁽⁺⁾	4.1 $\pm$ 0.4 ^(*)	7.9 $\pm$ 0.6 ^(*)	6.1 $\pm$ 0.8 ^(*)	4.6 $\pm$ 0.5 ^(*)	3.4 $\pm$ 0.8 ^(*,b)

Imax: intensidad máxima de agregación plaquetaria. 6-keto-PGF_{1 α} : 6-keto-prostaglandin F_{1 α} ; 11-dH-TxB₂: 11-dehidro-tromboxano B₂. MPOx: mieloperoxidasa. VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular tipo 1.

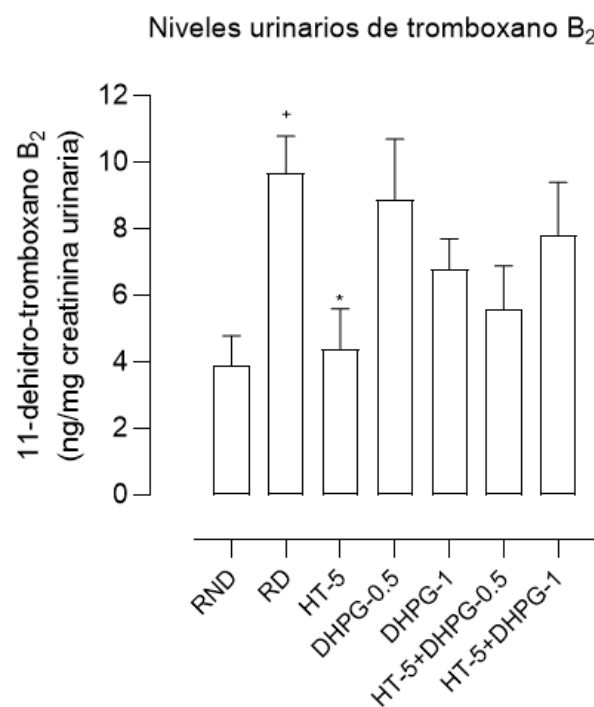
*p < 0.05 respecto a RD. ^ap < 0.05 respecto a DHPG-0.5; ^bp < 0.05 respecto a DHPG-0.5, DHPG-1 y HT-5+DHPG-0.5; ^cp < 0.05 respecto a HT, DHPG-0.5 y DHPG-1.

Intensidad máxima de agregación plaquetaria

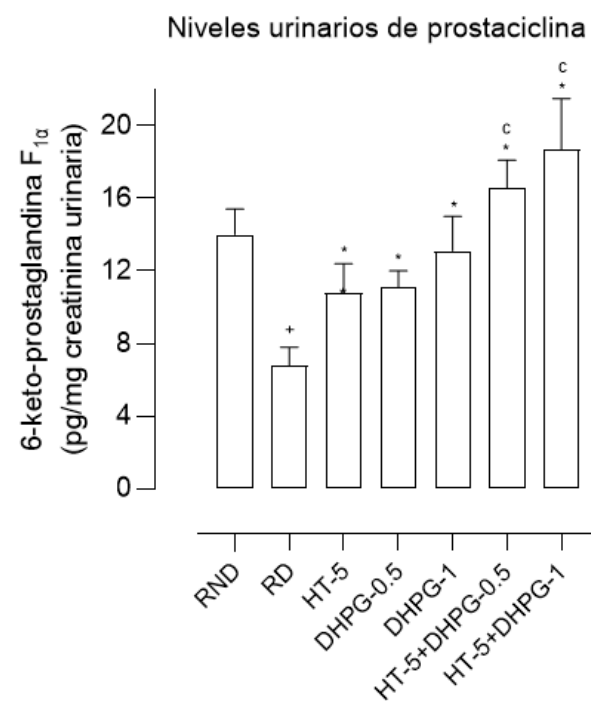


+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.
^ap < 0.05 respecto a DHPH-0.5

Figura 4.9. Intensidad máxima de agregación plaquetaria inducida con colágeno
 (Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.4.)

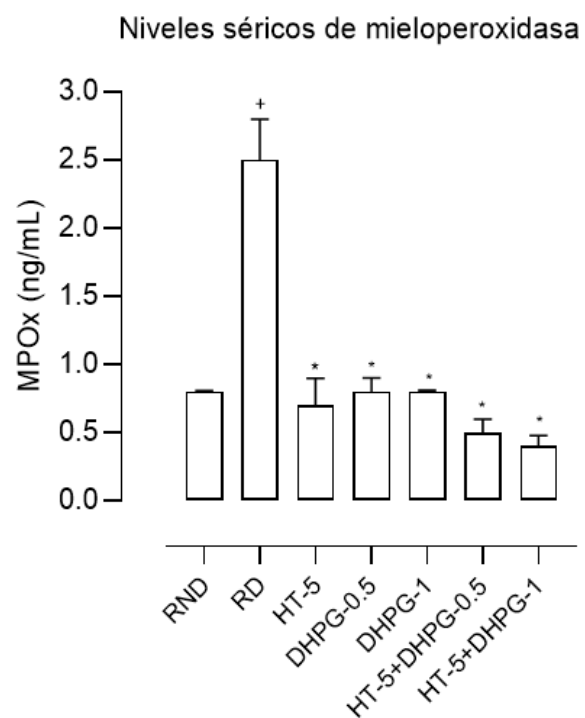


+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.

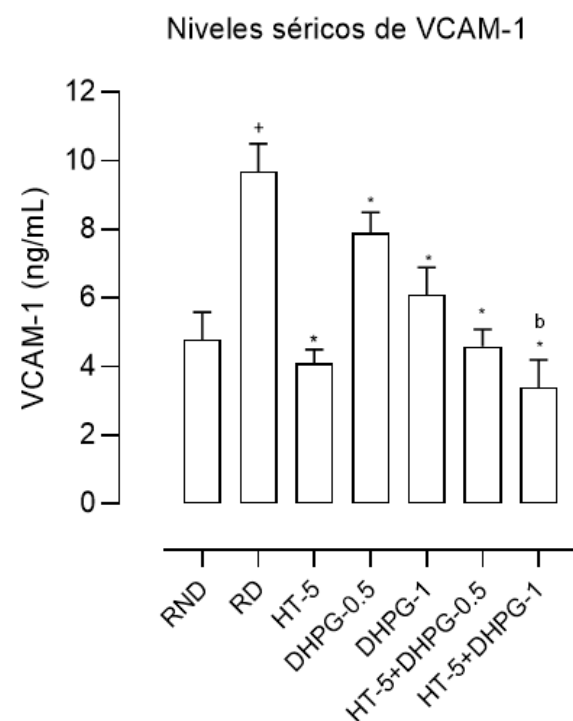


+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.
cp < 0,05 respecto a HT-5, DHPG-0.5 y DHPG-1

Figura 4.10. Niveles urinarios de tromboxano y prostaciclina
(Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.4.)



+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.



+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.

^bp < 0.05 respecto a DHPG-0.5, DHPG-1 y HT-5+DHPG-0.5

Figura 4.11. Niveles séricos de mieloperoxidasa y VCAM-1
(Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.4.)

4.5. RESULTADOS DE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS DE LA PARED AÓRTICA

En la Tabla 4.5. y Figuras 4.12. y 4.13. se muestran los valores medios (media $\pm$ desviación estándar) correspondientes a las diversas variables morfométricas determinadas en la pared aórtica. En la Figura 4.13. se muestran algunos ejemplos representativos de las imágenes morfológicas obtenidas en los distintos grupos de estudio.

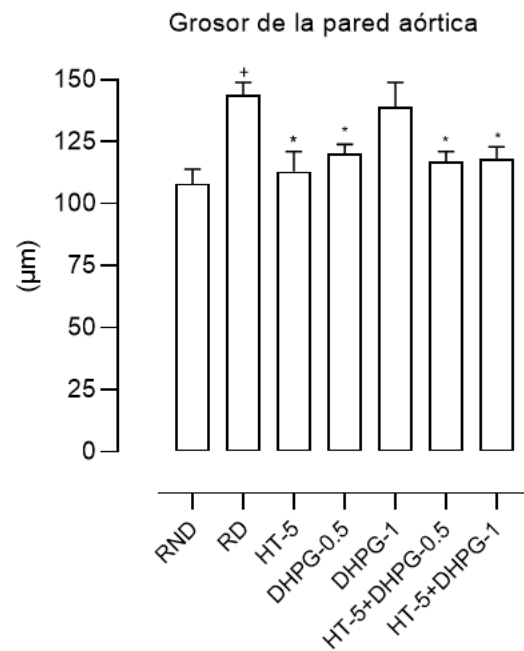
Los valores mostrados proceden de los animales controles no diabéticos (RND), animales controles diabéticos de dos meses de evolución (RD), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día p.o. de hidroxitirosol (HT), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 0.5 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 1 mg/kg/día p.o. de 3,4-dihidrofénilglicol (DHPG), animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG, y animales diabéticos de dos meses de evolución tratados con 5 mg/kg/día de HT más 0.5 mg/kg/día p.o. de DHPG.

El área de la capa media de las arterias analizadas en el grupo de animales controles diabéticos (Tabla 4.5.) fue significativamente mayor respecto a los animales controles no diabéticos (33.3% mayor). De igual manera, las arterias de los animales diabéticos presentaron una mayor densidad celular en la capa media que los normoglucémicos (31.2% mayor). Todos los tratamientos administrados a los animales diabéticos disminuyeron significativamente ambos parámetros morfométricos, excepto DHPG-1, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

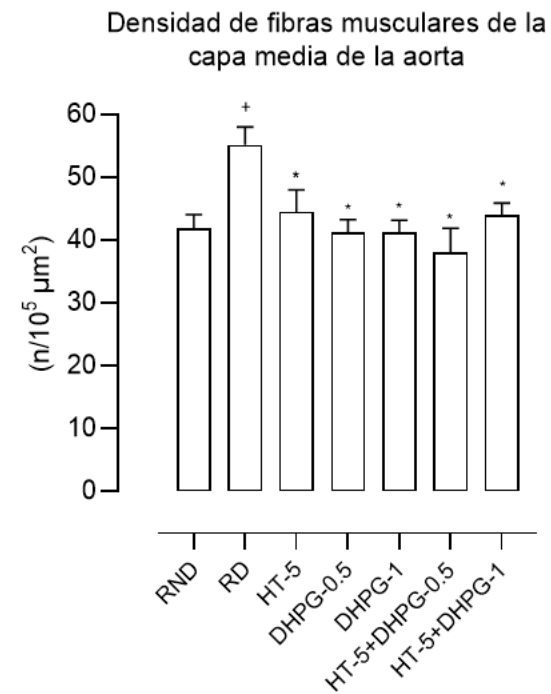
Tabla 4.5. Variables morfométricas cuantificadas en secciones de aorta abdominal (media $\pm$ desviación estándar) en los animales normoglucémicos (RND), controles diabéticos (RD) y RD tratadas con hidroxitirosol (HT) 5 mg/kg/día (HT-5), 3',4'-dihidroxifenilglicol (DHPG) 0.5 o 1 mg/kg/día (DHPG-0.5, DHPG-1) o su asociación. N = 10 ratas por grupo.

Variable	RND	RD	HT-5	DHPG-0.5	DHPG-1	HT-5+DHPG-0.5	HT-5+DHPG-1
Grosor del corte arterial (μm)	108 ± 5.8	$144 \pm 5.2^{(+)}$	$113 \pm 7.9^{(*)}$	$120 \pm 3.3^{(*)}$	$190 \pm 9.4^{(*)}$	$117 \pm 4.2^{(*)}$	$118 \pm 4.8^{(*)}$
Células musculares lisas de la capa media ($\text{n}/10^5 \mu\text{m}^2$)	41.9 ± 2.2	$55.2 \pm 2.8^{(+)}$	$44.5 \pm 3.5^{(*)}$	$41.2 \pm 2.1^{(*)}$	$41.3 \pm 1.9^{(*)}$	$38.1 \pm 3.8^{(*)}$	$44.0 \pm 1.9^{(*)}$

$^{+}p < 0.05$ respecto a NDR; $^{*}p < 0.05$ respecto a DR

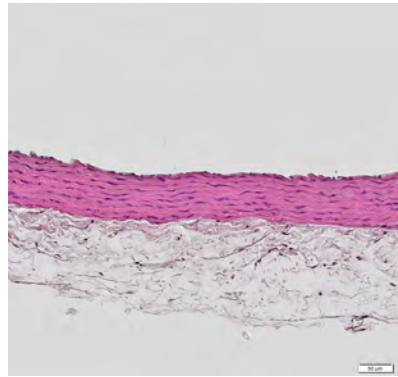


+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.

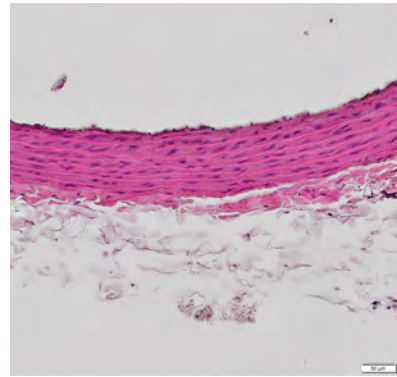


+p < 0.05 respecto a RND. *p < 0.05 respecto a RD.

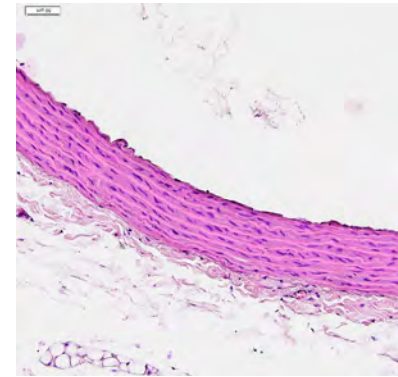
Figura 4.12. Valores morfométricos en cortes de aorta abdominal
(Abreviaturas en el enunciado de la Tabla 4.5.)



NDR



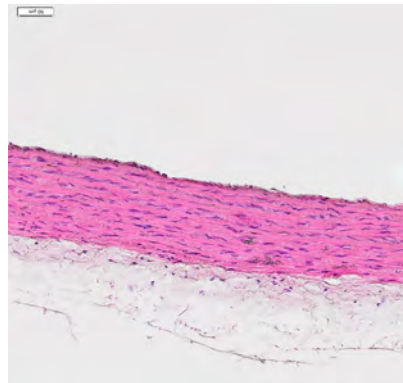
DR



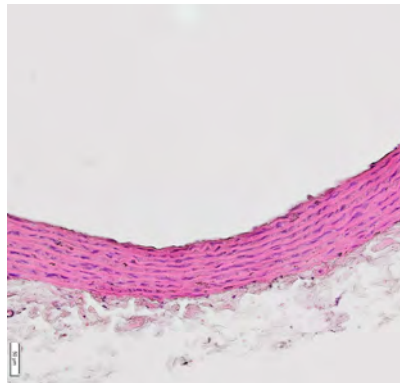
DR + HT (5)



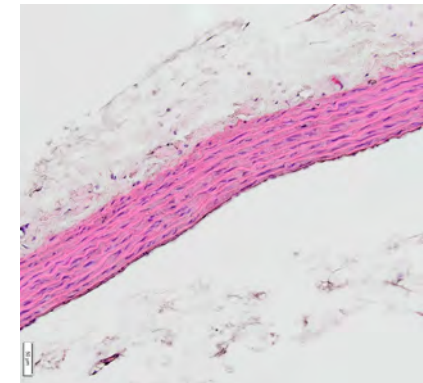
DR + DHPG (0.5)



DR + DHPG (1).



DR + HT (5) + DHPG (0.5).



DR + HT (5) + DHPG (1)

Figura 4.12. Ejemplos representativos de cortes de aorta abdominal



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los estudios que abordan las posibles interacciones de los efectos biológicos de los principales polifenoles del AOVE tienen dos objetivos principales (Hernández et al., 2021; Pedret et al., 2021): aportar las bases para mejorar los beneficios del AOVE y/o dar una explicación a los múltiples efectos del AOVE.

En primer lugar, conocer estos posibles efectos sinérgicos establece las evidencias para obtener aceites funcionales que mejoren el perfil saludable del AOVE. Está claramente demostrado que los polifenoles del AOVE son los responsables de sus efectos cardiovasculares, así como que AOVEs con una mayor cantidad de polifenoles en general, incrementan los efectos beneficiosos sobre diversos biomarcadores de enfermedad cardiovascular (Covas et al., 2006; Estruch et al., 2018). Con estos fundamentos, la industria alimentaria puso sus miras en la investigación de posibles aceites funcionalizados, es decir, aceites naturales enriquecidos con los componentes de estos que aseguraran un mejor espectro e intensidad de acción, en este caso en cuanto a la protección cardiovascular. Por eso, conocer qué polifenoles son los activos en este tema, en qué cantidad y cómo podrían interactuar entre ellos, es fundamental para este objetivo.

En este sentido, no hay que olvidar que no todas las cantidades de polifenoles son las óptimas como compuestos activos en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Se conoce que, con estos polifenoles, como con la mayoría de los compuestos antioxidantes naturales, se produce el fenómeno de la hormesis (Calabrese, 2018). Este fenómeno esclarece la observación de un menor efecto antioxidante, incluso una conversión hacia un efecto pro-oxidante, al incrementar la cantidad del compuesto, posiblemente debido al mecanismo de captación de radicales libres por parte del antioxidante o a un mecanismo inducido en el tejido biológico a modo de defensa contra el efecto de estos compuestos. Es por ello que en nuestro trabajo hemos elegido una ratio de dosis DHPG/HT que estuviera en el AOVE de forma natural.

Por otro lado, estos estudios intentan explicar el efecto final del AOVE a través de una interacción entre sus principales compuestos polifenólicos, ya que los estudios que analizaron estos compuestos por separado mostraron efectos biológicos (antioxidante, antiinflamatorio, sobre marcadores cardiovasculares, neuroprotector, etc.) que no

alcanzaron la intensidad significativa de los beneficios demostrados por el AOVE (De La Cruz et al., 2021; López-Villodres et al., 2016). Este segundo aspecto es el más directamente relacionado con nuestro estudio, a la vez que pudiera servir de base para futuros estudios con aceites funcionalizados con la asociación HT-DHPG, a la vista de los resultados obtenidos.

Se han publicado diversos estudios en los que se aborda el objetivo de analizar las posibles interacciones de los polifenoles del AOVE. Así, en cultivos de células endoteliales, se incubaron distintas mezclas de polifenoles obtenidos de extractos de aceitunas y se valoraron algunos biomarcadores vasculares y de estrés oxidativo. (Hernández et al., 2021). Se demostró que los principales polifenoles implicados en los efectos beneficiosos del AOVE, en este medio experimental, son HT, DHPG y oleocantal (Hernández et al., 2021).

Asimismo, en tejido cerebral sometido a un modelo de hipoxia-reoxigenación in vitro, se demostró que el DHPG aumenta significativamente el efecto neuroprotector del HT, posiblemente debido a un efecto sinérgico a nivel de su acción antioxidante, efecto que no se observó con otro polifenol del AOVE, el tirosol (De La Cruz et al., 2021).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el modelo experimental de diabetes utilizado en este trabajo presentó un estado bioquímico con un evidente estrés oxidativo y nitrosativo, así como un aumento de los biomarcadores implicados en la enfermedad cardiovascular en humanos, lo que justificó su uso para estudiar la asociación de HT y DHPG en una enfermedad que es un reconocido factor de riesgo cardiovascular. Estos resultados reproducen los previamente obtenidos por nuestro grupo (López-Villodres et al., 2016). La elección de este modelo experimental de diabetes mellitus similar al tipo 1 en humanos, se debe a que queríamos establecer un daño vascular directamente debido a la hiperglucemia mantenida, descartando posibles influencias de una alteración en el metabolismo lipídico, obesidad o alteraciones en el tejido hepático y/o graso a nivel del metabolismo de la glucosa, tal y como ocurre en los modelos experimentales de diabetes mellitus similar al tipo 2 en humanos (Islam & Loots, 2019). Por otra parte, elegimos dos meses de evolución de la diabetes para poder analizar un estado de “inflamación vascular”, más que un deterioro manifiesto y muchas veces irreversible del sistema cardiovascular, hecho que se obtiene con evoluciones de más de tres meses en este modelo experimental (Gvazaya et al., 2018).

En el grupo control diabético demostramos alteraciones en todas las variables analizadas, referentes a biomarcadores de daño vascular: estrés oxidativo, nitrosativo y variables cardiovasculares, tales como agregación plaquetaria, equilibrio tromboxano/prostaciclina y marcadores pro-inflamatorios, como mieloperoxidasa y VCAM-1. Por lo tanto, el modelo experimental utilizado ofrece las características que en los pacientes diabéticos configuran el inicio de la vasculopatía diabética.

¿Cómo influyen los dos polifenoles del AOVE utilizados sobre estas variables?

Si aceptamos la importancia del estrés oxidativo, la disfunción endotelial y los mediadores oro-inflamatorios, en el desarrollo de la vasculopatía diabética, hemos de afirmar que ambos polifenoles modifican estos parámetros en un sentido inhibitorio de los factores dañinos y un respeto, incluso estimulación, de los defensivos.

Tanto hidroxitirosol (Silva et al., 2020; Vlavcheski et al., 2019), como DHPG (Aparicio-Soto et al., 2015; Rodríguez-Gutierrez et al., 2012), han demostrado por separado efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antitrombóticos, todos ellos relacionados con importantes mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Silveira-Rossi et al., 2021).

Por otra parte, se ha demostrado que el AOVE modifica estos mismos mecanismos fisiopatológicos (Estruch et al., 2018; Hernáez et al., 2015). Habida cuenta la similitud de efectos, a nivel cualitativo, de los polifenoles del AOVE con su administración como tal aceite, se ha adjudicado a estos compuestos la mayor responsabilidad de los efectos cardiovasculares del AOVE. No obstante, concretamente con hidroxitirosol como polifenol que presenta el mayor peso específico en este efecto, no se puede adjudicar en su totalidad esta responsabilidad (Cabrerizo et al., 2013), por lo que habría que pensar en un posible efecto sinérgico entre algunos de los polifenoles que componen el AOVE (Hernáez et al., 2021). Es más, se postula que una combinación de estos polifenoles podría mejorar el efecto cardiovascular final del AOVE, permitiendo diseñar un nuevo AOVE con mayor poder protector cardiovascular (Hernáez et al., 2021).

En concreto, con hidroxitirosol y DHPG, esta sinergia se demostró a nivel de agregación plaquetaria, tanto *in vitro* (de Roos et al., 2011; Rubio-Senent et al., 2015) como *ex vivo* (Rubio-Senent et al., 2015), así como en su actividad antioxidante (De La Cruz et al.,

2021; Fernández-Prior et al., 2021), neuroprotectora (De La Cruz et al., 2021) y efectos antiinflamatorios (Fernández-Prior et al., 2021).

¿Qué aporta el presente estudio al análisis de esta asociación?

En este trabajo, estos efectos se combinaron en el mismo modelo experimental y esta interacción positiva se demostró en casi todos los biomarcadores de enfermedad cardiovascular: estrés oxidativo y nitrosativo, proteínas adhesivas y biomarcadores de enfermedad cardiovascular isquémica. Asimismo, este efecto sinérgico se demuestra con dosis de hidroxitirosol y DHPG en las mismas proporciones que se encuentran en AOVE de diferentes orígenes (Fernández-Bolaños et al., 2002; Rubio-Senent et al., 2012).

En cuanto al efecto antioxidante, ambos compuestos mostraron una inhibición de las variables oxidativas y un aumento de antioxidantes, así como una inhibición en la producción de estrés nitrosativo. En todos los casos, fundamentalmente asociando DHPG 1 mg/kg/día, se mejoró el perfil mostrado de ambos polifenoles. Está ampliamente demostrado que tanto la hidroxitirosol como el DHPG tienen capacidad de capturar radicales libres (“efecto scavenger”) (Fernández-Prior et al., 2021), así como de inhibir la producción de peroxidación lipídica (De La Cruz et al., 2021), nuestro trabajo demuestra que este efecto también se produjo en los niveles de glutatión y estrés nitrosativo, en una situación experimental en la que ambos aspectos bioquímicos se encuentran modificados. Es importante destacar que también se observó en la concentración sérica de LDL oxidada, molécula de importancia en la fisiopatología de la enfermedad vascular, ya sea en pacientes diabéticos o no (Mitra et al., 2011). La importancia de la LDL oxidada radica en que se convierte en radical libre y sigue oxidando a otras moléculas, además de dañar oxidativamente al endotelio, siendo uno de los factores que condicionan la disfunción endotelial en la vasculopatía diabética (Tousoulis et al., 2013).

En relación con su poder antitrombótico, tanto aisladamente como en asociación, hidroxitirosol y DHPG inhibieron la actividad plaquetaria y aumentaron la producción de prostaciclina vascular. El efecto de hidroxitirosol sobre la agregación plaquetaria se demostró tanto *in vitro* en sangre humana (González-Correa et al., 2009) como *ex vivo* en ratas sanas y diabéticas (González-Correa et al., 2008; López-Villodres et al., 2016).

Asimismo, DHPG mostró un efecto antiplaquetario en sangre humana que se potenció en presencia de hidroxitirosol (de Roos et al., 2011; Rubio-Senent et al., 2015).

El presente estudio demuestra que este efecto sinérgico se produce en condiciones ex vivo y en un modelo experimental de diabetes. El mecanismo por el cual se explica esta interacción se centra en la expresión de las proteínas que regulan el receptor de fibrinógeno plaquetario (de Roos et al., 2011, 2019). Asimismo, muestra que este mayor efecto de la asociación hidroxitirosol-DHPG podría deberse, en parte, a una mayor producción de prostaciclina vascular en condiciones ex vivo, directamente relacionado con un efecto antioxidante, ya que los radicales libres son uno de las principales causas de la degradación de la prostaciclina vascular (Higashi et al., 2009).

También es importante el efecto sinérgico sobre los otros biomarcadores cardiovasculares de importancia, como MPOx y VCAM-1, en el desarrollo de la vasculopatía aterosclerótica. Todos estos hallazgos aportan un aspecto muy importante a estos compuestos polifenólicos en la enfermedad cardiovascular, ya que participan en varios estadios de la enfermedad: estrés oxidativo y nitrosativo, inflamación vascular y mecanismos pro y antitrombóticos. Posiblemente se relacionen estos efectos con su acción antioxidante, ya que se encuentran interconectadas entre sí, si bien no se descarta algún mecanismo inhibitorio directo sobre los mecanismos de síntesis de estos factores pro-inflamatorios (Zhang et al., 2021).

Estos efectos se demostraron para hidroxitirosol en el mismo modelo experimental de diabetes utilizado en el presente trabajo (López-Villodres et al., 2016). En este estudio demostramos que DHPG también muestra estos efectos en condiciones ex vivo en un modelo de diabetes mellitus, así como el efecto sinérgico de ambos polifenoles en la inhibición de estos mediadores del daño cardiovascular.

Todos los cambios producidos en las variables bioquímicas determinadas se complementan o inducen cambios en la morfología de la pared arterial. En los animales diabéticos se produce un patrón morfológico que puede ser compatible con un estado de inflamación vascular, es decir, un incremento en el grosor y celularidad de la capa muscular. Ambos polifenoles reducen estas alteraciones, si bien no se aprecia un efecto sinérgico entre ellos. En un estudio previo (López-Villodres et al., 2016) se demostró este mismo efecto para hidroxitirosol.

¿Podría jugar algún papel un posible efecto antidiabético de estos compuestos fenólicos?

Una posible hipótesis para explicar los efectos de estos compuestos podría ser que mejoraran el perfil glucémico de los animales diabéticos y que, de esta forma, evitaran los daños que la hiperglucemia mantenida ejercen sobre la pared arterial, es decir, que hidroxitirosol y/o DHPG tuviesen un efecto antidiabético.

Algunos estudios mostraron un efecto beneficioso de hidroxitirosol sobre la alteración del metabolismo de los carbohidratos, pero siempre en modelos de diabetes mellitus tipo 2. Así, se ha demostrado que los polifenoles del AOVE incrementan la secreción de insulina en cultivo de células β pancreáticas (Caroleo et al., 2021); en condiciones *in vitro*, inhiben las actividades enzimáticas intestinales encargadas de la absorción de glucosa postprandial (Fki et al., 2020; Mwakalukwa et al., 2020); también se ha demostrado que hidroxitirosol modifica las actividades enzimáticas hepáticas que incrementan la tasa de glucosa libre en sangre, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de diabetes tipo 2 (Vlavcheski et al., 2019). No encontramos en la bibliografía consultada ningún estudio sobre este aspecto en la diabetes tipo 1, tan solo los trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, que demuestran una ausencia de efecto hipoglucemiante en un modelo de diabetes tipo 1 (González-Correa et al., 2018; López-Villodres et al., 2016; Reyes et al., 2017; Rodríguez-Pérez et al., 2021).

En el presente estudio se confirma la ausencia de efectos reductores de los niveles sanguíneos de glucosa por parte de ambos compuestos fenólicos del AOVE. Por lo tanto, no podemos adjudicar a este efecto los hallazgos encontrados en los biomarcadores analizados, sino que debemos pensar que estos efectos son directos sobre los mismos.

Una limitación de este estudio es que no profundiza en la relación de los dos polifenoles estudiados con el proceso metabólico de la diabetes mellitus, para lo cual debería probarse en un modelo de diabetes tipo 2.

La novedad de este estudio ha sido el uso de un modelo de diabetes mellitus para evaluar si esta interacción entre ambos polifenoles se producía en la diabetes, que es uno de los principales factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, ya sea del tipo 1 o 2. De

hecho, este modelo de diabetes tipo 1 se usa como inductor de daño cardiovascular, más que como modelo para estudiar compuestos que podrían afectar la enfermedad metabólica en sí. Como hemos comentado, es deseable un estudio que analice los efectos de hidroxitirosol y DHPG en la evolución de la diabetes, pero quizás eso debería estudiarse en un modelo experimental de diabetes tipo 2, donde los mecanismos tisulares (resistencia a la insulina) son más importantes. En el modelo de diabetes tipo 1 utilizado, se reconoce ampliamente que la producción de insulina pancreática está abolida, y se postula como un modelo que aumenta todos los perfiles (bioquímico y morfológico) de daño vascular (macro y microangiopático), que es justo lo que pretendíamos en este estudio. Actualmente estamos desarrollando un estudio sobre el efecto de estos polifenoles del aceite de oliva virgen extra en un modelo de diabetes tipo 2, analizando no solo los parámetros de daño vascular, sino también la propia enfermedad metabólica.

Otra limitación de este estudio es la ausencia de profundización en los mecanismos por los que hidroxitirosol y DHPG interactúan positivamente, produciendo un efecto sinérgico a nivel de los biomarcadores cardiovasculares determinados.

Los resultados del presente estudio pueden constituir la base del desarrollo de nuevos compuestos alimenticios, concretamente un AOVE enriquecido en estos polifenoles y en estas proporciones, así como poder añadir otros, como es el caso del oleocantal. No obstante, son precisos nuevos estudios que ahonden en los mecanismos de interacción entre polifenoles, así como estudios en los que se analice el efecto de un aceite enriquecido frente al AOVE estándar, ya sea en modelos experimentales de diabetes y posteriormente en seres humanos.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

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

1. Ninguno de los dos polifenoles del aceite de oliva virgen extra, solos o asociados, modificaron los niveles de glucosa en sangre en el modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1.
2. Hidroxitirosol y 3',4'-dihidroxifenilglicol, mostraron un efecto beneficioso sobre varios mecanismos que participan en la génesis y evolución de la enfermedad cardiovascular en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1.
3. La asociación de ambos compuestos, en las proporciones en que se encuentran en el aceite de oliva virgen extra, muestra un efecto sinérgico en la inhibición del estrés oxidativo y nitrosativo, agregación plaquetaria, producción vascular de prostaciclina, niveles séricos de mieloperoxidasa y proteínas adhesivas VCAM-1.
4. Ambos compuestos fenólicos reducen las modificaciones morfológicas observadas en la pared aórtica de los animales diabéticos, si bien no se aprecia un efecto sinérgico entre ellos.

Todos estos hallazgos podrían ser importantes para el desarrollo de aceites funcionales enriquecidos en estos dos polifenoles en la proporción utilizada en este estudio.



BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Kharashi AS. Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy. *Saudi J Ophthalmol.* 2018 Oct-Dec;32(4):318-323.
- Angeli F, Verdecchia P, Reboldi G. Aprocitan, A Dual Endothelin Receptor Antagonist Under Development for the Treatment of Resistant Hypertension. *Cardiol Ther.* 2021 Dec;10(2):397-406.
- 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):836-46.
- Arden GB, Sivaprasad S. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2011 Sep;7(5):291-304
- Azul L, Leandro A, Boroumand P, Klip A, Seica 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.
- Base de Datos Clínicos de Atención Primaria. 2020. <https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/SIAP/home.htm>.
- Bayram B, Ozcelik B, Grimm S, Roeder T, Schrader C, Ernst IM, Wagner AE, Grune T, Frank J, Rimbach G. A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuvenation Res.* 2012 Feb;15(1):71-81.
- Bechthold A, Boeing H, Schwedhelm C, Hoffmann G, Knüppel S, Iqbal K, De Henauw S, Michels N, Devleesschauwer B, Schlesinger S, Schwingshackl L. Food groups and risk of coronary heart disease, stroke and heart failure: A systematic review

and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(7):1071-1090.

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

Blicklé JF, Doucet J, Krummel T, Hannedouche T. Diabetic nephropathy in the elderly. *Diabetes Metab*. 2007 Apr;33 Suppl 1:S40-55

Bora S, Shankarrao Adole P. Carbonyl stress in diabetics with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2021 Sep;520:78-86.

Boskou D, Blekas G, Tsimidou M. *Olive Oil Composition*. 2nd ed.; AOCS Press. Urbana, IL, USA, 2006. ISBN 9780128043547.

Brown OI, Bridge KI, Kearney MT. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases in Glucose Homeostasis and Diabetes-Related Endothelial Cell Dysfunction. *Cells*. 2021 Sep 4;10(9):2315.

Bryk-Wiązania AH, Undas A. Hypofibrinolysis in type 2 diabetes and its clinical implications: from mechanisms to pharmacological modulation. *Cardiovasc Diabetol*. 2021 Sep 22;20(1):191.

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):2152-7.

Calabrese EJ. Hormesis: Path and Progression to Significance. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 21;19(10):2871.

Calabriso N, Gnoni A, Stanca E, Cavallo A, Damiano F, Siculella L, Carluccio MA. Hydroxytyrosol Ameliorates Endothelial Function under Inflammatory

Conditions by Preventing Mitochondrial Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Apr 18;2018:9086947.

Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distante A, Storelli C, De Caterina R. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct;293(4):H2344-54.

Caroleo MC, Plastina P, Fazio A, La Torre C, Manetti F, Cione E. Olive Oil Lipophenols Induce Insulin Secretion in 832/13 β -Cell Models. *Pharmaceutics*. 2021 Jul 16;13(7):1085.

Carrera I, Martínez O, Cacabelos R. Neuroprotection with Natural Antioxidants and Nutraceuticals in the Context of Brain Cell Degeneration: The Epigenetic Connection. *Curr Top Med Chem*. 2019;19(32):2999-3011.

Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*. 2010 Jul 10;376(9735):124-36.

Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, Keast RS. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009 Mar;49(3):218-36.

Cohen RA, Tong X. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010 Apr;55(4):308-16.

Covas MI. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of heart disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology*. 2008 Oct;16(5):216-8.

Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, et al.; EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 Sep 5;145(5):333-41

Croze ML, Soulage CO. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie*. 2013 Oct;95(10):1811-27.

- Csiszar A, Ungvari Z. Endothelial dysfunction and vascular inflammation in type 2 diabetes: interaction of AGE/RAGE and TNF-alpha signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Aug;295(2):H475-6.
- D'Angelo C, Franceschelli S, Quiles JL, Speranza L. Wide Biological Role of Hydroxytyrosol: Possible Therapeutic and Preventive Properties in Cardiovascular Diseases. *Cells*. 2020 Aug 21;9(9):1932.
- Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:472-485.
- De La Cruz Cortés JP, Pérez de Algaba I, Martín-Aurioles E, Arrebola MM, Ortega-Hombrados L, Rodríguez-Pérez MD, Fernández-Prior MÁ, Bermúdez-Oria A, Verdugo C, González-Correa JA. Extra Virgin Oil Polyphenols Improve the Protective Effects of Hydroxytyrosol in an In Vitro Model of Hypoxia-Reoxygenation of Rat Brain. *Brain Sci*. 2021 Aug 26;11(9):1133.
- De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, López-Villodres JA, Reyes JJ, Espartero JL, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *J Nutr Biochem*. 2015(a) May;26(5):549-55.
- 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(b) Jul 1;63(25):5957-63.
- 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):553-62.

- Dinu M, Pagliai G, Casini A, Sofi F. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *Eur J Clin Nutr.* 2018 Jan;72(1):30-43.
- Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012 Apr;46(4):382-419.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002 Oct 11;277(41):38079-86.
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Fitó M, Gea A, Hernán MA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med.* 2018 Jun 21;378(25):e34.
- Fan J, Watanabe T. Atherosclerosis: Known and unknown. *Pathol Int.* 2022 Jan 25
- Federici M, Lauro R. Review article: diabetes and atherosclerosis--running on a common road. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Nov;22 Suppl 2:11-5.
- Fenwick EK, Pesudovs K, Rees G, Dirani M, Kawasaki R, Wong TY, Lamoureux EL. The impact of diabetic retinopathy: understanding the patient's perspective. *Br J Ophthalmol.* 2011 Jun;95(6):774-82.
- Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *J Agric Food Chem.* 2002 Nov 6;50(23):6804-11.
- 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.

Fernández-Prior MÁ, Fatuarte JCP, Oria AB, Viera-Alcaide I, Fernández-Bolaños J, Rodríguez-Gutiérrez G. New Liquid Source of Antioxidant Phenolic Compounds in the Olive Oil Industry: Alperujo Water. *Foods*. 2020 Jul 21;9(7):962.

Fki I, Sayadi S, Mahmoudi A, Daoued I, Marrekchi R, Ghorbel H. Comparative Study on Beneficial Effects of Hydroxytyrosol- and Oleuropein-Rich Olive Leaf Extracts on High-Fat Diet-Induced Lipid Metabolism Disturbance and Liver Injury in Rats. *Biomed Res Int*. 2020 Jan 8;2020:1315202.

Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, Perego C, Muscogiuri G. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev*. 2011 Sep;7(5):313-24.

Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):137-88.

Forman HJ, Davies KJ, Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2014 Jan;66:24-35.

Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 15;482(3):419-425.

Golshiri K, Ataei Ataabadi E, Portilla Fernandez EC, Jan Danser AH, Roks AJM. The importance of the nitric oxide-cGMP pathway in age-related cardiovascular disease: Focus on phosphodiesterase-1 and soluble guanylate cyclase. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2020 Aug;127(2):67-80.

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):1157-64.

- 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):921-9.
- 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):7872-6.
- González-Correa JA, Navas MD, Lopez-Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL, De La Cruz JP. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neurosci Lett*. 2008 Dec 3;446(2-3):143-6.
- González-Correa JA, Rodríguez-Pérez MD, Márquez-Estrada L, López-Villodres JA, Reyes JJ, Rodríguez-Gutierrez G, Fernández-Bolaños J, De La Cruz JP. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetic Retinopathy: Relationship with Cardiovascular Biomarkers. *J Agric Food Chem*. 2018 Jan 24;66(3):637-644.
- Gorin Y, Block K. Nox as a target for diabetic complications. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Oct;125(8):361-82.
- Granados-Principal S, El-Azem N, Pamplona R, Ramirez-Tortosa C, Pulido-Moran M, Vera-Ramirez L, Quiles JL, Sanchez-Rovira P, Naudí A, Portero-Otin M, Perez-Lopez P, Ramirez-Tortosa M. Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochem Pharmacol*. 2014 Jul 1;90(1):25-33.
- Green JB. Understanding the type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk paradox. *Postgrad Med*. 2014 May;126(3):190-204.
- Guerrero A, De la Cruz JP, Muñoz-Marín J, López-Villodres JA, Madrona A, Espartero JL, González-Correa JA. Neuroprotective effect of alkyl hydroxytyrosyl ethers in rat brain slices subjected to a hypoxia-reoxygenation model. *Food Chem*. 2012 Oct 15;134(4):2176-83.

- Gvazava IG, Rogovaya OS, Borisov MA, Vorotelyak EA, Vasiliev AV. Pathogenesis of Type 1 Diabetes Mellitus and Rodent Experimental Models. *Acta Naturae*. 2018 Jan-Mar;10(1):24-33
- He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(2):532-553.
- Hernández Á, Jaramillo S, García-Borrego A, Espejo-Calvo JA, Covas MI, Blanchart G, et al.. From Green Technology to Functional Olive Oils: Assessing the Best Combination of Olive Tree-Related Extracts with Complementary Bioactivities. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jan 30;10(2):202.
- 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):1692-7.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009 Mar;73(3):411-8.
- Hoffman R, Gerber M. Evaluating and adapting the Mediterranean diet for non-Mediterranean populations: a critical appraisal. *Nutr Rev*. 2013 Sep;71(9):573-84.
- Idris I, Donnelly R. Protein kinase C beta inhibition: A novel therapeutic strategy for diabetic microangiopathy. *Diab Vasc Dis Res*. 2006 Dec;3(3):172-8.
- Imig JD. Eicosanoid blood vessel regulation in physiological and pathological states. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Oct 30;134(20):2707-2727.
- Instituto Nacional de Estadística. 2020. https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175
- Islam MS, Loots du T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2009 May;31(4):249-61.

- Jamwal S, Sharma S. Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders. *Inflamm Res*. 2018 May;67(5):391-405.
- Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem*. 2009 Oct 14;57(19):8798-804.
- Jimenez-Lopez C, Carpena M, Lourenço-Lopes C, Gallardo-Gomez M, Lorenzo JM, Barba FJ, Prieto MA, Simal-Gandara J. Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*. 2020 Jul 28;9(8):1014.
- Kaur N, Kishore L, Singh R. Diabetic autonomic neuropathy: pathogenesis to pharmacological management. *J Diabetes Metab*. 2014; 5: 1–8.
- Killeen MJ, Linder M, Pontoniere P, Crea R. NF- κ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discov Today*. 2014 Apr;19(4):373-8.
- Kim HJ, Jeong MS, Jang SB. Molecular Characteristics of RAGE and Advances in Small-Molecule Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 27;22(13):6904.
- Konstantinidou V, Covas MI, Muñoz-Aguayo D, Khymenets O, de la Torre R, Saez G, Tormos Mdel C, Toledo E, Marti A, Ruiz-Gutiérrez V, Ruiz Mendez MV, Fito M. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *FASEB J*. 2010 Jul;24(7):2546-57.
- Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:43603.
- Li X, Weber NC, Cohn DM, Hollmann MW, DeVries JH, Hermanides J, Preckel B. Effects of Hyperglycemia and Diabetes Mellitus on Coagulation and Hemostasis. *J Clin Med*. 2021 May 29;10(11):2419.
- Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *Eur J Nutr*. 2017 Jun;56(4):1421-1432.

- López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, Covas MI, et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010 May;20(4):284-94.
- López-Villodres JA, Abdel-Karim M, De La Cruz JP, Rodríguez-Pérez MD, Reyes JJ, Guzmán-Moscó R, Rodríguez-Gutiérrez 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.
- Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol.* 2019 Dec;70(6).
- Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014 Dec 5;224:164-75.
- Martínez-González J, Rodríguez-Rodríguez R, González-Díez M, Rodríguez C, Herrera MD, Ruiz-Gutiérrez V, Badimon L. Oleonic acid induces prostacyclin release in human vascular smooth muscle cells through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *J Nutr.* 2008 Mar;138(3):443-8.
- 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.
- McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996 Jan;211(1):24-32.
- Maruhashi T, Higashi Y. Pathophysiological Association between Diabetes Mellitus and Endothelial Dysfunction. *Antioxidants (Basel).* 2021 Aug 18;10(8):1306.
- Mauer SM, Lane P, Zhu D, Fioretto P, Steffes MW. Renal structure and function in insulin-dependent diabetes mellitus in man. *J Hypertens Suppl.* 1992 Apr;10(1):S17-20.

- 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.
- Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci.* 2011 Aug;342(2):135-42.
- Mogensen CE. Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: origin and development of ideas. *Diabetologia.* 1999 Mar;42(3):263-85.
- Mundi S, Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, van Hinsbergh VWM, Iruela-Arispe ML, De Caterina R. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors-a review. *Cardiovasc Res.* 2018 Jan 1;114(1):35-52.
- 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.
- Mwakalukwa R, Amen Y, Nagata M, Shimizu K. Postprandial Hyperglycemia Lowering Effect of the Isolated Compounds from Olive Mill Wastes - An Inhibitory Activity and Kinetics Studies on α -Glucosidase and α -Amylase Enzymes. *ACS Omega.* 2020 Aug 7;5(32):20070-20079.
- Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res.* 2021 May 20.
- Nicolas J, Razuk V, Giustino G, Mehran R. Current state-of-the-art antiplatelet and anticoagulation therapy in diabetic patients with coronary artery disease. *Future Cardiol.* 2021 May;17(3):521-534.
- Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J.* 2013 Aug;34(31):2436-43.

- Paul S, Ali A, Katare R. Molecular complexities underlying the vascular complications of diabetes mellitus - A comprehensive review. *J Diabetes Complications*. 2020 Aug;34(8):107613.
- Pedret A, Fernández-Castillejo S, Valls RM, Catalán Ú, Rubió L, et al. Cardiovascular Benefits of Phenol-Enriched Virgin Olive Oils: New Insights from the Virgin Olive Oil and HDL Functionality (VOHF) Study. *Mol Nutr Food Res*. 2021 Nov;65(22):e2170061.
- Pérez-Torres I, Manzano-Pech L, Rubio-Ruiz ME, Soto ME, Guarner-Lans V. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders. *Molecules*. 2020 May 31;25(11):2555.
- 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.
- Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 5;115(23):5839-5848.
- 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):591-9.
- 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):1137-47.
- 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.
- Rojo-Martínez, G., Valdés, S., Soriguer, F. et al. Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort di@bet.es study. *Sci Rep* 10, 2765 (2020).
- 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.
- 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):1287-95.
- Rubio-Senent F, Rodríguez-Gutiérrez G, Lama-Muñoz A, Fernández-Bolaños J. New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil byproduct alperujo and their antioxidative activities. *J Agric Food Chem*. 2012 Feb 8;60(5):1175-86.
- Sagoo MK, Gnudi L. Diabetic Nephropathy: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2020; 2067:3-7.
- Santiago AR, Boia R, Aires ID, Ambrósio AF, Fernandes R. Sweet Stress: Coping With Vascular Dysfunction in Diabetic Retinopathy. *Front Physiol*. 2018 Jul 13;9:820.

- Sarmah S, Roy AS. A review on prevention of glycation of proteins: Potential therapeutic substances to mitigate the severity of diabetes complications. *Int J Biol Macromol*. 2022 Jan 15;195:565-588.
- Serra-Majem L, Román-Viñas B, Sanchez-Villegas A, Guasch-Ferré M, Corella D, La Vecchia C. Benefits of the Mediterranean diet: Epidemiological and molecular aspects. *Mol Aspects Med*. 2019 Jun;67:1-55.
- Serrelli G, Le Sayec M, Diotallevi C, Teissier A, Deiana M, Corona G. Conjugated Metabolites of Hydroxytyrosol and Tyrosol Contribute to the Maintenance of Nitric Oxide Balance in Human Aortic Endothelial Cells at Physiologically Relevant Concentrations. *Molecules*. 2021 Dec 10;26(24):7480.
- Servili M, Esposto S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*. 2009 Apr;17(2):76-84.
- Shafabakhsh R, Aghadavod E, Mobini M, Heidari-Soureshjani R, Asemi Z. Association between microRNAs expression and signaling pathways of inflammatory markers in diabetic retinopathy. *J Cell Physiol*. 2019 Jun;234(6):7781-7787.
- Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes*. 2017 May;9(5):434-449.
- Silva AFR, Resende D, Monteiro M, Coimbra MA, Silva AMS, Cardoso SM. Application of Hydroxytyrosol in the Functional Foods Field: From Ingredient to Dietary Supplements. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Dec 8;9(12):1246.
- Silveira Rossi JL, Barbalho SM, Reverete de Araujo R, Bechara MD, Sloan KP, Sloan LA. Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Going beyond traditional risk factors. *Diabetes Metab Res Rev*. 2021 Oct 6:e3502.
- Simran AK, Grewal S, Singh Arora TG. Role of protein kinase C in diabetic complications. *J Pharm Technol Res Manag* 2019; 7: 87–95,

- Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacol Res.* 2014 Feb;80:21-35.
- Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacol Res.* 2014 Feb;80:21-35.
- Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A. Physiological and Pathological Roles of Aldose Reductase. *Metabolites.* 2021 Sep 27;11(10):655.
- Storniolo CE, Roselló-Catafau J, Pintó X, Mitjavila MT, Moreno JJ. Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biol.* 2014;2:971-7.
- Takaishi K, Kinoshita H, Kawashima S, Kawahito S. Human Vascular Smooth Muscle Function and Oxidative Stress Induced by NADPH Oxidase with the Clinical Implications. *Cells.* 2021 Jul 31;10(8):1947.
- Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* 2013 Jan 15;2013:343560.
- Tesfaye S. Recent advances in the management of diabetic distal symmetrical polyneuropathy. *J Diabetes Investig.* 2011 Jan 24;2(1):33-42.
- Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, Aoki K, Yufu K, Nakagawa M, Saikawa T. Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Circ J.* 2014;78(2):300-6.
- Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, Stefanadis C. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Aug 20;62(8):667-76.
- Vecchié A, Montecucco F, Carbone F, Dallegri F, Bonaventura A. Diabetes and Vascular Disease: Is It All About Glycemia? *Curr Pharm Des.* 2019;25(29):3112-3127.
- Vidal R, Hernandez-Vallejo S, Pauquai T, Texier O, Rousset M, Chambaz J, Demignot S, Lacorte JM. Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and

lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. *J Lipid Res.* 2005 Feb;46(2):258-68.

Vlavcheski F, Young M, Tsiani E. Antidiabetic Effects of Hydroxytyrosol: In Vitro and In Vivo Evidence. *Antioxidants (Basel).* 2019 Jun 21;8(6):188.

Wong TY, Klein R, Islam FM, Cotch MF, Folsom AR, Klein BE, Sharrett AR, Shea S. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States. *Am J Ophthalmol.* 2006 Mar;141(3):446-455.

Wong TY, Cheung N, Tay WT, Wang JJ, Aung T, Saw SM, Lim SC, Tai ES, Mitchell P. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy: the Singapore Malay Eye Study. *Ophthalmology.* 2008 Nov;115(11):1869-75.

Wood AM, Kaptoge S, Butterworth AS, Willeit P, Warnakula S, Bolton T, et al. Emerging Risk Factors Collaboration/EPIC-CVD/UK Biobank Alcohol Study Group. Risk thresholds for alcohol consumption: combined analysis of individual-participant data for 599 912 current drinkers in 83 prospective studies. *Lancet.* 2018 Apr 14;391(10129):1513-1523.

Xie YD, Chen ZZ, Li N, Lu WF, Xu YH, Lin YY, Shao LH, Wang QT, Guo LY, Gao YQ, Yang GD, Li YP, Bian XL. Hydroxytyrosol nicotinate, a new multifunctional hypolipidemic and hypoglycemic agent. *Biomed Pharmacother.* 2018 Mar;99:715-724.

Yan LJ. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Animal Model Exp Med.* 2018 Mar;1(1):7-13.

Yee WL, Wang Q, Agdinaoy T, Dang K, Chang H, Grandinetti A, Franke AA, Theriault A. Green tea catechins decrease apolipoprotein B-100 secretion from HepG2 cells. *Mol Cell Biochem.* 2002 Jan;229(1-2):85-92.

Yoon S, Eom GH, Kang G. Nitrosative Stress and Human Disease: Therapeutic Potential of Denitrosylation. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 10;22(18):9794.

Yubero-Serrano EM, Lopez-Moreno J, Gomez-Delgado F, Lopez-Miranda J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur J Clin Nutr.* 2019 Jul;72(Suppl 1):8-17.

- Zbidi H, Salido S, Altarejos J, Perez-Bonilla M, Bartegi A, Rosado JA, Salido GM. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood Cells Mol Dis.* 2009 May-Jun;42(3):279-85.
- Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Front Med.* 2020 Oct;14(5):583-600.
- Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009 Jun;379(6):581-6.
- Zhang L, Wen K, Zhang Z, Ma C, Zheng N. 3,4-Dihydroxyphenylethanol ameliorates lipopolysaccharide-induced septic cardiac injury in a murine model. *Open Life Sci.* 2021 Dec 20;16(1):1313-1320.
- 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.
- Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium.* 2004 Mar-Apr;11(2):89-97.
- Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P, Fu Y, Liu J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem.* 2012 Aug;23(8):994-1006.



ANEXOS

AUTORIZACIÓN COMITÉ INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL



INFORME Nº: 69
ANEXO VIII

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

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

DECLARA:

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

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

2. Que tiene una duración de:

3 Años

36 Meses

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

Apellidos: González Correa

Nombre: Jose Antonio

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

Fecha acreditación: (26/07/2006)

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

Bulevard Louis Pasteur, 32

29010 Málaga. MÁLAGA

Tel.: 952131569

Correo E.: correa@uma.es



INFORME Nº: 69

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

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

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

Reunión 37ª del 12/05/2018

Acta Nº 37 del 12/05/2018

Y

Reunión 40ª del 31/08/2018

Acta Nº 40 del 31/08/2018

Nº expediente 31-2018-A

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

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

Favorable

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

Favorable





INFORME Nº: 69

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

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

Evaluación: **Favorable**

Clasificación: Moderado

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

Favorable

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

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

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

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

Motivación de la evaluación retrospectiva:

No procede

Resultado:

X No

Periodo de realización (en caso afirmativo): No procede

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

No procede





INFORME Nº: 69

CONFIRMO:

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

Proyecto Tipo II

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

FAVORABLE

OBSERVACIONES:

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

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

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



INFORME CEUMA Nº 460

ANEXO IX

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

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

DECLARA:

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

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

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

Investigador responsable: D. Jose Antonio González Correa.

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

3 Años

36 Meses

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





INFORME CEUMA Nº 460

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

Reunión 37ª del 12/05/2018

Acta Nº 37 del 12/05/2018

Y

Reunión 40ª del 31/08/2018

Acta Nº 40 del 31/08/2018

10. Que basándose en las declaraciones anteriormente expuestas

CONFIRMO:

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

FAVORABLE

OBSERVACIONES:

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

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

Secretario CEEA

Presidente CEEA

Nombre: Ricardo González-Carrascosa Latín

Fecha: 01/08/2018

Firma:





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Centro de Experimentación Animal
Universidad de Málaga

Estimado/a Investigador/a,

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

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

IP: José Antonio González Correa

CÓDIGO: 2019-0007

FECHA INICIO: 14/10/19

FECHA FINALIZACIÓN: 14/10/22

ANIMALES: 250 ratas

PROYECTO DE COBRO: 806/79.3588

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

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

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

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM

AENOR



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

JUNTA DE ANDALUCIA

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

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.

Tabladilla, s/n
Teléfono 95 5032000
41071 - Sevilla

Código:640xu765PFIRMA0w8amplg16+Nfz2D.

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

FIRMADO POR	MANUEL FERNANDEZ MORENTE	FECHA	12/07/2019
ID. FIRMA		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. 25051699F, 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".

Código: 640xu691PFIRMA16P//EuaES+Qd6Kx.

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

FIRMADO POR	MANUEL GOMEZ GALERA	FECHA	10/07/2019
ID. FIRMA		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 período 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.

FIRMADO POR	MANUEL GOMEZ GALERA	FECHA	10/07/2019
ID. FIRMA		PÁGINA	3/3