

UNIVERSITAT DE LLEIDA

FACULTAD DE MEDICINA

GRADO DE NUTRICIÓN HUMANA I DIETÉTICA

***ESTUDIO SOBRE EL EFECTO PRODUCIDO POR UNA DIETA
SUPLEMENTADA CON COMPUESTOS FENÓLICOS PROCEDENTES DEL
ACEITE DE OLIVA EN EL DESARROLLO DE ATEROGÉNESIS EN EL
MODELO DE RATÓN APO-E^(-/-)***

Ana Mamajón Camiña

Curso 2015/2016

***ESTUDIO SOBRE EL EFECTO PRODUCIDO POR UNA DIETA
SUPLEMENTADA CON COMPUESTOS FENÓLICOS PROCEDENTES DEL
ACEITE DE OLIVA EN EL DESARROLLO DE ATEROGÉNESIS EN EL
MODELO DE RATÓN APO-E^(+/+)***

Trabajo Final de Grado presentado por: Ana Mamajón Camiña

**Tutora: María José Motilva Casado
Cotutora: María del Carmen López de las Hazas Mingo**

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	9
• ESTRÉS OXIDATIVO	10
• ANTIOXIDANTES NATURALES	11
• ATEROGÉNESIS.....	12
• COMPONENTES FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN Y SUS BENEFICIOS FRENTE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	15
• MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DEL ESTUDIO.....	19
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	21
5. METODOLOGÍA: MATERIAL Y MÉTODOS	23
• EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PROCEDENTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.....	23
• INTERVENCIÓN IN VIVO EN MODELOS ANIMALES.....	25
6. RESULTADOS	29
• CUANTIFICACIÓN DEL EXTRACTO.....	29
• EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS RATONES APOE(-/-) Y C57BL/6.....	29
• EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS DISTINTOS ÓRGANOS DE LOS RATONES APOE ^(-/-) Y C57BL/6.....	30
• EFECTO PRODUCIDO EN LOS NIVELES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS, POR LA SUPLEMENTACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN RATONES.....	31
• BIOMARCADORES DE CUMPLIMIENTO DE LA INGESTA	32
➤ HECES.....	32
➤ ORINA.....	33
• VALORACIÓN HISTOLÓGICA DE LA AORTA	34
➤ EVALUACIÓN DE LA DEPOSICIÓN DE PROTEOGLICANO	34
➤ EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS.....	36
7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	39
8. CONCLUSIONES.....	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
10. ANEXOS.....	49
• ANEXO 1: PROTOCOLO TINCIONES.....	49

ABREVIATURAS

AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados

AGS: Ácidos Grasos Saturados

AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados

AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

ASE: Solvente de Extracción Acelerada

C: Control

ECV: Enfermedades Cardiovasculares

G: Glucurónido

HDL: High Density Lipoprotein

HT: Hidroxitirosol

LDL: Low Density Lipoprotein

HLB: Balance Hidrófilo Lipófilo

LSE: Extracción Líquido-sólido

MCV: Malalties Cardiovasculars

N.D: No detectado

OH: Hidroxi

PLE: Pressurized Liquid Extraction (Extracción Líquido presurizado)

RL: Radicales Libres

S: Sulfato

SEC: Secoiridoides

SPE: Solid Phase Extraction (Extracción en fase sólida)

TC: Colesterol Total

TG: Triglicéridos

TTO: Tratamiento

1. RESUMEN

El aceite de oliva virgen es capaz de disminuir el efecto de los mecanismos oxidativos causantes del origen de la aterogénesis y etapa inicial del desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (ECV), consideradas primera causa de muerte en los países desarrollados. Gran cantidad de estudios respaldan la acción protectora de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, frente a la acción oxidativa de los radicales libres de nuestro organismo. El siguiente estudio pretende evaluar el efecto anti-aterogénico de los componentes fenólicos, al suplementar una dieta con 10mg de SEC/kg de animal/día, durante 12 semanas, en dos modelos de ratón; ApoE^(-/-) (enfermedad) y C57BL/6 (sano). Los resultados mostraron que la suplementación de la dieta con el extracto enriquecido en fenoles procedentes del aceite de oliva en los ratones enfermos, no solo no inhibía el proceso de aterogénesis en los ratones ApoE^(-/-), si no que empeoraba el perfil lipídico plasmático, aumentando los niveles de colesterol total, de las lipoproteínas LDL y triglicéridos, además de producir un aumento de las lesiones arterioscleróticas, mientras que no se pudieron evaluar daños en el modelo de ratón sano. Por tanto, la suplementación con fenoles en un estado oxidativo puede tener un efecto reverso al esperado y no ejercer un efecto positivo en la salud.

L'oli d'oliva verge és capaç de disminuir l'efecte dels mecanismes oxidatius, causants de l'origen de la aterogènesis y etapa inicial del desenvolupament de malalties cardiovasculars, considerades la primera causa de mort en els països desenvolupats. Gran quantitat d'estudis donen suport a l'acció protectora dels components fenòlics de l'oli d'oliva, front l'acció oxidativa dels radicals lliures del nostre organisme. El següent estudi pretén avaluar l'efecte anti-aterogènic dels components fenòlics, suplementant una dieta amb 10mg de SEC/kg animal/dia, durant 12 setmanes, en dos models de ratolins; ApoE^(-/-) (malalt) y C57BL/6 (sa). Els resultats van mostrar que suplementar la dieta amb l'extracte ric en fenols procedents de l'oli d'oliva en els ratolins malalts, no va inhibir el procés de aterogènesis, si no que va empitjorar el perfil lipídic plasmàtic, augmentant els nivells de colesterol total, de les lipoproteïnes LDL y triglicèrids, a més de produir un augment de les lesions arterioscleròtiques, mentre que no es van poder avaluar danys en el model de ratolí sa. Per tant, la suplementació amb fenols en un estat oxidatiu pot tenir un efecte invers al esperat y no exercir un efecte protector.

The virgin olive oil is able to decrease the effect of oxidative mechanisms causing the origin of atherogenesis and the initial stage of development of cardiovascular diseases (CVD), considered the main cause of death in developed countries. Lots of studies support the protective action of phenolic compounds of olive oil against oxidative action of free radicals in our body. The following study aims to evaluate the anti-atherogenic of phenolic compounds effect, to supplement a diet with SEC 10mg/kg animal/day for 12 weeks, in two mice models; ApoE(-/-) (illness) and C57BL/6 (healthy). The results showed as supplementing the diet with enriched extract phenols from olive oil, not only did not inhibit the process of atherogenesis in the ApoE(-/-) mice, but it got worse the plasma lipid profile, increasing levels of total cholesterol, LDL lipoproteins and triglycerides, in addition to producing increased atherosclerotic lesions, while not able to assess damage to the healthy mouse model. Thus, the supplementation with phenols in an oxidative state may have a reverse effect than expected and it does not have a positive effect on health.

2. ANTECEDENTES

El organismo está continuamente expuesto a una gran cantidad de amenazas tanto químicas, físicas, como metabólicas, que si no están inactivadas, pueden producir daño y llegar a provocar un estado de enfermedad. Por ello, la ciencia no cesa en la búsqueda de compuestos, que prevengan o protejan de estas distintas amenazas.

Los procesos de oxidación serían un ejemplo de agresión química. El estado oxidante es producido fundamentalmente por radicales libres (RL). Los RL son átomos, moléculas o iones con electrones no apareados que son muy inestables y activos a reaccionar químicamente con otras moléculas. Derivan de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, que por separado forman especies reactivas de oxígeno (ROS), las más frecuentes, especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de azufre (RSS). Estos elementos son producidos de manera habitual por el metabolismo. Por otro lado, su producción también puede estar potenciada por factores externos como el tabaquismo, los contaminantes ambientales, desnutrición, radiación, medicamentos... (Ugartondo Casadevall, 2009).

Por el contrario, los compuestos antioxidantes son aquellos capaces de combatir e inactivar los compuestos que inducen oxidación, como los RL. Estos compuestos ya fueron definidos por *Halliwell y Gutteridge* como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina cualquier daño oxidativo de una molécula diana” en el 1955 (Ugartondo Casadevall, 2009).

Gracias a estas propiedades, los antioxidantes nos proporcionan beneficios que pueden mejorar el estado de numerosas enfermedades de tipo cardiovascular, cánceres o alteraciones metabólicas. Por ello, cada día se intenta conocer más sobre este campo, para el control y prevención del desarrollo de este tipo de enfermedades (Matés, 2000) (Devasagayam, y otros, 2004), (Carocho & Ferreira, 2012), (Butnariu & Samfira, 2012).

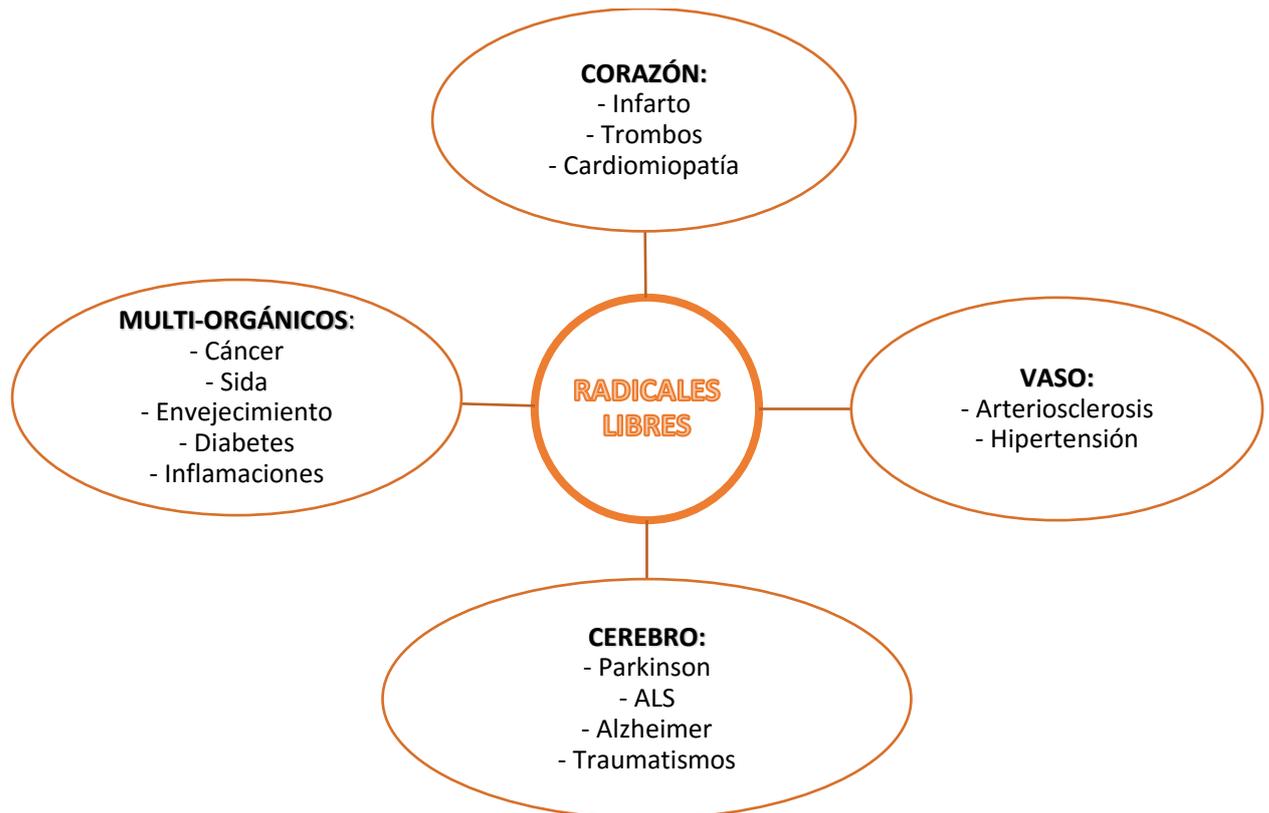


Figura 1. Ejemplos de enfermedades y alteraciones de distintos órganos, que producen la formación de radicales libres. En momentos de estrés metabólico, inflamación y/o lesión, los radicales libres se convierten en un producto normal del metabolismo.

- **ESTRÉS OXIDATIVO**

Como consecuencia de la sobreproducción de especies reactivas, los RL se acumulan en los tejidos interaccionando con moléculas del interior de la célula, lo que ocasiona una cadena de destrucción tanto a nivel proteico, lipídico, membranoso o sobre los ácidos nucleicos.

Los lípidos sufren peroxidación, lo cual desencadena una serie de reacciones que pueden promover el desarrollo de múltiples enfermedades por el acúmulo de sustancias tóxicas, como la diabetes, obesidad, etc., y las bases nitrogenadas del ADN, sufren una serie de mutaciones de diferentes tipos (delecciones, inserciones, polimorfismos...) tanto en el ADN nuclear como en el mitocondrial, que conducen a una alteración funcional en diversas proteínas y aminoácidos, con un impacto fisiológico fatal para el individuo (Matés, 2000) (Devasagayam, y otros, 2004) (Butnariu & Samfira, 2012).



Figura 2. Alteraciones causadas por daños oxidativos en las células del organismo. En el momento en que los sistemas pro-oxidantes superan a los antioxidantes, se instaura el estrés oxidativo, con una producción desmesurada de radicales libres, especies reactivas de oxígeno o de óxido de nitrógeno. Como consecuencias, se producen una serie de alteraciones que pueden dar lugar a diferentes trastornos crónicos.

- **ANTIOXIDANTES NATURALES**

Los antioxidantes naturales son las defensas endógenas que existen en nuestro cuerpo, que se encargan de equilibrar la producción de moléculas ROS y el estrés oxidativo. Concretamente, estas defensas naturales se pueden diferenciar en dos grandes grupos (Carocho & Ferreira, 2012):

- Antioxidantes enzimáticos: Dentro de este grupo se pueden dividir en enzimas de defensa primaria y secundaria:
 - *Los tres enzimas antioxidantes de defensa primaria son; el **Superóxido Dismutasa** (convierte aniones superóxidos en peróxido de hidrógeno para el uso de la catalasa), la **Catalasa** (convierte el Peróxido de Hidrógeno en H₂O y oxígeno molecular) y el **Glutación Peroxidasa** (dona dos electrones para reducir los peróxidos).*
 - Los enzimas de defensa secundaria, tienen una función de apoyo a las enzimas primarias y serían; el **Glutación Reductasa** (reduce el glutatión a su forma reducida para continuar la neutralización de los radicales libres)

y **Glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa** (regenera NADPH que es una coenzima utilizada en reacciones anabólicas).

- Antioxidantes no enzimáticos: Dentro de este grupo destacan un gran número de componentes como vitaminas, péptidos, compuestos de nitrógeno, cofactores, pero los que más destacan por su potente acción serían vitaminas como la A, la K, la C y sobretodo la E (Weinberg, VanderWerken, Anderson, Stegner, & Thomas, 2001), minerales como el Selenio y el Zinc, y otros compuestos como el coenzima Q, el glutatión, el ácido úrico, los carotenoides, los flavonoides y los fenoles.

- ATEROGÉNESIS

La aterogénesis se caracteriza por la acumulación de distintas moléculas (lipoproteínas oxidadas, macrófagos derivador de monocitos, células T del sistema inmunológico...) en la capa íntima de las arterias de tamaño medio y superior, que origina una reacción inflamatoria y una proliferación de células musculares lisas de la pared, produciendo el engrosamiento de la pared arterial hasta su posible oclusión, con un elevado riesgo de producir un infarto de miocardio.

El origen de la aterogénesis viene dada por la oxidación de las lipoproteínas LDL (lipoproteínas de baja densidad). Esta oxidación puede producirse en la pared arterial por efecto de un estado inflamatorio crónico donde los radicales libres y otros oxidantes que se generan, oxidan diferentes compuestos. La primera oxidación la sufren los ácidos grasos poliinsaturados y los productos oxidados que se producen, reaccionando con la proteína Apo B 100, presentes en las LDL. El problema aparece, cuando a diferencia de las LDL nativas, las LDL oxidadas no son reconocidas por sus receptores y consecuentemente, son captadas en una forma no regulada por receptores scavenger en las células vasculares. Este proceso lleva a la acumulación de colesterol en la pared vascular originando las células espumosas, características de la lesión aterosclerótica (Carvajal Carvajal, 2015) (González Santiago, 2005).

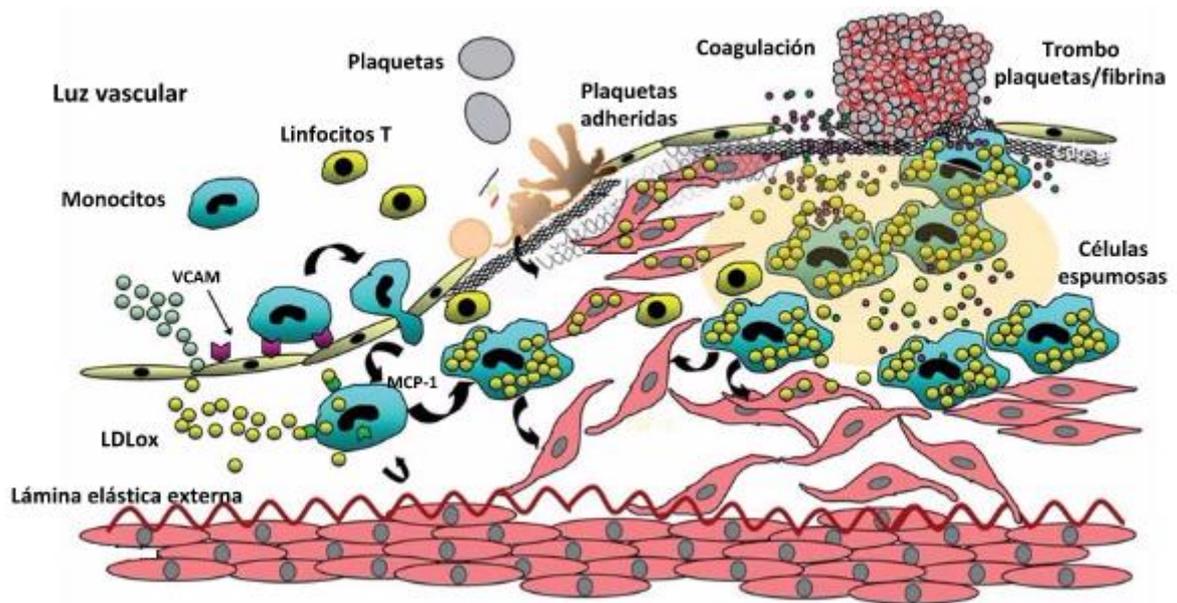


Figura 3. Proceso de formación de la placa de ateroma (Arranz Gutiérrez, 2013).

Las ECV constituyen la primera causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. En España, el 37% de las defunciones son producidas por ECV, siendo la primera causa de muerte. Dentro del grupo de ECV encontramos los ataques coronarios, enfermedades cerebrovasculares, aumento de la tensión arterial, las vasculopatías periféricas, las cardiopatías reumáticas y congénitas y la insuficiencia cardiaca. (González Santiago, 2005).

Anteriormente se explica como los radicales libres, entre otros compuestos oxidantes, provocan la disfunción endotelial, la cual produce una lesión arterial y consecuentemente aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, como la aterogénesis (Rodríguez, Mago, & Rosa, 2009) (Oyarzabal Aja, 2014). Por ello, la importancia de evitar procesos de oxidación y regular la producción de radicales libres, es indispensable en etapas de enfermedad.

Los países mediterráneos poseen una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares comparado con el resto del mundo y esto es gracias a que la dieta mediterránea se caracteriza por el consumo de diversos alimentos y bebidas, con alto contenido en fitonutrientes, considerados adecuados para la prevención de muchas de las enfermedades actuales, como las cardiovasculares, las neurodegenerativas, cáncer y diabetes (Fitó & Konstantinidou, 2016) (Sánchez Muniz, 2007).

Los alimentos típicos presentes en esta dieta son: las legumbres, frutas y verduras, frutos secos, cereales de tipo integrales, productos lácteos bajos en grasa, pescado y marisco,

alcohol (mayormente vino tinto) y el aceite de oliva virgen extra (Ros, LA DIETA MEDITERRÁNEA, 2013).

ALIMENTOS	COMPONENTES BIOACTIVOS	EFECTOS
Frutas y Verduras	<i>HC de digestión lenta y fibra</i>	Aumenta control glucémico
Legumbres	<i>Saponinas</i>	Disminuye colesterol
	<i>Minerales (K, Mg, Ca)</i>	Disminuye PA
	<i>Polifenoles</i>	Disminuye Oxidación
Frutos Secos	<i>Ácidos Grasos Insaturados</i>	Disminuye colesterol
	<i>Fitoesteroles</i>	Disminuye el colesterol
	<i>Minerales (K, Mg, Ca)</i>	Disminuye PA
	<i>Vitamina E</i>	Disminuye oxidación
	<i>Polifenoles</i>	Disminuye oxidación
Cereales Integrales	<i>HC de digestión lenta y fibra</i>	Aumenta control glucémico
	<i>Beta-Glucano (avena)</i>	Disminuye colesterol
	<i>Fitoesteroles</i>	Disminuye colesterol
	<i>Polifenoles</i>	Disminuye oxidación
Productos Lácteos	<i>AGS</i>	-Colesterol
	<i>Minerales (K, Mg, Ca)</i>	Disminuye PA
	<i>Péptidos del lactosuero y caseína</i>	Disminuye PA
Pescado y Marisco	<i>ÁG Omega-3</i>	Antiarrítmicos
Vino	<i>Etanol</i>	Aumenta colesterol HDL
		Disminuye fibrinógeno
	<i>Polifenoles</i>	Disminuye oxidación
		Disminuye PA
Aceite de Oliva Virgen	<i>AGM</i>	Disminuye colesterol
	<i>Fitoesteroles</i>	Disminuye colesterol
	<i>Vitamina E</i>	Disminuye oxidación
	<i>Polifenoles</i>	Disminuye oxidación
		Disminuye PA

Tabla 1. Grupos de alimentos típicos de la dieta mediterránea y su composición en componentes bioactivos. La dieta mediterránea es conocida por su riqueza en componentes bioactivos, que aportan una amplia variedad de efectos beneficiosos.

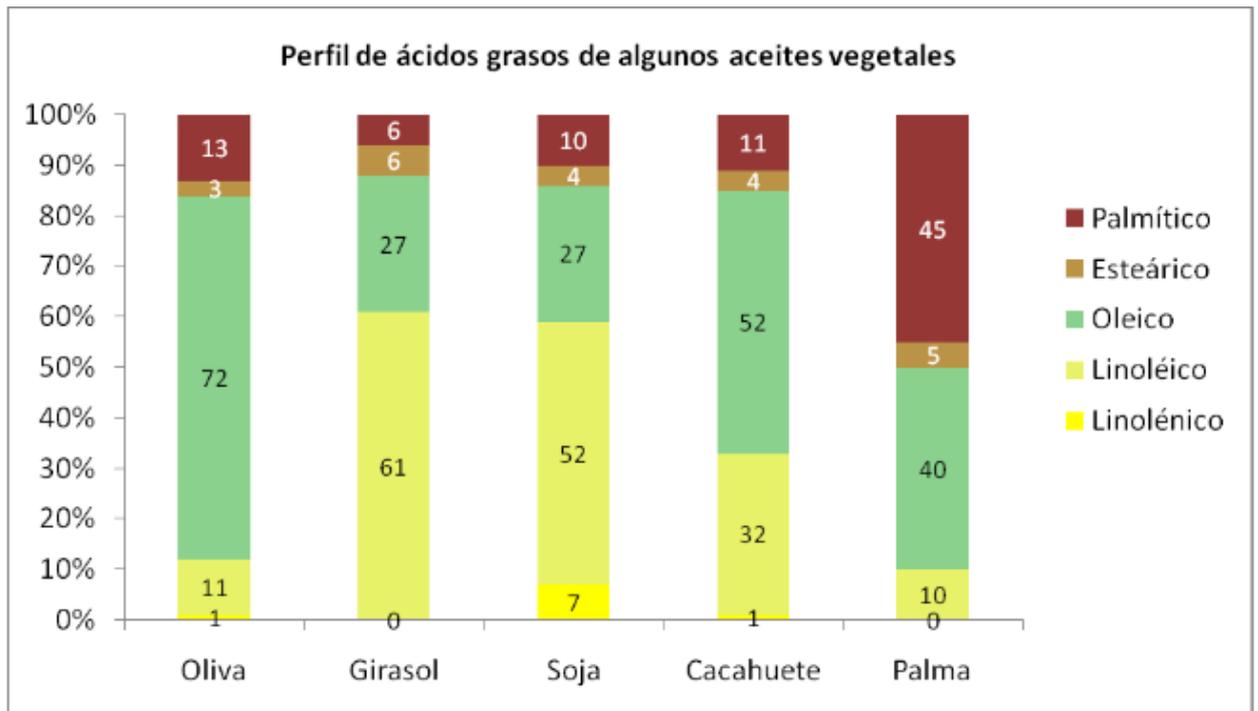
Gran parte de los beneficios que aporta la dieta mediterránea, es gracias a que nos proporciona a través de los alimentos, componentes bioactivos, caracterizados por su riqueza en moléculas antioxidantes y que conjuntamente con un estilo de vida saludable (dieta

equilibrada, practicar ejercicio regularmente, tener hábitos no tóxicos, etc.) determinan una mejora en el estado de salud (Bonaccio, y otros, 2013) (Martínez Álvarez, De Arpe Muñoz, & Villarino Marín, 2014).

A pesar de que esta dieta pueda no ser muy diferente con otro tipo de dietas que se recomiendan en todo el mundo, tiene un elemento básico, esencial y único que le aporta un valor adicional; el aceite de oliva. Es más, no es entendible el concepto de dieta mediterránea sin el concepto de aceite de oliva y viceversa, debido a que el aceite de oliva posee compuestos minoritarios únicos, además de tener una relación de ácidos grasos poliinsaturados/antioxidantes más adecuada que la de otros aceites, para prevenir la oxidación lipídica (Sánchez Muniz, 2007).

- **COMPONENTES FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN Y SUS BENEFICIOS FRENTE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

El aceite de oliva, está constituido en un 97-99% de su totalidad por triglicéridos, donde la mayoría (70%) son AGM (Ácidos grasos monoinsaturados), fundamentalmente ácido oleico, AGS (Ácidos grasos saturados) y AGP (Ácidos grasos poliinsaturados). El otro 1-3%, está formado por componentes minoritarios como polifenoles (entre ellos destaca el hidroxitirosol), tocoferoles, esteroides, hidrocarburos, aldehídos y cetonas, escualeno, etc. Pese a que estos compuestos se encuentran en una proporción muy baja tienen una gran importancia bajo el punto de vista nutricional y organoléptica, ya que mantiene las características primarias del aceite, frenando los procesos de auto-oxidación y posibles cambios de sabor (González Santiago, 2005).



Gráfica 1. Perfil de ácidos grasos de algunos ejemplos de aceites vegetales. La diferente composición en ácidos grasos de cada uno de los aceites vegetales, le proporcionan características nutricionales únicas.

Pese a tener una composición en ácidos grasos similar a otros aceites vegetales (**gráfica 1**), el aceite de oliva se caracteriza por tener una fracción minoritaria con alta riqueza en compuestos bioactivos, debido a que el AOVE no sufre procesos de refinado como el resto de aceites comestibles (González Santiago, 2005). De estos micronutrientes, destacan los compuestos polifenólicos como el hidroxitirosol, el tirosol y la oleuropeina, que han demostrado que junto los ácidos grasos monoinsaturados, proporcionan protección contra gran variedad de enfermedades cardiovasculares y la aterosclerosis, gracias a su capacidad de captar radicales libres y actuar como quelantes de metales (Berrougui, Ikhlef, & Khalil, 2015).

Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva contribuyen al mantenimiento del estado de salud (Lou-Bonafonte, Arnal, Navarro, & Osada, 2012) (Sánchez Muniz, 2007) mediante la prevención de la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad). La EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria), aprobó una reclamación, que decía:

“La evidencia del efecto protector de los polifenoles propios del aceite de oliva virgen (AOV) para las enfermedades cardiovasculares (ECV), se ha visto reforzada por la declaración de propiedades saludables aprobados en base al informe científico de la Comisión Técnica de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias de la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) (REGLAMENTO (UE) N ° 432/2012 de 16 de mayo de 2012): Los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre al estrés oxidativo. Esta

reclamación solo puede ser utilizada para el aceite de oliva que contiene al menos 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (por ejemplo, complejos de oleuropeína y tirosol) por 20 g de aceite de oliva.”

Numerosos estudios evidencian este efecto beneficioso que producen los compuestos antioxidantes del aceite de oliva virgen extra. En cambio, existen evidencias de que, en un estado de enfermedad, los compuestos de mayor poder antioxidante del aceite de oliva; los compuestos fenólicos, podrían tener efectos negativos en el desarrollo de la enfermedad, sob.

Concretamente, existen gran cantidad de estudios que evidencian el efecto beneficioso que producen los compuestos antioxidantes del AOVE (Lou-Bonafonte, Arnal, Navarro, & Osada, 2012) (Sánchez Muniz, 2007). Para ser más exactos, estudios recientes como el PREDIMED, han demostrado una vez más el efecto de la dieta mediterránea como protector cardiovascular. El estudio consistía en evaluar los efectos a largo plazo (5 años de seguimiento) de la dieta mediterránea en la incidencia de enfermedad cardiovascular, de forma aleatorizada y a gran escala (n=7447). Este estudio demostró con evidencias de alto nivel, la prevención primaria de eventos cardiovasculares que proporciona este tipo de dieta, dando especial mención a los compuestos fenólicos del aceite de oliva (Ros, y otros, 2014) (López Miranda, 2011) (Ruíz-Gutiérrez, G. Muriana, & Villar, 1998) (Perez-Ternero, Rodríguez-Rodríguez, Parrado, Herrera, & Alvarez de Sotomayor, 2013).

Por ello, gracias a la potente capacidad antioxidante de los componentes fenólicos, se recomienda el aceite de oliva como un alimento capaz de prevenir enfermedades cardiovasculares. Sus posibles efectos beneficiosos en el organismo son los siguientes (Gimeno Creus, 2004):

EFFECTOS BENEFICIOSOS ATRIBUIDOS A LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES
• Disminución de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)
• Disminución del proceso inflamatorio en la placa de ateroma
• Inhibición de la agregación plaquetaria
• Estimulación de la síntesis de óxido nítrico
• Estabilización de las fibras de colágeno de la pared arterial
• Actuación como fitoestrógenos (isoflavonas y lignanos)
• Actividad estrogénica/antiestrogénica
• Inhibición de la proliferación celular: inhibición del ciclo celular o inducción de apoptosis en células tumorales

- **Inhibición del daño oxidativo del ADN**

- **Activación de las enzimas de detoxificación de carcinógenos**

Tabla 2. Efecto preventivo de enfermedades cardiovasculares de los compuestos fenólicos.

Gracias al gran poder antioxidante característico de los compuestos fenólicos, su ingesta es altamente recomendada para prevenir enfermedades como las cardiovasculares, entre otras.

Sin embargo, las nuevas propuestas de descubrir diferentes estrategias para el desarrollo de alimentos fortificados, la caracterización de alimentos funciones y/o la formulación de suplementos antioxidantes, ha dado a luz a una gran controversia de estos compuestos, ya que en distintas situaciones analizadas más adelante, su acción antioxidante se convertía en pro-oxidante.

Diferentes ensayos experimentales y estudios epidemiológicos muestran que cuando la ingesta de componentes antioxidantes exógenos se mantiene dentro de los matrices de los alimentos naturales, su efecto es totalmente beneficioso para la salud, manteniendo y equilibrando la homeostasis redox del organismo. De manera contradictoria, se ha visto que cuando los antioxidantes exógenos se ingieren en dosis elevadas a las encontradas de forma natural en los alimentos, o en presencia de iones metálicos, o se ingieren dosis elevadas durante alguna patología crónica, como sería una ECV, su acción se convierte en pro-oxidante. Con este efecto dual de los antioxidantes, se puede contemplar la idea de que el estrés oxidativo pueda ser inducido por agentes pro-oxidantes, con la creación de moléculas ROS o por la inhibición de sistemas antioxidantes, que finalmente generan daño oxidativo a biomoléculas, tales como proteínas, ADN, lípidos y tejidos. Se ha reconocido que el origen de muchas enfermedades crónicas actuales, puede ser a causa de un desequilibrio antioxidante/pro-oxidante, causado por compuestos exógenos antioxidantes, que por diferentes factores, su acción se ha convertido en pro-oxidante. Los compuestos fenólicos, flavonoides, resveratrol, entre otros, son ejemplos de sustancias con esta doble acción.

Por otro lado, la acción pro-oxidante de los polifenoles naturales, no solo produce efectos negativos, ya que parece jugar un papel importante en la prevención de ciertos tipos de cánceres, gracias a su capacidad de inducir disfunción mitocondrial y por consiguiente la apoptosis celular.

Aun es necesario una mayor cantidad de estudios sobre los antioxidantes que se centren en su biodisponibilidad (absorción, metabolismo y la distribución celular y tisular), para establecer si los efectos in vitro son aplicables a la situación in vivo. Y también es necesario aclarar

algunos aspectos de la seguridad, para conseguir saber en qué circunstancias los antioxidantes pasan a actuar como pro-oxidantes (Guardado Yordi, Molina Pérez, Joao Matos, & Uriarte Villares, s.a) (Carocho & Ferreira, 2012) (Rahal, y otros, 2014).

- MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DEL ESTUDIO

El conocimiento sobre el desarrollo y regulación del proceso aterosclerótico y los mecanismos implicados mediante el empleo de modelos animales, han servido de gran ayuda para determinar los mecanismos fisiopatológicos y evaluar los efectos de tratamientos nutricionales y farmacológicos, sobre el desarrollo de este proceso aterosclerótico (Priyadharsini, 2015).

Existen numerosos modelos experimentales animales a los cuales se les induce la enfermedad cardiovascular ya sea, con una dieta alterada enriquecida en lípidos, a través de animales modificados genéticamente (conocidos también como; “*knock out*”), o bien mediante la alteración de un gen relacionado con el desarrollo de aterogénesis (Gil Hernández, Ramírez Tortosa, Aguilera García, & Mesa García, 2007). Es muy conocido el uso de conejos, hámsteres, como también de ratas o ratones como los C57BL/6 y ApoE^(-/-).

Animal	LDL (%)	VLDL (%)	HDL (%)
Mice	20	10	70
Rat	10	10	~80
Rabbit	35-40	10	45-50
Guinea-pig	70	10	20
Hamster	48	3	49
Swine	60	2	38
Human	63	12	28

Tabla 3. Diferenciación del perfil lipídico/colesterol en diferentes modelos animales.

Lo mejor en estudios “in vivo” es elegir modelos animales con un perfil lipídico más parecido al humano.

Los ratones ApoE^(-/-) se caracterizan por ser deficitarios de la apolipoproteína ApoE, sintetizada mayormente en el hígado y en el cerebro y que forma parte de todas las lipoproteínas, a excepción de las LDL. Su función es actuar como ligando entre moléculas como quilomicrones (QM), lipoproteínas de baja densidad (VLDL) y sus receptores, además de realizar otras funciones como la absorción de grasas de la dieta y la excreción del colesterol por vía biliar (Sehayek, y otros, 2013). Las lesiones ateroscleróticas que exhiben

son semejantes a las lesiones producidas en los seres humanos. Sin embargo, no hay que olvidar tener cuidado con las interpretaciones que se pueden realizar de los resultados obtenidos de este tipo de ratones, sobre todo cuando se hacen referencias a la enfermedad humana, ya que estos ratones se diferencian con los humanos en aspectos como; tener relativamente más altos los niveles de colesterol en plasma y un predominio de lipoproteínas tipo VLDL, a diferencia de los humanos, que tienen unos niveles mayores de lipoproteínas LDL (Potteaux, Ait-Oufella, & Mallat, 2007) (Oviedo Orta, Bermúdez Fajardo, & Danil de Namor, 2005) (Priyadharsini, 2015).

En resumen, este modelo animal ha confirmado las propiedades anti-aterogénicas del aceite de oliva virgen y además de corroborar que la relación dosis-efecto en un estudio es importante, también destaca la influencia del sexo, ya que las hembras suelen ser más susceptibles a los cambios. También demuestra la posible interacción existente entre la disminución del efecto del aceite de oliva y una dieta rica en colesterol. Por último, este modelo animal también ha verificado que los componentes menores del aceite de oliva, tales como el fitoesterol, el tocoferol, triterpenos y ceras, pueden ser relevantes en sus propiedades (Lou-Bonafonte, Arnal, Navarro, & Osada, 2012).

Otros estudios más actuales realizados con esta cepa de ratones, también han demostrado que los compuestos fenólicos pueden actuar de forma pro-oxidante, empeorando el proceso aterogénico. Suplementar una dieta con un extracto enriquecido en hidroxitirosol durante largos periodos de tiempo, encontrarse en una situación de enfermedad o seguir una dieta alta en colesterol al mismo tiempo, son diferentes situaciones que pueden alterar el perfil lipídico y empeorar la aterogénesis (Acín, y otros, 2006)

Todas estas controversias, solo demuestran que son aun necesarios muchos más estudios que investiguen los diferentes efectos que puede producir una dieta suplementada en compuestos fenólicos procedentes del aceite de oliva, según la situación del organismo.

3. HIPÓTESIS

La baja tasa de mortalidad por accidentes cerebrovasculares en los países de la cuenca mediterránea, está asociada al consumo de una alta cantidad de compuestos bioactivos. Muchos de estos efectos preventorios se relacionan con el consumo de aceite de oliva virgen extra. Ante la creciente expansión de numerosos productos nutracéuticos es importante evaluar el efecto de estos compuestos sobre la enfermedad una vez instaurada.

Por ello, el presente trabajo trata de estudiar el efecto producido por los compuestos fenólicos del AOVE durante el desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

Para comparar el efecto producido en función del estado de salud, se ha evaluado la suplementación sobre modelos de ratones C57BL/6 sanos (*wild type*) y ratones ApoE^(-/-) enfermos, ya que se caracterizan por padecer una modificación genética, que les provoca padecer una enfermedad cardiovascular congénita de manera precoz.

4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

El objetivo principal del estudio es evaluar el efecto producido por los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva mediante suplementación dietética en un modelo de ratón aterogénico.

Los objetivos secundarios a la investigación son:

- Evaluar el efecto de la suplementación de los compuestos fenólicos sobre el perfil lipídico y desarrollo de placas de ateroma sobre ratones deficiente en Apolipoproteína E.
- Estudiar los biomarcadores de cumplimiento de la ingesta y del metabolismo fenólico en el modelo ApoE^(-/-), mediante el análisis de muestras biológicas (orina y heces).
- Revisar la bibliografía sobre el efecto producido por los fenoles del aceite de oliva sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares dependiendo del estado de salud.

5. METODOLOGÍA: MATERIAL Y MÉTODOS

- EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PROCEDENTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

Aunque la concentración de los compuestos fenólicos y la composición del aceite varían mucho según el estado de madurez de las aceitunas y las condiciones climáticas durante su cultivo, en general, el orujo de oliva destaca por estar formado por componentes fenólicos (98-99% del total de fenoles presentes en la aceituna), como el hidroxitirosol y el tirosol, otros como los derivados de tipo secoiridoide como la oleuropeína, los ácidos fenólicos, lignanos y flavonoides (Marcela Usaquen Alvarado, 2008) (González Santiago, 2005) (López de las Hazas, y otros, 2016).

Para iniciar el estudio, obtuvimos los compuestos fenólicos del AOVE del orujo de oliva, que lo sometimos a un proceso de extracción, para obtener los compuestos fenólicos. Este proceso se llevó a cabo mediante el empleo de líquidos presurizados (PLE), que permite gracias a la combinación de temperaturas no muy elevadas y presiones muy altas, aislar en un tiempo muy reducido los compuestos fenólicos presentes en la matriz usada.

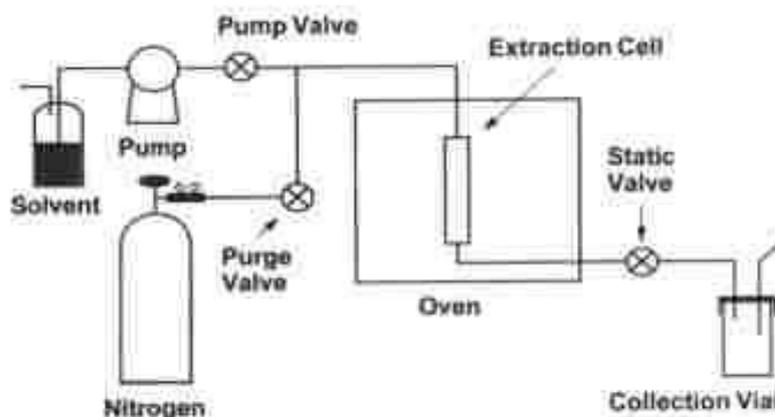


Figura 4. Método de extracción de líquidos presurizados (PLE) y los diferentes pasos del procedimiento. Con una combinación de temperaturas y presiones elevadas, se consigue un tipo de extracción rápida y eficaz, para aislar los metabolitos de interés.

El procedimiento empleado para la extracción de los compuestos fenólicos, es pesar 10g de orujo liofilizado y mezclarlo con 5g de tierras diatomeas, para homogeneizar toda la muestra.

La extracción de los compuestos bioactivos se llevó a cabo con Etanol-H₂O (80:20), a 80°C y realizando dos ciclos estáticos de 5 minutos por cada extracción. Tras la extracción, el solvente fue evaporado mediante rotavapor.

A pesar de poder conseguir una buena optimización de todos los parámetros de extracción, para poder conseguir un método de PLE selectivo, deben ser eliminados todos aquellos componentes de la matriz de elevado peso molecular; como pigmentos, proteínas, resinas, lípidos, etc. La muestra se acidificó la muestra hasta pH 4 y se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos con el propósito de precipitar las proteínas y otros residuos.

Para aislar aún más los compuestos fenólicos y obtener un extracto concentrado, la muestra fue purificada con el método SPE (Solid Phase Extraction), un tipo de exclusión según el tamaño cromatográfico. Los cartuchos son acondicionados con 35 mL de Metanol y lavados con 50 mL de Agua Milli-Q acidificada hasta pH=2. La muestra es previamente mezclada con ácido fosfórico 1:1 antes de cargarla en el cartucho. Para lavar los compuestos no deseados que han quedado retenidos, los cartuchos cargados se lavan con 30 mL de agua Milli-Q y a continuación, con 20 mL de Metanol al 5%. Finalmente los compuestos retenidos se desorben mediante Metanol al 60% (Suárez, y otros, 2009) (Carabias Martínez, Rodríguez Gonzalo, Revilla Ruiz, & Hernández Méndez, 2005).

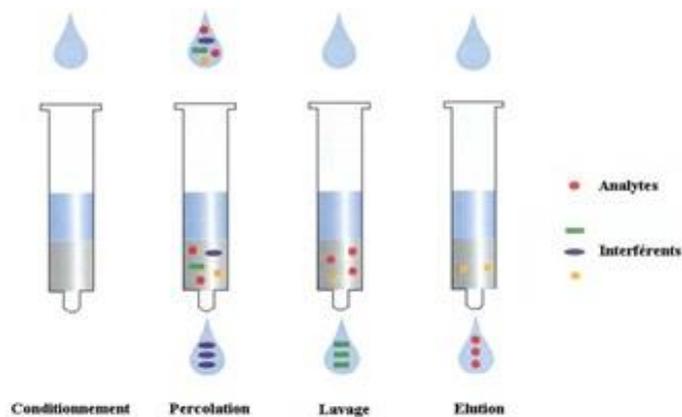


Figura 5. Método SPE (Solid Phase Extraction). Los diferentes cartuchos sufren diferentes acondicionamientos, para conseguir una muestra rica en los metabolitos de interés.

Una vez obtenida la muestra, mediante un análisis cromatográfico, se cuantifican los diferentes compuestos encontrados. Los resultados mostraron que el extracto procedente del orujo estaba compuesto mayoritariamente por tirosol e hidroxitirosol.

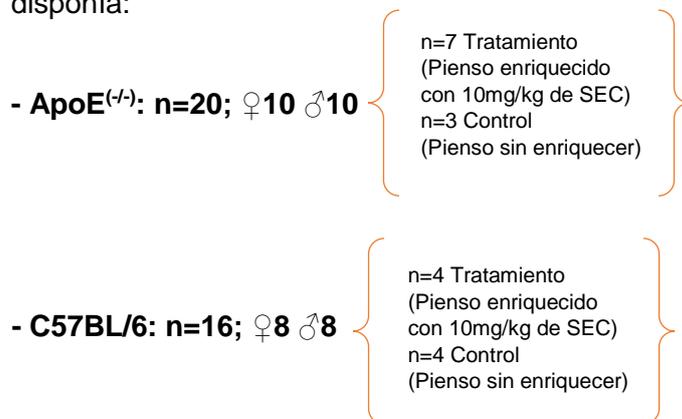
- INTERVENCIÓN IN VIVO EN MODELOS ANIMALES

La dieta de los ratones se realizó mediante pienso comercial triturado, agua Milli-Q y suplementadas con el extracto (SEC).

A la hora de incorporar los componentes fenólicos en la mezcla de pienso y agua mili-Q se tuvo en cuenta el peso medio de los ratones (± 20 g) y su ingesta media de pienso (4,5g pienso/día), con la intención de administrarles una dosis semanal exacta de 10mg/peso del ratón en kg/día, de compuesto fenólico.

Una vez elaboradas las croquetas enriquecidas en extractos fenólicos se liofilizaron para eliminar el agua en su totalidad y conseguir la textura adecuada para poder alimentar a los ratones.

Para el estudio se disponía de dos cepas de ratones; C57BL/6 y ApoE^(-/-), de los cuales se disponía:



El estudio tuvo una duración de 12 semanas. El primer día y el último, se obtuvieron muestras de orina y de heces. El agua y el alimento estaban a disposición de los ratones *ad libitum*. Semanalmente se hacía un registro del peso de cada ratón, para conocer su evolución y su ingesta y poder ajustar la dosis del tratamiento según la necesidad.

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano, antes de proceder al sacrificio por punción intracardiaca. Después, fueron perfundidos con una solución salina de cloruro de sodio (NaCL 0,9%), para eliminar los restos de sangre que pudieran quedar en los distintos órganos y tejidos.

A continuación se les extirpó los principales órganos relacionados con el proceso aterosclerótico. Las muestras obtenidas, se congelaban directamente en nitrógeno líquido para la cuantificación de los compuestos fenólicos, o bien, se destinaban a guardar en bloques de parafina, para el tratamiento histológico de las muestras mediante métodos de tinción *Oil Red Staining*, *Alcian Blue* y Tricrómico de Masson (**Anexo 1**), para finalmente observar las muestras en un microscopio óptico, con el uso de los objetivos secos del 10x, 20x y 40x.



Figura 6. Cronograma del estudio de 19 semanas de durabilidad, en ratones $ApoE^{(-/-)}$. Durante las primeras 6 semanas, se alimentaron de forma normal todos los ratones para promover su crecimiento, y en la mitad de este periodo se empezaron a extraer las diferentes muestras de orina y heces de cada uno de ellos. Las siguientes 12 semanas se alimentaron los ratones $ApoE^{(-/-)}$ con pienso enriquecido con 10mg/kg de SEC, hasta la semana número 19, en la cual se sacrificaron los ratones por punción intracardiaca, se extirparon los órganos, se obtuvieron diferentes muestras de tejidos musculares y se extrajeron muestras de sangre.

Todos los procedimientos llevados a cabo durante el estudio, fueron de acuerdo con las directrices de la *Directiva Comunidades Europeas 86/609/CEE del Consejo de regulación de la investigación con animales* y aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Lleida.

A la hora de analizar las diferentes muestras se siguieron diferentes procedimientos. Las muestras de plasma y orina se purificaron usando el sistema OASIS-HLB (W.M.A, 1998). Sin embargo, antes de eso se realizó un pre tratamiento de plasma con el método SPE desarrollado por (Suárez, y otros, 2009). Más tarde, 350µL de plasma se mezclaron con 300µL de ácido fosfórico al 4%, con 50µL de catecol como patrón interno. Se centrifugó y el

sobrenadante obtenido se sometió a SPE. Para ello, se acondicionaron los cartuchos usando 250µl de metanol y agua Mili-Q acidificada a pH 2. Luego se lavaron cada placa con 200µl de agua Mili-Q y 200µl de metanol al 5%. Seguidamente se realizó una elución dos veces consecutivas con 50µl de metanol y se aplicó el sistema UPLC-MS/MS.

Solo para el análisis de las muestras de orina, los cartuchos se acondicionaron con el método descrito anteriormente. Luego, 100µl de orina se mezclaron con 50µl de ácido fosfórico al 4% y 50µl de catecol para introducirlo en SPE. Con los compuestos extraídos se realizó una doble elución con 50µl de metanol y se incorporó en el sistema UPLC-MS/MS.

Para el análisis de los contenidos gastrointestinales y las heces, se recogieron 100mg de muestra ya liofilizada, se diluyó en un 1ml de metanol/agua (1:1) y se agitó en un vórtice durante 10min. Después, la muestra se centrifugó durante otros 10 minutos a 8784rpm y el sobrenadante se recogió y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante se filtró con un filtro 0,22µM y se hizo su análisis cromatográfico.

Las muestras de riñón e hígado también fueron tratadas antes de su análisis con una combinación de sistemas LSE y SPE. Para el análisis de LSE, se usaron 60mg de muestra liofilizada mezclados con 50µl de ácido ascórbico al 1%, 100µl de ácido fosfórico al 4% y 50µl de catecol. Luego se hicieron 4 lavados con 400ml de agua/metanol/ácido fosfórico al 4% (94:4,5:1,5). Para evitar el calentamiento de los compuestos extraídos, se utilizó baño de ultrasonidos en cada muestra durante 30 segundos, luego se centrifugó y del sobrenadante obtenido, 350µl se trató con SPE siguiendo el mismo método para las muestras de plasma (López de las Hazas, y otros, 2016).

6. RESULTADOS

- CUANTIFICACIÓN DEL EXTRACTO

La **tabla 4** muestra la composición del extracto obtenido a partir de la extracción por ASE y la posterior preconcentración, empleando SPE.

CONCENTRACIÓN FENÓLES	Mg/L de extracto
Tirosol	625,28 ± 60,02
Hidroxitirosol	4779,26 ± 101,51
Hidroxitirosol Acetato	70,21 ± 1,88
Ácido Elenóico	1529,62 ± 11,51
p-EDA	0,29 ± 0,02
3,4-EDA	3358,66 ± 185,45
Derivado Ligustrósido	177,06 ± 2,09
p-EA	1,25 ± 0,05
Derivados Oleuropeina	78,10 ± 3,20
3,4-EA	33,52 ± 2,37
OLE	109,52 ± 2,66

Tabla 4. Concentración fenólica de la muestra (mg/l), obtenida para la suplementación del pienso de los ratones.

Los dos componentes fenólicos mayoritarios de la composición de la muestra extraída fueron 3,4-EDA y Hidroxitirosol.

- EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS RATONES APOE(-/-) Y C57BL/6

Durante el estudio se realizó un seguimiento semanal del peso de cada ratón y de su ingesta de pienso.

	MACHOS				HEMBRAS			
	ApoE ^(-/-)		C57BL/6		ApoE ^(-/-)		C57BL/6	
	Control	Tto	Control	Tto	Control	Tto	Control	Tto
Peso Final	32.11 ± 0.44 ^{ab}	30.24 ± 2.42 ^a	34.05 ± 0.91 ^b	32.26 ± 0.96 ^{ab}	22.86 ± 0.37 ^{ab}	21.47 ± 1.46 ^a	23.85 ± 0.22 ^b	21.66 ± 0.08 ^{ab}
Media Ganancia Peso Corporal (g/día)	0.17	0.13	0.14	0.05	0.08	0.07	0.06	0.03
Ganancia Peso Corporal (g)	13.96	11.31	11.96	14.7	6.80	5,91	3.33	5.3

Tabla 5. Evolución del peso de los ratones ApoE^(-/-) y C57BL/6 durante el tiempo de estudio. Cada ratón se diferencia por sexo, modelo de estudio y si se trataba del grupo control o en tratamiento.

En la **tabla 5** no se observan diferencias significativas en el aumento del peso global de los ratones en el momento del sacrificio, pero cabe destacar que los grupos suplementados tenían un peso algo más bajo que los de grupo control y que en los dos grupos, los machos, tuvieron una ganancia de peso corporal mucho mayor que las hembras.

- **EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS DISTINTOS ÓRGANOS DE LOS RATONES APOE^(-/-) Y C57BL/6**

La **tabla 6** muestra el peso de los diferentes órganos extirpados tras el sacrificio. El peso de los órganos principales (hígado, riñones, corazón y bazo) fue comparado, para poder observar si se había producido algún cambio en el tamaño, durante la intervención.

	MACHOS				HEMBRAS			
	ApoE ^(-/-)		C57BL/6		ApoE ^(-/-)		C57BL/6	
	Control	Tto	Control	Tto	Control	Tto	Control	Tto
Hígado	0.94 ± 0.06	0.99 ± 0.11	0.93 ± 0.10	0.88 ± 0.04	0.75 ± 0.09	0.75 ± 0.16	0.84 ± 0.21	0.69 ± 0.02
Riñón	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.199 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.00
Corazón	0.07 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.01 ^{ab}	0.07 ± 0.02 ^{ab}	0.04 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.01
Bazo	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00

Tabla 6. Resultados del efecto producido por la suplementación de compuestos fenólicos del aceite de oliva en el peso de los diferentes órganos de los ratones ApoE^(-/-) y C57BL/6, una vez sacrificados. Los promedios en la fila que no comparten una letra común no son significativamente

diferentes entre grupos en $p < 0,05$ como se determina mediante una prueba de ANOVA de una sola vía.

No existen diferencias significativas sobre el peso de los distintos órganos en los grupos del mismo sexo. De forma general, sí se puede observar qué órganos de los ratones machos, tienen un peso mayor que el de las hembras, correlacionado con su mayor peso en general.

- EFFECTO PRODUCIDO EN LOS NIVELES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS, POR LA SUPLEMENTACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN RATONES

Después del sacrificio de los ratones, también se obtuvieron muestras sanguíneas de cada uno de ellos, para realizar la valoración de los niveles lipídicos en plasma.

(MG/DL)	APO-E ^(-/-)				C57BL/6			
	Macho		Hembra		Macho		Hembra	
	Control	Tto	Control	Tto	Control	Tto	Control	Tto
TC	294.5 ± 48.01 ^a	400.7 ± 70.59 ^b	270.3 ± 31.47 ^a	297.1 ± 34.94 ^a	86.23 ± 16.08 ^b	89.00 ± 10.10 ^b	66.22 ± 5.19 ^a	65.06 ± 2.46 ^a
	98.54 ± 4.33 ^{ab}	97.49 ± 19.84 ^b	76.54 ± 23.82 ^a	67.98 ± 20.54 ^{ab}	63.82 ± 40.43	76.32 ± 22.33	45.18 ± 10.54	69.74 ± 21.71
HDL	21.14 ± 2.39 ^{bc}	22.95 ± 4.91 ^c	13.80 ± 2.57 ^{ab}	10.62 ± 2.83 ^a	46.43 ± 14.00	37.64 ± 2.46	35.91 ± 2.73	33.59 ± 0.55
	254.8 ± 49.48 ^a	358.3 ± 64.82 ^b	231.2 ± 31.16 ^a	272.9 ± 28.98 ^a	28.41 ± 11.84 ^{ab}	36.15 ± 8.11 ^b	21.31 ± 0.36 ^a	17.58 ± 1.32 ^a
GLUCOSA	245.2 ± 17.95 ^b	268.9 ± 24.45 ^b	261.2 ± 24.93 ^{ab}	291.2 ± 20.69 ^a	288.2 ± 13.77	260.0 ± 28.28	245.0 ± 70.71	294.0 ± 24.04

Tabla 7. Resultados del efecto producido por la suplementación de compuestos fenólicos del aceite de oliva en los niveles de lípidos en plasma de los ratones ApoE^(-/-) y C57BL/6. Existen diferencias significativas entre los grupos de $p < 0,05$, como se determina por una prueba de ANOVA de una vía seguido de la prueba LSD. Los promedios en la fila que no comparten una letra común no se observan diferencias estadísticas.

En este aspecto del estudio, sí se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Los valores lipídicos en plasma de colesterol, LDL y triglicéridos totales, fueron más altos en el grupo de ratones machos ApoE^(-/-) con la dieta suplementada con SEC. Por otro lado, se observa que los niveles de HDL circulante disminuyeron significativamente en el grupo de hembras Apo-E^(-/-) comparadas con el grupo control.

La suplementación con los fenoles de oliva no produjo ninguna modificación en los niveles plasmáticos de glucosa en los ratones.

- **BIOMARCADORES DE CUMPLIMIENTO DE LA INGESTA**

Para verificar la ingesta, absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos, se analizó las excreciones y la orina de cada uno de los ratones, el día antes de comenzar el experimento y el último día con el fin de establecer diferencias.

➤ **HECES**

nmol/g	CONTENIDO HECES							
	ApoE(-/-)				C57BL/6			
	Macho		Hembra		Macho		Hembra	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Ácido Fenilacético	23.66 ± 11.07	39.86 ± 16.25 ^a	6.75 ± 4.72	9.97 ± 7.71 ^b	10.53 ± 6.21	50.68 ± 2.58 ^{a*}	2.08 ± 1.94	10.21 ± 0.96 ^{b*}
Ácido Hidroxifenilacético	93.85 ± 17.40	159.9 ± 34.78 ^{ab}	125.3 ± 16.63	138.5 ± 17.36 ^a	110.09 ± 36.86	192.9 ± 28.63 ^{b*}	82.01 ± 23.45	144.8 ± 12.19 ^a
Hidroxitirosol	N.D	11.64 ± 6.12 ^a	N.D	14.15 ± 10.43 ^{a*}	N.D	11.69 ± 0.60 ^{a*}	N.D	11.17 ± 0.85 ^{a*}
Ácido Hidroxifenilpropiónico	14.16 ± 3.08	32.01 ± 7.44 ^{a*}	18.89 ± 3.81	30.20 ± 7.00 ^{a*}	21.41 ± 4.90	26.21 ± 3.95 ^a	18.43 ± 6.33	31.56 ± 4.12 ^a
Ácido Dihidroxifenilacético	N.D	20.08 ± 18.4 ^{ab*}	N.D	8.09 ± 6.43 ^{a*}	22.85 ± 7.92	21.07 ± 6.87 ^b	22.60 ± 5.28	24.99 ± 2.84 ^b
Ácido Hipúrico	67.37 ± 10.55	110.1 ± 84.6 ^b	45.89 ± 25.25	85.67 ± 73.19 ^{ab}	34.16 ± 22.07	33.36 ± 21.11 ^a	31.43 ± 18.25	73.32 ± 47.24 ^{ab}
Tirosol Sulfatado	3.03 ± 6.06	17.0 ± 23.0 ^a	N.D	21.82 ± 25.00 ^{a*}	N.D	N.D	N.D	14.90 ± 17.22 ^a
Hidroxifenilacético Sulfatado	39.47 ± 41.47	124.0 ± 68.3 ^a	21.10 ± 13.00	49.03 ± 21.71 ^{a*}	1.97 ± 0.94	14.63 ± 5.83 ^{a*}	8.68 ± 8.05	24.69 ± 3.29 ^{a*}
Hidroxitirosol Sulfatado	N.D	30.67 ± 57.50 ^a	N.D	12.70 ± 4.05 ^{a*}	N.D	N.D	N.D	9.81 ± 2.92 ^{a*}
Ácido Hidroxifenilpropiónico Sulfatado	175.9 ± 212.6	260.8 ± 196.7 ^b	194.7 ± 140.3	162.2 ± 133.35 ^{ab}	21.17 ± 9.05	84.14 ± 36.75 ^a	77.83 ± 60.44	61.57 ± 46.43 ^a
Ácido Homovanílico Sulfatado	39.61 ± 47.42	143.1 ± 44.0 ^c	18.16 ± 12.33	28.62 ± 22.47 ^b	N.D	N.D	4.19 ± 4.02	20.21 ± 25.06 ^a
Ácido Hidroxifenilpropiónico Sulfatado	N.D	17.74 ± 32.02 ^a	N.D	36.11 ± 86.98 ^a	N.D	N.D	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00 ^a

Acetato de Hidroxitirosol Sulfatado	N.D	40.56 ±	N.D	16.85 ±	N.D	6.99 ±	N.D	9.13 ±
		31.42 ^b		9.12 ^{a*}		0.63 ^a		2.53 ^a
Catecol Sulfatado	25.23 ±	31.51 ±	11.76 ±	84.48 ±	N.D	N.D	N.D	N.D
	17.48	11.21 ^b	8.19	47.55 ^b				
Me Catecol Sulfatado	7.17 ±	101.2 ±	N.D	76.46 ±	0.03 ±	0.44 ±	N.D	6.40 ±
	14.34	34.79 ^b		67.60 ^a	0.05	0.08 ^{a*}		1.78 ^{a*}
Ácido Coumárico Sulfatado	26.85 ±	37.38 ±	21.67 ±	40.00 ±	19.29 ±	40.68 ±	19.23 ±	40.17 ±
	1.98	4.52 ^a	8.92	10.47 ^{a*}	6.98	3.29 ^a	7.97	3.11 ^{a*}

Tabla 8. Resultados sobre el contenido fecal de los ratones ApoE^(-/-) y C57BL/6 antes y después del tratamiento. Los resultados se expresan como media ± S.D. Hay un aumento significativo del grupo T en relación al T0. Y se observan diferencias significativas entre los grupos a-d usando ANOVA de un factor p< 0,05.

En cada uno de los grupos existe una gran diferencia entre el antes y después de la intervención, ya que la concentración de todos los componentes aumentó considerablemente al final del estudio. Sin embargo, algunos componentes aumentaron en grandes cantidades en el grupo de ratones ApoE^(-/-) en comparación al grupo C57BL6 como serían; el Tirosol S, el Catecol S, el HT Acetato S, el HT S y el OH Fenilacético S. Es importante destacar también las diferencias que hubo entre los dos sexos, ya que la mayoría de compuestos se encontraban en mayor concentración en los ratones machos ApoE^(-/-).

➤ ORINA

En la parte final del estudio se obtuvieron muestras de orina de 24h de los ratones ApoE^(-/-) y C57BL/6, para conocer la diferencia de contenido en cada grupo.

µMol/L	ANÁLISIS URINARIO							
	ApoE(-/-)				C57BL/6			
	Macho		Hembra		Macho		Hembra	
	Control	Tto	Control	Tto	Control	Tto	Control	Tto
Hidroxitirosol	0.00 ±	0.05 ±	0.00 ±	0.06 ±	0.00 ±	0.03 ±	0.00 ±	0.02 ±
	0.00	0.02 ^{*ab}	0.00	0.03 ^{*b}	0.00	0.01 ^{*ab}	0.00	0.01 ^{*a}
Alcohol Homovanílico	0.01 ±	0.05 ±	0.03 ±	0.08 ±	0.01 ±	0.03 ±	0.01 ±	0.04 ±
	0.00	0.03 ^{*b}	0.00	0.03 ^{*a}	0.00	0.01 [*]	0.01	0.00 ^a
Hidroxitirosol Sulfato	0.00 ±	0.18 ±	0.00 ±	0.14 ±	0.00 ±	0.05 ±	0.00 ±	0.03 ±
	0.00	0.07 ^{*c}	0.00	0.05 ^{*b}	0.00	0.02 ^{*a}	0.00	0.01 ^{*a}

Alcohol	0.04	±	0.06	±	0.04	±	0.10	±	0.04	±	0.05	±	0.05	±	0.02	±
Homovanílico	0.01		0.01 ^b		0.03		0.04 ^a		0.01		0.03 ^a		0.00		0.01 ^{*a}	
Sulfato																
Ácido	0.34	±	0.41	±	0.24	±	0.60	±	0,27	±	0.23	±	0.31	±	0.10	±
Homovanílico	0.03		0.06 ^{*c}		0.01		0.28 ^{*d}		0.04		0.03 ^b		0.03		0.01 ^{*a}	
Sulfato																
Hidroxitirosol	0.00	±	0.01	±	0.00	±	0.05	±	0.00	±	0.00	±	0.00	±	0.02	±
Acetato	0.00		0.00 ^a		0.00		0.04 ^b		0.00		0.00 ^{*a}		0.00		0.01 ^{*b}	
Sulfato																

Tabla 9. Resultados el análisis de orina 24h de todos los grupos de ratones, en la fase final del estudio. Los resultados son expresados como media de \pm SD. Las muestras pareadas $P < 0,05$ A. B. C.D muestran diferencias estadísticas con el grupo de tratamiento de cuatro, en una prueba de ANOVA ($p < 0,05$).

Los resultados de la **Tabla 9**, demuestran una diferencia significativa entre los grupos de ratones ApoE^(-/-) y C57BL/6 en TTO. Estos últimos destacan por tener concentraciones más bajas de cada uno de los componentes analizados, pero sobre todo en HT y de sus principales metabolitos HT Sulfato y Ácido Homovanílico.

- VALORACIÓN HISTOLÓGICA DE LA AORTA

Después del sacrificio, a todos los ratones se les extirpó la aorta, para posteriormente analizarla. Las muestras se embebieron en parafina y a continuación, se realizaron cortes seriados de ésta. Se seleccionaron diferentes tinciones para valorar distintos parámetros. Al no encontrar ningún indicio de daño cardiovascular en ratones C57BL, solo se midieron las lesiones ateroscleróticas en ratones ApoE^(-/-).

La elaboración de las gráficas se ha realizado con Photoshop e Image J.

- EVALUACIÓN DE LA DEPOSICIÓN DE PROTEOGLICANO

En las siguientes imágenes de aorta, se observan los cortes histológicos con la tinción Alcian Blue en ratones ApoE^(-/-). Esta tinción muestra que, cuanto más azulado mayor cantidad de depósitos de proteoglicanos hay en la pared de las arterias.

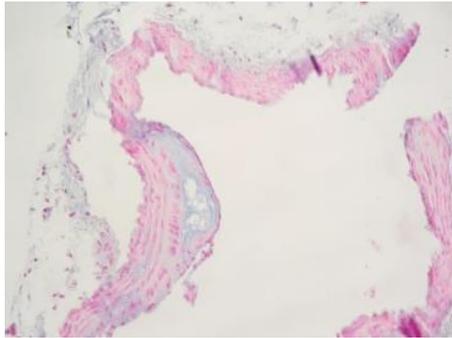


Figura 7. Fotografía realizada con el microscopio óptico, de una aorta de ApoE(-/-) en TTO con tinción Alcian Blue.

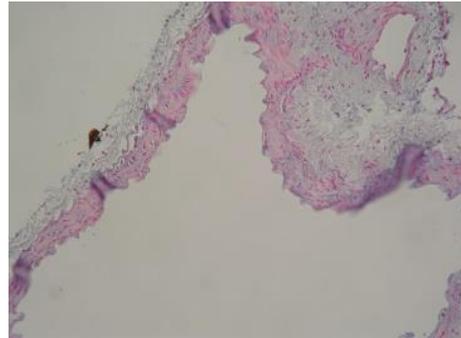
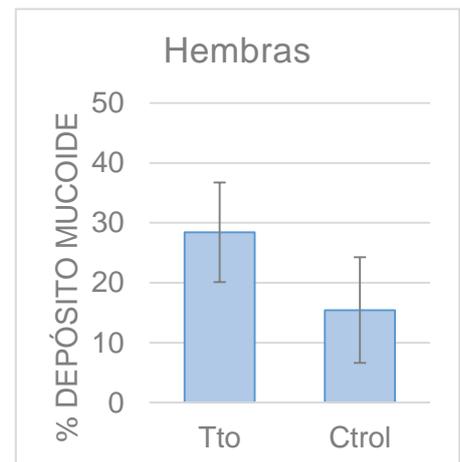
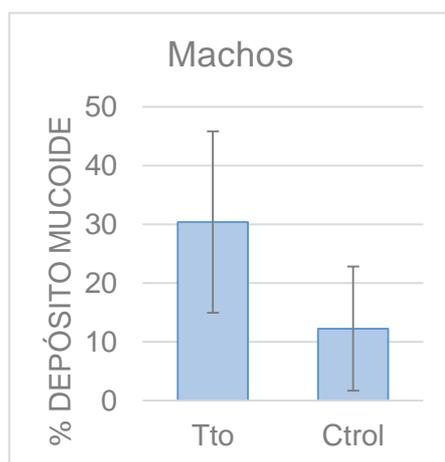


Figura 8. Fotografía realizada con el microscopio óptico, de una aorta de ratón ApoE(-/-) C con tinción Alcian Blue.

En las **Figuras 7 y 8** se observa como los depósitos de proteoglicanos fueron mayores en el grupo en TTO que en el grupo C. Además de encontrar una proporción más elevada en machos que en hembras.

Para medir de manera más completa, las lesiones ateroscleróticas producidas durante el estudio, también se valoró la proporción de degeneración del depósito mucoso, Un síntoma producido durante la necrosis quística en las arterias, que se asocia con una debilidad y una pérdida de la elasticidad de la aorta, con una elevada probabilidad de producir un aneurisma.



Gráfica 2. Resultados de la cantidad de depósito mucoso en %, en ratones ApoE(-/-) machos y hembras, de ambos grupos (TTO y C).

Las **Gráfica 2** muestra como la cantidad de depósito mucoso es similar entre machos y hembras y ambos comparten la característica de que los grupos en TTO lo conservan mejor que los grupos C.

➤ EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS

Por otro lado, la tinción Tricómico de Massón representa que cuanto más verdoso aparece un tejido, mayor es su tasa de rigidez, es decir, más proporción de depósitos de colágeno hay en la pared de las arterias.

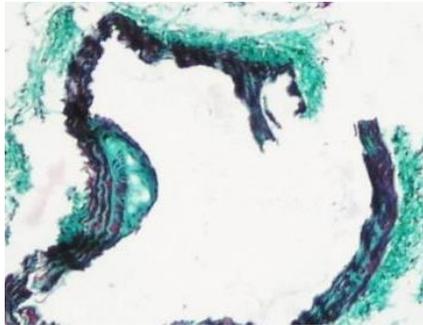


Figura 9. Fotografía realizada con el microscopio óptico, de una aorta de ratón ApoE^(-/-) en TTO con tinción Tricómico de Masson.

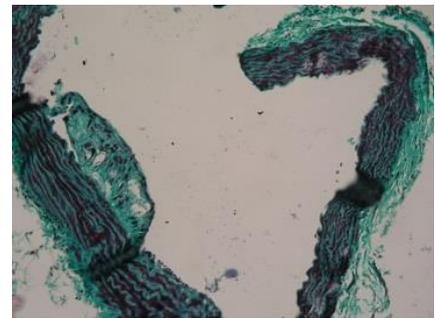
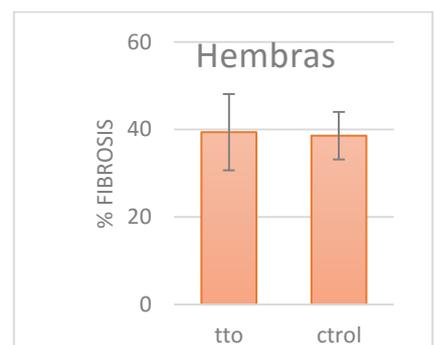


Figura 10. Fotografía realizada con microscopio óptico, de una aorta de ratón ApoE^(-/-) C, con tinción Tricómico de Masson.

En las **Figuras 9 y 10** destaca que hay una mayor cantidad de depósitos de colágeno en el grupo ApoE^(-/-) en tratamiento, en comparación con el grupo C. Sobre todo, las diferencias se encuentran en el grupo sexo masculino.

También se realizó una valoración de la fibrosis producida en el tejido aórtico, como lesión aterosclerótica.



Gráfica 3. Resultados del % de fibrosis que afectan a los ratones ApoE^(-/-) machos y hembras, en TTO.

La **Gráfica 3** muestra que son las hembras ApoE^(-/-) con TTO sufren menor proporción de fibrosis y en machos, la proporción de tejido fibroso es ligeramente mayor en el grupo en TTO que en el C.

También, se realizó la tinción Oil Red en los cortes histológicos de las diferentes aortas. Esta tinción ayuda a observar la acumulación de lípidos en la capa íntima de las arterias, gracias a una coloración rojiza.

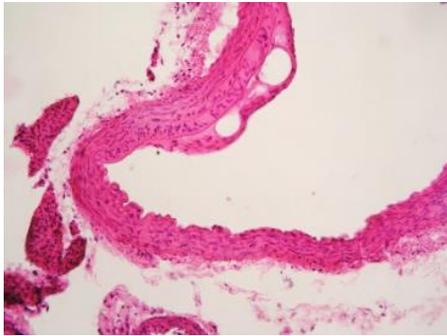


Figura 11. Fotografía realizada con el microscopio óptico, de una aorta ApoE^(-/-) en tratamiento con tinción Oil Red.

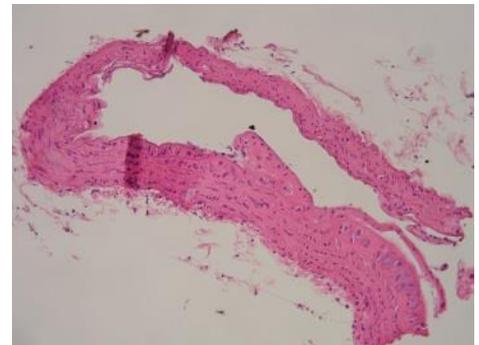
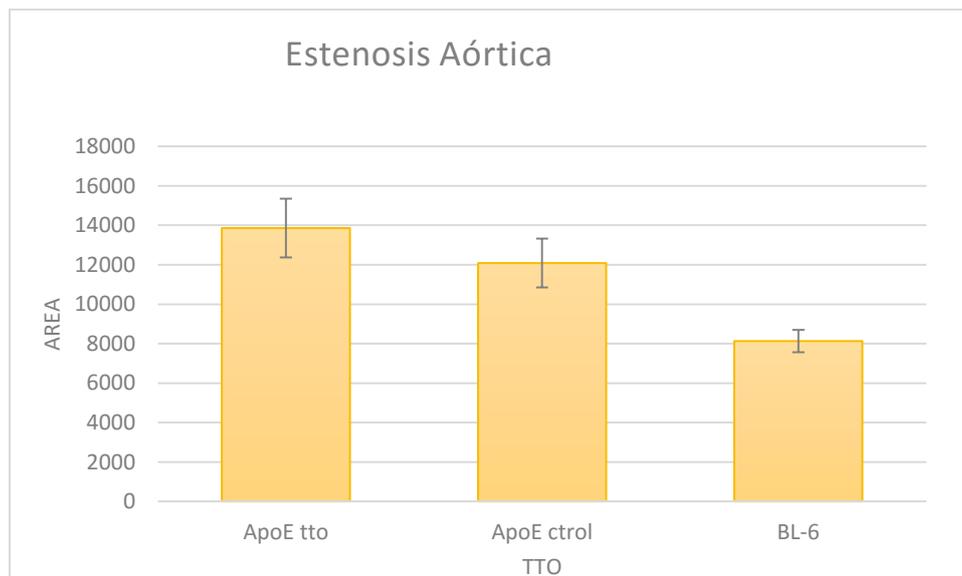


Figura 12. Fotografía realizada con el microscopio óptico, de una ratón aorta ratón ApoE^(-/-) control con tinción Oil Red.

Los resultados muestran como en el grupo de ratones ApoE^(-/-) en TTO, existe una mayor acumulación de lípidos en las arterias, en relación al grupo C.

Por último, la **Gráfica 4** muestra el área de la aorta la cual está afectada por estenosis, es decir, un estrechamiento anormal del lumen.



Gráfica 4. Resultados de la proporción de área afectada por estenosis aórtica en ratones ApoE^(-/-) C y TTO y ratones C57BL/6.

Los resultados muestran como en los ratones ApoE^(-/-) en TTO, tienen una mayor área afectada por estenosis, seguidamente por los ApoE^(-/-) C y finalmente, los ratones C57BL6.

7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las referencias bibliográficas de este estudio demuestran cómo seguir un modelo de Dieta Mediterránea, en la cual el aceite de oliva virgen es la grasa principal, acompañada de una ingesta baja en colesterol, se ha relacionado con una disminución en la incidencia de padecer aterogénesis, gracias a los componentes minoritarios propios del AOVE, como serían los compuestos fenólicos. Sin embargo, los resultados de este estudio, realizado en un modelo de desarrollo de aterogénesis, han demostrado que cuando estos compuestos fenólicos se administran fuera de la dieta habitual y se toman como suplemento en una cantidad de 10mg/kg de ratón ApoE^(-/-)/día (modelo con una fuerte alteración oxidante), durante 12 semanas, el perfil de lípidos se ve alterado y la situación aterogénica empeora.

Los resultados muestran como en los grupos de ratones ApoE^(-/-) con una dieta suplementada en SEC, los niveles de lipoproteínas LDL, colesterol y triglicéridos, aumentaron considerablemente en relación con aquellos grupos de ratones que no tomaron una dieta enriquecida en fenoles. El incremento de este tipo de moléculas, marcan un daño celular, que a la larga potencian procesos como la aterogénesis. Se pudo asociar el incremento de estos compuestos plasmáticos, con la suplementación enriquecida por compuestos fenólicos, gracias al análisis de las heces obtenidas antes y después de la intervención del estudio y de un análisis de orina, realizado después del sacrificio. En los dos tipos de muestras, se observaron concentraciones elevadas de metabolitos secundarios producidos por la ingesta de componentes fenólicos procedentes del orujo del aceite de oliva, en aquellos ratones que durante el estudio tenían su dieta enriquecida en fenoles.

En el momento de medir la lesión arteriosclerótica, los resultados también muestran que los modelos de ratón ApoE^(-/-) en TTO, sufrían de alteraciones graves relacionadas con el desarrollo de aterogénesis. En todos ellos, el nivel de fibrosis, la acumulación de colágeno, el depósito mucoso y de proteoglicanos, era mayor que en los de grupo control. Y con una gran diferencia con los ratones C57BL/6 a los que no se les pudo detectar daño tisular alguno. Además, la acumulación de lípidos en la capa íntima de las arterias aumentó en todos aquellos ratones que seguían una dieta suplementada en SEC, aumentando el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular.

Este mismo efecto negativo se observa en el estudio (Guillén, y otros, 2009), en el cual ratones carentes de la ApoE^(-/-) son alimentados con dietas con un 10% (p/p) de este aceite y sin colesterol. Después de administrar la dieta durante 12 semanas, se sacrificaron los ratones y se cuantificó el grado de lesión aterosclerótica presente. Los resultados mostraron que la suplementación de la dieta con el 10% de aceite de oliva producía un retraso en el desarrollo de

la aterosclerosis. Sin embargo, la suplementación de la dieta con el 20% (p/p) de aceite de oliva virgen extra en presencia o ausencia de colesterol, producía un aumento del peso corporal de los ratones y de la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos. Además, todos aquellos ratones con inclusión de colesterol dietético en su dieta, aumentaron su lesión, tanto aquellos alimentados con la dieta control, como aquellos alimentados con dieta enriquecida. Cuando se investigaron los resultados se observó que en las hembras, el colesterol dietético producía una reducción de la apolipoproteína A-I, por el contrario, en los machos se redujo la actividad de la paraoxonasa sérica. Ambos parámetros están asociados a las lipoproteínas HDL y a sus propiedades antiaterogénicas. Gracias a estos resultados, se puede concluir que en función del sexo, existe una evidencia sobre la regulación nutricional de la paraoxonasa y su asociación con la aterosclerosis, además de que existen unos márgenes en los que el aceite de oliva virgen ejerce una mejor protección.

Por último, este grupo de investigación estudió el efecto en el desarrollo aterosclerótico del hidroxitirosol en particular, al ser el componente más abundante de la fracción soluble del AOVE y un potente antioxidante. Se administró la dosis de 10mg/kg ratón ApoE^(-/-)/día durante el mismo periodo de estudio y los resultados indicaron que en esta dosis y en bajo contenido en colesterol, el HT inducía un mayor desarrollo de la aterosclerosis, acompañado de una disminución de la concentración de la apolipoproteína A-I y un aumento del colesterol plasmático. La conclusión es que el HT ingerido en cantidades más elevadas que las presentes de forma natural en el aceite de oliva, induce a un empeoramiento de la aterosclerosis.

El estudio realizado por *Boauyed y col.* explica que, los polifenoles son más eficientes que la vitamina C en afrontar el estrés oxidativo, pero su efecto está directamente relacionado con la absorción en el sistema gastrointestinal, que está condicionado por factores como la formación de complejos con la matriz de los alimentos o por la presencia de potenciales inhibidores de absorción. Sin embargo, el estudio aclara que aunque los antioxidantes se necesiten para mantener el equilibrio homeostático, altas dosis de antioxidantes exógenos pueden perturbar el equilibrio redox al actuar como pro-oxidantes (Bouayed & Bohn, 2010).

Estos resultados, son reforzados por diferentes estudios realizados con animales transgénicos que muestran las anomalías de los sistemas enzimáticos antioxidantes, al producirse una ingesta de componentes fenólicos en dosis elevadas. Por lo tanto, el estudio concluye la evidencia de los beneficios para la salud procedentes de los compuestos antioxidantes como los polifenoles, al ser consumidos dentro de las cantidades de los alimentos naturales, pero que en el momento en que se aumentan las dosis de ingesta, se producen desequilibrios y su efecto cambia a pro-oxidante.

El estudio (Carocho & Ferreira, 2012) declara que los compuestos fenólicos de la dieta, también pueden actuar de manera pro-oxidante en sistemas que contienen metales redox activos, que conducen a la formación de ROS y fenoxilo y acaban dañando moléculas de ADN, lípidos y otras moléculas biológicas, aunque todo depende de la concentración en la que se encuentren estos componentes fenólicos y la naturaleza de las moléculas vecinas, entre otros factores. Sin embargo *Halliwell (2008)* postula que el efecto pro-oxidante de los compuestos fenólicos, puede ser beneficioso en un grado leve de estrés oxidativo, ya que podría elevar los niveles de las defensas antioxidantes y xenobióticos, que metabolizan enzimas y conducen a la citoprotección en general. Otros autores, también plantean la hipótesis de que los pro-oxidantes también pueden tener propiedades de señalización celular esenciales para la vida. *Halliwell (2010)* aclara que aún queda mucho camino por recorrer a lo que se refiere a los antioxidantes. Además, habla de que las investigaciones realizadas con ratones de laboratorios, al ser más sensibles a los antioxidantes dietéticos que los seres humanos, no se pueden interpretar los resultados y sacar conclusiones precipitadas, sin tener en cuenta las diferencias entre las especies. Otra limitación significativa en la capacidad antioxidante de los alimentos es el gran número de ensayos que se pueden utilizar para determinar los mismos parámetros. La infinidad de matrices, plantea serios problemas que no ayudan a la comunidad científica para seguir adelante. Por lo tanto, hay una necesidad clara, de mirar más profundamente en todos los ensayos de antioxidantes disponibles hasta ahora, para mejorarlos y para tener un número uniforme de los procedimientos que deben ser obligatorios, con el fin de ayudar a la comparación entre resultados.

Por último, el estudio (Acín, y otros, 2006) también realizó una intervención similar al de este trabajo, con 21 ratones ApoE^(-/-) de dos meses de edad, los cuales recibieron durante 10 semanas una dieta control (en un grupo de 13 ratones) y una dieta rica en hidroxitirosol con una dosis en el pienso de 10mg/kg de ratón/día (en otro grupo de 8 ratones), para verificar el efecto del hidroxitirosol en el desarrollo de la aterogénesis. Para comprobar su efecto se midieron las concentraciones de colesterol y triglicéridos, se analizaron las apolipoproteínas, los monocitos Mac-1 y la lesión aórtica. Los resultados no mostraron ningún cambio significativo en el colesterol HDL, en la paraoxonasa, la apolipoproteína B o en los niveles de triglicéridos. Sin embargo, la administración de hidroxitirosol redujo la apolipoproteína A-I y aumentó el colesterol total, las áreas de lesión aterosclerótica y los monocitos circulantes expresando Mac-1 $r=0,65$, $p<0,01$ (el cual se correlaciona con áreas de lesión). Por el contrario de otros estudios, los resultados de este estudio indican que la administración de hidroxitirosol en las dietas bajas en colesterol, aumenta la lesión aterosclerótica asociada con el grado de activación de monocitos y remodelación de las lipoproteínas del plasma. Por lo tanto, estos datos apoyan el concepto de que alimentos enriquecidos en fenoles, fuera de la matriz original, podrían ser también perjudiciales. Concretamente, el efecto de la dieta suplementada en hidroxitirosol fue la del

aumento de las lipoproteínas VLDL y el colesterol LDL. Además, con el fin de verificar la absorción del hidroxitirosol, el estudio también realizó la valoración de orina, donde se observaron elevadas concentraciones de hidroxitirosol y su principal metabolito secundario alcohol homovanílico, en aquellos ratones con una dieta suplementada en HT.

También explica cómo los componentes fenólicos con poder antioxidante in vivo, no actúan de forma aislada, sino como una red de antioxidantes junto con componentes como el ascorbato o el glutatión. Por ello, ingerir cantidades elevadas de hidroxitirosol o realizar tratamiento de largo plazo, puede agotar el glutatión reducido o el ácido ascórbico, convirtiendo un efecto antioxidante en pro-oxidante. Ensayos en seres humanos ponen en práctica esta teoría, observando el efecto antioxidante de la vitamina E en solitario, y el efecto antioxidante de la vitamina E junto con la vitamina C. La vitamina C al poder regenerar la forma oxidada de la vitamina E si pudo reducir la aterosclerosis, en cambio la vitamina E en solitario, solo promovió la peroxidación de lípidos. Además, gracias a los diferentes estudios revisados, se sabe que este efecto pro-oxidante, no solo se observa únicamente en los compuestos fenólicos, ni en el aceite de oliva como único alimento. La quercetina, el resveratrol, diferentes flavonoides, el ácido ascórbico y hasta los componentes antioxidantes del aceite de ajo, entre otros muchos ejemplos, son capaces de cambiar su acción antioxidante por pro-oxidante por los mismos factores (Guardado Yordi, Molina Pérez, Joao Matos, & Uriarte Villares, s.a) (Carocho & Ferreira, 2012) (G., L.H, M.L, & G., 1012).

8. CONCLUSIONES

En conclusión, la suplementación de la dieta con los componentes fenólicos procedentes del aceite de oliva, no inhibió el proceso de aterogénesis de los modelos de ratones ApoE^(-/-). Por el contrario, todos aquellos ratones que formaban parte del grupo en TTO, sufrieron un empeoramiento del perfil lipídico, con un aumento de las concentraciones plasmáticas del colesterol total, colesterol LDL y TG y una disminución de HDL en hembras. Además, se evidenció el aumento del riesgo de sufrir una alteración cardiovascular en todos los ratones ApoE^(-/-) en TTO, en observar que los resultados mostraban un aumento de las diferentes lesiones arterioscleróticas, como sería un aumento del depósito mucoide y de proteoglicanos en la membrana de las arterias, un aumento del colágeno y consecuentemente de una mayor fibrosis y por último, una mayor acumulación de lípidos en la capa intima de las arterias.

Por otro lado, valorar el cumplimiento de la ingesta y del metabolismo fenólico en el modelo ApoE^(-/-) mediante el análisis de muestras de heces y de la orina al principio y al final del estudio, ayudó a validar los resultados obtenidos en el estudio, gracias a que se observaron como todos aquellos metabolitos secundarios resultantes del metabolismo de los componentes fenólicos, aumentaron en aquellos ratones que formaron parte del grupo con una dieta suplementada en SEC. Sobre todo, en orina, se observaron en grandes concentraciones hidroxitirosol y sus metabolitos secundarios principales; el aclohol y ácido homovanililo

Y como conclusión final del estudio, gracias a la revisión bibliográfica realizada y los resultados obtenidos, se puede decir que los componentes fenólicos procedentes del aceite de oliva, aportan efectos beneficiosos sobre la salud gracias a su poder antioxidante, entre las que destaca la prevención de enfermedades cardiovasculares, siempre y cuando su ingesta se mantenga dentro de los matrices de los alimentos naturales. Sin embargo, los resultados de este estudio, conjuntamente con otros, han mostrado que existe un margen muy estrecho en el que este poder antioxidante, puede convertirse en pro-oxidante. Las causas, se asocian a diversos factores. Diferentes estudios asocian que una dieta enriquecida en antioxidantes (como podrían ser los compuestos fenólicos del aceite de oliva) en dosis demasiado elevadas, puede potenciar el poder pro-oxidante de estos componentes. Además, que el organismo se encuentre en un periodo de enfermedad con elevados niveles de estrés oxidativo y la posible interacción de los antioxidantes con otras moléculas del organismo, también se asocia como causa de cambio a una acción pro-oxidante.

Por lo tanto, considerando que la aterosclerosis es una enfermedad compleja y de lento progreso, y la cual, su efecto oxidativo podría ser ejercido por diversos mecanismos que actúan sobre

diferentes vías y/o procesos, se considera necesario más cantidad de estudios para aclarar las influencias de las distintas dietas, de los diferentes diseños experimentales que se realizan y los efectos específicos de cada especie o dosis, entre otros factores.

También la *Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología* ha declarado la necesidad de aclarar los aspectos de seguridad, la estructura y actividad, la biodisponibilidad y el metabolismo, de los compuestos con actividad antioxidante cuando se convierten en parte de los alimentos funcionales o nutraceuticos, ya que muchos resultados de los estudios son insuficiencias y en algunos casos contradictorios. Además de que, los resultados del presente estudio podrían sugerir que, la formulación de posibles alimentos funcionales ricos en compuestos antioxidantes, siempre deberían aproximarse lo máximo posible a las concentraciones que se encuentran de forma natural en los alimentos, debido a que los antioxidantes no se encuentran de manera natural aislados de productos alimenticios y a causa de ello, otros constituyentes podrían influir en su actividad, transformándola en pro-oxidante.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acín, S., Navarro, M., Arbonés-Mainar, J., Guillén, N., Sarría, A., Carnicer, R., . . . Osada, J. (2006). Hydroxytyrosol Administration Enhances Atherosclerotic Lesion Development in Apo E Deficient Mice. *Oxford Journals*, 9.
- Arranz Gutiérrez, E. M. (2013). *Estudio de antiinflamatorios naturales para el diseño de alimentos de uso específico para la salud*. Madrid: s.e.
- Berrougui, H., Ikhlef, S., & Khalil, A. (2015). Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Promote Cholesterol Efflux and Improve HDL Functionality. *Hindawi Publishing Corporation*, 9.
- Bonaccio, M., Di Castelnuovo, A., Bonanni, A., Costanzo, S., De Lucia, F., Pounis, G., . . . Iacoviello, L. (2013). Adherence to a Mediterranean diet is associated with a better health-related quality of life: a possible role of high dietary antioxidant content. *BMJopen*, 11.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants -- Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 11.
- Butnariu, M., & Samfira, I. (2012). *Free Radicals and Oxidative Stress*. Romania: Bioequivalence & Bioavailability.
- Carabias Martínez, R., Rodríguez Gonzalo, E., Revilla Ruiz, P., & Hernández Méndez, J. (2005). Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *ELSEVIER*, 17.
- Carocho, M., & Ferreira, I. (2012). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *ELSEVIER*, 11.
- Carvajal Carvajal, C. (2015). LDL OXIDADA Y LA ATEROSCLEROSIS. *SCIELO*, 9.
- Devasagayam, T., Tilak, J., Bloor, K., S Sane, K., Ghaskadbi, S., & Lele, R. (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health; Current Status and Future Prospects. *Japi*, 11.
- Fitó, M., & Konstantinidou, V. (2016). Nutritional Genomics and the Mediterranean Diet's Effects on Human Cardiovascular Health. *Nutrients*, 12.
- G., N., L.H, S., M.L, A., & G., R. (1012). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PROOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE AJO POR RESONANCIA DE SPIN ELECTRÓNICA. *I.S.S.N*, 11.
- Gil Hernández, A., Ramírez Tortosa, M. C., Aguilera García, M. C., & Mesa García, M. (2007). Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 9.
- Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos Fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*, 5.
- González Santiago, M. P. (2005). *Estudio de los efectos cardiovasculares y la absorción oral del hidroxitiroso en modelos animales y humanos*. Granada: Editorial de la Universidad de Granada.
- Guardado Yordi, E., Molina Pérez, E., Joao Matos, M., & Uriarte Villares, E. (s.a). Antioxidant and Pro-oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. *intechopen*, 27.

- Guillén, N., Acín, S., Navarro, M., Surra, J. C., Arnal, C., Lou-Bonafonte, J. M., . . . Osada, J. (2009). Conocimiento de la acción biológica del aceite de oliva virgen extra mediante el uso del ratón carente de la apolipoproteína E. *Re Esp Cardiol.*, 11.
- López de las Hazas, M. C., Piñol, C., Marcià, A., Romero, M. P., Pedret, A., Solà, R., . . . Motilva, M. J. (2016). Differential absorption and metabolism of hydroxytyrosol and its precursors oleuropein and secoiridoids. *ELSEVIER*, 12.
- López Miranda, J. (2011). Efectos saludables del aceite de oliva: la perspectiva desde la Nutrigenómica. *I Congreso Médico Aceite de Oliva, Nutrición y Salud* (pág. 15). Madrid: s.e.
- Lou-Bonafonte, J. M., Arnal, C., Navarro, M. A., & Osada, J. (2012). Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Molecular Nutrition & Food Research*, 15.
- Marcela Usaquen Alvarado, S. (2008). Aprovechamiento y valorización del afeorajo tratado térmicamente como: fertilizante biológico y fuente de hidroxitirosol. *eez*, 73.
- Martínez Álvarez, J. R., De Arpe Muñoz, C., & Villarino Marín, A. (2014). *Dieta mediterránea: Avances en Alimentación, Nutrición y Dietética*. España: Punto Didot.
- Matés, J. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *ELSEVIER*, 22.
- Oviedo Orta, E., Bermúdez Fajardo, A., & Danil de Namor, Á. (2005). INMUNOMODULACIÓN: UN NUEVO ENFOQUE TERAPÉUTICO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS. *Cirugía Cardiovascular*, 11.
- Oyarzabal Aja, Y. (2014). *Control de procesos aterogénicos*. País Vasco: s.e.
- Perez-Ternero, C., Rodríguez-Rodríguez, R., Parrado, J., Herrera, M., & Alvarez de Sotomayor, M. (2013). Protección antioxidante de un extracto enzimático de orujo de la uva y sus polifenoles mayoritarios sobre la activación de NADPH oxidasa y la inhibición de superóxido dismutasa. *SEF*, 24.
- Potteaux, S., Ait-Oufella, H., & Mallat, Z. (2007). Mouse models of atherosclerosis. *ELSEVIER*, 6.
- Priyadharsini, R. (2015). Animal models to evaluate anti-atherosclerotic drugs. *SFPT*, 12.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *Hindawi*, 20.
- Rodríguez, G., Mago, N., & Rosa, F. (2009). El papel de la inflamación en la aterogénesis. Revisión. *Investigación Clínica*, 21.
- Ros, E. (2013). LA DIETA MEDITERRÁNEA. *Mediterráneo Económico*, 15.
- Ros, E., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Salas-Salvado, J., Fitó, M., Martínez, J. A., & Corella, D. (2014). Mediterranean Diet and Cardiovascular Health: Teachings of the PREDIMED Study. *Advances in Nutrition*, 7.
- Ruíz-Gutiérrez, V., G. Muriana, F. J., & Villar, J. (1998). El aceite de oliva virgen y las enfermedades cardiovasculares. Perfil lipídico en plasma y composición lipídica de la membrana de eritrocito humano. *Digital.CSIC*, 21.
- Sánchez Muniz, F. J. (2007). Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea. *Dialnet*, 40.

- Sehayek, E., Shefer, S., B. Nguyen, L., G. Ono, J., Merkel, M., & L. Breslow, J. (2013). Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: Studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *PNAS*, 5.
- Simini, B. (2000). Serge Renaud: from French paradox to Cretan miracle. *The Lancet*.
- Suárez, M., Romero, M. P., Macià, A., Valls, R. M., Fernández, S., Solà, R., & Moltiva, M. J. (2009). Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *ELSEVIER*, 10.
- Ugartondo Casadevall, V. (2009). *Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares*. Barcelona: s.e.
- W.M.A, N. (1998). Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *ELSEVIER*, 53-75.
- Weinberg, R., VanderWerken, B., Anderson, R., Stegner, J., & Thomas, M. (2001). Pro-Oxidant Effect og Vitamin E in Cigarette Smokers Consuming a High Polyunsaturated Fat Diet. *American Heart Association*, 6.

10. ANEXOS

- ANEXO 1: PROTOCOLO TINCIONES

Las tres tinciones realizadas durante el estudio, en los diferentes órganos y tejidos de cada uno de los ratones, fueron:

- **Tinción *Oil Red Staining***
- **Tinción *Alcian Blue***
- **Tricrómico de Masson**

Sin embargo, antes de realizar las distintas tinciones se deben realizar unos pasos previos de preparación de la muestra, para poder observarla en el microscopio adecuadamente:

- Fijación: Una vez el tejido muere, sufre una serie de procesos degenerativos, por eso, con la fijación se intentan preservar las características morfológicas y moleculares de un tejido, para que sean lo más parecidas posibles a las que poseía en su estado vivo. Para ello se pueden utilizar diferentes fijadores químicos. En este estudio se utilizó como fijador el formaldehído pH 7 con una concentración próxima al 4%, durante 24h a 4°C.
- Inclusión: Se trata de endurecer el tejido, para obtener posteriormente, secciones muy finas de este y así poder observarlas mejor en el microscopio. En el estudio, se endurecieron las diferentes muestras, congelándolas a -80°C durante 24H.
- Corte: Se hizo uso de los criomuellos para obtener secciones de cada tejido de un grosor de 10µm.

Una vez realizada la preparación de la muestra, aplicamos las diferentes tinciones.

La tinción Oil Red Staining, sirve para detectar la acumulación de grasa (triglicéridos y lípidos) en la capa íntima de la arteria. Para visualizarlos, esta tinción tiñe de rojo los depósitos de gasa que aparecen en los distintos tejidos. El protocolo para su aplicación se resume a continuación:

TINCIÓN OIL RED STAINNING	
Reactivo	Tiempo
Formalina 10%	10 minutos
Agua corriente	4 minutos
Propilenglicol 100%	5 minutos
Propilenglicol 100%	5 minutos
Oil red	7 minutos
Propilenglicol 85% en agua	3 minutos
Agua corriente	3 minutos

Hematoxilina	1 minuto
Agua corriente	3 minutos
Solución de Bluing	20 sumersiones
Agua corriente	3 minutos

Tabla. Protocolo tinción Oil Red Staining. Tinción aplicada en los tejidos obtenidos de los ratones del estudio, el cual tiñe de rojo los depósitos de grasa acumulados en las células.

Por otro lado, la tinción *Alcian Blue*, marca con color azul-verdoso los depósitos de proteoglicanos que se acumulan en las paredes de las arterias. El protocolo a seguir es el siguiente:

TINCIÓN ALCIAN BLUE	
Reactivo	Tiempo
Xileno (en el caso de haber aplicado parafina)	2x10 minutos
Etanol 100%	2x10 minutos
Etanol 96%	10 minutos
Etanol 80%	10 minutos
Etanol 50%	10 minutos
Agua destilada	5 minutos
Azul Alcian 1%	30 minutos
Agua corriente	3 minutos
Ácido Peryódico al 0.5% en Agua destilada	10 minutos
Agua Destilada	3x1 minuto
Reactivo de Schiff	30 minutos
Agua corriente	5 minutos
Agua destialda	Varios lavados
Etanol 80°	5 minutos
Etanol 96°	5 minutos
Etanol 100°	2x10 minutos
Xileno	2x10 minutos

Tabla: Protocolo tinción "Alcian Blue". Tinción que detecta las zonas ricas en lipolisacáridos, tiñéndolas de un azul-verdoso.

Por último, la tinción Tricrómico de Masson, mide la rigidez de un tejido, a causa de la

acumulación de depósitos de colágeno en la pared de las arterias, gracias a una coloración verdosa. Cuanto más verde, más elevada es la tasa de rigidez y más dañado está el tejido. A continuación, el protocolo utilizado:

TINCIÓN TRICROMICO DE MASSON	
Reactivo	Tiempo
Solución de Bouin	1 hora 56°C o 16 horas RT en cámara húmeda
Agua corriente	5 minutos
Hematoxilina Férrica	2 segundos
Agua corriente	3 minutos
Hematoxilina	2 segundos
Agua corriente	3 minutos
Solución de Bluing	4 sumersiones
Agua corriente	3 minutos
Ácido acético 1%	30 segundos
Azofloxina	30 segundos
Ácido Acético 1%	30 segundos
Ácido fosfotúngstico-anaranjado G	30 segundos
Ácido acético 1%	30 segundos
Colorante Luz Verde	15 minutos
Ácido acético 1%	30 segundos

Tabla. Protocolo tinción "Tricómico de Masson". Tiñe de color verde las zonas más rígidas del tejido, evidenciando un daño tisular importante.