



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Facultad de Ciencias de la Salud



TESIS DOCTORAL

*Efecto de hidroxitirosol sobre algunos
biomarcadores cardiovasculares en la Diabetes
Mellitus experimental*

Miriam Abdel Karim Ruiz

*Departamento de Farmacología
y Terapéutica Clínica*



Laboratorio de Investigaciones


Antitrombóticas e Isquemia Tisular





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Miriam Abdel Karim Ruiz

 <http://orcid.org/0000-0002-8251-1386>

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





FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE
FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA

D. JOSE ANTONIO GONZALEZ CORREA, Doctor en Medicina y Cirugía, D. JOSE PEDRO DE LA CRUZ CORTES, Doctor en Medicina y Cirugía y D. JUAN ANTONIO LOPEZ VILLODRES, Doctor en Medicina y Cirugía, adscritos al Área de Farmacología y Terapéutica Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN:

Que D^a. Miriam Abdel Karim Ruiz ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral titulada: **“Efecto de hidroxitirosol sobre algunos biomarcadores cardiovasculares en la Diabetes Mellitus experimental”**, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que la suscriben revisado su Tesis y estando conformes para ser juzgada.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en Málaga a 12 de Noviembre de 2015.

J.A. González Correa

J.P. de la Cruz Cortés

J. A. López Villodres



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



*Nos dijeron que
no éramos de aquí
que éramos viajeros,
gente de paso
huéspedes de la tierra,
camino de las nubes.
Rafael Alberti*

En primer lugar una mención a los Profesores José Pedro de la Cruz Cortés, José Antonio González Correa, y Juan Antonio López Villodres.

Mi agradecimiento a José Pedro por haberme acogido en su grupo de trabajo. Todavía recuerdo el primer día que entre en el Departamento, me dijo que no, que no necesitaban alumnos, me fui desilusionada. Pero mi voz interior, me impulsaba a insistir, y aquí estoy leyendo mi tesis en el día de hoy. Gracias por tanta paciencia y confianza que ha mostrado conmigo y el entusiasmo con el que me ha guiado.

A José Antonio, gracias, por orientarme y aconsejarme, por acogerme en su grupo de trabajo, así como la guía que me ha ofrecido durante estos años, por los consejos que me ha brindado y en general por estar siempre disponible para ayudar.

A Juan agradecerle, su dedicación, el tiempo que ha pasado junto a mí, en el Laboratorio, en el Animalario, por sus explicaciones, por sus consejos...ayudándome con su experiencia y conocimiento a darle forma a este trabajo.

A los doctores Javier Muñoz Marín, Ana Guerrero Loriguillo y Antonio Pino Blanes, por las infinitas horas, por haber sido mi paño de lágrimas, por haber brindado su esfuerzo, por su tiempo y sus opiniones.

A Jose Julio, por aquella tarde, compartir conmigo su meta, su doctorado, haciendo que me interesase, y agradecerle las infinitas veces que se ha puesto a explicarme, con esos ejemplos tan fáciles para que pudiese entender las dudas que tenía.

A Beatriz, Lucía, Elena, Maribel, Rocío, Miriam, María, Lidia, Inma, Susana y Nuria mis compañeras del Laboratorio por las horas que habéis compartido conmigo.

Al personal del Animalario, por el cuidado y mantenimiento de mis ratillas. Recuerdo, con mucho cariño, aquella vez que entretuvieron a mi hija Dana enseñándole los animalillos mientras yo les daba el tratamiento. O, el día que, tuve que entrar con ella, le encantaban, las quería coger, las observaba muy de cerca y constantemente me preguntaba que como estaban, lo qué iba a ser de ellas...

Bueno, pues aquí estoy...por fin...y parece que fue ayer...

Ahora me encuentro finalizando esta aventura tan enriquecedora. No siempre ha sido fácil. Las circunstancias de mi vida han hecho que la realización del doctorado se convirtiera por momentos en un tormento. Cuantas veces pensé en abandonar pues todo lo tenía en contra. Esta experiencia me ha permitido conocerme mucho mejor y desarrollar mi paciencia, comprender lo que mis padres me decían sobre la importancia vital de terminar lo que uno empieza, crecer en fortaleza, seguir siempre adelante y no rendirme nunca.

Gracias a la vida por esta experiencia en la que mis lagrimas, se han convertido a día de hoy en destellos de luz y alegría.

A Jose y Dana, por su paciencia, su ánimo, por su comprensión, por no poder dedicarles su tiempo.

Como no, a mis padres por su ejemplo y constante ayuda...

A mi abuelo y sus anécdotas, a mi abuela..., dondequiera que esten...

A mis hermanas, Yasmeen y Naila.

A Gloria, mi amiga del alma.

A Rosario por su incondicional amistad.

A Soledad, por su sonrisa, por su dulzura.

A María Dolores, por estar siempre ahí.

A Latifa, siempre, desde niñas.

A María Jesús por la paz que trasmites.

Mi reconocimiento a Jose Luís, Marian y Moisés por estar siempre apoyándome. A Manuel, Migue, Angie, Alfonsa, Miguel y Matias por sus ánimos.

A Patricia Carbonell y Oscar, por esas horas...

A Rafa y mis compañeros Almudena, Bea, Begoña, Carlos, Cuca, Encarni, Esperanza, Eva, Irene, Isa, Lourdes, Manolo, M^a Carmen, Mariela, Mery, Paco, Paola, Patri, Rocio, Sonia Muñoz y Sonia Sanchez por su gran ayuda en la Unidad de Hemodiálisis del Hospital Costa del Sol.

A Joana de la Biblioteca del Hospital Costa del Sol por facilitarme los artículos.

A Ahmad, gracias por su apoyo, su confianza, su ayuda y su tiempo...

Muchas gracias.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



*A la cima no se llega superando a los demás,
sino a uno mismo.*

Anónimo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A ti, Dana, mi hijita.

A Jose, siempre.

A mis padres.

A mis abuelos.

Al espíritu de la Tierra...



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A

AA: Ácido araquidónico

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ADP: Adenín difosfato

AP-1: Proteína activadora 1

AO: Aceite de oliva

AOV: Aceite de oliva virgen

ATP: Adenín trifosfato

ANOVA: Análisis de la varianza

B

BBS: Solución tampón bicarbonatada

BH4: Tetrahidrobiopterina

C

CaM: calmodulina

COX: Ciclooxygenasa

D

DAG: Diacilglicerol

DE: Disfunción endotelial

DietMed: Dieta Mediterránea

Abreviaturas

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

E

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

ECE: Enzima convertidora de endotelina

ECGS: Suplemento de crecimiento de células endoteliales

ECV: Enfermedad Cardiovascular

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ET: Endotelina

F

FAD: Flavina adenina dinucleótido

FAM: Flavina adenina mononucleótido

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FCEV: Factor de crecimiento del endotelio vascular

FNT α : Factor de necrosis tumoral alfa

FvW: Factor von Willebrand

G

G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GC: Guanilato ciclasa

GCs: Guanilato ciclasa soluble

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

Glu: glutamato

GLUT 4: Glucosa transportadora tipo 4

Gln: Glutamina

GSH: Glutation

H

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HbA1c: Hemoglobina glicosilada A1c

HT: Hidroxitirosol

I

ICAM: Moléculas de adhesión intracelular

IFN- γ : monoquina inducida por interferón

IL: Interluquina

Abreviaturas

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

L

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada

M

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MCP-1: Proteína quimiotáctica monocitaria 1

MDA: Malondialdehido

MMP: matriz metaloproteasa

MPO: Mieloperoxidasa

MPOx: Concentración sérica de Mieloperoxidasa

N

NDDG: National Diabetes Data Group

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADP+: Alcohol deshidrogenasa

NF-kB: Factor de transcripción nuclear kB

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOSn: Oxido nítrico sintasa neuronal

NOSe: Óxido nítrico sintasa endotelial

O

O_2^- : Anión superóxido

-OH: Anión hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

$ONOO^-$: peroxinitrito

P

PAI-1: Plasminógeno de tipo 1

PCR: reacción de la cadena de la polimerasa

PFG: productos finales de glicación

PGI_2 : Prostaciclina.

PKC: Proteína quinasa C

PNs: Péptidos natriuréticos

PREDIMED: Prevención con dieta mediterránea

R

RL: Radicales libres

rpm: Revoluciones por minuto.

RAGE: Receptores específicos

S

Abreviaturas

SOD: Superoxido dismutasa.

STAT-1 α : Activador de transcripción-1 α

sGC: Guanilato ciclasa soluble

T

TBARS: Ácido tiobarbitúrico

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

tPA: activador del plasminógeno tisular

TxA₂: Tromboxano A₂

TxB₂: Troboxano B₂

U

UDP-NAc-glu: Uridin-difosfato N-Acetil-glucosamina

V

VCAM: Moléculas de adhesión de células vasculares.

ÍNDICE





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DEFINICION DE DIABETES MELLITUS	3
1.2. CLASIFICACIÓN.	4
1.2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOINMUNE.	5
1.2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2.	5
1.3. FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR DIABETES	6
1.4. EPIDEMIOLOGÍA EN LA DIABETES	7
1.5. COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS	8
1.6. MECANISMOS DE DAÑO DE HIPERGLUCEMIA. CAMBIOS EN VÍAS BIOQUÍMICAS.	10
1.6.1. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE LOS POLIOLES	12
1.6.2. VÍA DE LA HEXOSAMINA	14
1.6.3. VÍA DEL DIACILGLICEROL-PROTEINCINASA C	15
1.6.4. FORMACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA (PFG)	18
1.6.5. ESTRÉS OXIDATIVO	19
1.7. ENDOTELIO VASCULAR	24
1.8. SUSTANCIAS VASODILATADORAS DEL ENDOTELIO	25
1.8.1. ÓXIDO NÍTRICO	25
1.8.2. PROSTACICLINA	28
1.9. SUSTANCIAS VASOCONSTRICTORAS DEL ENDOTELIO	29
1.9.1. ENDOTELINAS	29
1.9.2. ANGIOTENSINA II	30
1.9.3. TROMBOXANO A ₂	31
1.10. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	32
1.11. DAÑOS BIOQUÍMICOS: ESTÍMULO DE LA INFLAMACIÓN	35
1.12. COAGULABILIDAD	39
1.13. DIETA MEDITERRANEA	41
1.14. ACEITE DE OLIVA	46
1.15. OBTENCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA	47
1.16. TIPOS DE ACEITE DE OLIVA	50
1.17. COMPONENTES DEL ACEITE DE OLIVA	51
1.18. HIDROXITIRO SOL	55
1.19. PROPIEDADES DEL HIDROXITIRO SOL	57

1.19.1. ANTIOXIDANTE	57
1.19.2. ANTICANCERÍGENO	59
1.19.3. ANTIINFLAMATORIO Y ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO	60
1.19.4. ANTIMICROBIANA	63
1.19.5. NEUROPROTECTORA	64
1.19.6. CAPACIDAD CARDIOPROTECTORA	65
1.19.7. PREVENCIÓN DE LA OSTEOPOROSIS	67
1.19.8. ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA	68
1.20. ESTUDIOS EN HUMANOS: OTROS DATOS	69
2. OBJETIVOS	75
3. METODOLOGÍA	79
3.1. TIPO DE ESTUDIO	81
3.2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	81
3.3. MÉTODO DE INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DIABETES EXPERIMENTAL	82
3.3.1. PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA	82
3.3.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL	82
3.3.3. MEDICIÓN Y CONTROL DE LAS CIFRAS DE GLUCEMIA	83
3.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	84
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA VASCULAR	85
3.5. COMPUESTO DE ESTUDIO	86
3.6. VARIABLES DE ESTUDIO PARÁMETROS PLAQUETARIOS Y ENDOTELIALES	87
3.6.1. PARÁMETROS PLAQUETARIOS	87
3.6.2. PARÁMETROS ENDOTELIALES	87
3.7. PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO	87
3.7.1. DAÑO OXIDATIVO	88
3.7.2. LDL OXIDADA (LDLox)	88
3.8. PARÁMETROS INFLAMATORIOS	88
3.9. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS	89
3.10. DESCRIPCIÓN DE LAS DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.	89
3.10.1. VARIABLES PLAQUETARIAS	89
AGREGACIÓN PLAQUETARIA	89

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN PLAQUETARIA DE TROMBOXANO	
B ₂	91
3.10.2. VARIALES ENDOTELIALES	91
PRODUCCIÓN VASCULAR DE 6-KETO-PROSTAGLANDINA F1 α (6-KETO-PGF1 α)	91
PRODUCCIÓN ENDOTELIAL DE ÓXIDO NÍTRICO	92
3.10.3. VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO	92
PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	92
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD	94
PRODUCCIÓN DE LDLox	94
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS INFLAMATORIOS	95
Actividad Mieloperoxidasa	95
Producción de interleucina 6 (IL-6)	95
Producción de Moléculas de adhesión leucocitaria (VCAM-1)	95
Producción de peroxinititos	96
3.11. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS	96
TINCIÓN ARTERIAS HEMATOXILINA-EOSINA	97
PREPARACION DE LA HEMATOXILINA-EOSINA	99
3.12. MÉTODO ESTADÍSTICO	99
4. RESULTADOS	101
4.1. PARÁMETROS ZOOMÉTRICOS	103
4.2. PARÁMETROS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA: AGREGACIÓN PLAQUETARIA Y PRODUCCIÓN DE TROMBOXANO	108
4.3. PARÁMETROS VASCULARES	113
4.4. LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD OXIDADA (LDLOX) Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	118
4.5. PARÁMETROS INFLAMATORIOS	123
4.6. DETERMINACIÓN MORFOMÉTRICA EN PARED ARTERIAL	130
5. DISCUSIÓN	137
5.1. MODIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES VASCULARES EN EL MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL	140
5.2. MODIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES VASCULARES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL	144
Fase inicial: comienzo de las alteraciones bioquímicas vasculares	145

Índice

Fase de inflamación vascular: propagación y autoalimentación de las alteraciones bioquímicas vasculares	148
Fase de afectación de capas celulares adyacentes	152
Estadío ulterior: consecuencias del daño vascular arterial	159
5.3. CONSIDERACIONES FINALES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	161
6. CONCLUSIÓN	141
7. BIBLIOGRAFÍA	167
8. ANEXOS	215

1. INTRODUCCIÓN





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.1. DEFINICION DE DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de los lípidos y las proteínas resultantes de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambos (Julio & Galleguillos, 2009).

La DM puede presentarse con las siguientes manifestaciones clínicas como, poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, pérdida progresiva de visión, hipertensión arterial, dolor isquémico o neuropático de las extremidades.

En sus formas más graves, cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetósico puede desarrollar y llevar a estupor, coma y, en ausencia de tratamiento eficaz, la muerte. A menudo los síntomas no son graves, o pueden estar ausentes, por consiguiente, una hiperglucemia suficiente como para causar cambios patológicos y funcionales puede estar presente durante un periodo prolongado antes de que se realice el diagnóstico.

Las personas con diabetes están en mayor riesgo de padecer enfermedades vasculares, cardiovasculares y cerebrovasculares. Los efectos a largo plazo de la DM son el desarrollo progresivo de las complicaciones, como retinopatía, nefropatía, neuropatía, riesgo de úlceras en los pies, amputación, articulaciones de Charcot, y disfunción sexual.

Algunos procesos patogénicos implicados en el desarrollo de la DM destruyen las células beta del páncreas con la consiguiente deficiencia de insulina, y otros que resultan en la resistencia a la acción de la insulina. Las anomalías del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas son deficientes debido a la acción de la insulina sobre los tejidos diana que resultan de la insensibilidad o la falta de insulina (Bosch, Alfonso, & Bermejo, 2002; World Health Organization, 1999).

1.2. CLASIFICACIÓN.

La clasificación de la DM, data del año 1979 por la National Diabetes Data Group (NDDG), que aprobó un documento, titulado “Classification and diagnosis of DM and other categories of glucose intolerance”, publicado en la revista de Diabetes y posteriormente adaptado y publicado por la OMS. En 1997, tras dos años de trabajo de una comisión formada por expertos de la OMS y la Asociación Americana de Diabetes (ADA), se dieron a conocer los diferentes tipos de DM que quedaron reducidos a 4 grupos (Albert Cuñat, 2001; Alberti & Zimmet, 1998; World Health Organization, 1999):

1. Diabetes tipo 1.
2. Diabetes tipo 2.
3. Diabetes gestacional.
4. Otros tipos específicos.
 - a. Defectos genéticos de las células Beta.
 - b. Defectos de acción de la insulina de etiología genética.
 - c. Enfermedades del páncreas exócrino.

- d. Endocrinopatías.
- e. Inducida por fármacos u otras sustancias químicas
- f. Infecciones.
- g. Formas infrecuentes de diabetes mediada por inmunidad.
- h. Otros síndromes genéticos a veces asociados a diabetes.

1.2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOINMUNE.

Este tipo de diabetes corresponde a la llamada antiguamente *Diabetes Insulino dependiente* o *Diabetes de comienzo juvenil*. Puede afectar a todas las edades, pero es más frecuente en niños, jóvenes y adultos jóvenes, y por lo general se diagnostica antes de los 30-40 años. Suele tener un comienzo brusco, con abundante sintomatología. En las personas con diabetes tipo 1 el páncreas es incapaz de producir suficiente insulina, debido a la destrucción autoinmune de las células β de los Islotes de Langerhans del páncreas regulado por células T, necesitando la administración de insulina para poder controlar los niveles de insulina en sangre.

1.2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2.

Es un mecanismo fisiológico y complejo, aquí el páncreas sí produce insulina pero, o bien, no produce suficiente, o no puede aprovechar la que produce y la glucosa no está bien distribuida en el organismo (resistencia a la insulina), esto quiere decir que el receptor de insulina de las células que se encargan de facilitar la entrada de la glucosa a la propia célula están dañados. Este tipo afecta al 90-95% de las personas, se observa en adultos y ancianos, aunque puede aparecer en niños y adolescentes, se relaciona con

la obesidad; anteriormente llamada *diabetes del adulto* o *diabetes relacionada con la obesidad*. Habitualmente se diagnóstica por encima de los 30-40 años de edad.

Frecuentemente la persona no nota los síntomas, por lo que se diagnostica después de algún tiempo de padecerla sin saberlo. Se caracteriza porque aunque el páncreas produce insulina (a veces en cantidades superiores a lo normal), el organismo no es capaz de utilizarla de modo eficaz. Para controlarla es necesario el uso de antidiabéticos orales, y pueden acabar precisando inyecciones de insulina.

Los criterios diagnósticos para la DM en la actualidad son:

Glucosa en ayuno < 100 mg/dL = glucosa de ayunas normal.

AGA 101 mg/dL y < 126 mg/dL = AGA = anomalías de glucosa de ayuno.

DM > 126 mg/dL = diagnóstico de DM.

1.3. FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR DIABETES

Los principales factores de riesgo para la diabetes son la edad (se incrementa con la edad), el sobrepeso o la obesidad, los antecedentes familiares, el sedentarismo, el pertenecer a un grupo étnico de alto riesgo y el haberle identificado prediabetes con anterioridad.

Otros factores de riesgo son la diabetes gestacional o haber dado a luz un bebé con un peso igual o superior 4 kg, la hipertensión arterial, la hipertrigliceridemia (> 2.82 mmol/L o 250 mg/dL) o tener niveles séricos bajos de colesterol de alta densidad (HDL

0.9 mmol/L o 35 mg/dL). El síndrome de ovarios poliquísticos y la historia de enfermedad vascular también son considerados factores de riesgo para la diabetes. En pacientes con síndrome metabólico el riesgo de desarrollar diabetes es, en promedio tres veces mayor (Gerstein et al., 2007).

El conocimiento de los principales factores de riesgo para estas enfermedades y las conductas preventivas en la población, son fundamentales para la prevención y el control de estas afecciones.

1.4. EPIDEMIOLOGÍA EN LA DIABETES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha pronosticado que en el año 2030 la diabetes afectará a 370 millones de personas, lo que supone un aumento de un 114% con respecto a las últimas cifras publicadas por esta entidad, correspondientes al año 2000. La prevalencia de la diabetes para todos los grupos de edad en todo el mundo se estimó en 4,4% en 2030. El cambio demográfico más importante en cuanto a la prevalencia de la diabetes en todo el mundo, se incrementa en personas > 65 años de edad (Wild, Roglic, Green, Sicree, & King, 2004).

Actualmente, la diabetes se distribuye por todo el mundo, aunque tiene mayor peso en los países desarrollados y en aquellos en vías de desarrollo, existiendo actualmente unos 177 millones de enfermos en todo el mundo, de los cuales más del 90% son pacientes con diabetes tipo 2 (DM2). La incidencia de la DM2 podría cifrarse en torno a 60-150 casos nuevos por 100.000 habitantes y año, mientras que en la diabetes tipo 1 (DM1) se acercaría a 10-12 casos por 100.000 habitantes. En los

próximos años las cifras obtenidas aumentarían, entre otros factores, por el envejecimiento de la población y el estilo de vida sedentario, y una de sus consecuencias, el aumento de la obesidad, especialmente entre los niños. En este sentido, los especialistas recomiendan la adopción de medidas higiénico-dietéticas con carácter preventivo para intentar limitar la prevalencia futura de la patología.

En España, la DM es una de las primeras causas de mortalidad. Canarias y Andalucía presentan la mayor mortalidad, con una tendencia descendente. Los diabéticos tienen una mayor mortalidad que los no diabéticos, sus complicaciones son las principales causas de la mayor mortalidad, sobre todo la enfermedad isquémica del corazón. Las estimaciones de prevalencia de DM2 en España varían entre el 4,8 y el 18,7%, las de DM1 entre el 0,08 y el 0,2%. En cuanto a incidencia anual, se estima entre 146 y 820 por 100.000 personas para la DM2 y entre 10 y 17 nuevos casos anuales por 100.000 personas para la DM1. Los costes económicos de la DM1 van de 1.262 a 3.311 €/persona/año. Los costes de la DM2 oscilan entre 381 y 2.560 €/paciente/año. Los estudios que estiman costes totales los sitúan entre 758 y 4.348 €/persona/año. Se ha demostrado que a menor nivel socioeconómico peor es el control de la enfermedad y mayor su frecuencia y los otros factores de riesgo de DM2 (Ruiz-Ramos, Escolar-Pujolar, Mayoral-Sánchez, Corral-San & Fernández-Fernández, 2006).

1.5. COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

Cuando se inicia la DM, si hay un control glucémico adecuado no suele cursar con complicaciones, pero sí, cuando el control es inadecuado, sobre todo en hiperglucemias que asocian cifras de HbA1c > 7% de forma crónica. También se

complica cuando se produce un déficit agudo de insulina o cuando hay un exceso de la misma en las que se denominan complicaciones agudas.

Las complicaciones crónicas, surgen en los dos tipos de diabetes, porque aparece una descompensación en los valores de glucemia, apareciendo las complicaciones microangiopáticas y macroangiopáticas.

Complicaciones de la DM	
Descompensaciones agudas	Hiperglucemia cetoacidótica Hiperglucemia hiperosmolar Hipoglucemia
Complicaciones microvasculares	Retinopatía Nefropatía Neuropatía
Complicaciones macrovasculares	Cardiopatía isquémica Accidente vasculocerebral Arteriopatía periférica

Las complicaciones vasculares de la DM1 y de la DM2 se centran en la enfermedad vascular, se clasifican en (Mahía Vilas M & Pérez Pérez L, 2000):

Microangiopatía, que es un proceso típico de diabetes, que afecta a pequeños vasos de la microcirculación que afecta a la retina, el glomérulo y a los nervios periféricos y que se conoce como, retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética.

Macroangiopatía, está ligada a un proceso de aterosclerosis y aterogénesis progresivo, afecta a los vasos de grueso y mediano calibre, fundamentalmente a las arterias coronarias, cerebrales, aorta, corazón y los miembros inferiores. Sus manifestaciones clínicas son: la cardiopatía coronaria isquémica, los accidentes vasculares cerebrales y la arteriosclerosis obliterante de las extremidades (Rask-Madsen & King, 2013).

La aterosclerosis es una enfermedad, se caracteriza por la presencia de depósitos de lípidos y elementos celulares en la capa íntima de las arterias grandes, medianas o pequeñas, produciendo con el tiempo la placa aterosclerótica que obstruye parcial y totalmente, la luz arterial. En el paciente diabético, la aterosclerosis se desarrolla más rápidamente y afecta a mayor número de vasos. Las lesiones aterosclerosas tienen más contenido lipídico y más complicaciones trombóticas, que las de los no diabéticos (Kannel, 1985; Laakso & Lehto, 1998).

1.6. MECANISMOS DE DAÑO DE HIPERGLUCEMIA. CAMBIOS EN VÍAS BIOQUÍMICAS.

En individuos sanos la glucosa se metaboliza en el citoplasma por la vía glucolítica y por la vía de las pentosas fosfato. El exceso de glucosa se metaboliza por

las vías alternativas, normalmente poco activas (Bonafonte S, Arévalo F, & García RA, n.d.).

La hiperglucemia crónica es el defecto subyacente sobre el que giran todas las alteraciones implicadas en el desarrollo de la diabetes (De La Cruz, González-Correa, Guerrero, & de la Cuesta, 2004; “The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent DM. The Diabetes Control and Complications Trial,” 1995, “The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent DM. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group,” 1993).

Las cifras altas de glucosa sanguínea provocan cambios importantes en el metabolismo celular, entre los que destacan, por su especial importancia, los siguientes (De La Cruz et al., 2004; Miranda et al., 2004, 2006):

Activación de la vía de los polioles.

Activación de la vía de la hexosamina.

Activación de la vía del diacilglicerol-proteincinasa C.

Formación de productos finales de la glicación de proteínas.

Estímulo del estrés oxidativo celular.

Estas alteraciones pueden explicar la mayor parte de las lesiones celulares, fundamentalmente las más precoces, que se centran en el endotelio, dando lugar a la denominada DE (De Vriese, Verbeuren, Van de Voorde, Lameire, & Vanhoutte, 2000).

Dichas alteraciones están relacionadas entre sí, influyendo cada una en todas las demás.

1.6.1. ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE LOS POLIOLES

En condiciones normales, la glucosa intracelular se metaboliza, por fosforilación y glucólisis. Cuando hay hiperglucemia, el exceso de glucosa intracelular se convierte en sorbitol y posteriormente en fructosa, lo que genera una alteración del potencial oxirreductor, induce a un estado hiperosmolar intracelular, genera una situación de estrés oxidativo (EO) y cambios celulares que conducen a la apoptosis celular. Las enzimas de estas reacciones son aldosa-reductasa y sorbitol-deshidrogenasa (King & Brownlee, 1996).

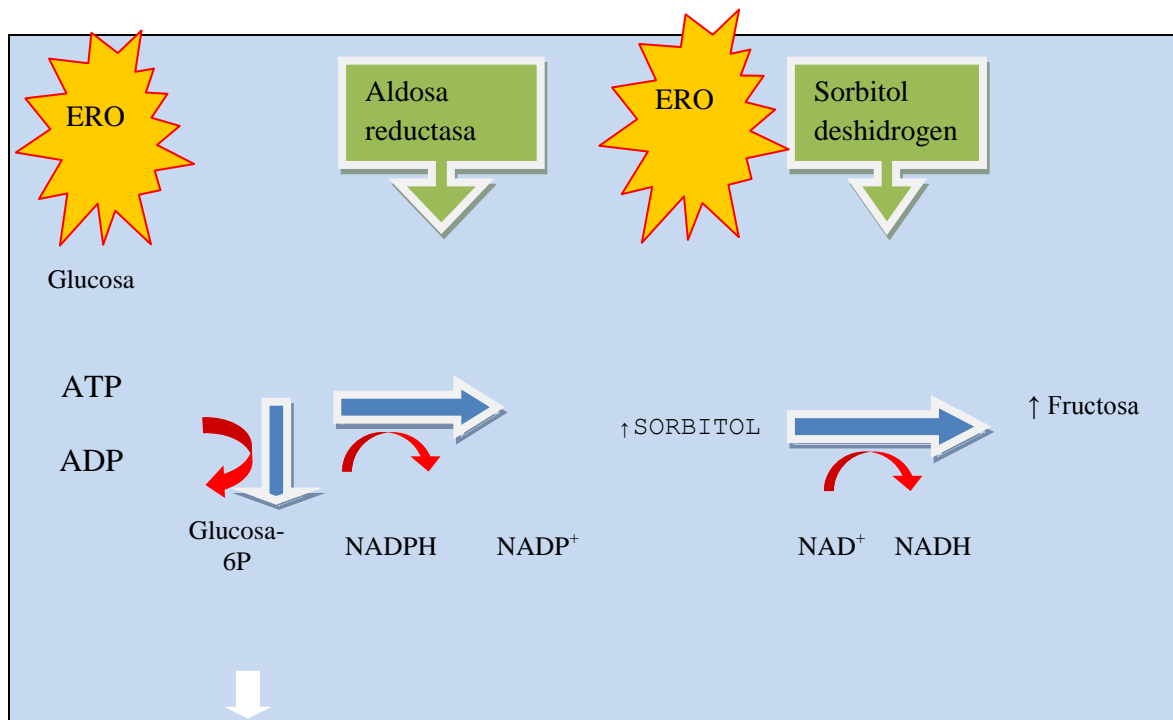


Figura 1.1: Vía de los polioles.

La aldosa-reductasa, cataliza la reacción de galactosa a galactitol además de la ya mencionada transformación de la glucosa en sorbitol. La aldosa-reductasa tiene más

afinidad por la galactosa que por la propia glucosa. El acúmulo de polioles es mayor en la galactosemia que en la diabetes, por dicho motivo y debido además a que la enzima sorbitol deshidrogenasa transforma lentamente el sorbitol a fructosa, pero no metaboliza el galactitol.

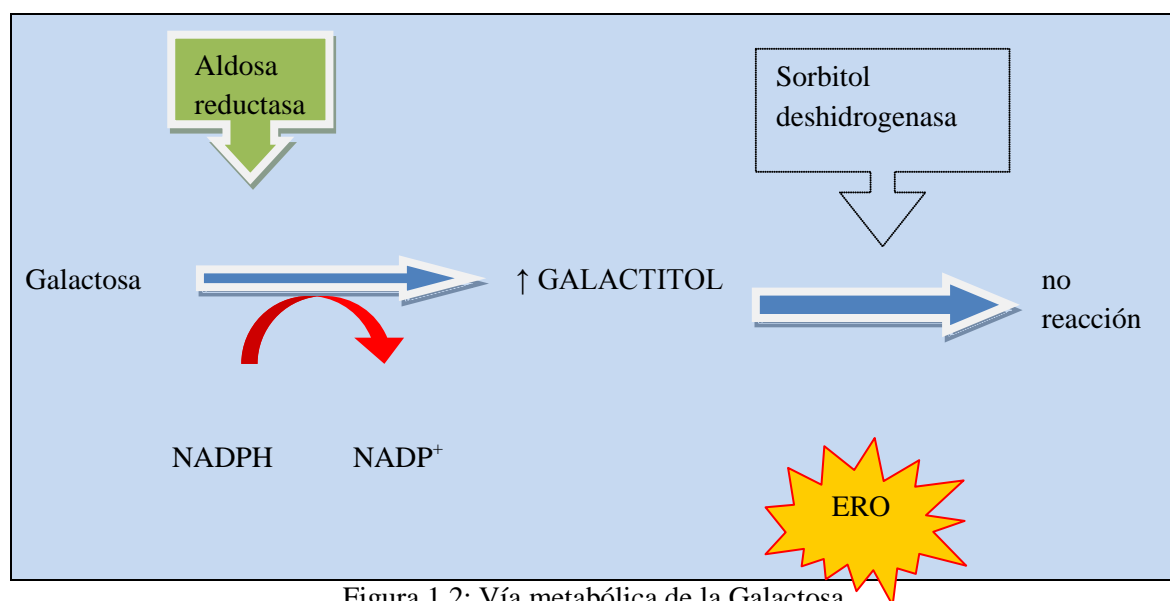


Figura 1.2: Vía metabólica de la Galactosa.

El incremento de la vía de los polioles se relaciona con otras alteraciones, tales como el incremento del EO celular, el incremento de la síntesis de prostaglandinas y la disminución en la producción de óxido nítrico (NO) (De La Cruz, González-Correa, Guerrero, & de la Cuesta, 2004).

Se ha relacionado que la oxidación del sorbitol por el NAD^+ aumenta el cociente NADH/NAD^+ inhibiendo la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (enzima que inicia la segunda fase de la glucólisis), aumentando la concentración de D-gliceraldehído 3-fosfato y por tanto la formación de metilglioxal, un precursor de los productos avanzados de la glicación y del diacilglicerol, potente estimulador de la proteincinasa C (PCK) (Williamson et al., 1993).

1.6.2. VÍA DE LA HEXOSAMINA

En la célula, la glucosa-6-fosfato se transforma en fructosa-6-fosfato, por la acción de la enzima fructosa-6-fosfato aminotransferasa, se transforma en glucosamina-6-fosfato, y ésta tras varios pasos, en Uridin-difosfato N-Acetil-glucosamina (UDP-NAc-glu), que sirve como donante de N-acetilglucosamina para la glucosilación proteica (Buse, 2006).

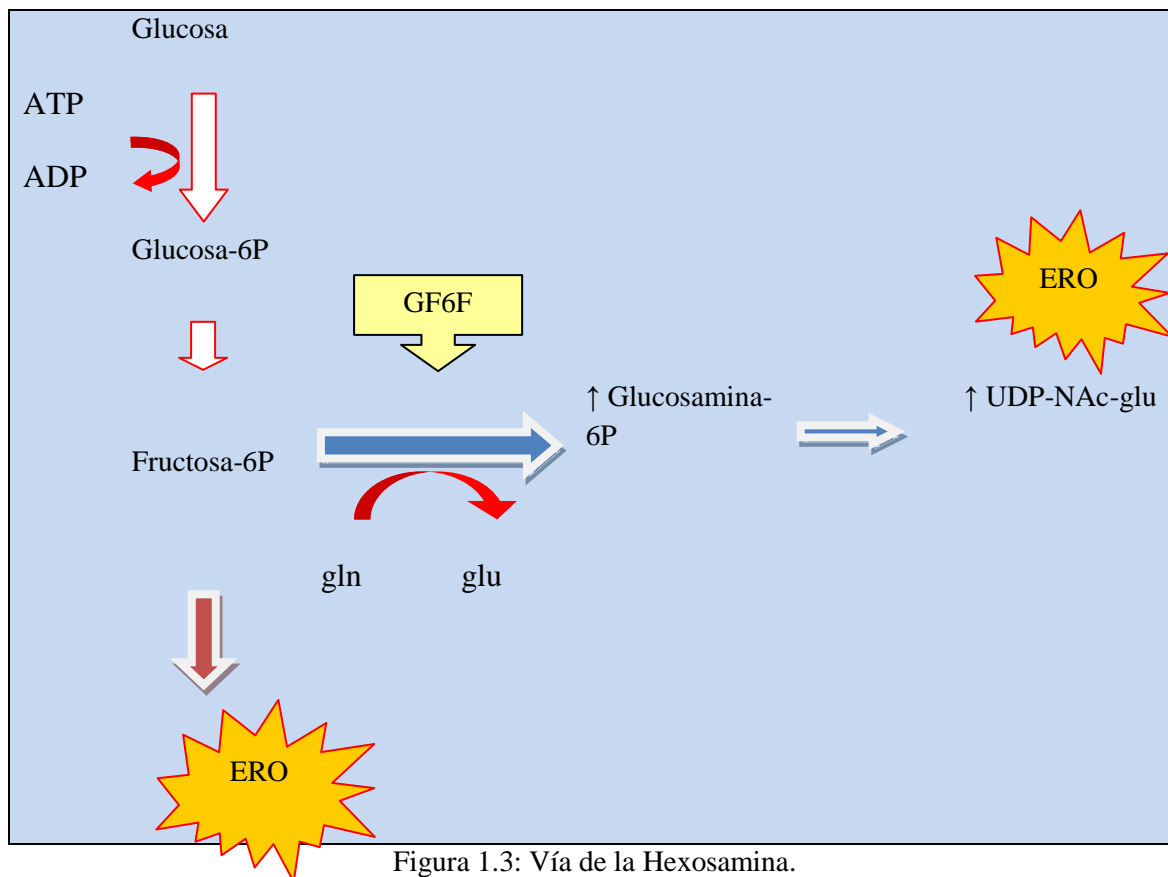


Figura 1.3: Vía de la Hexosamina.

En el primer paso se genera glutamato (glu) a partir de glutamina (gln), que puede ser neurotóxico. Al elevarse la actividad de esta vía se producen alteraciones funcionales proteicas, incluso con pequeños incrementos de hexosamina.

La hexosamina favorece el desarrollo de las complicaciones diabéticas e induce resistencia a la insulina, quizás por la inhibición de la fosforilación y activación del sustrato proteico del receptor de insulina tipo 1 o bien por alteraciones postraduccionales del receptor de insulina o del GLUT-4. La vía de la hexosamina induce también cambios en la transcripción de genes relacionados con la microangiopatía, como el TGF α y TGF β 1 (factores transformante de crecimiento) y el del PAI-1 (inhibidor de la activación del plasminógeno de tipo 1) (Kolm-Litty, Sauer, Nerlich, Lehmann, & Schleicher, 1998).

En el paciente diabético mal controlado, se puede activar en el propio vaso la vía hexosamina, tras una activación previa de PKC o por el EO. También se la relaciona con la actividad de la angiotensina II, implicada en el desarrollo de trastornos vasculares.

1.6.3. VÍA DEL DIACILGLICEROL-PROTEINCINASA C

Tras dos fosforilaciones sucesivas en la glucólisis, la cadena de seis carbonos se rompe en dos moléculas de tres carbonos: fosfato de dihidroxiacetona y D-gliceraldehído 3-fosfato, de los que solo éste último puede continuar en las siguientes etapas de la glucólisis. El fosfato de dihidroxiacetona puede convertirse, de modo rápido y reversible, en D-gliceraldehído 3-fosfato por medio de la enzima triosa fosfato isomerasa. Niveles altos de glucosa estimulan la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG), potente estimulador de la PKC (Aronson, 2008; Das Evcimen & King, 2007).

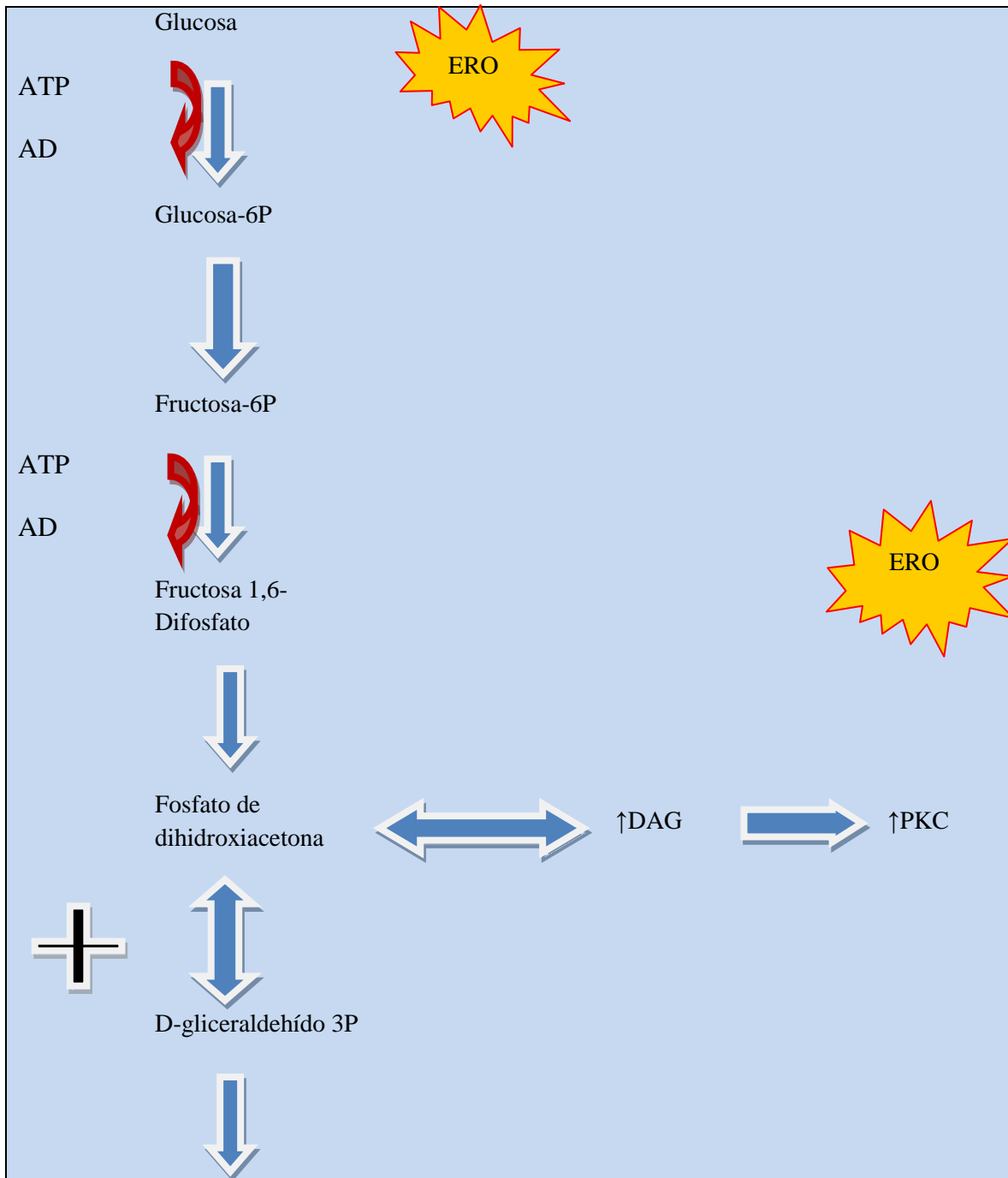


Figura 1.4: Vía de Diacilglicerol-Proteincinasa C.

El incremento en la síntesis de DAG y la prolongada activación de la PKC pueden favorecer la liberación de factores de crecimiento celular, como el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (FCEV) y citocinas (Bonafonte S, Arévalo F, & García RA, 2006; De La Cruz et al., 2004).

La familia de la PKC comprende 15 isoformas, 9 de las cuales son activadas por el DAG (segundo mensajero de los lípidos). La activación de la PKC afecta a nivel vascular, induce al engrosamiento de la membrana basal y oclusión vascular, aumenta el PAI-1, disminuye la acción fibrinolítica.

La isoforma PKC- α aumenta la permeabilidad capilar, estimula la angiogénesis y altera la contractibilidad vascular. Desempeña un papel trascendental como mediador del FCEV, favoreciendo el edema macular al alterar la permeabilidad vascular.

La isoforma de la PKC- β disminuye la producción de NO glomerular y en el musculo liso, a la vez que estimula la producción de ET-1 por lo que aumenta la vasoconstricción.

La actividad de la PKC- β aumenta con la isquemia y tras la exposición del endotelio vascular al EO (Giacco & Brownlee, 2010; Taher, Garcia, & Natarajan, 1993).

1.6.4. FORMACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA (PFG)

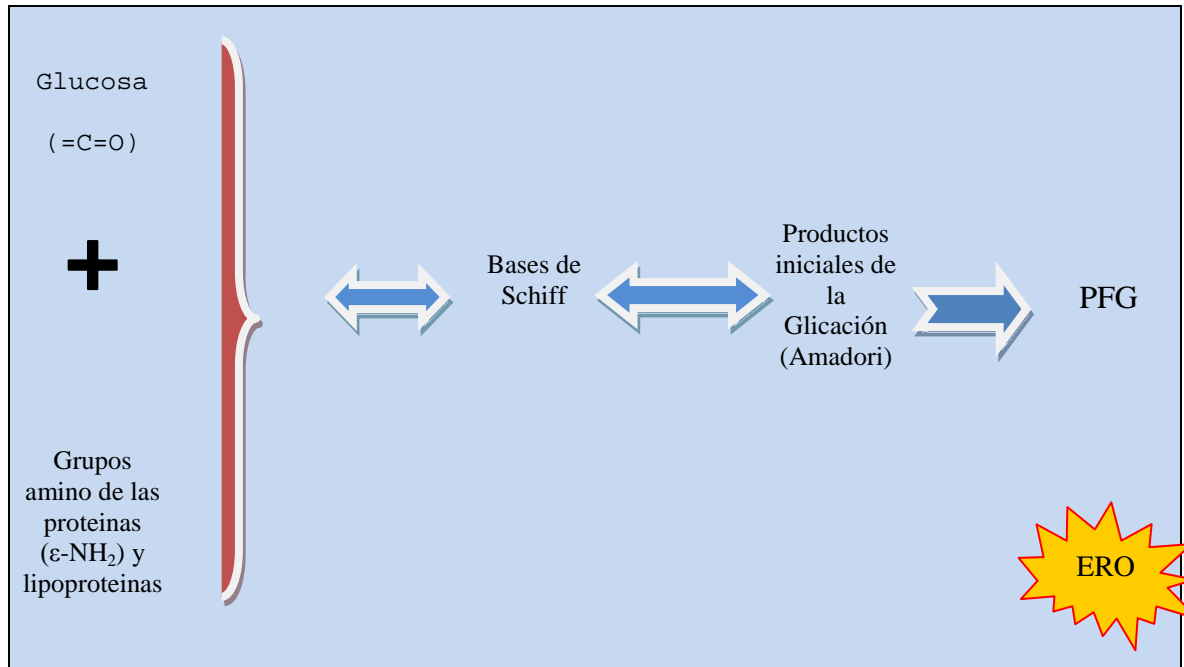


Figura 1.5: Formación de productos finales de Glicación.

El grupo carbonilo (=CO) de la glucosa puede unirse de forma no enzimática a grupos amino-ε (ε-NH₂) de los residuos de lisina de las proteínas y lipoproteínas, para formar bases de Schiff, que desaparecen o progresan a productos iniciales de la glicación (productos de Amadori). Uno de los productos Amadori más conocidos es la HbA1c resultado de la combinación de la glucosa con el aminoácido valina de la cadena.

Los productos Amadori se entrecruzan (cross-linking) unos con otros mediante complejas reacciones bioquímicas irreversibles hasta formar productos finales de la glicación (PFG), que se acumulan en la célula durante largo tiempo, y no se eliminan aunque se normalice la glucemia.

Los PFG son muy estables e irreversibles por lo que acumulan proteínas en la pared arterial, por lo que se alteran las estructuras celulares y se acelera el proceso de aterosclerosis (Aronson, 2008).

Los PFG interaccionan con receptores específicos (RAGE) localizados en los macrófagos, células del endotelio vascular y células musculares lisas, de esta forma estimulan la acción de las hormonas, citocinas y radicales libres (RL). Como consecuencia de estas transformaciones aumenta la permeabilidad vascular, hay mayor actividad procoagulante, expresión de moléculas de adhesión y entrada de monocitos a la íntima. Así pues los PFG son responsables de la aterosclerosis del diabético (Goldin, Beckman, Schmidt, & Creager, 2006).

1.6.5. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo (EO) es un estado de desequilibrio entre productos oxidantes y antioxidantes, se trata de un proceso caracterizado por dos mecanismos: la producción de RL de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), y la dificultad de su eliminación. Estas moléculas reactivas, los ERO y ENR, se producen en todas las células aerobias por distintas reacciones de oxi-reducción. Dentro de los ERO tenemos: hidroxilo (OH⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), anión superóxido (O²⁻), y del ERN; óxido nítrico (NO⁻) y peroxinitritos (ONOO⁻). Estas sustancias, en condiciones fisiológicas, participan en la respuesta inflamatoria defensiva frente a procesos infecciosos o inflamatorios, pero en circunstancias patológicas, puede aparecer una excesiva proliferación de ERO que puede conducir a la aparición de la aterosclerosis, el Alzheimer o la diabetes (Cruz Hernández, Licea Puig, Hernández García, Abraham Marcel, & Yanes Quesada, 2011; Sies, 2007).

Químicamente un radical libre se define como un átomo o molécula que en su orbital más externo presenta uno o más electrones no apareados, por lo que es altamente inestable y reactivo, por lo que tiende rápidamente a reaccionar con otro átomo o molécula a fin de aparear su electrón y conseguir la estabilidad. Si esto sucede, puede afectar la fisiología de las células al oxidar a los lípidos de la membrana, a los carbohidratos, a las proteínas, e incluso al ADN, lo cual sería uno de los mecanismos de daño (Rosado-Pérez & Mendoza-Núñez, n.d.).

Cualquier molécula puede convertirse en un RL, no obstante, cuánto más pequeña sea, más capacidad de formación de RL posee. En este sentido, es el oxígeno el que con mayor frecuencia e importancia biológica lo realiza.

En condiciones normales, las células mantienen un equilibrio entre los mecanismos oxidativos y sus defensas antioxidantes, estableciéndose el denominado *estatus oxidativo tisular*. Se define el EO tisular como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, superándose el límite máximo de formación mitocondrial de ERO. Esto puede ocurrir cuando se forman muchos RL, cuando disminuyen las defensas antioxidantes endógenas (fundamentalmente el glutatión) o, lo que ocurre con mayor frecuencia, ambas cosas a la vez (De La Cruz et al., 2004; Miranda et al., 2004, 2006).

Todas las vías anteriores producen especies reactivas del oxígeno (ERO), la más importante parece ser la hiperproducción del anión superóxido (O_2^-) por la cadena mitocondrial de transporte de electrones, que provocan lesiones oxidativas vasculares. Se

forman por autooxidación de la glucosa y por cualquiera de las vías bioquímicas mayores descritas antes, sobre todo la vía de los polioles (Wolff & Dean, 1987).

En la diabetes se ha observado a la vez una disminución de las defensas antioxidantes endógenas y un aumento de la producción de RL, causando un aumento de los marcadores del EO como son los marcadores de la peroxidación lipídica. Asimismo, las arterias de los animales diabéticos son más sensibles a los RL que la de los animales normales. Un exceso de producción de RL puede dañar a cualquier estructura celular, ya sean las membranas (peroxidación lipídica), proteínas (polimerización anómala) o el núcleo celular (daño en la estructura del ADN). Así mismo, estos RL pueden reaccionar con el NO y formar peroxinitritos, que son más lesivos aún que el propio anión hidroxilo. También se ha demostrado que el acúmulo de RL descrito en la diabetes, puede originar glicación no enzimática de las proteínas y acúmulo de sorbitol en las células endoteliales (De La Cruz et al., 2010).

Se ha comprobado que las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos son altamente sensibles a la acción de estos RL, al poseer el más bajo potencial secuestrador de ERO. Actualmente se cree que los RL desempeñan una función importante en la destrucción de las células β del páncreas en la DM1.

El EO ha sido relacionado con más de 100 enfermedades crónicas entre las que están la aterosclerosis, el cáncer, la artritis reumatoide y por supuesto la DM.

La generación de las ERO se encuentra aumentada tanto en la DM1 como en la DM2, y en modelos experimentales; por ello, el surgimiento de la diabetes, el desarrollo

de resistencia a la insulina y de las complicaciones tardías de la diabetes, están estrechamente asociados al EO. Las ERO contribuyen a la resistencia a la insulina, debido a que interfiere con las vías de señalización inducida por esta hormona y evitan la traslocación del transportador de glucosa GLUT 4 a la membrana plasmática. El mecanismo por el que contribuyen a las complicaciones de la diabetes es parcialmente conocido y se piensa que actúan por la modificación oxidativa de macromoléculas y por la activación del factor de transcripción NFκB, lo que conduce a la expresión alterada de genes. En concordancia con esta hipótesis, se ha encontrado que en pacientes diabéticos el empleo de antioxidantes como el ácido lipoico reduce la activación del NFκB (Díaz-Flores et al., 2004).

Así pues, la hiperglucemia, a través de diversos mecanismos, puede inducir una producción incrementada de EO, debido a un aumento de RL y disminución de los sistemas de defensa de antioxidantes, responsables de la degradación del estrés oxidativo (NO), dando lugar a la disfunción endotelial (DE), crecimiento del número de células, inflamación producida por la activación del factor nuclear kappa beta (NF-κβ), la proteína quimiotáctica monocitaria 1 (MCP-1), la molécula de adhesión celular vascular y la liberación de citocinas como la interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). La acción de las moléculas de adhesión y las citocinas aumentan la adhesión del endotelio y fijación de las células inflamatorias a la superficie endotelial, causando inflamación y trombosis vascular (Gerich, 2003; Hsueh, Jackson, & Law, 2001).

Hiperglucemia y daño vascular

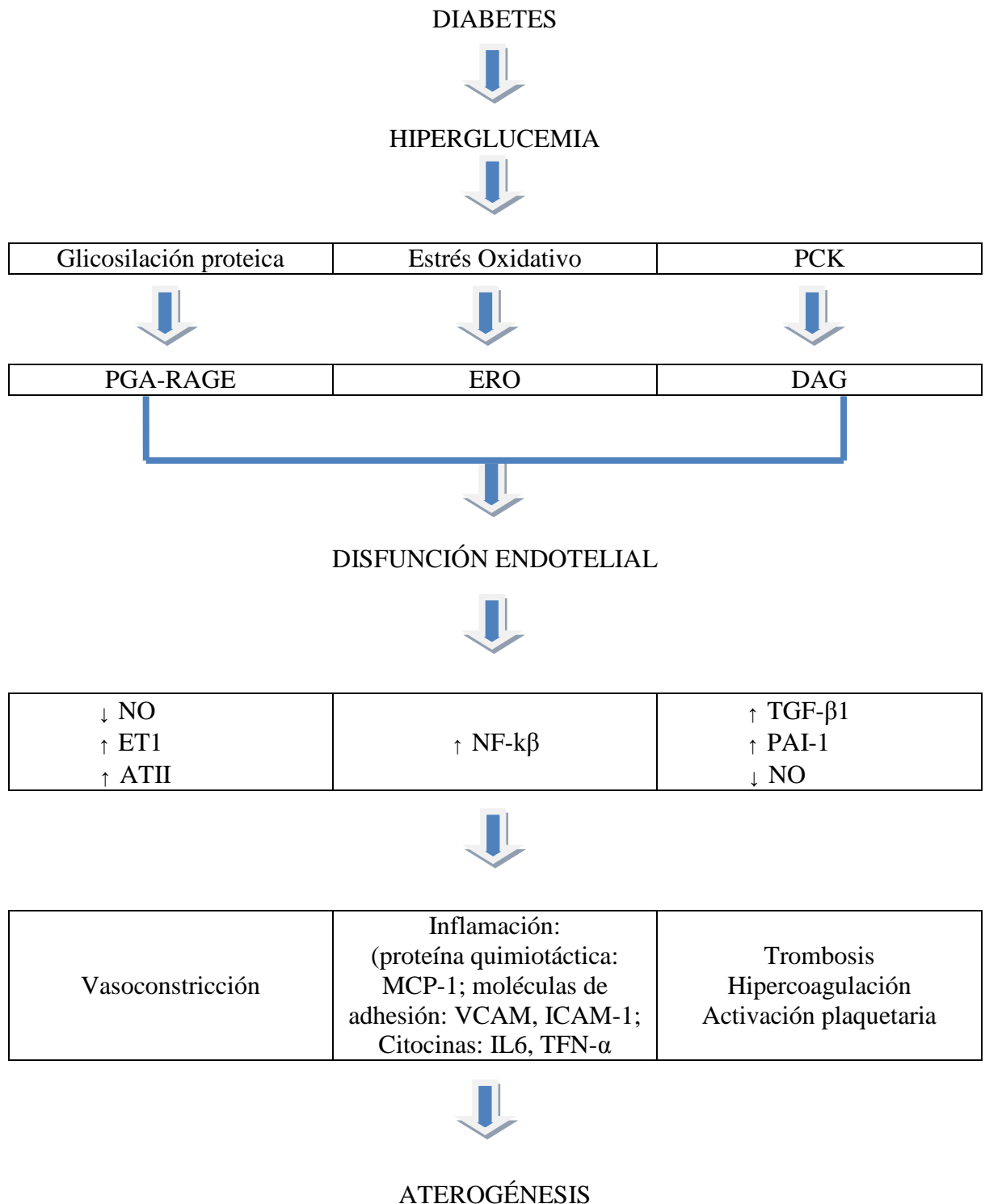


Figura 1.6: Hiperglucemia y daño vascular

1.7. ENDOTELIO VASCULAR

El endotelio forma una monocapa celular que cubre la superficie interior de los vasos sanguíneos. Cada célula endotelial es nucleada y tiene una superficie hacia el espacio subendotelial con diferentes proteínas de membrana. Entre las células endoteliales se constituyen puentes de hidrógeno que regulan la permeabilidad entre la sangre y los tejidos. Su estructura y función depende del territorio vascular que se considere (Badimón & Martínez-González, 2006; Dalli, 2005).

Las células del endotelio ejercen funciones vasodilatadoras y vasoconstrictoras, mitógenas y antimitógenas, procoagulantes y anticoagulantes, inflamatorias y antiinflamatorias, fibrinolíticas y antifibrinolíticas, oxidantes y antioxidantes, proliferativas y antiproliferativas, angiogénicas y antiangiogénicas, inmunes y autoinmunes, y autocrinas, paracrinas y endocrinas. De su equilibrio depende la homeostasis y la salud vascular. El endotelio sano presta su superficie para elementos claves del metabolismo (lipoproteína lipasa) y del sistema antitrombótico (heparinoides de superficie, proteínas anticoagulantes) pero además produce y libera una serie de sustancias como el NO, ET, prostaciclina (PGI₂), y factor von Willebrand (FvW), entre otras. Cuando el endotelio reduce su capacidad de mantener equilibrio, producidos por factores de riesgo (colesterol, hipertensión, tabaquismo, homocisteína, procesos inmuno-inflamatorios y diabetes), se crean condiciones en las que penetran lípidos, leucocitos, monocitos y linfocitos T, se inician mecanismos inflamatorios e instalación de células espumosas (foam cells), matriz de estria grasa, constituyendo el primer paso de la formación de la placa aterosclerosa. (Cruz Hernández, Licea Puig, Hernández García, Yanes Quesada, & Salvato Dueñas, 2012; Esper et al., 2006; Melagarejo, 2005).

Esto, se traduce en una cascada de daño funcional y estructural, que conlleva a la muerte. Esta cascada se resume en: reducción en la producción de óxido nítrico, pérdida del control del tono vascular, aumento de adherencia leucocito-monocito, reducción en la producción de otros inhibidores de crecimiento, aumento en el depósito de lípidos, alteración de la relación tPA y PAI- 1 convirtiendo al endotelio en una estructura protrombótica y antifibrinolítica e hiperproducción de radicales (Melagarejo, 2005).

1.8. SUSTANCIAS VASODILATADORAS DEL ENDOTELIO

1.8.1. ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un gas inorgánico, presente en casi todas las células del organismo, que en condiciones normales actúa como mediador fisiológico de la vasodilatación. Su síntesis se realiza a partir de L-arginina y tiene como producto final de la reacción la L-citrulina (Moncada & Higgs, 1995). Para que tenga lugar dicha reacción se requiere la participación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), calmodulina (CaM) y una serie de cofactores, entre ellos la tetrahydrobiopterina (BH₄). En ausencia de CaM se genera anión superóxido (O₂⁻) que puede unirse al NO dando lugar a peroxinitritos (ONOO⁻). La falta de tetrahydrobiopterina (TBH) genera además de O₂⁻, H₂O₂ (Domenico, 2004).

Se han identificado diferentes isoformas de NO sintasa, han sido clasificadas de la siguiente manera:

Óxido nítrico sintasa	Ubicación	Función
Tipo I: NOS neuronal (NOSn)	Neuronas Neuroglia Médula espinal Sistema nervioso periférico leucocitos	Comunicación celular
Tipo II: NOS inducible (iNOS)	Células musculares lisas Macrófagos Neutrófilos Hepatocitos Endotelio	Defensa inmune contra patógenos
Tipo III: NOS endotelial (NOSe)	endotelio leucocitos plaquetas	Vasodilatación Defensa inmune contra patógenos

Figura 1.7: Clasificación del Óxido nítrico sintasa.

Las isoformas tipo I, presentes en el cerebro, y la tipo III, aislada en las células endoteliales vasculares, son reguladas por Ca^{2+} -calmodulina y utilizan NADPH, flavina adenina dinucleótido/mononucleótido (FAD/FAM) y tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactores.

El NOS tipo III endotelial, produce NO que se difunde desde el endotelio al musculo liso vascular, a través de enzima guanilatociclasa (GC) provoca la degradación del trifosfato cíclico de guanosina (GTPc), liberando monofosfato cíclico de guanosina

(GMPc), molécula que reduce la concentración de Ca^{2+} citosólico, responsable de la vasodilatación a nivel de las células musculares lisas. A nivel de la plaqueta, la elevación del GMPc es responsable de la antiagregación (Rooke, 2008) .

El GMPc es sintetizado por enzimas de la membrana plasmática llamadas guanililciclasas o guanilato ciclasas (GC). Su forma soluble (GCs) es considerada el receptor del NO que comparte con la nitroglicerina y sorprendentemente con el monóxido de carbono (CO). Las GC no solubles o de membrana son activadas por péptidos. La primera de las GC que fue aislada presenta receptores para la familia de los péptidos natriuréticos (PNs): GC-A para el PNA y el GC-B (para el PN tipo C). El NO además de actuar sobre la GCs también actúa sobre otras enzimas, activándolas o inhibiéndolas. A las primeras pertenece la COX, y a las segundas la ribonucleótido reductasa, el citocromo P450 y la oxidasa de NADPH. A nivel plaquetario, además de producir una elevación del GMPc, disminuye la P-selectina en el endotelio, que interviene en el frenado de la plaqueta, e inhibe la glicoproteína IIb/IIIa. Ésta representa el principal receptor en la membrana plaquetaria y es un miembro de la familia de las integrinas. Participa en la agregación plaquetaria por unión a las proteínas adhesivas como el factor von Willebrand (FvW) y el fibrinógeno. El NO además de antiagregante y vasodilatador, es scavenger o capturador de RL, antiproliferativo (inhibe la proliferación de las células musculares lisas) y antiapoptótico. Junto a ello disminuye la expresión de moléculas de adhesión como VCAM (moléculas de adhesión de células vasculares) y quemoquinas como MCP-1 (J. Ruiz, 2009).

1.8.2. PROSTACICLINA

Es el mayor miembro de la familia de las prostaglandinas producida por el endotelio. Se trata de una sustancia vasodilatadora, no tan potente como el NO, pero que también inhibe la agregación plaquetaria mediante la activación de la adenilciclasa; además, es rápidamente degradada en el plasma (Mitchell et al., 2014; Moncada, Gryglewski, Bunting, & Vane, 1976).

Existen evidencias que sugieren que el NO puede aumentar o inhibir la actividad y expresión de la COX (Villar, Francis, Webb, Hobbs, & Ahluwalia, 2006). Además, la prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria y la liberación de factores de crecimiento implicados en el engrosamiento de la pared vascular (Zou, 2007). La enzima COX tiene dos isoformas, COX-1 (ciclooxigenasa-1) y COX-2. La COX-1 se expresa de forma constitutiva por la mayoría de los tejidos y participa en la síntesis de las prostaglandinas que controlan procesos fisiológicos. Por el contrario, la isoforma COX-2 es inducible y se expresa en respuesta a diferentes estímulos proinflamatorios o factores mitogénicos en distintos tipos celulares (células endoteliales, células de músculo liso vascular, macrófagos, etc.). Además, se ha descrito que la COX-2 contribuye a la proliferación de la célula muscular lisa inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF α) y por la angiotensina II (Kang, Van Der Zyppe, Iannazzo, & Majewski, 2006).

Existen estímulos mecánicos y químicos a nivel de la membrana que ocasionan la liberación de prostaglandinas, incluyendo prostaciclina, las cuales no son almacenadas. De esta manera, en el endotelio, el flujo pulsátil además de algunos mediadores endógenos (bradiquinina, trombina, serotonina, factor de crecimiento derivado de la

plaqueta, interleucina-1) y la hipoxia, estimulan la producción de prostaciclina. Esta producción se inicia con la activación de la fosfolipasa A₂, la cual libera ácido AA a partir de los fosfolípidos de membrana. Posteriormente la COX lo convierte en endoperóxidos de prostaglandina (prostaciclina H₂) y finalmente la prostaciclina sintetasa, la convierte a prostaciclina, que se une a su receptor de membrana, activando la adenil-ciclasa y aumentando subsecuentemente los niveles de AMPc. Las plaquetas son muy sensibles al aumento del AMPc, el cual inhibe la activación pero no la adhesión plaquetaria. Esto se traduce en que la PGI₂ tiene como mayor papel biológico, la prevención de la activación de las plaquetas y la formación de trombos. La síntesis de PGI₂ puede ser estimulada por ATP, catecolaminas, kininas, calcioantagonistas, inhibidores de la enzima convertidora y nitrovasodilatadores. Al mismo tiempo que se produce prostaciclina, se produce tromboxano A₂ (TxA₂), el cual tiene propiedades pro-agregantes y de vasoconstricción. En caso de DE, predomina la acción del TxA₂ (Dimitropoulou, Chatterjee, McCloud, Yetik-Anacak, & Catravas, 2006).

1.9. SUSTANCIAS VASOCONSTRICTORAS DEL ENDOTELIO

1.9.1. ENDOTELINAS

La endotelina-1 (ET-1) es un péptido vasoconstrictor con propiedades pro-mitogénica y pro-inflamatorias y por tanto es de interés en el desarrollo de la DE. ET-1 actúa como un antagonista fisiológico del NO y es producida en macrófagos, células de músculo liso y, principalmente, en la célula endotelial a partir de la proendotelina, sobre la que actúa la enzima convertidora de endotelina (ECE) (Lemkens et al., 2012).

Para contrarrestar la acción vasodilatadora, el endotelio sano produce endotelina (ET), descubierta en 1988 por Yanagisawa. La ET, junto a sustancias como el TxA₂, las ERO y la propia angiotensina II, son los «Factores constrictores del endotelio» y participan de una forma destacada en el «endotelio enfermo». De todas ellas, es la ET, producida en pequeñas cantidades en situación basal, la que juega un papel primordial en el endotelio sano para que el NO no se extralimite en sus funciones. A excepción del TxA₂, de origen plaquetario, todos son de producción endotelial (Barton & Yanagisawa, 2008; Yanagisawa et al., 1988)

La ET-1 y de la producción en las células endoteliales se incrementa en la estimulación de angiotensina II (Brewer et al., 2013), en seres humanos de mediana edad y adultos mayores sedentarios sanos, la LDL oxidada (Donato et al., 2009) y la DM (Widyantoro et al., 2010).

1.9.2. ANGIOTENSINA II

El sistema renina-angiotensina influye en las alteraciones bioquímicas, estructurales y funcionales asociadas con la hipertensión arterial (HTA) (Vanhoutte, Feletou, & Taddei, 2005).

La angiotensina es un potente vasoconstrictor, que aumenta con la tensión arterial y actúa tanto al comienzo y progresión como en las consecuencias de la arterioesclerosis, además de participar en la regulación de Na⁺, K⁺ y el equilibrio hidrolítico, el tono de vasos sanguíneos y el sistema nervioso simpático.

La angiotensina II es producida por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que convierte la angiotensina I en la angiotensina II.

Este péptido desempeña un papel importante en la fisiología vascular normal a través del receptor de la Angiotensina II tipo 1 y parcialmente a través del receptor tipo 2. La angiotensina II, después de la activación de sus receptores, estimula también la producción de ET-1 y de otros mediadores, tales como el activador de plasminógeno (Andresen, Romero, & Jackson, 2004).

La angiotensina II en la pared arterial produce un incremento en las moléculas de adhesión, que pueden actuar junto con moléculas quimiotácticas para inducir adherencia, invasión y proliferación de monocitos y linfocitos T. Además, la angiotensina II induce la expresión de citocinas proinflamatorias, como la IL-6, que participan en la proliferación y la migración de las células musculares lisas y en la desestabilización de la placa fibrosa. Así que, puede ser considerada como un agente proaterogénico, porque es capaz de estimular la mayoría de los procesos involucrados en el desarrollo de arteriosclerosis (Padilla, Sanz, Ganado, & Tejerina, 2002; E. Ruiz et al., 2007).

1.9.3. TROMBOXANO A₂

Los tromboxanos son el resultado, principalmente, de la acción de la enzima COX sobre el AA, que origina compuestos con efecto autocrino y paracrino. El TxA₂ es un metabolito del AA generado por la acción de la COX y, en un paso posterior, por la tromboxano sintasa. Es vasoconstrictor y actúa como un potente agregante plaquetario.

Las plaquetas son ricas en la enzima tromboxano sintetasa y producen una cantidad elevada de TxA_2 . Su principal función es participar en la hemostasia, en los procesos de coagulación y agregación plaquetaria (Nakahata, 2008).

El TxA_2 ejerce su efecto específico activando el receptor del tromboxano en el tejido muscular vascular y en plaquetas, contrarrestando la acción del NO y PGI_2 en ambos tipos celulares (Dogné et al., 2006). Debido a su función en la agregación plaquetaria, es importante en el cierre de las heridas y hemorragias.

1.10. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio vascular es, gracias a sus propiedades, un órgano multifuncional, determinante para el buen funcionamiento cardiovascular, regulador de flujo sanguíneo y de la homeostasis humoral-tisular. Se opone a la formación de trombosis y desarrollo de la aterogénesis y regula el flujo sanguíneo mediante la producción de NO, principal mediador de la reactividad vascular. Cuando su fisiología se altera por daño estructural o funcional, se inicia un largo proceso que puede desembocar en patologías cardiovasculares tan graves como el infarto de miocardio, el ictus y la patología vascular periférica. De hecho, actualmente, las enfermedades cardiovasculares se consideran la principal causa de muerte en las sociedades occidentales avanzadas (Pérez, 2005).

Hay endotelio en todo el lecho vascular, cuando disfunciona, es el responsable de la patología arterial. Existen muchas teorías pero ninguna como la de Wick. Según su hipótesis, las células endoteliales arteriales están sometidas de por vida a la agresión permanente de la presión arterial, incluso en rango normal, y por ello la hace más

vulnerable a los factores estresantes hemodinámicos (HTA), metabólicos (dislipemia, hiperglucemia) o tóxicos (tabaco) (Wick, Knoflach, & Xu, 2004).

En el ámbito vascular, la diabetes establece una secuencia de fenómenos bioquímicos que se traducen a la alteración del endotelio como órgano, lo cual causa una DE que es responsable de muchas de las manifestaciones clínicas en esta patología. La DE es tanto un precursor como una consecuencia de la aterosclerosis. En la diabetes, la DE, se produce a través de varios mecanismos, entre los que destacan: hiperglucemia crónica, oxidación de LDL, hiperinsulinemia y EO (Chakrabarti, Cukiernik, Hileeto, Evans, & Chen, 2000; Julio & Galleguillos, 2009).

Algunos estudios sugieren que los niveles altos de glucosa interfieren con NO y la producción de iNOS, expresión de la proteína en las células musculares lisas vasculares IL-1 β estimulada en ratas. En ratas Wistar Kyoto normotensas y espontáneamente hipertensas (Pacheco et al., 2006). Este estudio sugiere que la función del endotelio puede estar alterada en los pacientes con DM. La hiperglucemia atenúa la relajación dependiente del endotelio en arterias de conejo normales en las arteriolas *in vitro* y de rata *in vivo* (Williams et al., 1998). Otros estudios indican que un aumento transitorio de las concentraciones sanguíneas de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos, y la insulina son capaces de deprimir la vasodilatación dependiente del endotelio en sujetos sanos y que la hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia son generadores de especies reactivas del oxígeno que originan una cascada de acontecimientos fisiopatológicos resultantes en la activación del NF- κ B. Estos mecanismos están implicados en el desarrollo de la disfunción del endotelio y el EO (Nitenberg, Cosson, & Pham, 2006).

Las implicaciones clínicas de la DE en la diabetes no se limitan al desarrollo de la aterosclerosis. Las células endoteliales intervienen en la formación de la circulación colateral, que se encuentra limitada en los diabéticos. La activación de endotelio incrementa la expresión de quimiocinas con actividad proinflamatoria (MCP-1, IL-8) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) responsables del reclutamiento de monocitos y linfocitos y su infiltración al subendotelio. Allí, los monocitos se transforman en macrófagos y expresan receptores tipo scavenger receptor A y CD36 que junto a las lipoproteínas modificadas, van cargando de ésteres de colesterol a la célula, transformándose en célula espumosa, base celular de la placa de ateroma.

Las partículas LDL (lipoproteína de baja densidad), atrapadas en la red de proteoglucanos se oxidan y se comportan como un agente inflamatorio, pudiendo inducir una respuesta inmune. El depósito subendotelial en la red de proteoglucanos de lipoproteínas modificadas y oxidadas, es responsable de los estímulos que facilitan el paso de células mononucleares a la íntima, su transformación a macrófagos y luego a células espumosas al fagocitar las LDLox. Estas células secretan citocinas, que activan las células endoteliales y musculares lisas, prolongando así, el proceso inflamatorio. En el mismo sentido, los macrófagos y subtipos de linfocitos T, estimulan la migración y proliferación de células musculares lisas, ampliando el área de la placa de ateroma y contribuyendo al fenómeno de la remodelación vascular, tratando de conservar la luz arterial.

Las citocinas activan diversas vías de señalización celular, como el factor de transcripción nuclear NF- κ B, que regula genes codificadores de citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento, enzimas inducibles (COX-2) y la iNOS. En

modelos de diabetes experimental, se ha comprobado la aparición y crecimiento de la placa de ateroma.

La hiperglucemia, contribuye a la inflamación al inducir la formación de PFG y EO, también amplifica y facilita la aterosclerosis e induce la debilidad de la placa de ateroma. Existen pruebas para considerar a la aterosclerosis o macroangiopatía diabética como una enfermedad inflamatoria crónica (Aronson, 2008).

1.11. DAÑOS BIOQUÍMICOS: ESTÍMULO DE LA INFLAMACIÓN

Cuando se lesiona un tejido, ya sea por la acción de bacterias, traumatismos, sustancias químicas, calor u otros fenómenos, el tejido lesionado libera múltiples sustancias que le provocan cambios secundarios. Todo el complejo de cambios tisulares se denomina inflamación y junto a la respuesta inmunitaria se activan como mecanismo de defensa (Hall, 2011).

La inflamación se caracteriza por:

- 1) La vasodilatación de los vasos sanguíneos locales, con el consiguiente exceso de flujo sanguíneo local.
- 2) El aumento de la permeabilidad de los capilares, lo que permite la fuga de grandes cantidades de líquido hacia los espacios intersticiales.
- 3) A menudo la coagulación del líquido de los espacios intersticiales por cantidades excesivas de fibrinógeno y otras proteínas que salen de los capilares.
- 4) La migración de un gran número de granulocitos y monocitos a los tejidos colindantes.

5) La tumefacción de las células tisulares.

Algunos de los muchos productos tisulares que provocan estas reacciones son la histamina, la bradicinina, la serotonina, las prostaglandinas, varios productos de reacción diferentes del sistema del complemento, los productos de reacción del sistema de coagulación de la sangre y múltiples sustancias llamadas linfocinas. Varias de estas sustancias activan el sistema macrofágico y en pocas horas los macrófagos comienzan a devorar los tejidos destruidos, en ocasiones también lesionan las células tisulares aún vivas.

La inflamación desempeña un papel central en la fisiopatología de la aterosclerosis, a partir de la iniciación, progresión y a través de las complicaciones trombóticas de la aterosclerosis. Las LDLox y otros restos biológicamente activos se localizan en el núcleo lipídico de la placa de ateroma y estos lípidos modificados, inducen la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas, citocinas pro-inflamatorias en los macrófagos y endotelio (Maiti & Agrawal, 2007).

La activación inflamatoria de las células endoteliales causa un aumento de la expresión de selectina (P y E), VCAM-1 e ICAM-1. Diferentes citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α), proteína de fase aguda, LDLox, CD40 / CD40 ligando también inducen la expresión de moléculas de adhesión. Aunque el endotelio arterial normal resiste el contacto prolongado con leucocitos, incluyendo los monocitos de la sangre, con el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, existe un mayor reclutamiento de monocitos y su adhesión al endotelio. Una vez que los monocitos entran en la íntima adquieren características de macrófagos. En el ateroma, los

macrófagos presentan en su superficie receptores llamados “scavenger o basureros”, que reconocen y captan lipoproteínas modificadas y otras partículas. La captación de lípidos por los macrófagos hace que se acumulen en el interior de la célula transformándose en células espumosas. Estas células espumosas secretan citoquinas pro-inflamatorias que amplifican la respuesta inflamatoria, continuando el círculo vicioso (Szman et al., 2003). Los linfocitos T también entran en la íntima después de la unión a VCAM-1 y en respuesta a sustancias quimioatrayentes, que incluyen γ -interferón-inducible y quimiocinas. Una vez se convierten en residentes en la íntima arterial, las células T interactúan con LDLox y proteínas de choque térmico y se activan para producir citoquinas que influyen en el comportamiento de otras células presentes en el ateroma. En general, las células TH1 predominan en el ateroma, y secretan citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF y IFN- γ (Libby, 2002).

Los leucocitos se filtran dentro de las placas de ateroma, también se encuentra una importante población de mastocitos. En la íntima, los mastocitos se someten a la degranulación y liberación de TNF- α y proteasas (triptasa y quinasa). La quinasa tiene un papel muy importante en la conversión de angiotensina I en angiotensina II, importante en la DE. Las plaquetas también tienen un papel importante en la inflamación, contribuyen a la modificación oxidativa de las LDL, a la proliferación del músculo liso, a la reacción inflamatoria mediante la expresión y a la liberación de CD40 ligando, que resulta en la activación de la matriz metaloproteasa y la actividad procoagulante (D Tousoulis, Davies, Stefanadis, Toutouzias, & Ambrose, 2003).

La formación de la estría grasa, se inicia con la migración de las células del músculo liso desde la capa media hacia la matriz subendotelial, allí las células proliferan

y captan las lipoproteínas modificadas contribuyendo así junto con las células espumosas al engrosamiento del núcleo lipídico. Con la expansión de la lesión, comienza a aparecer el estrechamiento de la luz, lo que dificulta el flujo de sangre. La liberación continuada de citoquinas como MCP-1 por las células endoteliales activadas es responsable del crecimiento de la lesión, ya que influye en la actividad del músculo liso, además de perpetuar la inflamación y la acumulación de lípidos (Szmitko et al., 2003).

Tanto en modelos animales diabéticos como en pacientes con DM1 y DM2, se han encontrado aumentadas las concentraciones circulantes de factores inflamatorios como la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 β y el TNF- α (Marques-Vidal et al., 2013; Wang et al., 2013). La IL-1 β y el TNF- α son citoquinas pro-inflamatorias producidas por múltiples estirpes celulares en respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Son mediadores que actúan en la superficie de las células vasculares sobre receptores específicos de membrana, los cuales, una vez activados, desencadenan una señalización intracelular que genera ERO y activa diferentes vías sensibles a ellas, como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las MAPK promueven la síntesis proteica y activan distintos factores de transcripción, incluyendo el NF- κ B que, a su vez, facilita la expresión de genes sensibles al estado de óxidoreducción intracelular que codifican citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y enzimas proinflamatorias, como la COX-2 y la iNOS (Kracht & Saklatvala, 2002).

1.12. COAGULABILIDAD

En estos momentos, se sabe que la lesión no solo afecta al endotelio, o a la media de la arteria, hay una ruptura de la elástica interna e inflamación que afecta a la adventicia, participando los vaso-vasorum. Esta agresión favorece la neovascularización de las placas y de la capa media y puede ser clave de los fenómenos trombóticos.

El endotelio también contribuye a la activación plaquetaria mediante la liberación de FvW, que promueve la agregación de las plaquetas por la unión de los complejos de plaquetas GPIb-IX y IIb-IIIa. En los pacientes diabéticos se elevan: FvW, fibrinógeno, factorVII, factor VIII, factorXI, factorXII, caliceína, el fragmento de protrombina activación 1 y 2 y complejos trombina-antitrombina están también elevada en la DM. Por el contrario, el nivel de proteína C anticoagulante disminuye (Carr, 2001).

Se considera, la trombosis como la principal causa de estenosis coronaria y muerte súbita y como una de las principales complicaciones de la evolución de la placa de ateroma. En la diabetes intervienen una serie de circunstancias que influyen en la aterotrombosis y las complicaciones cardiovasculares. De hecho, se piensa en la diabetes como un estado procoagulante. En los diabéticos, en la placa de ateroma, se localiza una elevada expresión del factor tisular, principal activador de la vía extrínseca de la coagulación, que facilita la actividad procoagulante. La ruptura de la placa permite que el factor tisular entre en contacto con el Factor VII circulante en la sangre, induciendo en la generación de VIIa activo y la formación de complejos factor tisular-VIIa, incidiendo en la cascada de coagulación.

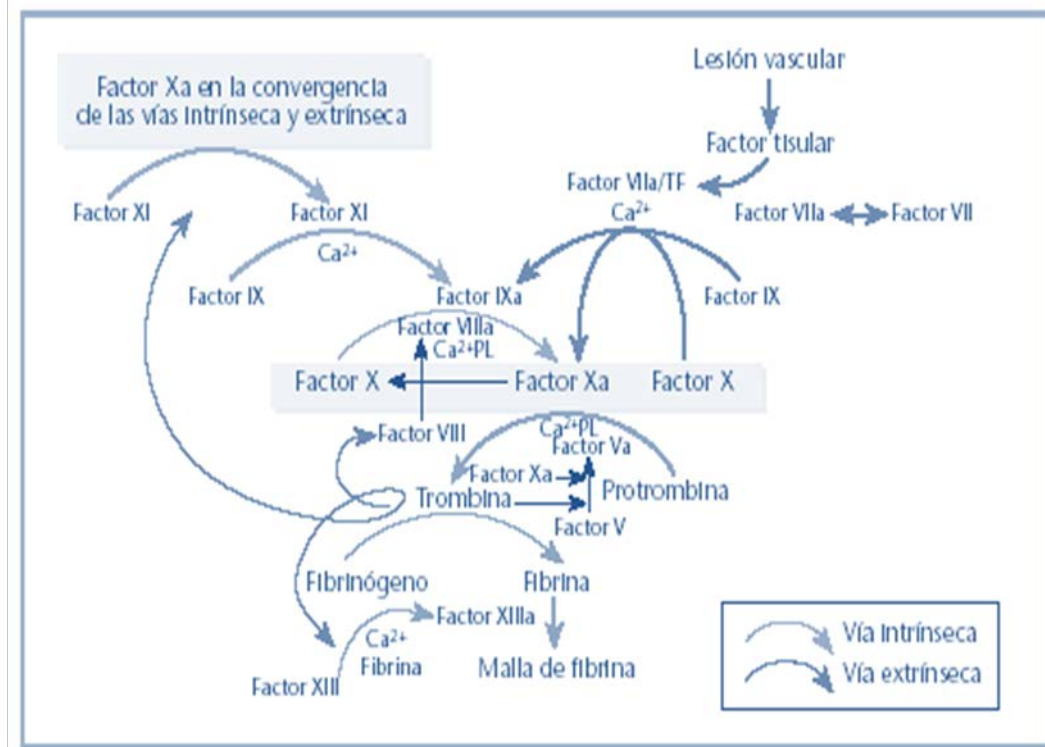


Figura 1.8: Cascada de la coagulación.

En los diabéticos, es la DE la que reduce las propiedades anticoagulantes del endotelio, al disminuir la síntesis de PGI_2 y NO y facilitar la adhesión de plaquetas. La disfunción se asocia al aumento de citoquinas inflamatorias (IL-6, FNT α , y PCR). Tanto en la DM1 como en la DM2 se han descrito alteraciones en la función plaquetaria, con un aumento de agregabilidad, adhesividad secundaria a la elevación del TXA $_2$. Todos estos cambios contribuyen al estado procoagulante y favorecen la aterotrombosis, al permitir la expansión de los trombos generados en la ruptura de la placa (Grant, 2007).

1.13. DIETA MEDITERRANEA

La dieta Mediterránea (DietMed) ha sido considerada con frecuencia como un "elixir" nutricional que reduce los factores de riesgo asociados con la enfermedad.

La DietMed antigua se centra en las especies: trigo, cebada, uvas, higos, granadas, aceitunas, y miel junto con otros alimentos indígenas de Oriente Medio que irradiaban de la cuna de la civilización en Mesopotamia (Berry, Arnoni, & Aviram, 2011).

En la actualidad, el término "DietMed" se refiere a los hábitos alimenticios de algunas regiones mediterráneas asociadas al cultivo del olivo. Estos países incluyen Marruecos y Túnez en el norte de África; Grecia, Portugal, España, sur de Francia, algunas partes de Italia, Turquía en Europa; Líbano y Siria en Oriente Medio. Estas regiones han ayudado a desarrollar toda la forma original de la DietMed, que se deriva de las tradiciones rurales y de los productos agrícolas en estas regiones (da Silva et al., 2009; Noah & Truswell, 2001).

Aunque el patrón dietético mediterráneo varía según que regiones, se pueden identificar algunas características comunes caracterizado por un consumo elevado de verduras, hortalizas, frutas, pasta, arroz, frutos secos, leguminosas y una rica variedad de pescados, además de aceite de oliva virgen (AOV), te y vino tinto (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005; Trichopoulou & Lagiou, 1997) que tienen efectos beneficiosos sobre la función endotelial y por lo tanto podrían reducir el riesgo cardiovascular (Chistiakov, Revin, Sobenin, Orekhov, & Bobryshev, 2015). Se caracteriza por un perfil

de ácidos grasos beneficiosos con grandes cantidades de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y un ácido graso superior MUFA-a-saturado (SFA) (Bos et al., 2010).

El elevado consumo de compuestos antioxidantes es otro de los argumentos empleados para explicar el efecto beneficioso de la DietMed en patologías como la ECV (Bazzano, Serdula, & Liu, 2003; Trichopoulou & Lagiou, 1997). La elevada exposición a las radiaciones solares y las temperaturas cálidas existentes en las regiones de la cuenca mediterránea, lleva a las especies vegetales a desarrollar mecanismos de defensa frente a las radiaciones ultravioletas y la producción excesiva de RL, mediante la acumulación de sustancias antioxidantes, como flavonoides, antocianinas y polifenoles (D'Angelo et al., 2005).

Los rápidos cambios en las dietas y estilos de vida como resultado de la industrialización, la urbanización, el desarrollo económico, el mercado y la globalización está teniendo un efecto significativo en la salud y el estado nutricional de las poblaciones (Reguant-Aleix, Arbore, Bach-Faig, & Serra-Majem, 2009). En países como España e Italia han mostrado una tendencia a la baja en la adhesión al patrón de DietMed en las últimas décadas (Bach-Faig, Fuentes-Bol, et al., 2011).

En este sentido, la DietMed se ajusta adecuadamente a las recomendaciones de la conocida “*pirámide nutricional*” (Figura 1.9), que es el resultado de un consenso internacional, que se basa en los últimos datos científicos de salud y nutrición publicados en cientos de artículos en las últimas décadas. Se recomienda su uso y promoción, sin ninguna restricción, y la edición de 2010 tiene adaptado, traducido y editado en 10 idiomas diferentes (inglés, árabe, catalán, gallego, euskera, francés, español, italiano,

portugués y griego) en colaboración con algunas organizaciones internacionales (Bach-Faig, Berry, et al., 2011).



Figura 1.9: Pirámide nutricional.

La DietMed, que se caracteriza por los alimentos que contienen fenoles, se correlacionó con una menor incidencia de ECV (Migliori et al., 2015), cáncer (Kontou, 2015) y enfermedades inflamatorias (Rodríguez-Morató et al., 2015).

La DietMed es un patrimonio cultural, histórico, social, territorial y medioambiental transmitida de generación en generación durante siglos, y ha formado parte, como un Sistema Alimentario del Mediterráneo, de los estilos de vida de Pueblos del Mediterráneo a lo largo de su historia (Reguant-Aleix, Arbore, Bach-Faig, & Serra-Majem, 2009). En el año 2010, es reconocida como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad por las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Fue el resultado de un proceso internacional coordinado desde España por la Fundación

DietMed. Este reconocimiento permite un mejor entendimiento de la DietMed en todo el mundo (UNESCO, 2010).

En 2009, en Parma, Italia, la conferencia internacional de la DietMed, como modelo de dieta sostenible, fue organizada por CIISCAM (Centro interuniversitario internacional de estudio sobre cultura alimentaria mediterránea) en colaboración con la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), División de Protección al Consumidor, el Foro sobre culturas del Mediterráneo, y el CIHEAM-IAM (Centro International de Estudios Agronómicos Mediterráneos Instituto Agronómico Mediterráneo de Montpellier) de Bari. Su objetivo era promover la DietMed como ejemplo de una dieta sostenible en el que la nutrición, la producción de alimentos, la biodiversidad, la cultura y la sostenibilidad estaban fuertemente interrelacionados, con un bajo impacto sobre el medioambiente (Burlingame & Dernini, 2011).

En la DietMed se ha demostrado que disminuyen biomarcadores asociados con un mayor riesgo para la ECV. Además, numerosos estudios han demostrado que la dieta mediterránea mejora la resistencia a la insulina, aumenta el colesterol HDL, y disminuye los triglicéridos en plasma, así como los marcadores inflamatorios y la presión arterial (Estruch et al., 2013).

El estudio PREDIMED (Prevención con DietMed) y Lyon Diet Heart han demostrado los efectos protectores y beneficiosos asociados a la DietMed en la prevención de diversas enfermedades crónicas como pueden ser la diabetes, el cáncer, la HTA o enfermedades neurodegenerativas; por ejemplo, parece estar asociada a un menor riesgo de deterioro cognitivo leve durante el envejecimiento, en la etapa de transición de

la demencia y en el deterioro cognitivo leve de la enfermedad de Alzheimer (de Lorigeril et al., 1999; Martínez-González et al., 2015; Ros et al., 2014).

La OMS en su último informe recomienda sustituir el consumo de grasa saturada por grasa monoinsaturada (subrayando así el consumo de el aceite de oliva) y aumentar el consumo de frutas y verduras frescas (OMS, 2003).

Según el informe anual del año 2012 de la OMS, las ECV causaron casi 17,5 millones de muertes en 2012; es decir, 3 de cada 10. De estas, 7,4 millones se atribuyeron a la cardiopatía isquémica, y 6,7 millones, a los accidentes cerebrovasculares. Según el informe del Instituto Nacional de Estadística de España, en 2012 la muerte por enfermedades cardiovasculares fue del 30,3%, lo que supone el primer puesto del total de defunciones (“WHO | Healthy diet,” n.d.).

La American Heart Association, también emitió una advertencia científica que indica que una DietMed demuestra efectos impresionantes en ECV (Kris-Etherton et al., 2001).

La dieta, la obesidad, la dislipidemia, la hipertensión y la DM son factores de riesgo para la aterosclerosis (Camargo et al., 2012) y esta es un factor de riesgo de las ECV, el desarrollo de la placa aterosclerótica es el resultado de una compleja cascada de procesos inflamatorios, acumulación de lípidos y calcificación (Urpi-Sarda et al., 2012).

La principal fuente de grasa en la DietMed es aceite de oliva (AO). En las poblaciones mediterráneas se estima que las personas consumen entre 25 y 50 ml de AO

por día (AO en bruto y que se utilizan para cocinar). Recientes estudios de cohortes y ensayos clínicos aleatorizados han aportado pruebas que muestran que la ingesta de AOV, rico en compuestos fenólicos, proporciona beneficios para la salud (Rodríguez-Morató et al., 2015).

1.14. ACEITE DE OLIVA

El olivo (*Olea europea* L.) es un árbol muy conocido en todo el mundo debido a su antigüedad, extensión y fruto, del que se extrae el tan valorado “oro amarillo”, el aceite. El zumo de las aceitunas tiene tales propiedades nutricionales que han hecho que se consagre como la grasa más perfecta, la más apropiada por su composición en ácidos grasos mono y poliinsaturados para preservar la salud (prevención de arteriosclerosis, el infarto, algunos tipos de cáncer, mejor funcionamiento del hígado, etc.), favorecer el metabolismo, dificultar la formación de colesterol “malo” y favorecer la del “bueno”. El olivo es uno de los árboles antiguos cultivados más tradicionales y extendidos a lo largo de toda la Cuenca Mediterránea. Su cultivo se remonta al Neolítico, mucho antes de conocerse la palabra escrita, 3.000 a 4.000 años a.C. Se han encontrado hojas de olivo en los yacimientos pliocénicos de Mongardino (a 18 km de Bolonia) y huesos del mismo fruto en las estaciones neolíticas de El Garcel, en España. Muchos historiadores como De Candolle, consideran que proviene de Siria, del Asia Menor, y del Oriente Próximo, donde creció originalmente en abundancia en estado salvaje, llamado vulgarmente acebuche. Sin embargo, también crecían olivos salvajes en el Norte de África, España y en Grecia; lo que hace incierto el origen exacto del olivo (Buendía & Martínez, 2013).

El olivo pertenece a la familia botánica de las Oleaceae. Es una planta perenne que presenta diferentes variedades, denominadas "cultivares", de acuerdo a las zonas geográficas en las que crece (Vossen, 2007).

El AOV procede de la primera y segunda prensada de la aceituna, por el método de prensado en frío (donde no se aplican los productos químicos y sólo una pequeña cantidad de calor) y se compone de un resto de glicerol (que componen 90-99% de la aceituna) y una fracción insaponificable compuesta por sustancias muy diversas no glicéridas (que compone 0,4-5% de la fruta de oliva) que contiene compuestos fenólicos (Cicerale, Lucas, & Keast, 2010).

1.15. OBTENCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA

El AO se puede obtener directamente de la oliva utilizando sólo la extracción mecánica y pudiendo ser consumida sin más tratamientos. Los pasos del proceso de producción de AO incluyen la recogida, lavado y trituración de aceitunas, batido de la pasta de oliva, centrifugación, almacenamiento y filtración (Figura 1.10). La calidad del aceite está determinada por la composición química y el estado bioquímico de la aceituna. Para producir alta calidad, las aceitunas deben ser cosechadas sin que se rompan la piel del fruto y tras la recogida, debe ser procesada dentro de 12 a 24 h. Las aceitunas pueden llevar distintos tipos de contaminantes como tierra, hojas piedras, etc. Estos materiales se eliminan con inyección de aire, posteriormente se lavan con agua a temperatura ambiente. Actualmente se utilizaban molinos de martillos metálicos que giran a una velocidad alta, arrojando las aceitunas contra una pantalla de metal, golpeando y rompiendo sus estructuras (Di Giovacchino, Sestili, & Di Vincenzo, 2002).

El rápido aplastamiento de la fruta, crea una pasta, que se agita en una batidora, a una temperatura entre 25 y 35°C. El tiempo de batido influye en la disminución de polifenoles y disolución de pigmentos (Angerosa, Mostallino, Basti, Vito, & Serraiocco, 2000).

El siguiente paso es la extracción del aceite que puede ser realizada por centrífugado, se somete la pasta a la acción de la fuerza centrífuga y los sólidos se adosan a la pared del interior del rotor y son arrastrados hacia un extremo, mientras que los líquidos son enviados al exterior por conductos diferentes. De esta manera se obtienen tres componentes: la fase sólida llamada orujo, que contiene la piel de la aceituna, la pulpa exprimida y los restos del hueso. La fase líquida, incluye un componente acuoso que es el alpechín, y un componente oleoso que es el aceite.

La centrifugación puede realizarse en dos y tres fases; en la de dos fases se obtiene por una parte el aceite y por otra, el orujo y alpechín mezclado, que se denomina alpeorujo; mientras que en el sistema de tres fases se obtienen los tres componentes mencionados anteriormente separados.

El aceite obtenido se pasa por pequeños decantadores para que tenga lugar la desaireación y la decantación de partículas más pesadas entre ellas el agua, que provoca la centrifugación, así posteriormente se podrá pasar a recipientes dónde se efectuará la clasificación por calidad para ser almacenado según sus características.

El almacenamiento ha de ser en depósitos impermeables e inatacables, para que el aceite no se altere, así como controlar la temperatura e iluminación debiendo ser constante entre 15-18 °C y mínima luminosidad.

El AO se produce generalmente de septiembre a febrero y se almacena en el molino hasta la filtración y comercialización. Como era de esperar, después de un almacenamiento durante 9 meses el aumento de valores de peróxido y el contenido de fenoles totales y la estabilidad oxidativa del AO disminuyen (Rigane, Boukhris, Bouaaziz, Sayadi, & Ben Salem, 2013).

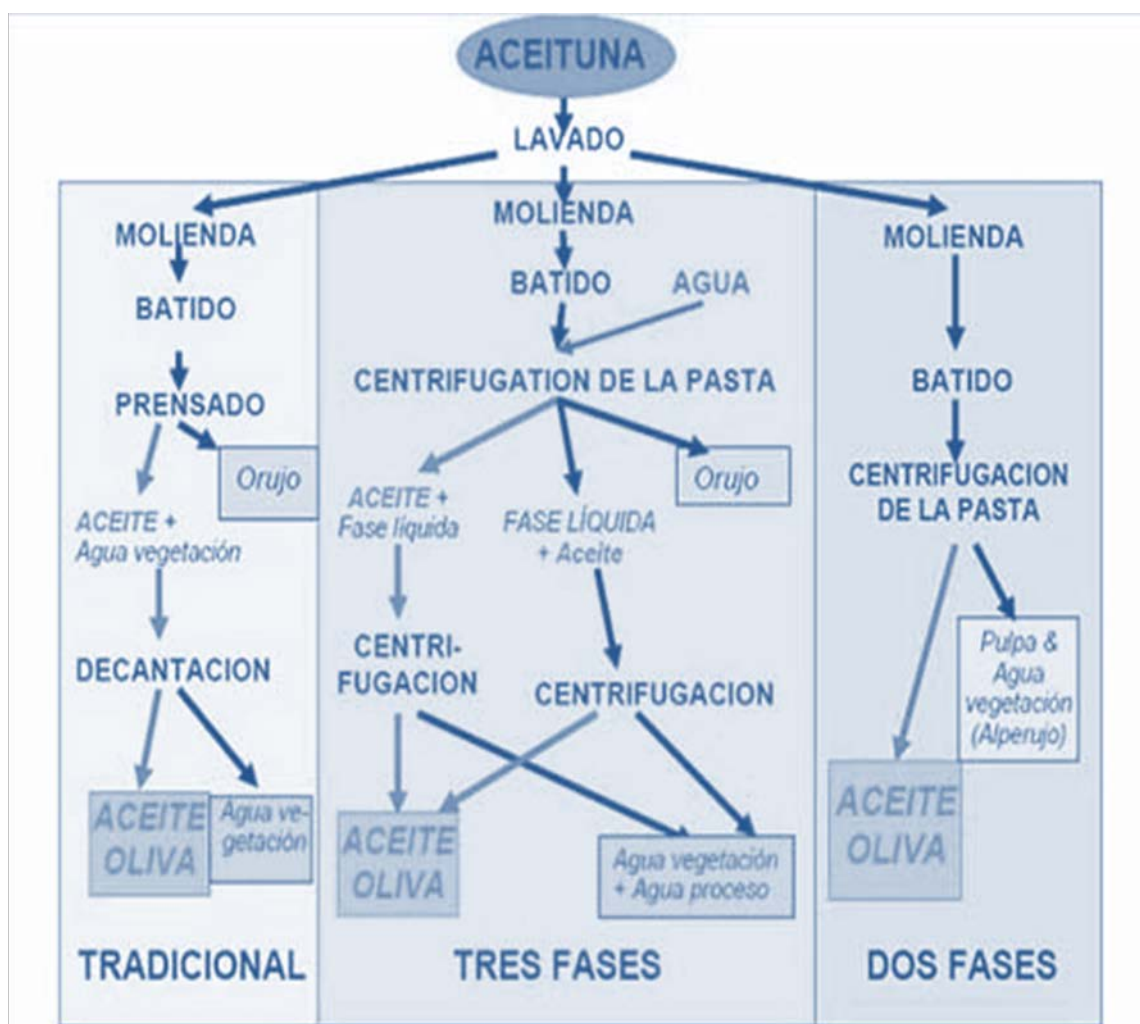


Figura 1.10: Obtención del aceite de oliva

1.16. TIPOS DE ACEITE DE OLIVA

El AO, según sus características se divide en AOV y orujo.

El AOV, se subdivide en:

El AOV Extra presenta características irreprochables de sabor y olor y una acidez menor o igual a 0,8°. Es el mejor de los aceites vírgenes.

El AOV que tiene características de buen sabor y una acidez menor o igual a 2°.

El AOV Lampante no es válido para consumo directo por su acidez superior a 2° y debe ser refinado. Es el peor de los AOV.

El AO refinado, presenta unas características sensoriales nulas, sin apenas sabor ni color, no se comercializa y sirve para la composición de otros aceites. Sua acidez no podrá ser superior a 0,3°

El orujo es la parte sólida de la pasta de aceitunas retenida en las almazaras durante el prensado o durante la centrifugación. Esta parte contiene la mayor parte de la piel, pulpa agotada y trozos de huesos, reteniendo algo de aceite (5-10%) que hace rentable su recuperación. Mediante la extracción se produce el aceite de orujo de aceituna o aceite de orujo bruto. Este aceite es refinado produciendo un aceite de orujo refinado cuya acidez debe ser menor a 0,3°. Para dotar a este aceite se mezcla con AOV, originándose el Aceite de Orujo de Oliva cuya acidez debe ser menor o igual a 1,0° (Muniz, 2009).

1.17. COMPONENTES DEL ACEITE DE OLIVA

La composición de AO está relacionada con su física, química, y las características organolépticas (Ruiz-Domínguez, Raigón, & Prohens, 2013). La principal característica y aquella que lo hace único, es el alto índice de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), y antioxidantes.

El AO contiene dos fracciones; una fracción saponificable y otra insaponificable. La fracción saponificable representa mas del 98%, comprende triglicéridos y ácidos grasos, que pueden ser saturados (AGS) e insaturados (AGI), estos últimos: monoinsaturado, MUFA (ácido oleico) y poliinsaturados, PUFA (ácido linoleico y linolénico). Y la fracción insaponificable, aproximadamente del 2%, que comprende mas de 230 compuestos químicos (hidrocarburos, alcoholes alifáticos y triterpénicos, esteroides libres, ceras, compuestos volátiles y antioxidantes) (Muniz, 2009; Servili et al., 2013).

Familias de compuestos presentes en el AOV	
Fracción glicérida y derivados (98%)	Compuestos minoritarios (2%)
Triglicéridos	Esteroides y terpenos
Monoglicéridos	Alcoholes alifáticos
Diglicéridos	Esteres no glicéridos
Fosfátidos	Hidrocarburos
Ácidos grasos libres	Compuestos volátiles
	Ceras
	Tocoferoles
	Pigmentos
	Fenoles

Figura 1.11: Compuestos presentes en el AOV.

La mayor parte de estos ácidos grasos del AO están esterificados a una molécula de glicerol, formando los triacilglicéridos o triglicéridos, aunque también están presentes en un porcentaje minoritario formando parte de mono y diglicéridos, fosfátidos y ácidos grasos libres.

Composición Ácidos Grasos del Aceite de Oliva		
Saturado		Ácido mirístico Ácido palmítico Ácido margárico Ácido esteárico Ácido araquídico Ácido behénico Ácido lignocérico
Insaturado	Monoinsaturado	Ácido palmitoleico Ácido Heptadecenoico Ácido oleico Ácido eicosenoico
	Poliinsaturado	ω -6 Ácido Linoleico ω -3 α -ÁcidoLinolénico

Figura 1.12: Composición Ácidos Grasos del Aceite de Oliva

De entre los componentes que forman el AO, tres destacan por sus efectos sobre la salud en las personas; el ácido oleico, el escualeno y los componentes fenólicos.

El ácido oleico (18:1n9) es el componente principal (55-83%) de la fracción saponificable; otros ácidos grasos son palmítico, esteárico, linoleico, linolénico y ácidos (Servili et al., 2013).

Históricamente, los efectos beneficiosos para la salud del AO se le atribuía al ácido oleico (Hannachi et al., 2008). Sin embargo, otros aceites de semilla como: girasol, soja y colza contienen altas cantidades de grasas monoinsaturadas y son ineficaces en el riesgo de enfermedades crónicas (Di Vaio, Nocerino, Paduano, & Sacchi, 2013; Vinha et al., 2005).

El escualeno es un hidrocarburo triterpénico, uno de los compuestos principales de la fracción insaponificable, importante intermediario en la biosíntesis de colesterol.

Los componentes fenólicos, principal antioxidante junto con los carotenos, están relacionados con las propiedades saludables del AO y están asociados con la estabilidad de la oxidación y sabor característico de AOV. El contenido de estos componentes en el AO varía dependiendo de la variedad de la aceituna, el clima, la maduración en la cosecha, el sistema de tratamiento utilizado y las condiciones de almacenamiento (Di Giovacchino et al., 2002; Servili et al., 2007).

La concentración de estos compuestos varían entre los frutos y aceites de las variedades *Arbequina*, *Cornicabra*, *Morisca*, *Picolimón*, *Picudo* y *Picual* a tres índices de maduración diferentes (verde, envero y negra) (Gómez-Rico et al., 2008).

Los compuestos fenólicos, a bajas concentraciones, funcionan como antioxidantes. Esta propiedad es beneficiosa tanto para el alimento en sí como en el organismo después de haberlo ingerido, ya que en ambos casos evitan la oxidación de otros componentes importantes del alimento o de las células del cuerpo humano. Esta actividad antioxidante está relacionada con el efecto que se le atribuye a los fenoles

como antiarterioescleróticos, cardioprotectores, neuroprotectores, antiinflamatorios, antimutagénicos, anticarcinogénicos, moduladores hormonales, protectores endoteliales, protectores del sistema inmunológico, antialergénicos y antidiabéticos (Cicerale et al., 2010; Han, Shen, & Lou, 2007).

Los compuestos fenólicos que contiene el aceite son muy variados, desde fenoles simples, ácidos fenólicos, difenoles, hasta moléculas complejas de polifenoles.

Los compuestos fenólicos del AO son, fenoles hidrofílicos como: alcoholes y ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y secoiridoides. Y los fenoles lipofílicos, incluyen tocoferoles.

Los compuestos secoiridoides principales en la aceituna son oleuropeína y ligustrósido, que son formas glucosiladas de esteres del ácido elenólico con 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol) y 2-(4-hidroxifenil) etanol (tirosol), respectivamente (Ghanbari, Anwar, Alkharfy, Gilani, & Saari, 2012; Soler-Rivas, Espín, & Wichers, 2000). Uno de los compuestos fenólicos del AO cuyo estudio ha generado un mayor interés ha sido el hidroxitirosol. Varios estudios han confirmado que este compuesto inhibe la oxidación de las LDL, así como su efecto protector frente a la muerte celular de las células endoteliales. Gran parte de los derivados secoiridoides presentes en el AO, son transformados a tirosol e hidroxitirosol durante la digestión. Estos compuestos son absorbidos en el intestino y sus metabolitos son posteriormente detectados en el plasma sanguíneo (Fitó et al., 2007; Rubió et al., 2012).

A nivel mundial, la cantidad de polifenoles en el AO oscila entre 200 y 1000 mg/kg, dependiendo de la variedad y las prácticas agrícolas. Por lo tanto, la dosis diaria para HT (que combina el volumen de AO y la cantidad de polifenoles) no podrá exceder de 7 mg / día (Rodríguez-Morató et al., 2015).

Propiedades de los compuestos fenólicos

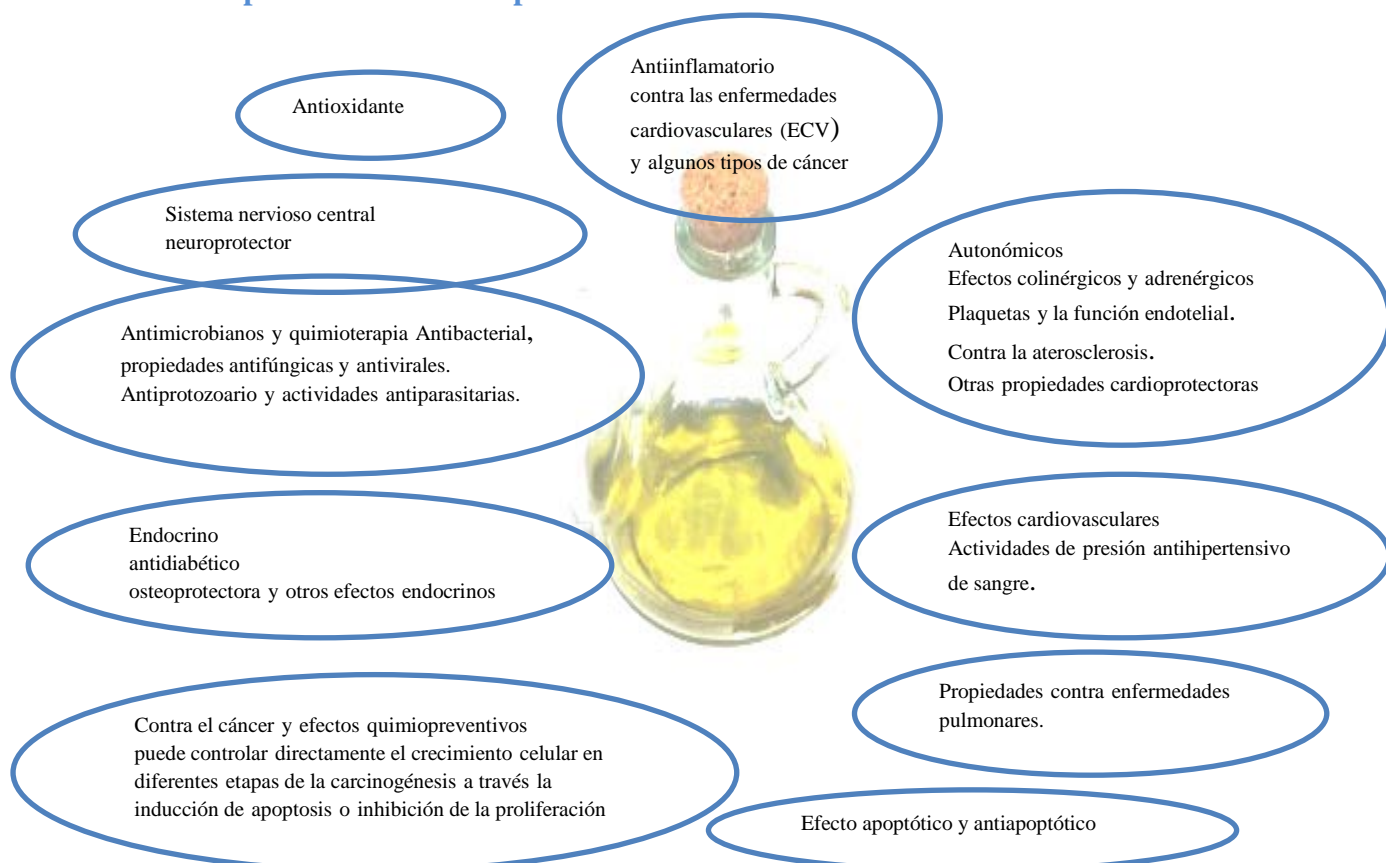


Figura 1.13: Propiedades de los compuestos fenólicos.

1.18. HIDROXITIRO SOL

El hidroxitirosol (HT), es un polifenol que se encuentra en diversas fuentes naturales, especialmente en el olivo. El contenido de HT es superior en las hojas que en

los frutos del olivo, por lo que puede ser extraído con mejores rendimientos a partir de extractos metanólicos de la hoja (Ryan, Prenzler, Lavee, Antolovich, & Robards, 2003).

En su forma pura es un líquido transparente e inodoro. El HT se encuentra en el AOV extra bien en forma libre o en forma de éster, contribuyendo en un 70 - 80% a la fracción fenólica total (M. Ruiz, 2013).

Un grupo de investigadores del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Sevilla), ha desarrollado un sistema de aislamiento y purificación de HT, a escala industrial, a partir de subproductos de la fabricación de aceitunas de mesa o del aceite, utilizando agua de lavado, hueso de aceituna, alpechín y alperujo, que son mezclas de agua y sólidos residuales de la obtención de AO (protegido bajo patente) y por lo tanto, más económico. Este HT puede tener una pureza de hasta el 95% (Fernández-Bolaños et al., 2005).

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

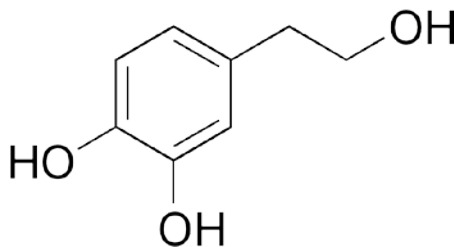


Figura 1.14: Hidroxitirosol: 3,4-dihidroxifeniletanol

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

1.19. PROPIEDADES DEL HIDROXITIRO SOL

El compuesto fenólico, HT ha sido identificado como uno de los antioxidantes más potentes que se encuentran en el AO. Presenta una variada gama de actividades biológicas como son: actividad antimicrobiana, antihipertensiva, hipoglucémica, antiagregante plaquetaria, cardioprotectora y antiinflamatoria (Visioli et al., 2002a; Tuck y Hayball, 2002a; Bianco y Ramunno, 2006; Covas et al., 2006a y b; Bendini y cols., 2007; Reyes et al., 2013; Covas, de la Torre, & Fitó, 2015), aparte de inhibir la proliferación y promover la apoptosis en numerosas líneas celulares tumorales humanas (Fabiani et al., 2009).

1.19.1. ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante está relacionada con el efecto que se le atribuye a los fenoles como antiarterioescleróticos, cardioprotectores, neuroprotectores, antiinflamatorios, antimutagénicos, anticarcinogénicos, moduladores hormonales, protectores endoteliales, protectores del sistema inmunológico, antialérgicos y antidiabéticos (Cicerale et al., 2010; Hu, He, Jiang, & Xu, 2014).

Una de las características comunes de estas enfermedades degenerativas crónicas es una sobreproducción de RL incontrolada que conduce a EO y la desregulación de la

célula. La DietMed otorga una ingesta elevada de micronutrientes como vitaminas, carotenoides y polifenoles, los cuales tienen un efecto potente antioxidante (Balsano & Alisi, 2009; Fitó et al., 2007)

El HT tiene propiedades antiaterogénicas con fuerte poder antioxidante. Actúa como eliminador de RL con el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, etc. Además, tiene un fuerte efecto quelante sobre metales como el hierro, disminuyendo la aparición de ERO derivadas de reacciones asociado con este metal. Esta característica es responsable del efecto en la aterosclerosis, caracterizado por la entrada de partículas de LDLox en el interior de la íntima arterial. Es capaz de prevenir la oxidación de estas lipoproteínas por macrófagos, ya que aumenta la capacidad antioxidante de estas células relacionadas con los bajos niveles de glutatión (Granados-Principal, Quiles, Ramirez-Tortosa, Sanchez-Rovira, & Ramirez-Tortosa, 2010a).

El HT neutraliza a ERO producidos por los neutrófilos y otros fagocitos, que están implicados en la inducción de muchas enfermedades. Además de HT, otros compuestos de AO como oleuropeína, tirosol, escualeno, ácido oleico, y tocoferoles también tienen actividades antioxidantes.

La ingesta dietética de los polifenoles del AO puede reducir el riesgo de enfermedades mediadas por ERO y explicar el efecto beneficioso de la DietMed sobre la salud humana (Antonio Moreno et al., 2003).

1.19.2. ANTICANCERÍGENO

El EO y la generación de RL también parecen estar implicados en la patología del cáncer y se ha sugerido que el HT y los compuestos fenólicos del AO han mostrado actividad en la prevención del cáncer. El consumo de AO tiene beneficios para la prevención del cáncer de colon y de mama (Owen et al., 2004; Waterman & Lockwood, 2007).

Cualquier alteración oxidativa del ADN y ARN juega un papel esencial en la patogenia de las principales enfermedades degenerativas y, en particular, puede constituir el punto de partida para el desarrollo de cualquier tipo de cáncer (Evans, Dizdaroglu, & Cooke, 2004).

Debido a sus antioxidantes, antiproliferativos, actividades proapoptóticos, y anti-inflamatorias, el HT tiene el potencial de contrarrestar todas las características distintivas del cáncer (Bernini, Merendino, Romani, & Velotti, 2013).

Estudios con cultivos celulares mostraron que el HT fue capaz de detener el ciclo celular, reduciendo el crecimiento y la proliferación de células cancerosas, e inducir la apoptosis de células HL60 (leucemia promielocítica) y células HT29 (adenocarcinoma de colon) sin afectar a otro tipo de células no cancerosas como linfocitos aislados y células polimorfonucleares (Waterman & Lockwood, 2007).

Se ha comprobado que HT presenta efecto anticancerígeno, atenuando la proliferación de células en cultivos celulares humanos de adenocarcinoma colo-rectal, un efecto relacionado con su actividad antiinflamatoria (Terzuoli et al., 2010).

1.19.3. ANTIINFLAMATORIO Y ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO

También se han descrito efectos del HT en la inflamación y la agregación plaquetaria en sangre de ratas sanas y humanos voluntarios sanos (González-Correa, Navas, Muñoz-Marín, et al., 2008; Reyes et al., 2013).

La inflamación y sus consecuencias tienen un papel importante en la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado en varios estudios epidemiológicos y en animales que los polifenoles disminuyen la producción de marcadores inflamatorios, como son el NO y las citoquinas (Bernini et al., 2013; Richard et al., 2011).

También tienen beneficios sobre la función plaquetaria, estrechamente relacionada con la inflamación, al demostrar que inhibe la inducción química de la agregación, la acumulación del pro-agregante TxB2 en suero humano, la producción de moléculas pro-inflamatorias de leucotrienos y la actividad de la lipoxigenasa araquidonato (González-Correa et al., 2009; González-Correa, Navas, Muñoz-Marín, et al., 2008).

El HT tiene efectos *in vitro* sobre la función plaquetaria. El compuesto inhibe la agregación plaquetaria, la acumulación del tromboxano agente proagregante en el suero

humano, la producción de leucotrienos moléculas proinflamatorias y la inhibición del araquidonato lipooxigenasa (Visioli & Galli, 2002).

El HT reduce el riesgo de enfermedad de la arteria coronaria como consecuencia de su alto contenido de antioxidantes, debido a las ICAM-1 y VCAM-1 , E-selectina y adhesión a monocitos, que son cruciales para la activación endotelial y se las relaciona con la inflamación y propiedades antiagregantes (Dell'Agli et al., 2006; Caterina Manna, Napoli, Cacciapuoti, Porcelli, & Zappia, 2009).

Carluccio et al., demostraron que el tratamiento con HT y resveratrol disminuyen la expresión del ARNm de VCAM-1 mediante el bloqueo de la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, que pueden regular directamente la expresión de sustancias proinflamatorias / genes proaterogénicos (Carluccio et al., 2003).

Se investigó el efecto HT, a través de la medición del iNOS y la COX-2 en macrófagos de ratón J774 estimulados con lipopolisacárido. La incubación de las células con liposacaridos provocaron un aumento de la iNOS y COX-2 y el nivel de proteínas, así como la generación de ERO, lo que fue disminuido por HT. Además, el HT bloqueó la activación del NF- κ B, transductor de señal nuclear y activador de la transcripción-1 alfa (STAT-1 α) y el factor 1 regulador de interferón. Por otra parte, HT ejerce actividad anti-inflamatoria, su concentración inhibe la COX-2 y la iNOS en células monocíticas humanas (Zhang, Cao, & Zhong, 2009).

HT también ha sido observado en un modelo de osteoporosis en ratas postmenopausicas, mostrándose una reducción del grado de inflamación asociado con esta patología (Liu et al., 2014; Puel et al., 2008).

También se ha diseñado estudios para analizar el efecto antiinflamatorio de cuatro compuestos fenólicos que inhibieron fuertemente la enzima mieloperoxidasa (MPO), lo que indica una reducción de la afluencia de neutrófilos en los tejidos inflamados (de la Puerta, Martínez-Domínguez, & Ruíz-Gutiérrez, 2000).

Gong et al., estudiaron el papel de HT en la inflamación y en la hiperalgesia, en ratas macho con inflamación aguda inducida por carragenina. En este modelo, los animales fueron elegidos al azar en cinco grupos de 10 ratas, con un grupo control al que se le administraba por sonda agua destilada, tres grupos al que se administraba HT-20: 100, 250 y 500 mg/kg de peso corporal, 30 min antes y después de 120 min de la administración y otro grupo que recibía una solución de morfina 12,5 mg/ kg de peso corporal. El HT disminuye las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α y no aumenta la expresión de ARNm de citoquinas antiinflamatorias de la IL-10 (Gong et al., 2009).

El HT inhibe la agregación plaquetaria, en este estudio se evaluó el posible efecto anti-plaquetario de cinco derivados de éter HT (etilo, butilo, hexilo, octilo y dodecilo) después de la administración oral a ratas. La administración de 20 mg / kg / día inhibió la agregación plaquetaria, TxB2 y TBARS. Los éteres HT, especialmente el derivado de hexilo, son una alternativa potencial a HT en la profilaxis de la enfermedad vascular (Muñoz-Marín et al., 2013).

En ratones a los que se le ha inducido colitis por dextrano sulfato de sodio se ha evaluado el efecto oral de HT, se ha demostrado la inhibición de la producción de NO, la expresión de iNOS, NF- κ B subunidad p65 translocación, la expresión de ARNm, y la liberación de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , principales interleucinas proinflamatorias (Giner et al., 2011).

1.19.4. ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana de HT, tirosol y oleuropeína se ha manifestado contra varias cepas de bacterias implicadas en las infecciones gastrointestinales y respiratorias.

El HT presentó propiedades antimicrobianas *in vitro* frente a varios agentes infecciosos del tracto gastrointestinal y respiratorio, tales como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* o *Staphylococcus aureus*, a concentraciones mínimas inhibitorias que, fueron inferiores a la que presentaron antibióticos como la ampicilina (Bisignano et al., 1999). También posee actividad frente al agente causal de la neumonía, el *Mycoplasma pneumoniae* y otras especies de la familia de los micoplasmas (Furneri, Piperno, Sajia, & Bisignano, 2004; Granados-Principal et al., 2010a).

Se encontró que el AOV, gracias a sus compuestos fenólicos tienen acción bactericida contra el *Helicobacter pylori*, causante de las úlceras gástricas y vinculado a los cánceres gástricos (Waterman & Lockwood, 2007).

1.19.5. NEUROPROTECTORA

HT y éteres de HT presentan un efecto neuroprotector, tras someter al tejido cerebral de rata a un proceso de hipoxia-reoxigenación, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados indicaron la capacidad de estos compuestos para inhibir de manera dosis dependiente el flujo de lactato deshidrogenasa (LDH), proporcionando una base inicial para el estudio del HT como un potencial compuesto neuroprotector (Cabrerizo et al., 2013; González-Correa et al., 2008; Guerrero et al., 2012; Muñoz-Marín et al., 2012).

Hay evidencia de estudios epidemiológicos que indican que la adhesión a las dietas ricas en polifenoles y ácidos fenólicos, posiblemente reduce el riesgo de neurodegeneración con la edad y el posterior deterioro cognitivo. Schaffer et al, ha demostrado que HT protege a las células cerebrales *in vitro* y *ex vivo*, en cultivos celulares PC12 y células cerebrales de ratones después de la administración oral subcrónica. Los resultados obtenidos confirman la citoprotección y neuroprotección de las células cerebrales debido a HT (Schaffer, Müller, & Eckert, 2010).

También se ha identificado que algunos factores dietéticos, las dietas ricas en ácidos grasos insaturados, polifenoles, antioxidantes y vitaminas previenen el riesgo de la enfermedad de Alzheimer. Se realizó un estudio para determinar los efectos protectores de dos componentes del AO, tirosol e HT, en cultivos celulares de neuroblastoma N2, observando que el tratamiento del péptido amiloide- β (25-35) (100 g / ml) indujo una disminución del glutatión (GSH) y la activación del factor de transcripción NF- κ B y la muerte celular (St-Laurent-Thibault, Arseneault, Longpré, & Ramassamy, 2011).

En este estudio se analizó el mecanismo del efecto neuroprotector de HT, en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en cortes de cerebro de rata. Se les administró HT durante 7 días (1, 5 y 10 mg/kg por día). La inhibición máxima era 57,4% *in vitro* y 38,7% *ex vivo*. El HT reduce parámetros de EO: se inhibe la peroxidación de lípidos y aumento de las actividades enzimáticas relacionadas con el sistema de glutatión tanto *in vitro* como después de la administración oral a ratas. El aumento de la prostaglandina E2 y la IL-1 β después de la reoxigenación fueron inhibidas después de la incubación de cortes de cerebro con HT y después de la administración oral (Cabrerizo et al., 2013).

1.19.6. CAPACIDAD CARDIOPROTECTORA

Se ha comprobado que HT, reduce el riesgo de aterosclerosis y enfermedad coronaria (Grignaffini, Roma, Galli, & Catapano, 1994; Rafehi, Ververis, & Karagiannis, 2012; Salami, Galli, De Angelis, & Visioli, 1995).

El HT ha demostrado que puede prevenir la ECV mediante la reducción de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y la prevención de la oxidación de LDL (Fitó et al., 2007; Rafehi et al., 2012). Se cree que HT además ejerce dicho efecto por otros mecanismos adicionales, inhibiendo o frenando la vía inflamatoria (Bitler, Viale, Damaj, & Crea, 2005).

Algunos estudios analizaron los efectos de HT sobre los lípidos sanguíneos, el estado antioxidante y la progresión de las lesiones aórticas. En uno de ellos se utilizaron conejos hiperlipémicos, que fueron alimentados con una dieta de control que contenía el

aceite de girasol, una dieta aterogénica alta en grasas saturadas y colesterol, y una dieta con HT, respectivamente. Los grupos HT mejoraron su estado antioxidante y redujeron el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en comparación con los animales control, por lo que concluyeron que la suplementación con HT tenía efectos cardioprotectores *in vivo* (González-Santiago et al., 2006).

También ejerce un efecto beneficioso sobre la función plaquetaria, al reducir *in vitro* la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares (Carluccio et al., 2007) o inhibir *in vivo* la agregación plaquetaria en ratas (Correa et al., 2009; José Antonio González-Correa, Navas, Lopez-Villodres, et al., 2008). También en estudios de intervención con humanos, se ha relacionado el HT y derivados a la mejora del perfil hemostático postprandial trombogénico de FVIIa y PAI-1 (Ruano et al., 2007).

El estudio PREDIMED asoció una menor incidencia de eventos cardiovasculares en personas que habían consumido AOV, así como una mejora en la capacidad cognitiva de pacientes ancianos con factores de riesgo cardiovascular (Martínez-González et al., 2015).

Se investigaron los efectos de escualeno, HT y coenzima Q (10) sobre los tejidos gingivales en cuarenta y ocho conejos distribuidos en seis grupos. El grupo control fue alimentado con comida estándar durante 80 días. El resto fueron alimentados con una dieta aterogénica durante 50 días. Después de eso, un grupo fue sacrificado y el resto fue sometido durante otros 30 días más a comida comercial y suplementos con coenzima Q (10), escualeno o HT. Los conejos desarrollaron aterosclerosis, tuvieron mayor fibrosis y activación endotelial y baja celularidad en la mucosa gingival que los controles (p

<0,05). El HT reduce la activación endotelial ($P < 0,05$) y escualeno, además, disminuye la fibrosis ($p < 0,05$). Los resultados sugieren que los cambios vasculares gingivales después de la dieta aterosclerótica se han invertido por HT y escualeno (Bullon et al., 2009).

En ratas Wistar alimentadas con dieta estándar y dieta rica en colesterol durante 16 semanas. Se examinaron; los niveles de lípidos en suero, el nivel de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), y las actividades de las enzimas antioxidantes hígado (SOD y catalasa). La administración de extractos de hoja de oliva ricos en polifenoles redujo significativamente los niveles séricos de CT, TG y LDL-C y aumentó el nivel sérico de colesterol de HDL (HDL-C). Además, el contenido de TBARS en el hígado, corazón, riñones y aorta disminuyó significativamente después de la administración oral de extractos de hoja de olivo ricos en polifenoles en comparación con los de las ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol (Jemai, Bouaziz, Fki, El Feki, & Sayadi, 2008).

1.19.7. PREVENCIÓN DE LA OSTEOPOROSIS

La oleupeína y el HT podrían ser utilizados como un posible recurso efectivo en el tratamiento de los síntomas de la osteoporosis, ya que se ha descrito su capacidad para estimular la deposición de calcio e inhibir la formación de osteoclastos multinucleados de una manera dosis-dependiente en ratones hembras ovariectomizadas (Hagiwara, Goto, Araki, Miyazaki, & Hagiwara, 2011).

1.19.8. ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA

Existen evidencias que una mayor adherencia a la DietMed, puede aportar mecanismos de protección tanto en la prevención como en el desarrollo de la DM, puede tener también un papel beneficioso en la prevención primaria y secundaria de las enfermedades cardiovasculares y un efecto favorable sobre el hígado y la función sexual en este tipo de pacientes (Pauwels, 2011).

Se diseñó un estudio donde se utilizaron ratas Wistar diabéticas inducidas por inyecciones intraperitoneales de aloxan (tóxico análogo de la glucosa que destruye las células β del páncreas). Estas mostraron hiperglucemia, hipercolesterolemia, aumento de la peroxidación lipídica, y el agotamiento de las actividades de las enzimas antioxidantes. Se le administró, durante 4 semanas, oleuropeína y extractos ricos HT, entre 8 y 16 mg / kg de peso corporal de cada compuesto, disminuyendo los niveles de glucosa en suero y colesterol, y restaurando las perturbaciones antioxidantes. Estos resultados sugirieron un efecto antidiabético (Jemai, El Feki, & Sayadi, 2009).

En otro estudio se evaluó el efecto del HT sobre el EO en ratas diabéticas inducidas por aloxan. Su administración causó una disminución del nivel de glucosa en plasma y un aumento de la superóxido dismutasa renal (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPX) actividades en el hígado y el riñón. Además, se observó una acción protectora contra la toxicidad hepática y renal. En este estudio se demostró que los polifenoles y especialmente HT son eficientes en la inhibición de la hiperglucemia y el EO inducido por la diabetes y sugiere que la administración de HT puede ser útil en la

prevención de las complicaciones diabéticas asociadas con el EO (Hamden, Allouche, Damak, & Elfeki, 2009).

Del mismo modo, los polifenoles presentes en extracto de hoja de olivo, oleuropeína e HT como compuestos mayoritarios, revirtieron la inflamación crónica y el EO causantes de los síntomas cardiovasculares, hepáticos y metabólicos en un modelo de ratas Wistar macho obesas con diabetes inducida por la dieta y otras inducidas por estreptozotocina (Poudyal, Campbell, & Brown, 2010). Otros estudios basados en un tratamiento crónico mediante administración oral de HT a ratas diabéticas mejoraron el efecto de la aspirina sobre una de las complicaciones de la DM como es la retinopatía diabética (De La Cruz et al., 2010).

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

1.20. ESTUDIOS EN HUMANOS: OTROS DATOS

Las primeras evidencias de la absorción del HT en humanos se publicaron en el año 2000 (Visioli et al., 2000). En este estudio se administraron diferentes aceites de oliva con distinto contenido en compuestos fenólicos, encontrando de HT y tirosol en orina cuya cantidad fue proporcional al contenido de los mismos en el aceite. Así, la excreción de HT por orina fue mayor cuando se ingirió AOV que cuando el aceite estaba enriquecido en compuestos fenólicos, o cuando este compuesto fue incorporado a otro alimento como el yogurt (Visioli et al., 2003).

Bonanome et al., publicaron un trabajo, en el que se detectó tirosol y en algunos casos también HT en las lipoproteínas plasmáticas después del consumo de 100 ml de aceite de oliva (Bonanome et al., 2000).

En el año 2000 se publicó un estudio, en el que los datos cinéticos demostraban que el transporte de HT se produce a través de un mecanismo de difusión pasiva y es bidireccional; el coeficiente de permeabilidad aparente que se ha calculado indica que la molécula se absorbe cuantitativamente a nivel intestinal (Manna et al., 2000).

Miro-Casas et al., desarrolló un método analítico para HT y 3-O-metil-hidroxitirosol en plasma. La dosis administrada de los compuestos fenólicos se estimó a partir de extractos metanólicos de AOV después de someterlos a diferentes tratamientos hidrolíticos. Las muestras de plasma y orina se recogieron de 0 a 12 horas antes y después de administrar 25 ml de AOV, una dosis similar a la utilizada en los países mediterráneos. Aproximadamente el 98% de HT parece estar presente en el plasma y orina en formas conjugadas (Miro-Casas et al., 2003).

El HT es el principal polifenol de AO consumido y se absorbe bien en los seres humanos. Se considera que tiene la mayor potencia antioxidante en comparación con los otros polifenoles de AO. Se revisaron estudios de intervención en humanos y mostraron que los polifenoles de AO disminuyeron los niveles de LDLox en el plasma y varios biomarcadores de daño oxidativo. Se observaron los efectos antioxidantes de estos polifenoles, en la oxidación de la LDL después de una ingestión dietética de aproximadamente 10 mg por día. La evidencia general de ensayos in vitro y animales y estudios en humanos apoyan el efecto antioxidante de estos polifenoles de AO. Sin

embargo, se necesitan más estudios para aclarar el efecto de los polifenoles sobre los marcadores de EO, en particular los niveles de daño del ADN e isoprostano plasma (Raederstorff, 2009).

En mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas recibieron 250 mg de extracto de hoja de olivo, se tomaron muestras de sangre y orina. Los niveles plasmáticos de HT glucurónido, sulfato de HT, oleuropeína aglicona glucurónido y oleuropeína aglicona derivado 1 fueron mayores en las mujeres posmenopáusicas y los niveles de MDA se redujeron en estas. Con la ingesta de compuestos fenólicos de AO se evita la osteoporosis (García-Villalba, Larrosa, Possemiers, Tomás-Barberán, & Espín, 2014).

Soni et al., revisaron la literatura relacionada con la seguridad / toxicidad disponibles en polifenoles de AO, especialmente el HT. En los estudios de biodisponibilidad oral, se encontró la excreción urinaria de HT y su glucurónido para ser asociado con la ingesta de HT. En estudios comparativos, la excreción urinaria de HT fue mayor en humanos que en ratas. Sobre la base de los estudios disponibles del extracto y polifenoles, y una historia de la exposición y el uso de componentes del extracto a través de la aceituna de mesa, productos de la oliva y del AO. El consumo de HIDROX se considera seguro a niveles de hasta 20 mg / kg / día (Soni, Burdock, Christian, Bitler, & Crea, 2006).

En este estudio, se administró a 12 varones voluntarios sanos, tirosol e HT, estos compuestos fenólicos, se absorbieron dosis-dependiente ($p < 0,001$) el contenido fenólico del AO parece modular el contenido fenólico LDL y el EO postprandial promovido por

40 ml de oliva de la ingestión de aceite en los seres humanos (Covas, de la Torre, et al., 2006).

Vissers et al., realizaron una revisión bibliográfica y encontraron estudios en los que la biodisponibilidad en humanos mostraron que la absorción de tirosol e HT es 55 a 66 % moles, y que al menos 5% se excreta en la orina. En algunos de los estudios en humanos, no se encontraron efectos de estos fenoles. No hay datos sobre las concentraciones de fenol en el plasma que sean alcanzables por la ingesta de AO. Se estimó que 50 g de AO por día proporciona aproximadamente 2 mg o aproximadamente 13 micromol de HT por día, y que la concentración plasmática de fenoles en el AO con potencial antioxidante resultante de una ingesta de este tipo puede ser a lo sumo 0,06 micromol / l. Esto es mucho más bajo, que las concentraciones mínimas de estos fenoles (50-100 micromoles), necesarios para mostrar la actividad antioxidante *in vitro* (Vissers, Zock, & Katan, 2004).

Muchas de las propiedades beneficiosas del HT descritas en modelos *in vitro* también se han observado en animales y humanos cuando se administra un AOV lo que hizo suponer que estos compuestos pudieron absorberse y ejercer su efecto *in vivo* (Ramírez-Tortose, Pulido-Moran, Granados, Gaforio, & Quiles, 2015).

2. OBJETIVOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los beneficios que la adherencia a una DietMed tiene sobre diversos aspectos de la salud humana es algo que ya no es elemento de discusión ni controversia. El amplio estudio PREDIMED ha demostrado que este tipo de dieta es un pilar muy importante para la prevención de enfermedades cardiovasculares (cardíacas, cerebrales y periféricas), síndrome metabólico, procesos neurodegenerativos (Martínez-González et al., 2015) y, más recientemente, algunos tipos de cánceres (Toledo et al., 2015).

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

Debido a la trayectoria de investigación de nuestro grupo, nos interesó especialmente el papel del AOV y de su principal componente polifenólico HT, en diversos aspectos de la bioquímica y función cardiovascular, sobre todo en lo referente a

su papel en la prevención de fenómenos isquémicos. Se ha demostrado que este componente del AOV disminuye una serie de factores bioquímicos y/o funcionales reconocidos como participantes fundamentales en el desarrollo de la ECV, tales como agregación plaquetaria, oxidación de la lipoproteína LDL, EO, etc (Covas et al., 2015; Reyes et al., 2013).

La mayor parte de estos estudios se realizan en modelos experimentales *in vitro* o en animales de experimentación sanos. En ambos casos se induce el daño bioquímico-funcional mediante agentes químicos reconocidos y se observa que la presencia de HT reduce la mayor parte de los efectos de estos agentes nocivos. Sin embargo, son pocos los estudios que utilizan modelos en los que el daño cardiovascular se derive del desarrollo de una enfermedad determinada. Por ello nos interesó abordar este campo, ya que constituye un paso más en el conocimiento de los efectos protectores cardiovasculares del HT.

Uno de los principales factores de riesgo de la ECV es la DM. Las complicaciones a largo plazo de esta enfermedad a nivel vascular son bien conocidas y se han estudiado los principales mecanismos de daño. Por ello elegimos un modelo experimental de DM que analiza el daño vascular en sus primeros estadios, es decir, cuando se produce una inflamación vascular sin detectar aún un daño morfológico evidente. De esta forma podríamos definir mejor el posible efecto preventivo de la administración oral de HT.

Como consecuencia de estos conocimientos, nos planteamos un trabajo en un modelo experimental de DM, con el objetivo de valorar la posible modificación de los

principales biomarcadores que inciden en la aparición de la enfermedad vascular diabética derivada de la administración oral de HT.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. METODOLOGÍA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3.1. TIPO DE ESTUDIO

Realizamos un estudio experimental ex vivo en ratas estreptozotocin-diabéticas.

3.2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

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

Los animales fueron estabulados de acuerdo con la normativa de uso, manejo y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia), según lo dispuesto en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo, de 22 de septiembre de 2010. El protocolo de estudio fue aprobado y supervisado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Málaga.

Para realizar este estudio utilizamos un total de 70 animales que establecimos en 7 grupos de 10 animales cada uno. Establecimos dos grupos controles, uno no diabético y uno diabético, a los que se les administró suero fisiológico. El resto de grupos experimentales estaban compuestos por animales diabéticos a los cuales se les administró diversas concentraciones de HT (0,5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día).

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

3.3. MÉTODO DE INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

3.3.1. PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA

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

3.3.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

Los animales de experimentación fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de diazepam (Valium[®], Roche Farma, S.A. Madrid-España). Una vez anestesiados, se procedió a realizar una incisión longitudinal en el pliegue inguinal (afectando a la piel, el tejido celular subcutáneo y las aponeurosis musculares).

Tras la localización del paquete vasculonervioso femoral, se inyectó la estreptozotocina en la vena femoral (Imagen 1) con una jeringa U-100 de insulina (0.33x13mm/29G Becton Dickinson, Madrid-España). Finalizada la administración, se procedió a suturar la piel con seda trenzada de 4/0.

3.3.3. MEDICIÓN Y CONTROL DE LAS CIFRAS DE GLUCEMIA

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

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

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

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

Todos los animales diabéticos mantuvieron cifras de glucemia entre 400 y 600 mg/dl, mediante la inyección subcutánea de insulina *Levemir_FlexPen*[®] (Bagsværd-Dinamarca) usando agujas desechables *NovoFine*[®] (Madrid-España). La dosis de insulina administrada osciló entre 4 y 6 UI dependiendo de la cifra de glucemia obtenida previamente.

3.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Al finalizar el periodo de tratamiento de dos meses, se procedió a la obtención de muestras. Una hora antes del sacrificio se les administró la última dosis del tratamiento. Se realizó una inducción anestésica con 50 mg/kg de diazepam (*Valium*[®], Roche Farma, S.A. Madrid-España) y tras ello se anestesiaron con una dosis de 50 mg/kg de pentobarbital sódico (*Dolethal*, Vetoquinol S.A.). Una vez anestesiadas fueron inmovilizadas en decúbito supino, se procedió a abrir la cavidad abdominal, y, previo desplazamiento del paquete intestinal hacia el lado derecho, se procedió a la disección de la aorta abdominal a nivel de su bifurcación en las dos ilíacas. A este nivel fue puncionada dicha arteria, procediéndose a la extracción de sangre.

La sangre obtenida se dividió en dos muestras:

1. La primera fue anticoagulada con citrato sódico 3.8% en proporción 1:10 y, a su vez, fue dividida en dos. Una para ser posteriormente usada como tal en la técnica de agregometría plaquetaria inducida con colágeno, previo contaje celular de las plaquetas (Coulter MD10. Coulter Electronics Limited). La otra parte de esta muestra anticoagulada fue centrifugada a 1500 x g (centrífuga refrigerada modelo 5800. Kubota Co. Japón), durante 15 minutos y a una temperatura de 4°C, el plasma obtenido se congeló a -80°C (ultracongelador -80°C. Heraeus. USA) para la posterior determinación de los distintos parámetros bioquímicos. Del pellet obtenido, se obtuvo lisado de hematíes diluyendo 1mL del mismo con 3 mL de agua HPLC fría y tras un proceso de centrifugación a 5000 x g (Eppendorf Centrifuge 5415D), durante 15 minutos y a 4 °C. Posteriormente, se realizó un contaje celular de las muestras y tras ello se procedió a su congelación a -80°C hasta su procesamiento.

2. La segunda muestra de sangre total sin anticoagulantes, se dejó 30 minutos a 37°C, transcurridos los cuales se paralizó la actividad ciclooxigenasa con 10 µl de indometacina 100 µM y se centrifugó a 1500 x g durante 15 minutos. El suero obtenido se congeló a -80°C.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA VASCULAR

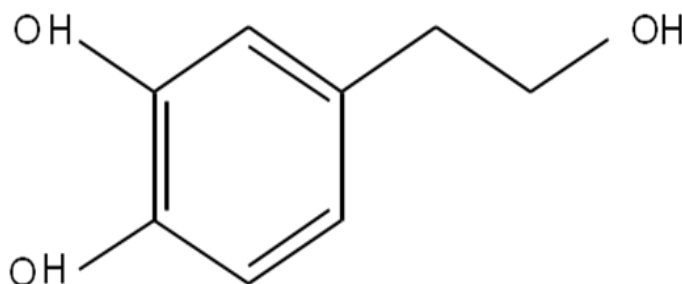
Una vez abierta la cavidad abdominal, por el procedimiento descrito anteriormente para obtención de sangre, continuamos la incisión y descubrimos la cavidad torácica de la cual se extrajo la aorta torácica completa.

La aorta se lavó cuidadosamente en suero salino isotónico, se dividió en 3 partes, se pesó. Dos segmentos se introdujeron en un recipiente con 500 μ l de tampón compuesto por: NaCl (100 mM), KCl (4 mM), NaHCO₃ (25 mM), Na₂SO₄ (2.1 mM), citrato sódico (20 mM), glucosa (2.7 mM) y Tris (50 mM) (pH 8.3). Se añadió 10 μ l de ionoforo de calcio A23187 (Sigma Chemical Co. USA), se incubó durante 20 minutos a 37°C y se conservó el sobrenadante a -80°C hasta su utilización para la determinación de la 6-keto prostaglandina F_{1 α} y producción de NO. El tercer segmento se utilizó para las determinaciones morfológicas, que se describirán posteriormente.

3.5. COMPUESTO DE ESTUDIO

El compuesto de estudio fue el siguiente:

HIDROXITIRO SOL: 3,4-dihidroxi feniletanol (cedido gentilmente por Dr. Juan Fernández Bolaños, Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa, CSIF, Sevilla).



3.6. VARIABLES DE ESTUDIO PARÁMETROS PLAQUETARIOS Y ENDOTELIALES

En las muestras de sangre y de aorta se cuantificaron algunos parámetros que regulan la interacción plaqueta-endotelio:

3.6.1. PARÁMETROS PLAQUETARIOS

Agregometría plaquetaria en sangre total inducida con colágeno y determinación de la producción de TxB_2 (metabolito estable del TxA_2) en suero.

3.6.2. PARÁMETROS ENDOTELIALES

Producción vascular de 6-keto-prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ (metabolito estable de la PGI_2) y de nitritos y nitratos (índice indirecto de la producción endotelial de NO). Ambos parámetros en pared de aorta torácica obtenida según procedimiento detallado anteriormente.

3.7. PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO

En las muestras obtenidas se valoraron una serie de parámetros que definen el *estrés oxidativo*.

3.7.1. DAÑO OXIDATIVO

Determinación de la capacidad de peroxidación lipídica a través de la cuantificación de los productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en muestras de plasma.

3.7.2. LDL OXIDADA (LDLox)

La oxidación de las moléculas de LDL constituye la forma más aterogénica de las mismas, acontece ante un exceso de RL de oxígeno y se ha postulado como clave en el desarrollo de la patología vascular, estando en el origen de, entre otros procesos, de la DE. Se realizó en muestras de plasma.

3.8. PARÁMETROS INFLAMATORIOS

Determinación de parámetros presentes en procesos inflamatorios vasculares, se estudió en muestras séricas donde se cuantificó la concentración de mieloperoxidasa (MPOx), interleucina 6 (IL-6) y moléculas de adhesión (VCAM-1) como índice de activación leucocitaria, producción de interleucinas y la expresión de moléculas de adhesión endotelio-leucocitos. También se ha realizado la determinación de la producción de peroxinitritos a través de la nitración de proteínas, concretamente de la 3-nitrotirosina, por ello a través de su expresión se puede valorar el efecto tóxico del NO. Se realizó en muestras de plasma.

3.9. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS

Como es conocido, la diabetes provoca un daño considerable en el sistema vascular. La DE, que predispone a la aterosclerosis y a otras comorbilidades cardiovasculares, es generalizada en la diabetes y entre otros, causa efectos sobre el tono vascular provocando vasoconstricción, al igual que hiperplasia y migración anormal de miocitos. Por ello se cuantificó el grosor de la pared arterial y la densidad de células en segmentos aórticos.

3.10. DESCRIPCIÓN DE LAS DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.

3.10.1. VARIABLES PLAQUETARIAS

Agregometría plaquetaria en sangre total inducida con colágeno y determinación de la producción de TxB_2 (metabolito estable del TxA_2).

AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Esta prueba tiene por finalidad establecer cuantitativamente la proporción de plaquetas que forman agregados tras la adición de un inductor de la agregación plaquetaria. Como consecuencia estudia la actividad global plaquetaria ante determinados estímulos químicos.

Esta técnica aporta como ventaja fundamental la posibilidad de explorar el funcionalismo plaquetario en presencia de todos los elementos sanguíneos. Es por ello que sea considerada como una de las técnicas que más fisiológicamente explora el funcionalismo plaquetario.

Esta técnica se basa en la introducción de dos electrodos en la muestra de sangre, dejando circular una corriente eléctrica entre ambos, que pasará a través de la sangre. Cuando se añade un agente inductor de la agregación plaquetaria, las plaquetas se adhieren a los electrodos en proporción directa al grado de agregabilidad, incrementando la resistencia al paso de la corriente eléctrica de forma proporcional al número de plaqueta agregadas en dichos electrodos. Estos cambios en la impedancia eléctrica se pueden registrar gráficamente, constituyendo la denominada curva de agregación plaquetaria.

Para la realización de las curvas de agregación se utilizó sangre anticoagulada. Posteriormente se distribuyó la sangre en cubetas siliconadas, 500 μ L en cada cubeta, a las cuales se les añadió 500 μ L de suero salino isotónico. De esta forma el volumen final de cada cubeta fue de 1 ml. Esta dilución se realizó en base a trabajos previos según los cuales el registro gráfico es más apropiado y cuantificable empleando esta dilución. Las cubetas con las muestras y un imán agitador se introducen en unos pocillos de incubación que para tal efecto posee el agregómetro (modelo 590-2D Chrono-log Corporation Havertown USA) a una temperatura constante de 37°C.

Cuando la sangre adquirió esta temperatura, se introdujo la muestra en el pocillo de agregación, fijándose la velocidad del imán a 1000 rpm. A continuación se

introdujeron los electrodos en la sangre, graduando el registro gráfico en su línea basal (mínima impedancia o máximo paso de corriente eléctrica). Después se añadió el agente inductor, en nuestro caso colágeno, registrándose la agregación durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Una vez obtenida la curva de agregación, se consideró como intensidad máxima de agregación la altura en centímetros (correspondiente al valor numérico de la impedancia en ohmios) desde la línea basal hasta el punto máximo de la curva. Dicho valor fue expresado en ohmios de resistencia eléctrica.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN PLAQUETARIA DE TROMBOXANO B₂

Mediante la determinación del tromboxano B₂ (TxB₂) conocemos la actividad metabólica del AA trombocitario. El TxB₂ se cuantificó mediante técnicas de enzimoimmunoensayo en las muestras congeladas de suero (RPN-220 Thromboxane B2 biotrak assay. GE Healthcare) y para su posterior medición se necesitó un espectrofluorímetro (Polarstar Galaxy. BMG Labtechnologies. Alemania).

3.10.2. VARIALES ENDOTELIALES

PRODUCCIÓN VASCULAR DE 6-KETO-PROSTAGLANDINA F1 α (6-KETO-PGF1 α)

La determinación y posterior medición de la producción vascular de 6-keto-PGF_{1 α} en el sobrenadante de las muestras inducidas de aorta, al igual que la descrita para la determinación del TxB₂, se realizó mediante técnicas de enzimoimmunoensayo en las

muestras congeladas (6-keto-Prostaglandin F_{1α} ELISA Kit. Cayman Chemical). Los resultados de la lectura se ajustaron según el peso de la porción arterial correspondiente.

PRODUCCIÓN ENDOTELIAL DE ÓXIDO NÍTRICO

Se realizó mediante la determinación de nitritos-nitratos, que se utiliza como medida indirecta de la producción de NO, se determinó en el sobrenadante obtenido tras inducción de arteria aórtica con ionóforo de Ca. Una vez obtenidos, se congelaron a -80°C hasta su procesamiento con el kit nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical Company) y posterior medición en espectrofluorímetro. Los resultados de la lectura se ajustaron según el peso de la porción arterial correspondiente.

3.10.3. VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Se valoró el EO a través de la determinación de la reacción con el ácido tiobarbitúrico, cuantificándose los productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico o TBARS, cuyo principal representante es el malondialdehído (MDA).

El MDA es un producto derivado del metabolismo del AA, que se produce por hidrólisis del endoperóxido cíclico PGH₂ junto al ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico (HHT).

La determinación de este metabolito del AA nos indica de modo indirecto los niveles de peroxidación alcanzados y aunque no es un metabolito específico del catabolismo peroxidativo, es un buen indicador, aceptado por muchos autores, del funcionalismo de esta vía oxidativa. Presenta también la ventaja de que puede colorearse al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, lo que nos permite de forma fácil cuantificar sus niveles en cualquier muestra determinando simplemente su absorbancia espectrofotométrica (Polarstar Galaxy. BMG Labtechnologies. Alemania). Se determinó la concentración de proteínas en plasma antes de centrifugar, para ello, aplicamos el método de Bradford (técnica detallada más adelante). Tomamos 500 μ l de muestra en un tubo y añadimos 250 μ l de ácido tricloroacético, agitamos y centrifugamos 5 min a 20000 x g (ultracentrífuga Modelo L-80. Beckman Instrument S.A. España). Se preparó el reactivo TRIS-TBA de la siguiente manera:

- TRIS: 1,5 g de Tris en 50 ml de agua destilada
- 17,2 mg de TBA por 1 ml de TRIS.

Tomamos 500 μ l del sobrenadante de la muestra tras su centrifugación y le añadimos 100 μ l de TRIS-TBA. Incubamos en el baño de 100° durante 15 min. A continuación enfriamos y tomamos 200 μ l en las placas transparentes y medimos la absorbancia espectrofotométrica a 532 nm. El cero se hace con suero fisiológico o agua.

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

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD

Se tomaron 5mL del reactivo de Bradford y se vertieron en tubos de plástico de 10mL. A cada tubo se le añadieron 100µL de las muestras, excepto al blanco al que se le adicionó 100µL de disolución de ClNa 5N. Se agitaron los tubos y tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió a realizar la medición de las proteínas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm.

Para hallar el valor de las proteínas, sólo restó por aplicar la ecuación de la curva-patrón para las proteínas, siendo la siguiente un ejemplo de la misma:

$$(y)= 7.25(x) + 14.2$$

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

PRODUCCIÓN DE LDLox

Un paso clave en la génesis del proceso ateromatoso vascular es la oxidación de la LDL colesterol mediante los RL, esta desarrolla un papel fundamental en el inicio del proceso oxidativo e inflamatorio vascular que acontece en esta patología vascular. Por ello realizamos la determinación de LDLox en muestras plasmáticas utilizando el ELISA Kit for Oxidized Low Density Lipoprotein de USCN Life Science Inc.

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS INFLAMATORIOS

Actividad Mieloperoxidasa

El incremento de la actividad de la MPOx se ha demostrado en diversos procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al EO e inflamatorio, ambos presentes en el origen de los procesos ateroscleróticos. Un aumento de la actividad de MPOx, se relaciona de forma directa al número y actividad de leucocitos activos.

Para su determinación en plasma se utilizó el Enzyme-linked Immunosorbent assay kit for Myeloperoxidase de USCN Life Science Inc.

Producción de interleucina 6 (IL-6)

El incremento de la expresión de interleucina IL-6 se ha demostrado en procesos patológicos especialmente en aquellos con un importante desarrollo de fenómenos inflamatorios vasculares. El procesado de las muestras plasmáticas recogidas se realizó mediante kit comercial (IL-6 Elisa Kit Rat, ThermoScientific Inc.).

Producción de Moléculas de adhesión leucocitaria (VCAM-1)

La activación leucocitaria marca el inicio del proceso ateromatoso vascular. Hay diversos parámetros que determinan esta actividad, entre los cuales se encuentra la VCAM-1 (proteína de adhesión leucocitaria) que propicia la adhesión de estas células

inflamatorias al endotelio vascular. Su presencia en muestras plasmáticas se cuantificó con el Enzyme-linked Immunosorbent assay kit for VCAM-1 de USCN Life Science Inc.

Producción de peroxinitros

Esta valoración se realizó a través de la detección de 3-nitrotirosina en plasma, un producto final estable de los peroxinitros y cuyo incremento está presente en diversos procesos patológicos como los ateroscleróticos en los que existe un incremento de la presencia de RL de oxígeno y de nitrógeno. Para la determinación de la 3-nitrotirosina utilizamos el Nitrotyrosine Elisa Test Kit de Hycult biotechnology.

3.11. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS

Tras la extracción de la arteria aorta y obtener una muestra de unos dos cm de largo se fijó en formol al 10% durante 48 h en agitación suave y a temperatura ambiente, posteriormente se realizó la fijación e inclusión en parafina siguiendo un protocolo convencional para más tarde realizar los cortes con micrótopo de rotación HM 325. Los cortes se realizaron de un grosor de 7 μm y tras el desparafinado se procedió a la tinción con hematoxilina–eosina.

Una vez teñidas las muestras se realizó el estudio de la arteria midiendo el grosor, el área, el recuento de núcleos de células musculares lisas (estudio cuantitativo).

De cada muestra se estudió 10 cortes elegidos aleatoriamente de un total de 5-7 portas por muestra y 5-8 cortes por porta.

El grosor de la arteria se determinó tras obtener la medición en la posición 12, 3, 6, y 9 del radio total y del radio de la luz de la arteria y calcular la media del grosor de la pared.

$RT - RL =$ Grosor medio de la pared.

Recuento del número de núcleos: para el recuento de los núcleos se procedió a elegir aleatoriamente un cuadrante de grosor y área ya medido y proceder al recuento de núcleos de las células musculares lisas. Posteriormente se multiplicaba por el total del área.

Para el Área de la pared arterial (AP) se calculó el área total de la arteria (AT) y el área de la luz (AL). $AT - AL = AP$

Este proceso se llevó a cabo utilizando el programa informático Visilog 6.3 licenciado para el Servicio Central de Informática de la Universidad de Málaga.

TINCIÓN ARTERIAS HEMATOXILINA-EOSINA

1º DESPARAFINADO.

Tras dejar el porta con los cortes en la estufa durante 24 h a 37°C.

Sumergimos los cortes en xilol, se hará dos pases de 15 y 10 minutos cada uno, es decir tendremos dos recipientes con xilol.

2º HIDRATACIÓN

Alcohol absoluto durante 10 min

Alcohol de 96º durante 10 min

Alcohol de 70º durante 5 min

Alcohol de 50º durante 5 min

3º Lavar en agua destilada durante 2 min

4º HEMATOXILINA durante 6 minutos

5º Lavar en agua corriente durante 2 o 3 minutos

6º EOSINA durante 30 segundos

Lavar con agua corriente y pasar por agua destilada

7º DESHIDRATAR

Alcohol de 70º durante 3 min

Alcohol de 96º durante 3 min

Alcohol absoluto durante 3 min

XILOL durante 15 minutos (nota: este xilol será nuevo es decir no el que se utiliza al principio), en cuanto veamos que se pone turbio cambiar el xileno.

8º MONTAJE, dejar 24 horas aproximadamente en estufa a 37°C y observar al Microscopio óptico.

PREPARACION DE LA HEMATOXILINA-EOSINA

Para preparar 100 ml:

Para Hematoxilina de la dilución madre coger 50 ml y diluir en 50 ml de H₂O destilada

Para Eosina se pesará un gramo de la misma y de diluirá en 100 ml de H₂O destilada, cuando esté diluido añadir dos gotas de Acético glacial.

3.12. MÉTODO ESTADÍSTICO

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

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

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

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

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

4. RESULTADOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4.1. PARÁMETROS ZOOMÉTRICOS

En la Tabla 4.1. se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a los principales parámetros zoométricos obtenidos en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con HT (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

Estas variables hacen referencia al peso de los animales al final del periodo experimental, los niveles de glucemia y determinaciones básicas hematimétricas, tales como los recuentos celulares (hematíes, leucocitos y plaquetas), hemoglobina y parámetros de segundo orden como el hematocrito y el volumen plaquetario.

En términos generales se observa una obvia diferencia estadísticamente significativa en la glucemia de los animales diabéticos respecto a los no diabéticos y solo se cuantificó significancia estadística en el volumen plaquetario de los animales diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con 0.5 y 1 mg/kg/día p.o. de HT.

En las Figuras 4.1 a 4.3 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados zoométricos.

Resultados

Tabla 4.1. Valores medios (media \pm SEM) de las principales variables zoométricas cuantificadas en los grupos experimentales.

	CND	CD	HT-0.5	HT 1.0	HT-2.5	HT-5.0	HT10.0
Peso (g)	420 \pm 7	387 \pm 16	386 \pm 9	391 \pm 14	402 \pm 12	393 \pm 12	350 \pm 14
Glucemia (mg/dL)	102 \pm 3*	491 \pm 8	507 \pm 7	512 \pm 9	487 \pm 28	474 \pm 14	496 \pm 5
Hematías (X10 ¹² /L)	8.6 \pm 0.2	9.0 \pm 0.2	8.6 \pm 0.2	8.2 \pm 0.2	8.2 \pm 0.1	8.6 \pm 0.2	8.2 \pm 0.7
Leucocitos (X10 ⁶ /L)	6.1 \pm 0.3	6.4 \pm 1.9	5.9 \pm 0.5	5.3 \pm 0.4	5.4 \pm 0.6	5.0 \pm 0.3	5.1 \pm 0.6
Plaquetas (X10 ⁶ /L)	909 \pm 33	924 \pm 20	893 \pm 27	882 \pm 30	910 \pm 22	890 \pm 22	925 \pm 13
Hb (g/L)	16.0 \pm 0.4	16.7 \pm 0.5	15.8 \pm 0.3	16.3 \pm 0.3	16.6 \pm 0.2	16.7 \pm 0.3	16.4 \pm 0.5
Hematocrito (%)	46.8 \pm 1.0	46.4 \pm 1.3	44.3 \pm 0.8	45.8 \pm 0.8	48.5 \pm 0.7	48.4 \pm 0.7	45.2 \pm 1.2
Vol.plaquetario (fL)	4.9 \pm 0.1	5.9 \pm 0.1†	5.3 \pm 0.1#	5.3 \pm 0.1#	5.6 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1	5.6 \pm 0.2

*P < 0.05 respecto al resto de grupos. †P < 0.05 respecto a CND. #P < 0.05 respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)

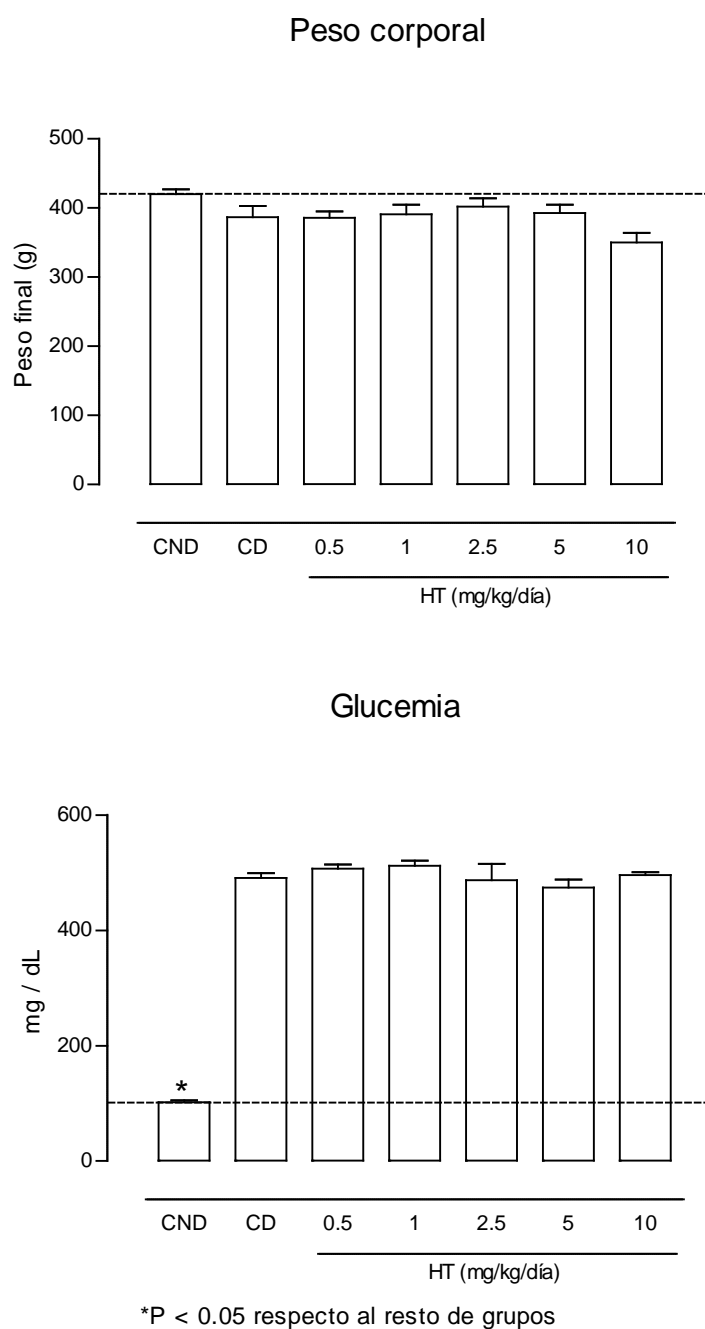


Figura 4.1. Valores medios de peso corporal y glucemia al finalizar el periodo de seguimiento.

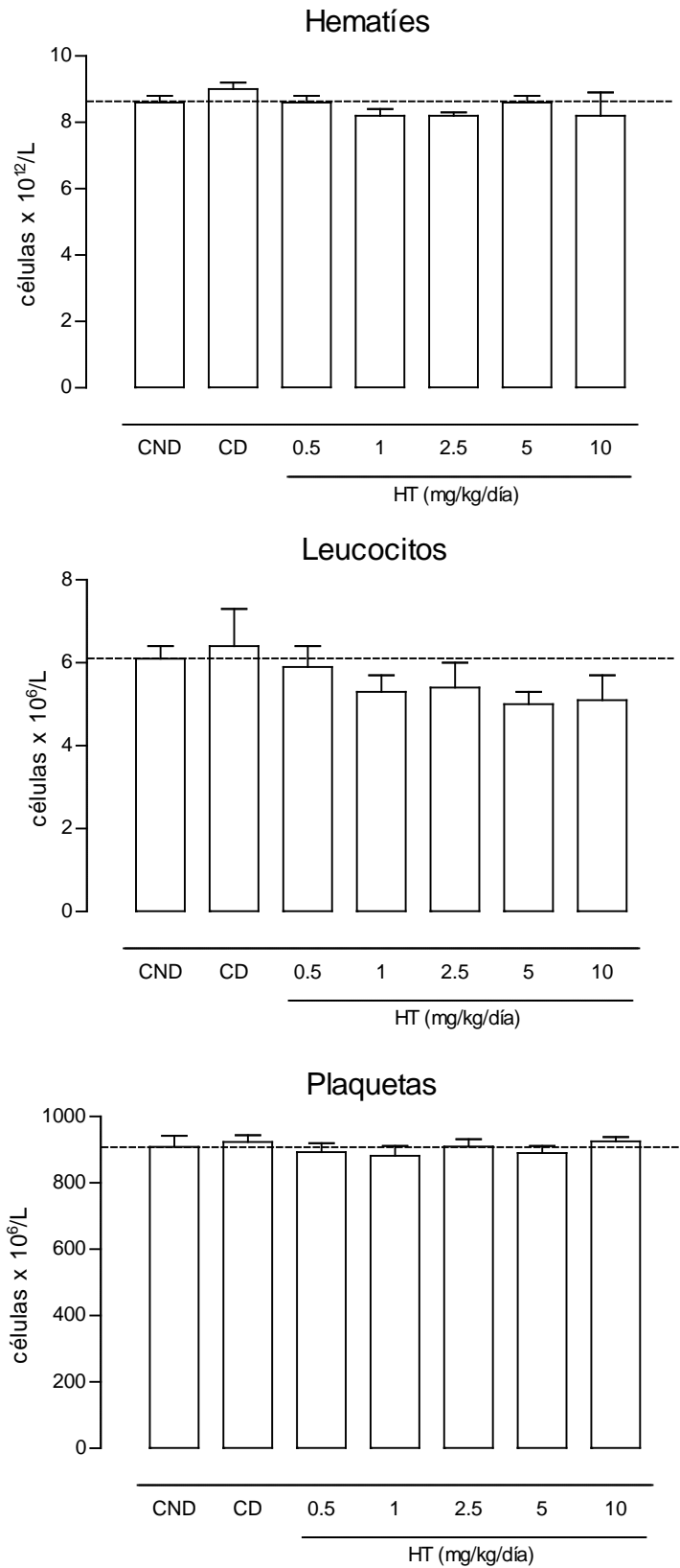


Figura 4.2. Valores medios de recuentos celulares sanguíneos al finalizar el periodo de seguimiento.

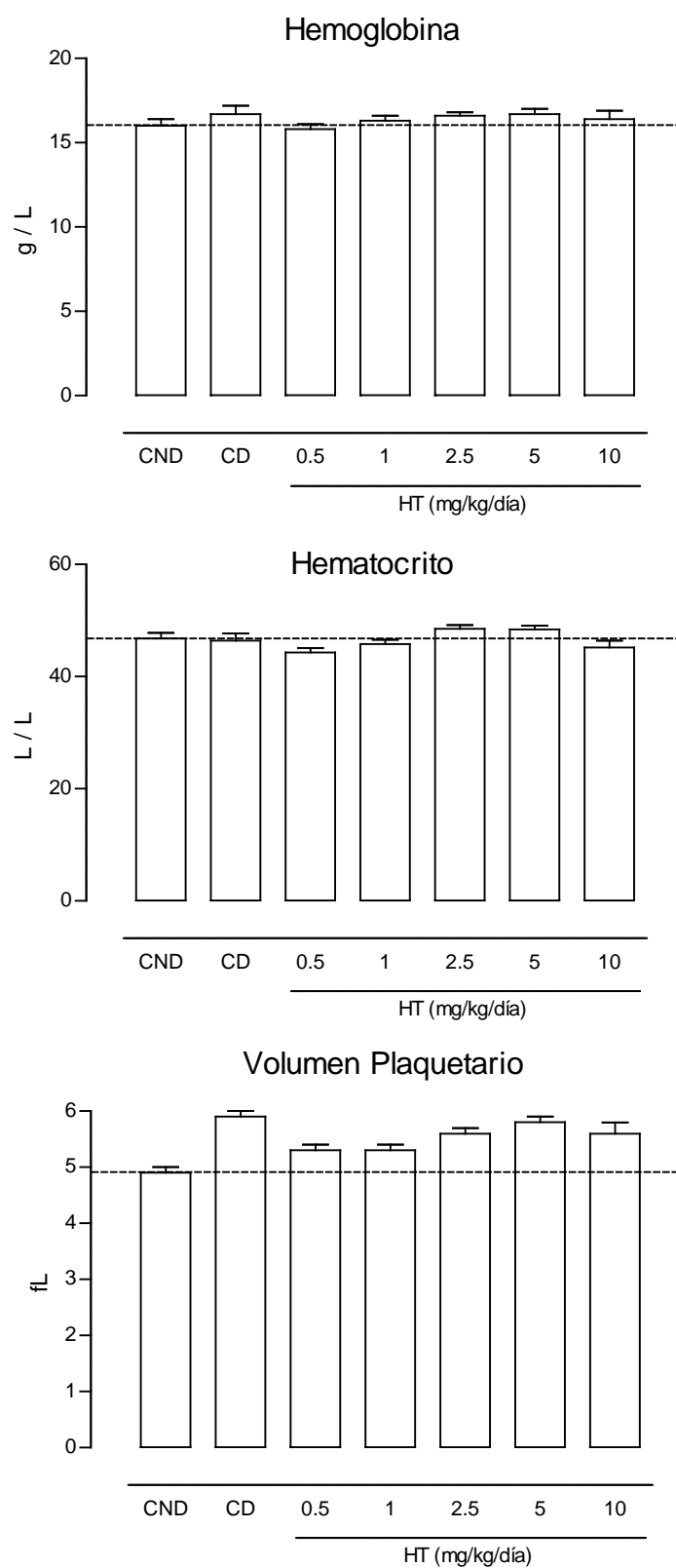


Figura 4.3. Valores medios de hematimetría al finalizar el periodo de seguimiento.

4.2. PARÁMETROS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA: AGREGACIÓN PLAQUETARIA Y PRODUCCIÓN DE TROMBOXANO

En la Tabla 4.2. se muestra los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a la intensidad máxima de agregación plaquetaria (Imax) y a la producción plaquetaria de TxB₂ en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con HT (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

En términos generales se observa un incremento estadísticamente significativo de estos parámetros en los animales diabéticos sin tratamiento. La administración de HT reduce significativamente la I_{max} y la producción de TxB₂.

En las Figuras 4.4 y 4.5 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados plaquetarios.

Tabla 4.2. Valores medios (media \pm SEM) de las principales variables plaquetarias cuantificadas en los grupos experimentales.

mg/kg/día p.o.	Imax (ohms)	TxB ₂ (pg/mL)
CND	14.50 \pm 1.36	44.72 \pm 4.03
CD	28.30 \pm 1.42*	75.81 \pm 3.46*
HT – 0.5	26.27 \pm 0.84	67.22 \pm 3.17
HT – 1	21.66 \pm 0.44††	62.19 \pm 4.00
HT – 2.5	18.60 \pm 0.85††	61.11 \pm 5.51
HT – 5	16.81 \pm 1.09††	57.03 \pm 3.91†
HT – 10	10.83 \pm 0.87††	47.01 \pm 4.67†

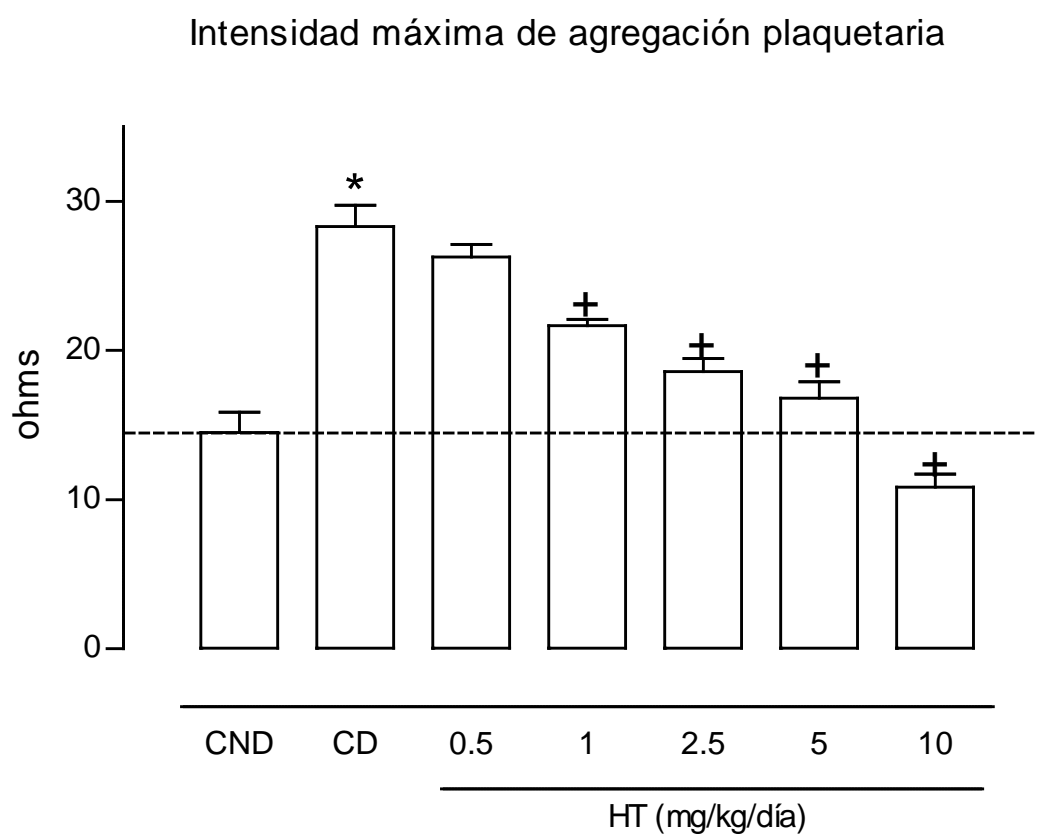
*P < 0.0001 respecto a CND. †P < 0.05, ††P < 0.0001 respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)

Tabla 4.3. Comparación estadística (análisis ANOVA) entre grupos de animales diabéticos

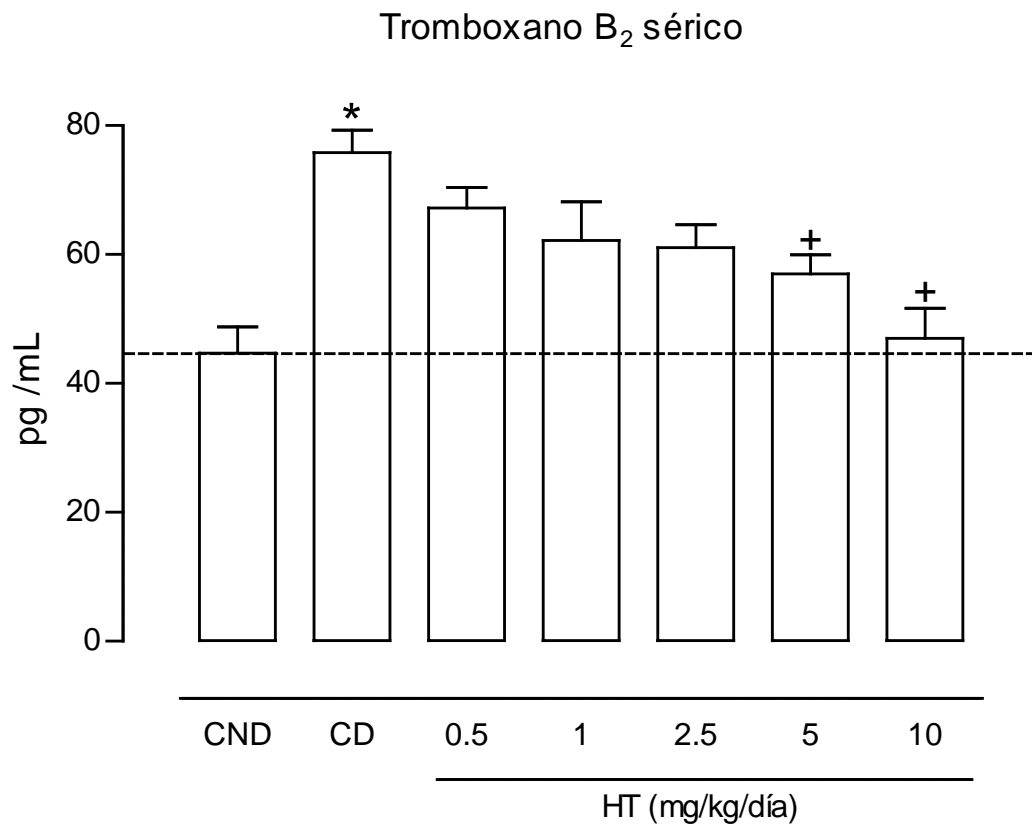
		P	
		I _{max}	TxB ₂
CD	0.5	1.000	1.000
		1	0.0001
		2.5	0.0001
		5	0.0001
		10	0.0001
HT-0.5	CD	1.000	1.000
		1	0.024
		2.5	0.0001
		5	0.0001
		10	0.0001
HT-1	CD	0.0001	0.451
		0.5	0.024
		2.5	0.517
		5	0.017
		10	0.0001
HT-2.5	CD	0.0001	0.245
		0.5	0.0001
		1	0.517
		5	1,000
		10	0.0001
HT-5	CD	0.0001	0.039
		0.5	0.0001
		1	0.017
		2.5	1,000
		10	0.007
HT-10	CD	0.0001	0.003
		0.5	0.0001
		1	0.0001
		2.5	0.0001
		5	0.007

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)



*P < 0.0001 respecto a CND. +P < 0.01 respecto a CD

Figura 4.4. Valores medios de intensidad máxima de agregación plaquetaria al finalizar el periodo de seguimiento



*P < 0.0001 respecto a CND. + P < 0.01 respecto a CD

Figura 4.5. Valores medios de concentración sérica de TxB₂ al finalizar el periodo de seguimiento

4.3. PARÁMETROS VASCULARES

En la Tabla 4.4. se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a la producción de 6-keto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$) (índice de la producción de PGI $_2$) y de nitritos+nitratos (NO $_2^-$ +NO $_3^-$) (representación de la producción de NO) en anillos aórticos, en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con HT (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

En términos generales se observa un incremento estadísticamente significativo de la producción global de NO en los animales diabéticos sin tratamiento. La administración de hidroxitirosol la reduce significativamente de forma dosis-dependiente.

En la Figura 4.6 y 4.7 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados vasculares.

Resultados

Tabla 4.4. Valores medios (media \pm SEM) de las principales variables vasculares cuantificadas en los grupos experimentales.

mg/kg/día p.o.	6-keto-PGF _{1α} (pg/mg aorta)	NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻ (nmol/mg aorta)
CND	0.896 \pm 0.131	6.59 \pm 0.49
CD	0.388 \pm 0.032*	12.04 \pm 1.30**
HT – 0.5	0.431 \pm 0.027	10.14 \pm 0.87
HT – 1	0.509 \pm 0.075	7.42 \pm 0.70††
HT – 2.5	0.861 \pm 0.065†	7.47 \pm 0.32††
HT – 5	0.817 \pm 0.080†	7.19 \pm 0.53††
HT – 10	0.642 \pm 0.096	6.46 \pm 0.24††

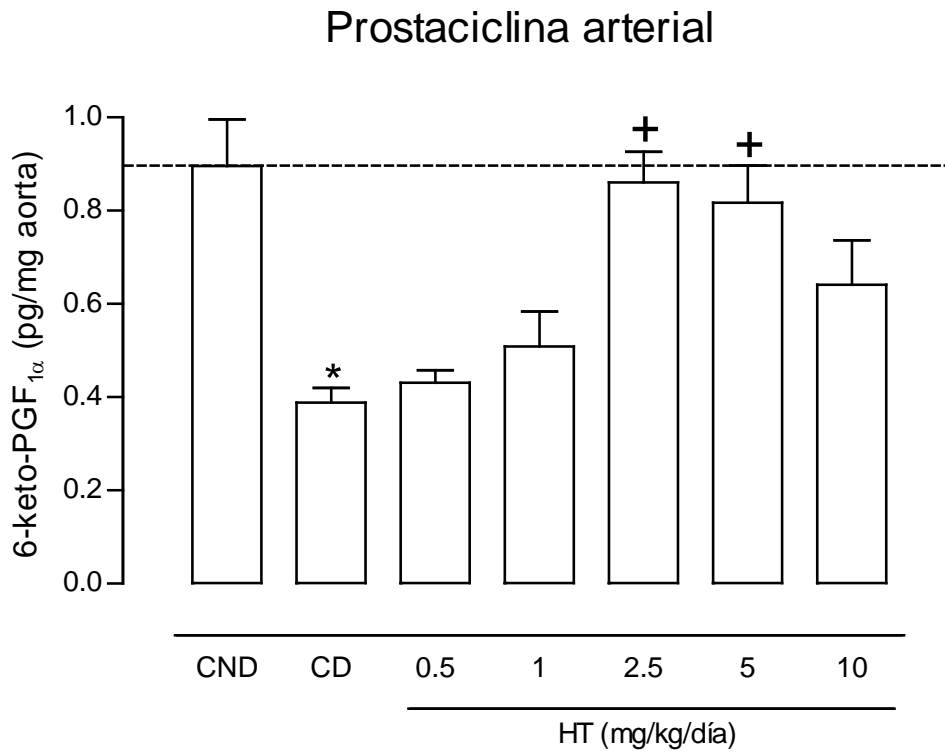
*P < 0.001, **P < 0.0001 respecto a CND. †P < 0.05, ††P < 0.001 respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)

Tabla 4.5. Comparación estadística (análisis ANOVA) entre grupos de animales diabéticos

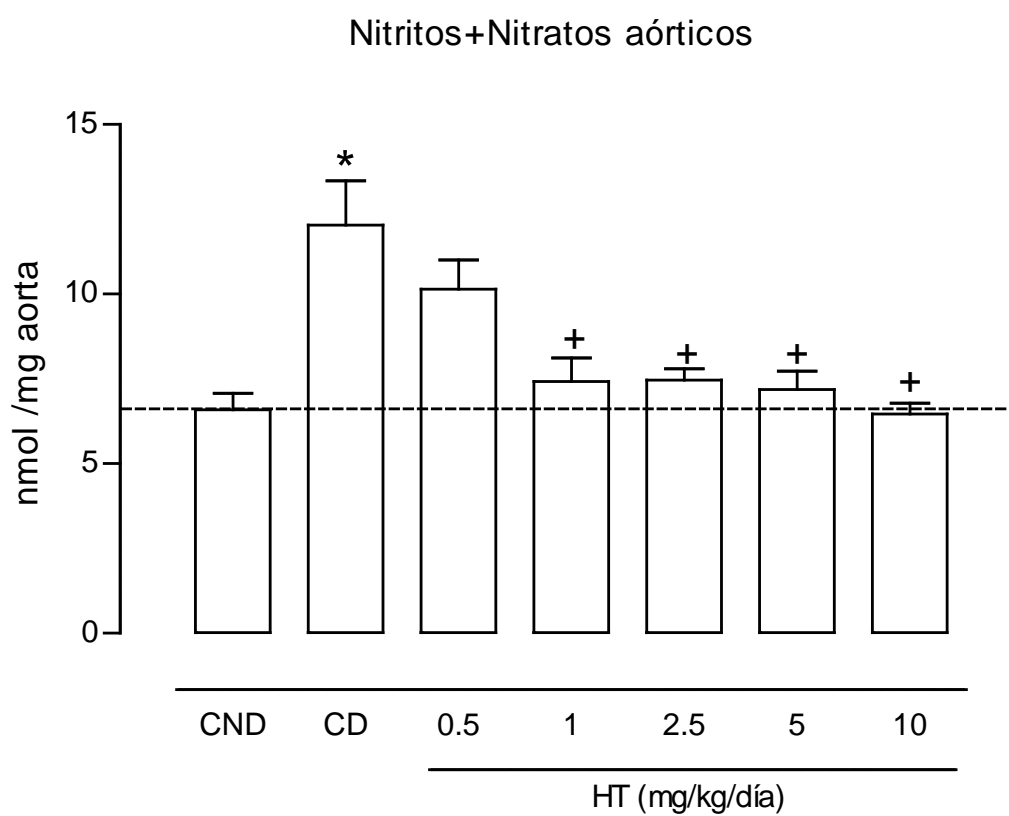
		P	
		6-keto-PGF _{1α}	NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻
CD	0.5	1.000	1.000
	1	0.001	0.003
	2.5	0.0001	0.001
	5	0.0001	0.004
	10	0.0001	0.001
HT-0.5	CD	1.000	1.000
	1	0.044	0.274
	2.5	0.0001	0.197
	5	0.0001	0.266
	10	0.0001	0.078
HT-1	CD	0.001	0.003
	0.5	0.044	0.274
	2.5	0.841	1.000
	5	0.032	1.000
	10	0.0001	1.000
HT-2.5	CD	0.0001	0.001
	0.5	0.0001	0.197
	1	0.841	1.000
	5	1.000	1.000
	10	0.0001	1.000
HT-5	CD	0.0001	0.004
	0.5	0.0001	0.266
	1	0.032	1.000
	2.5	1.000	1.000
	10	0.012	1.000
HT-10	CD	0.0001	0.001
	0.5	0.0001	0.078
	1	0.0001	1.000
	2.5	0.0001	1.000
	5	0.012	1.000

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)



*P < 0.001 respecto a CND. +P < 0.05 respecto a CD

Figura 4.6. Valores medios de 6-keto-PGF_{1α} en anillos aórticos al finalizar el periodo de seguimiento



*P < 0.0001 respecto a CND. + P < 0.001 respecto a CD

Figura 4.7. Valores medios de nitritos+nitratos en anillos aórticos al finalizar el periodo de seguimiento

4.4. LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD OXIDADA (LDLOX) Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

En la Tabla 4.6. se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a la concentración plasmática de lipoproteína de baja densidad en forma oxidada (LDLox) y de los productos de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS), en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con HT (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

En términos generales se observa un incremento estadísticamente significativo de la concentración plasmática de LDLox en los animales diabéticos, reduciéndose tras la administración de HT.

En las Figura 4.8 y 4.9 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados de LDLox y TBARS.

Tabla 4.6. Valores medios (media \pm SEM) de la concentración de lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox) cuantificada en los grupos experimentales.

mg/kg/día p.o.	LDLox (ng/mL)	TBARS (nmol/mg proteína)
CND	13.09 \pm 1.73	0.27 \pm 0.03
CD	21.86 \pm 2.07*	0.61 \pm 0.05**
HT – 0.5	14.69 \pm 0.97†	0.33 \pm 0.04††
HT – 1	14.88 \pm 1.32†	0.28 \pm 0.03††
HT – 2.5	11.58 \pm 0.79††	0.15 \pm 0.02††
HT – 5	11.78 \pm 1.06††	0.12 \pm 0.05††
HT – 10	13.58 \pm 1.03†	0.19 \pm 0.02††

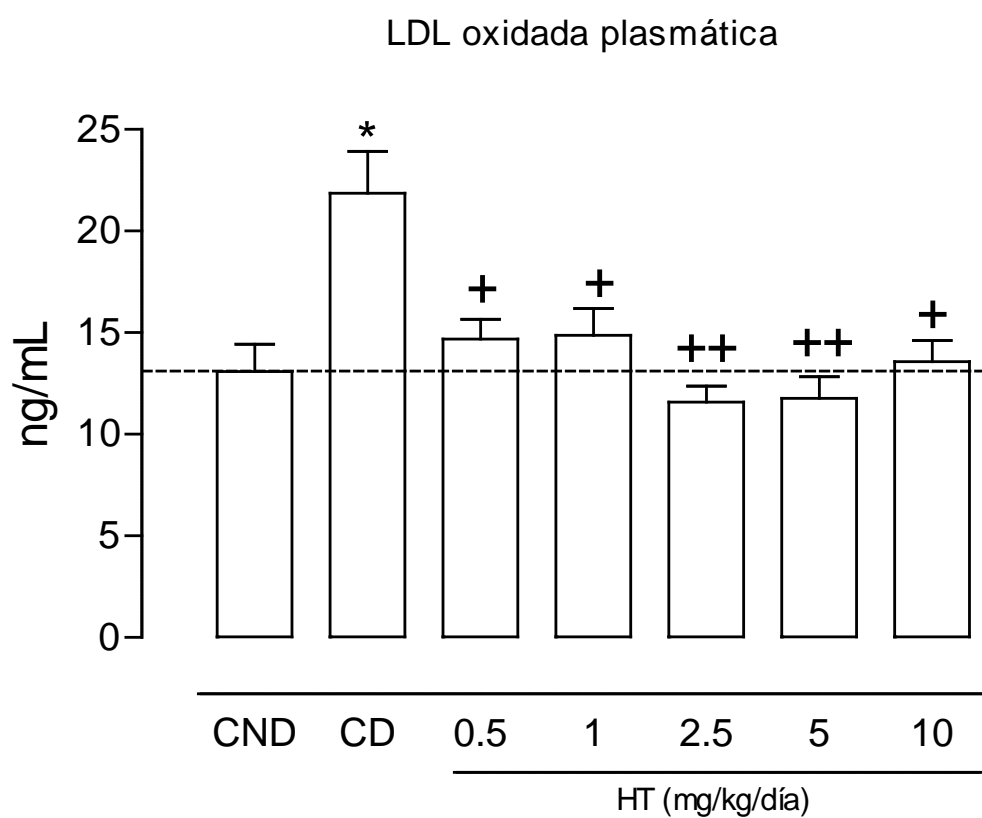
*P < 0.001, **P < 0.0001 respecto a CND. †P < 0.01, ††P < 0.0001 respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)

Tabla 4.7. Comparación estadística (análisis ANOVA) entre grupos de animales diabéticos

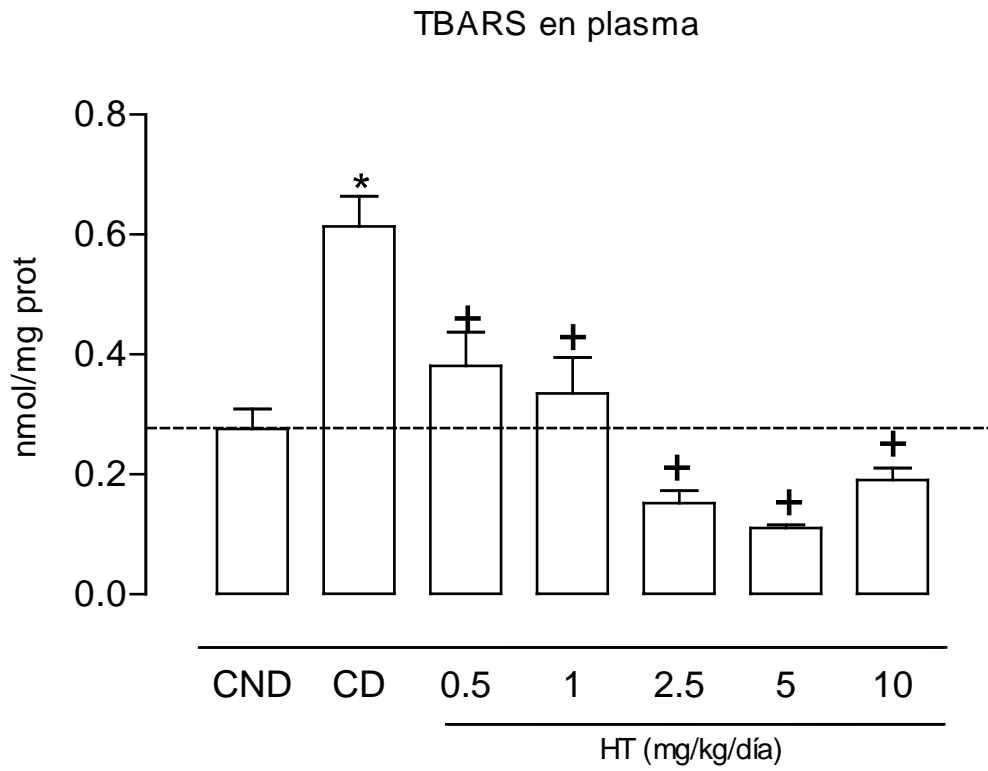
		P	
		LDLox	TBARS
CD	0.5	0.002	0.0001
	1	0.010	0.0001
	2.5	0.0001	0.0001
	5	0.0001	0.0001
	10	0.009	0.0001
HT-0.5	CD	0.002	0.0001
	1	1.000	1.000
	2.5	0.976	0.002
	5	1.000	0.0001
	10	1.000	0.291
HT-1	CD	0.010	0.0001
	0.5	1.000	1.000
	2.5	1.000	0.148
	5	1.000	0.017
	10	1.000	1.000
HT-2.5	CD	0.0001	0.0001
	0.5	0.976	0.002
	1	1.000	0.148
	5	1.000	1.000
	10	1.000	1.000
HT-5	CD	0.0001	0.0001
	0.5	1.000	0.0001
	1	1.000	0.017
	2.5	1.000	1.000
	10	1.000	1.000
HT-10	CD	0.009	0.0001
	0.5	1.000	0.291
	1	1.000	1.000
	2.5	1.000	1.000
	5	1.000	1.000

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)



*P < 0.001 respecto a CND. + P < 0.01, +++P < 0.0001 respecto a CD

Figura 4.8. Valores medios de la concentración de lipoproteína de baja densidad en forma oxidada (LDLox) al finalizar el periodo de seguimiento



*P < 0.0001 respecto a CND. + P < 0.0001 respecto a CD

Figura 4.9. Valores medios de la concentración de peróxidos lipídicos plasmáticos (TBARS) al finalizar el periodo de seguimiento

4.5. PARÁMETROS INFLAMATORIOS

En la Tabla 4.8. se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes a la concentración séricas de MPOx, VCAM-1, IL-6 y 3-nitrotirosina (representación de la concentración plasmática de peroxinitritos), en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con HT (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

En términos generales se observa un incremento estadísticamente significativo de los mediadores inflamatorios en los animales diabéticos, reduciéndose tras la administración de HT. Asimismo se aprecia que esta reducción se produce con las dosis más bajas, existiendo un menor efecto reductor con las mayores.

En las Figuras 4.10 a 4.13 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados de variables inflamatorias.

Resultados

Tabla 4.8. Valores medios (media \pm SEM) de las principales variables inflamatorias cuantificadas en los grupos experimentales.

mg/kg/día p.o.	MPOx (ng/mL)	VCAM-1 (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	3-nitrotirosina (pg/mL)
CND	4.08 \pm 0.23	0.37 \pm 0.03	12.46 \pm 0.11	0.79 \pm 0.02
CD	12.30 \pm 1.23*	1.16 \pm 0.09*	12.66 \pm 0.22	5.98 \pm 0.64*
HT – 0.5	3.10 \pm 0.20†	0.22 \pm 0.04†	11.58 \pm 0.13	3.85 \pm 0.48
HT – 1	3.69 \pm 0.35†	0.43 \pm 0.06†	12.05 \pm 0.15	2.43 \pm 0.19††
HT – 2.5	7.10 \pm 0.83†	0.48 \pm 0.06†	12.65 \pm 0.53	0.97 \pm 0.04††
HT – 5	8.59 \pm 0.77††	0.58 \pm 0.05†	13.74 \pm 1.06	2.93 \pm 0.36††
HT – 10	7.14 \pm 0.99††	0.49 \pm 0.08†	13.15 \pm 0.69	2.85 \pm 0.12††

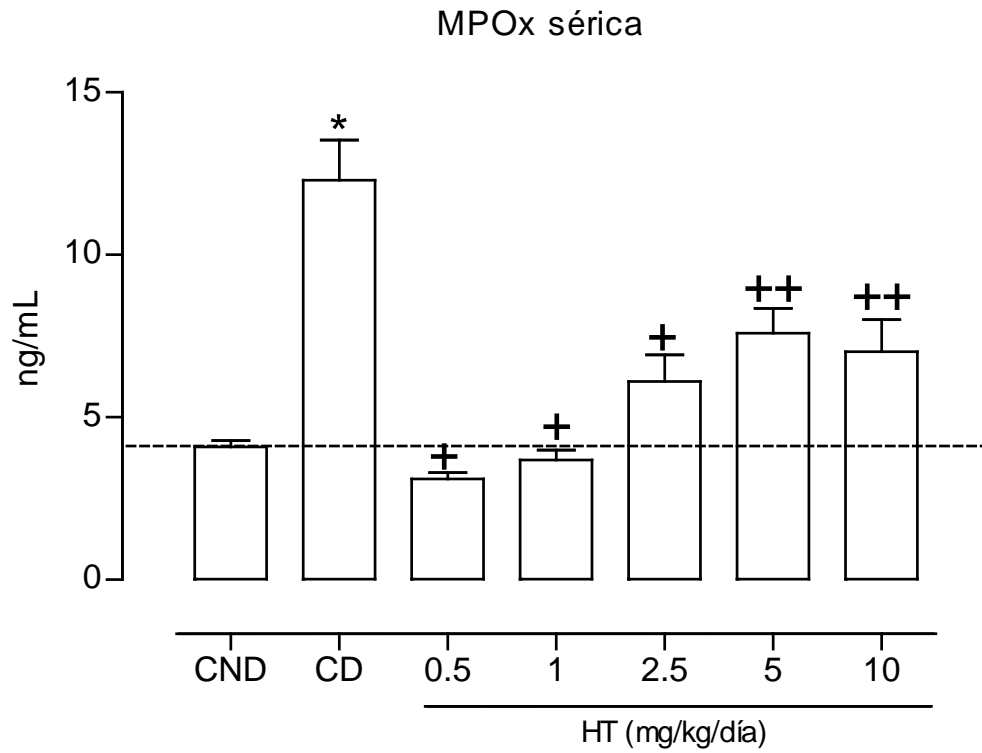
*P < 0.0001 respecto a CND. †P < 0.0001, ††P < 0.05, respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)

Tabla 4.9. Comparación estadística (análisis ANOVA) entre grupos de animales diabéticos

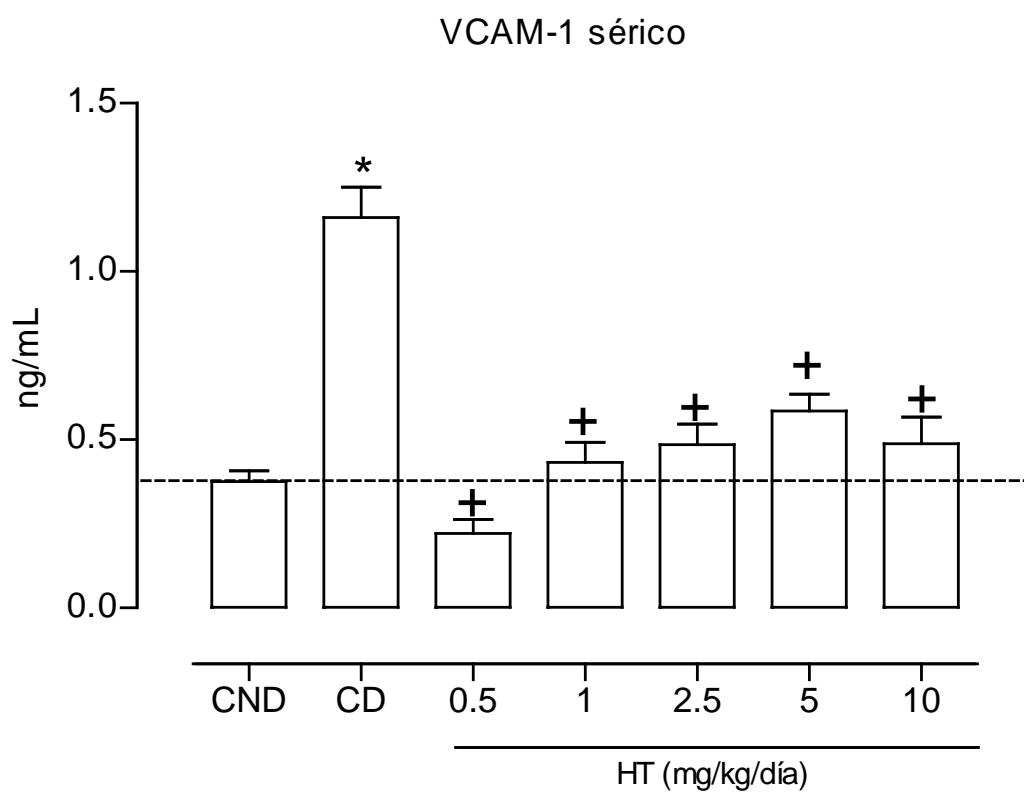
		P		
		MPOx	VCAM-1	3-nitrotirosina
CD	0.5	0.0001	0.0001	0.204
	1	0.0001	0.0001	0.002
	2.5	0.0001	0.0001	0.0001
	5	0.032	0.0001	0.011
	10	0.003	0.0001	0.064
HT-0.5	CD	0.0001	0.0001	0.204
	1	1.000	0.380	1.000
	2.5	0.111	0.043	0.027
	5	0.002	0.002	1.000
	10	0.434	0.369	1.000
HT-1	CD	0.0001	0.0001	0.002
	0.5	1.000	0.380	1.000
	2.5	0.110	1.000	1.000
	5	0.003	1.000	1.000
	10	0.394	1.000	1.000
HT-2.5	CD	0.0001	0.0001	0.0001
	0.5	0.111	0.043	0.027
	1	0.110	1.000	1.000
	5	1.000	1.000	0.419
	10	1.000	1.000	1.000
HT-5	CD	0.032	0.0001	0.011
	0.5	0.002	0.002	1.000
	1	0.003	1.000	1.000
	2.5	1.000	1.000	0.419
	10	1.000	1.000	1.000
HT-10	CD	0.003	0.0001	0.064
	0.5	0.434	0.369	1.000
	1	0.394	1.000	1.000
	2.5	1.000	1.000	1.000
	5	1.000	1.000	1.000

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)



*P < 0.0001 respecto a CND. + P < 0.0001, ++P < 0.05 respecto a CD

Figura 4.10. Valores medios de la concentración sérica de mieloperoxidasa (MPOx) al finalizar el periodo de seguimiento



*P < 0.0001 respecto a CND. + P < 0.0001 respecto a CD

Figura 4.11. Valores medios de la concentración sérica de VCAM-1 al finalizar el periodo de seguimiento

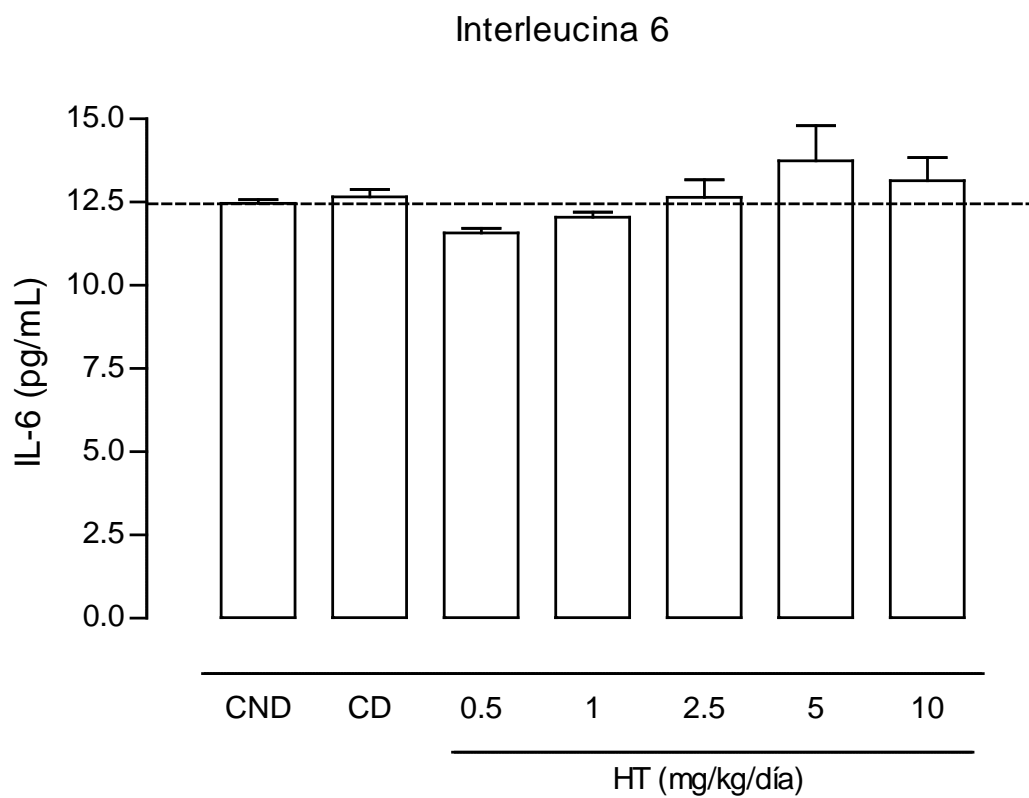
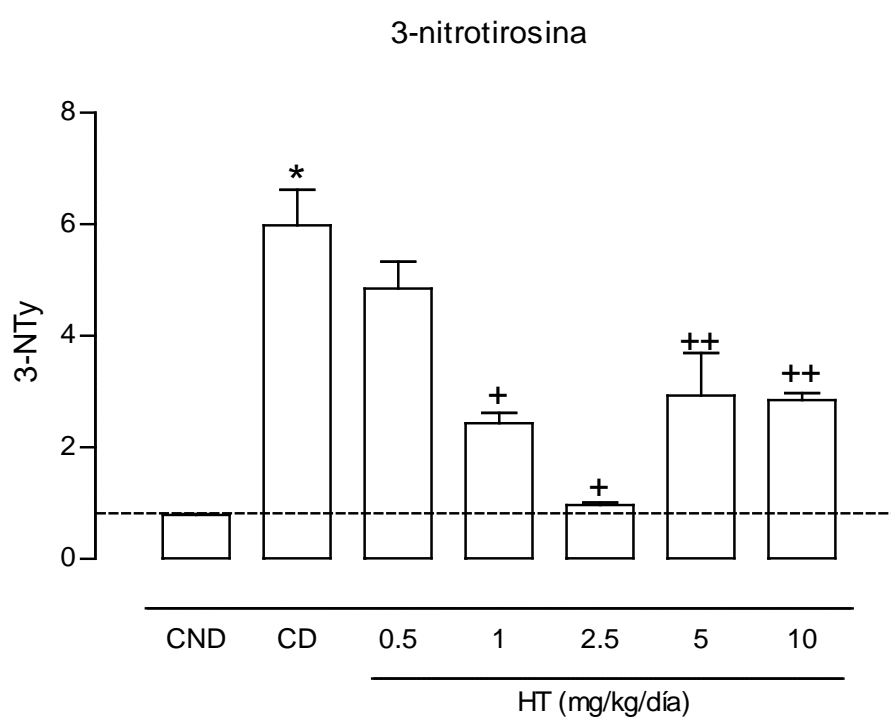


Figura 4.12. Valores medios de la concentración sérica de interleucina 6 al finalizar el periodo de seguimiento



*P < 0.0001 respecto a CND. +P < 0.0001, ++P < 0.05, respecto a CD

Figura 4.13. Valores medios de la concentración sérica de 3-nitrotirosina al finalizar el periodo de seguimiento

4.6. DETERMINACIÓN MORFOMÉTRICA EN PARED ARTERIAL

En la Tabla 4.10 se muestran los valores medios (media \pm error estándar de la media) correspondientes al área de la superficie de la pared de la aorta torácica y a la densidad celular (núcleos/mm²), en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con HT (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

Se cuantificó un incremento del área total así como de la densidad de células, en los cortes de pared aórtica en los animales diabéticos, respecto a los normoglucémicos. La administración de HT redujo significativamente ambas variables morfométricas.

En la Figura 4.14 y 4.15 se representan gráficamente, en forma de histograma, la determinación morfométrica de la pared arterial.

En la Figura 4.16 muestra algunos ejemplos de preparaciones histológicas de los grupos de animales integrantes del estudio.

Tabla 4.10. Valores medios (media \pm SEM) del área de la pared de la aorta torácica cuantificada en los grupos experimentales.

mg/kg/día p.o.	Area (mm²)	Densidad celular (n/mm²)
CND	0.654 \pm 0.0196	1028 \pm 54
CD	0.776 \pm 0.0188*	1637 \pm 112**
HT – 0.5	0.477 \pm 0.0102††	1161 \pm 37††
HT – 1	0.486 \pm 0.0134††	1100 \pm 16††
HT – 2.5	0.554 \pm 0.0103††	1302 \pm 50†
HT – 5	0.572 \pm 0.0138†	1278 \pm 48†
HT – 10	0.657 \pm 0.0165	1205 \pm 53†

*P = 0.015, **P < 0.0001 respecto a CND. †P < 0.05, ††P < 0.0001 respecto a CD.

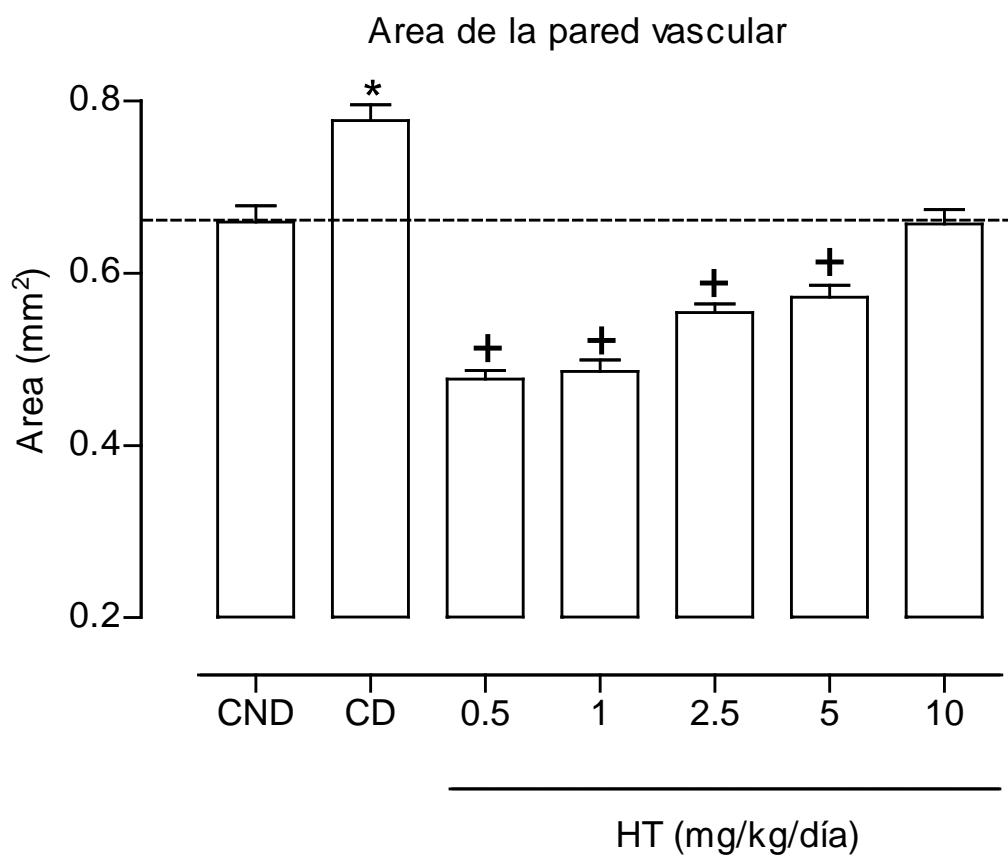
CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)

Tabla 4.11. Comparación estadística (análisis ANOVA) entre grupos de animales diabéticos

		P	
		Area	Densidad celular
CD	0.5	0.0001	0.002
	1	0.0001	0.040
	2.5	0.0001	0.0001
	5	0.002	0.004
	10	1.000	
HT-0.5	CD	0.0001	0.002
	1	1.000	1.000
	2.5	1.000	1.000
	5	0.948	1.000
	10	0.0001	
HT-1	CD	0.0001	0.040
	0.5	1.000	1.000
	2.5	1.000	0.649
	5	1.000	1.000
	10	0.001	
HT-2.5	CD	0.0001	0.0001
	0.5	1.000	1.000
	1	1.000	0.649
	5	1.000	1.000
	10	0.006	
HT-5	CD	0.002	0.004
	0.5	0.948	1.000
	1	1.000	1.000
	2.5	1.000	1.000
	10	0.034	
HT-10	CD	1.000	0.0001
	0.5	0.0001	1.000
	1	0.001	1.000
	2.5	0.006	1.000
	5	0.034	1.000

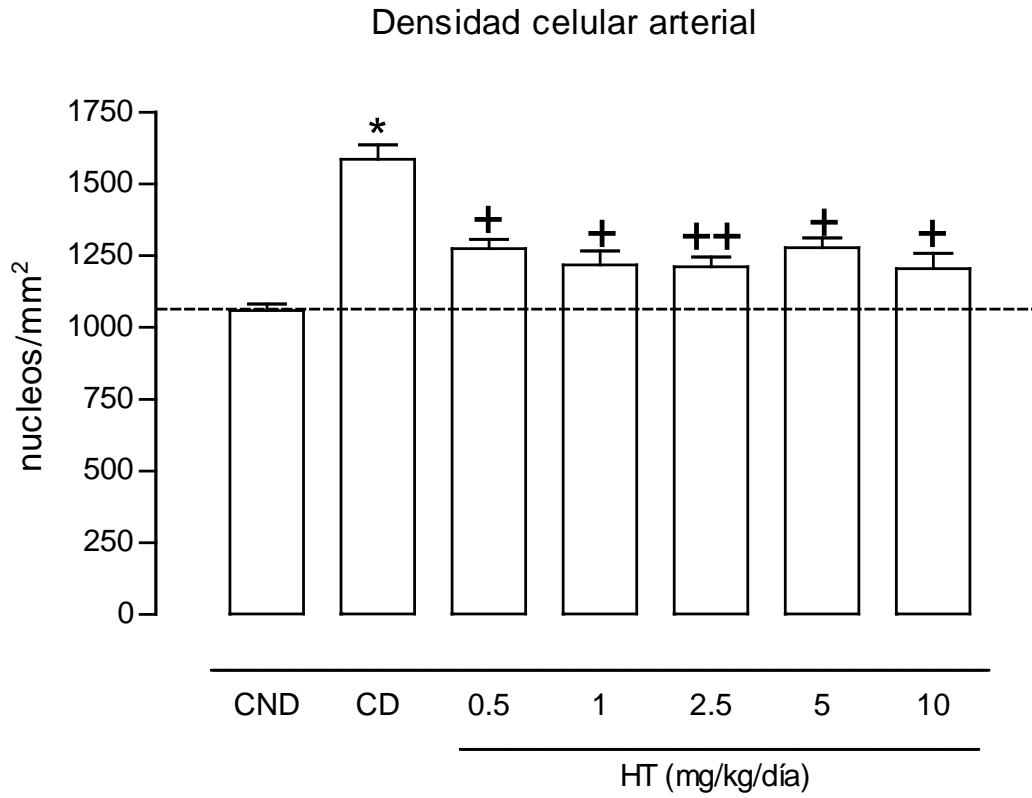
CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)

Figura 4.14. Valores medios del área de la pared arterial (aorta torácica) al finalizar el periodo de seguimiento

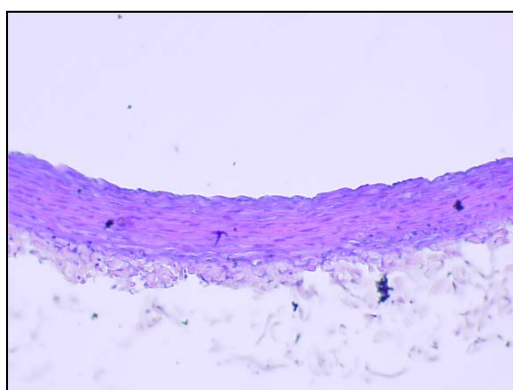


* $p = 0.015$ respecto a CND. + $p < 0.0001$ respecto a CD

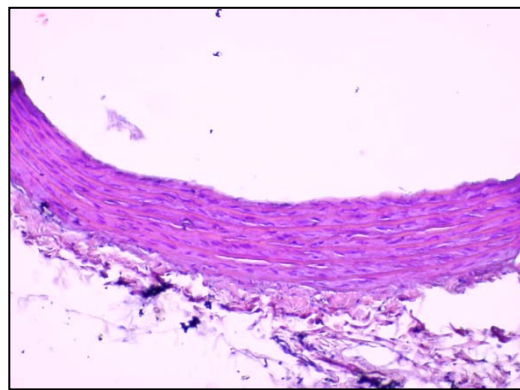
Figura 4.15. Valores medios de densidad celular arterial (aorta torácica) al finalizar el periodo de seguimiento



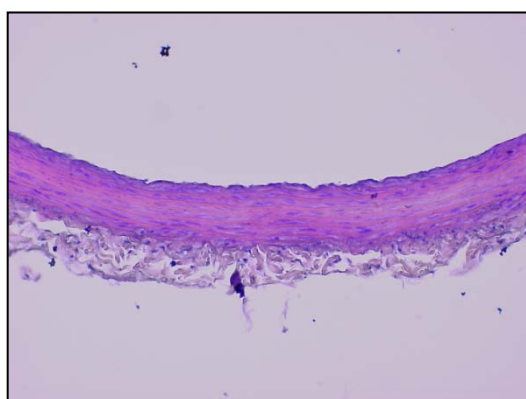
* $p < 0.0001$ respecto a CD. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.0001$ respecto a CD



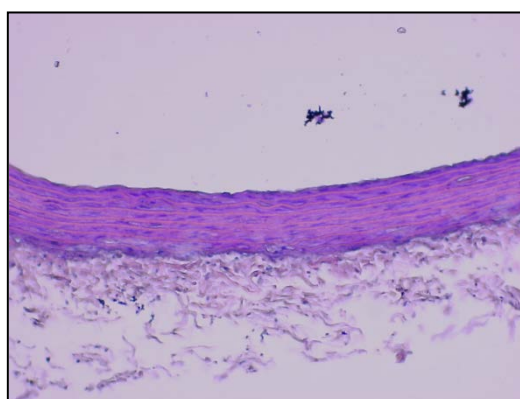
Control no diabético



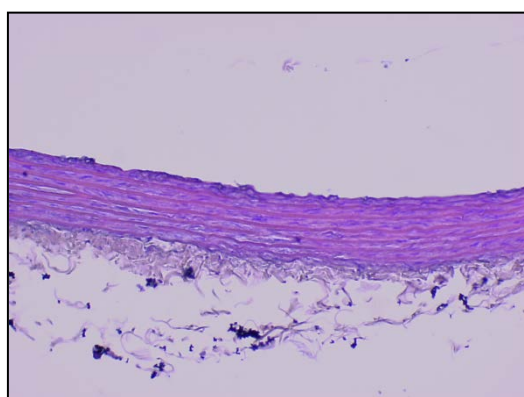
Control diabético



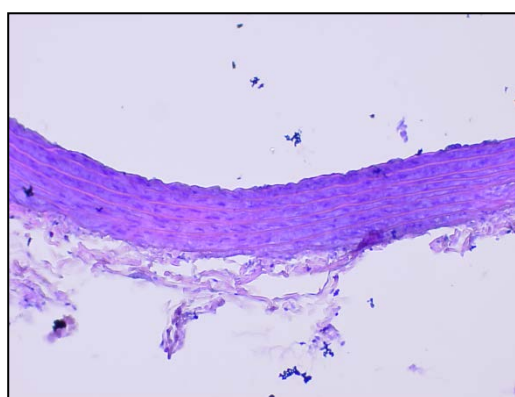
HT 0.5 mg/kg/día



HT 1 mg/kg/día



HT 2.5 mg/kg/día



HT 10 mg/kg/día

Figura 4.16. Ejemplos de cortes histológicos de aorta torácica al finalizar el periodo de seguimiento.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. DISCUSIÓN





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La enfermedad cardiovascular es considerada como un proceso en el que se puede apreciar un tronco común (enfermedad inflamatoria vascular) y diversas ramas terminales (isquemia tisular: cardiaca, cerebral, etc.). Este tipo de vía fisiopatológica conduce al conocimiento y descubrimiento de mecanismos bioquímicos, celulares y funcionales bastantes comunes a todos los procesos finales de daño isquémico así como al propio origen vascular de la isquemia.

La alteración de la bioquímica endotelial, la activación de las vías inflamatorias vasculares, junto a un claro estrés oxidativo, la disfunción del endotelio y el consiguiente estímulo del funcionalismo plaquetario, son el origen de una disminución del flujo sanguíneo tisular y por ende, del proceso isquémico. Por todo ello, una de las vías de investigación en la prevención de estos eventos tiene por finalidad estudiar moléculas que pudieran actuar sobre todo el proceso: desde la disfunción endotelial hasta el daño celular postisquémico. No obstante, una intervención sobre los primeros pasos de todo este proceso podría ser el punto clave para detener o retrasar todo el desarrollo fisiopatológico posterior.

Debido a la importancia que el estrés oxidativo tiene en ese inicio de la enfermedad vascular, los antioxidantes pueden ser un grupo de moléculas candidatas a cumplir el objetivo antes citado. En este sentido, hidroxitirosol ha mostrado una capacidad antioxidante evidente, así como diversos efectos beneficiosos sobre vías bioquímicas que intervienen en la enfermedad cardiovascular (Covas et al., 2015).

La principal aportación *a priori* de nuestro estudio es la valoración de estas vías en la Diabetes Mellitus, así como el análisis del comportamiento de hidroxitirosol en este

escenario. Por ello, analizaremos en primer lugar las modificaciones de las variables cuantificadas en el modelo de diabetes experimental y posteriormente el efecto de hidroxitirosol.

5.1. MODIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES VASCULARES EN EL MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL

En términos generales, los animales diabéticos mostraron un perfil bioquímico compatible con un claro “estrés vascular bioquímico”, que conformaría un estado de “inflamación vascular”, base de todo el proceso isquémico acontecido en las complicaciones de la Diabetes Mellitus. En la siguiente tabla (Tabla 5.1.) comparamos los resultados obtenidos en los animales normoglucémicos con los diabéticos:

Variable	Animales normoglucémicos	Animales diabéticos
Imax (ohms)	14.50 ± 1.36	28.30 ± 1.42***
TxB₂ (pg/mL)	44.72 ± 4.03	75.81 ± 3.46***
6-keto-PGF_{1α} (pg/mg aorta)	0.89 ± 0.12	0.39 ± 0.03**
NO₂⁻+NO₃⁻ (nmol/mg aorta)	6.59 ± 0.49	12.04 ± 1.30***
LDLox (ng/mL)	13.09 ± 1.73	21.86 ± 2.07**
TBARS (nmol/mg prot)	0.27 ± 0.03	0.61 ± 0.05***
MPOx (ng/mL)	4.08 ± 0.23	12.30 ± 1.23***
VCAM-1 (ng/mL)	0.37 ± 0.03	1.16 ± 0.09***
IL-6 (pg/mL)	12.46 ± 0.11	12.66 ± 0.22
3-nitrotirosina (pg/mL)	0.79 ± 0.02	5.98 ± 0.64***
Area pared vascular (mm²)	0.654 ± 0.02	0.776 ± 0.02*
Densidad celular vascular (núcleos/mm²)	1028 ± 54	1637 ± 112***

*P < 0.01, **P < 0.001, ***P < 0.0001, respecto a los valores de los animales normoglucémicos

Como se puede observar en esta tabla, los animales diabéticos presentan un perfil en relación con el sistema vascular, compatible con un estado de “daño bioquímico” caracterizado por un estrés oxidativo con signos de déficit endotelial y estado proinflamatorio, con un inicio de daño morfológico vascular, lo cual se acompaña de una hipersensibilidad plaquetaria. Estas alteraciones confirman las investigaciones que han sido la base del establecimiento de un esquema, más o menos definitivo, de lo que acontece en la pared vascular en los estadios primarios de lo que podría evolucionar hacia una vasculopatía diabético y una isquemia tisular posterior (de Zeeuw, Wong, & Carmeliet, 2015; Ladeia, Sampaio, Hita, & Adan, 2014; Roberts & Porter, 2013). De forma resumida, el citado esquema fisiopatológico se iniciaría con un estado de hiperglucemia mantenida que originaría una activación del sistema de NADPH oxidasa y por ende una formación excesiva de radicales libres, los cuales iniciarían la expresión de moléculas adhesivas y proinflamatorias, así como una activación de la adhesión y penetración de leucocitos en la pared arterial; la entrada paralela de colesterol LDL, junto a la formación de mediadores inflamatorios y de radicales libres, induce a la oxidación de dicha lipoproteína, formándose LDL oxidada; ésta, junto a los propios mediadores inflamatorios, producen un doble efecto: de una parte, hacia el espesor de la pared arterial inducen la proliferación de células de la capa muscular arterial (Komolafe, Adeyemi, Adewole, Obuotor, & Abiodun, 2009) y, de otra, hacia el endotelio, originan un déficit del funcionalismo normal endotelial, destacando una disminución de su actividad antitrombótica, lo cual se une a la estimulación plaquetaria que se produce asimismo por una hiperglucemia mantenida. De esta forma, la pared arterial en su conjunto se convierte en un elemento susceptible de iniciar un proceso isquémico-trombótico que configure una vasculopatía diabética manifiesta (Fig. 5.1.).

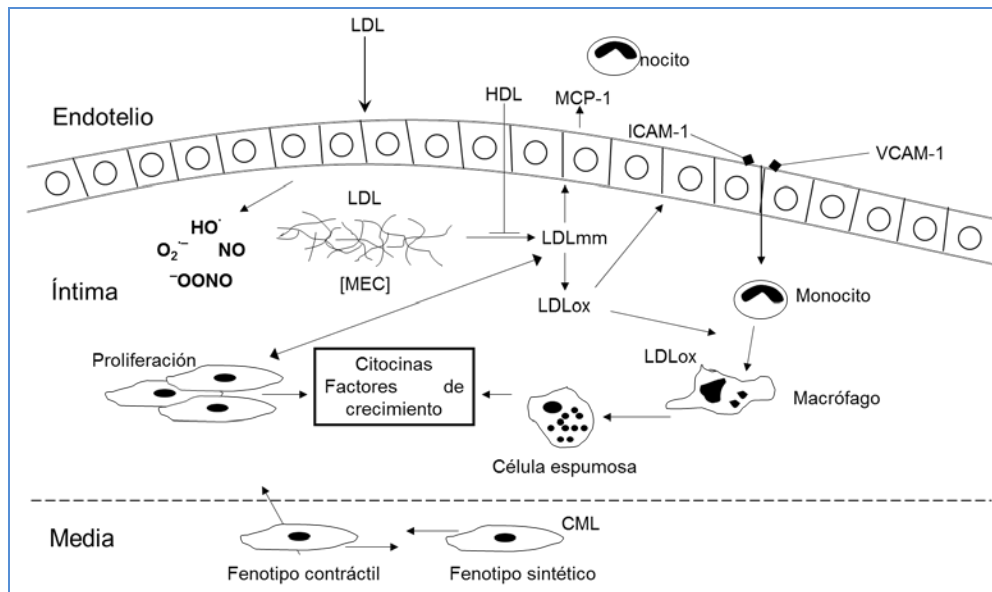


Fig. 5.1. Esquema de las principales vías de daño vascular en la Diabetes Mellitus

Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman la mayor parte de estas alteraciones, si bien destacamos dos excepciones:

- Debido a la disfunción endotelial acaecida en las fases iniciales de la vasculopatía diabética, cabría esperar un déficit de las vías antitrombóticas endoteliales, es decir, PGI_2 y óxido nítrico. El prostanoide vasodilatador PGI_2 se encuentra disminuido en los animales diabéticos, pero no así el óxido nítrico. Se ha demostrado que en la Diabetes Mellitus se produce un desacoplamiento de la enzima eNOS (vía constitutiva de síntesis de óxido nítrico), lo cual originaría una disminución en la producción y biodisponibilidad de dicho mediador (Cai, Khoo, Mussa, Alp, & Channon, 2005). Sin embargo, debido a la presencia de mediadores inflamatorios y de radicales libres, también se ha descrito un incremento en la expresión y función iNOS (vía inducida de la formación de

(óxido nítrico), lo cual originaría, en presencia de aniones superóxidos, un exceso de formación de radicales peroxinitritos (Di Pietro et al., 2013), hecho que demostramos mediante un incremento de la 3-nitrotirosina, los cuales son altamente reactivos y citotóxicos. Este mismo patrón de comportamiento se ha demostrado también en tejido cerebral de animales sometidos a un estrés oxidativo hipóxico (De La Cruz et al., 2015).

- En segundo lugar, la vasculopatía diabética se inicia con un estado de inflamación vascular, hecho admitido ampliamente en la literatura (Angeli et al., 2015). Entre las citoquinas descritas a este nivel destacan la 1 β , 6, 12, 17 y TNF α , así como otros mediadores tales como mieloperoxidasa (MPOx) o proteínas adhesivas tipo ICAM o VCAM (Carbone & Montecucco, 2015). En nuestro estudio hemos detectado un incremento de MPOx, VCAM-1 y 3-nitrotirosina (índice indirecto de un estado proinflamatorio), pero no hemos cuantificado variaciones significativas en los niveles de IL-6. Posiblemente en este modelo experimental, a diferencia de la enfermedad arterial humana, la IL-6 no sea un marcador definitorio.

Por lo tanto, en términos generales, el modelo experimental utilizado en nuestro estudio representa un estado de inflamación vascular con disfunción endotelial y signos morfológicos de vasculopatía inicial. En trabajos previos se ha demostrado que tiempos más largos de evolución de la diabetes experimental producen un claro cuadro de isquemia tisular, como es el caso de una retinopatía diabética isquémica (De La Cruz et al., 2012).

5.2. MODIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES VASCULARES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL

En primer lugar es necesario acotar el efecto observado tras la administración de hidroxitirosol al propio compuesto y no a un posible efecto directo sobre los niveles de glucosa en sangre, ya que es conocido que el control de la glucemia es un elemento clave para frenar las complicaciones de la Diabetes Mellitus. Por otra parte, algunos estudios han de mostrado que este polifenol podría mejorar el perfil glucémico en distintos modelos experimentales de diabetes (Cao et al., 2014; Jemai et al., 2009). Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que ninguna de las dosis de hidroxitirosol utilizadas modifica los niveles de glucosa en sangre tras dos meses de tratamiento (Tabla 4.1. y Figura 4.1.). En los estudios en los que se postula un posible efecto antidiabético de hidroxitirosol, los animales mostraron niveles plasmáticos de glucosa alrededor de 280-300 mg/dL mientras que en nuestro estudio éstos alcanzaron valores de 470-507 mg/dL. Posiblemente estas cifras tan altas puedan ser un hándicap para ejercer un efecto reductor de la glucosa circulante. Por lo tanto, sin descartar un posible efecto reductor de la glucemia, en nuestro estudio no se puede adjudicar una responsabilidad a este mecanismo en la interpretación global de los efectos de hidroxitirosol sobre los biomarcadores analizados.

En términos generales podemos aseverar que la administración preventiva de hidroxitirosol modifica todas las fases de la vasculopatía diabética, si bien con algunos matices y diferencias que analizaremos posteriormente. Para ello dividiremos la evolución de las complicaciones vasculares de la diabetes en cuatro fases, teniendo en

cuenta que esta estratificación se realiza solo con una función didáctica, ya que todos los mecanismos van imbricándose entre sí desde el inicio del proceso.

Fase inicial: comienzo de las alteraciones bioquímicas vasculares

Como ya indicamos anteriormente, el proceso de la vasculopatía diabética se asemeja bastante al de la enfermedad vascular arteriosclerótica, sobre todo en lo que se refiere a la macroangiopatía. En este caso, una hiperglucemia mantenida comienza a alterar los mecanismos de defensa vascular, originando un acercamiento de los leucocitos al endotelio, causado fundamentalmente por una expresión de moléculas adhesivas (familia de las ICAM y VCAM) (Stulc, Ceska, Marinov, & Skrha, 2012). Asimismo niveles altos de glucosa originan un estado de estrés oxidativo intraendotelial, a través de una estimulación de la NADPH oxidasa, que se suma a la aparición de un estrés oxidativo general (Jansen et al., 2013; Shaw, Doherty, Mutch, MacRury, & Megson, 2014).

Ya hemos analizado la ausencia de efecto de hidroxitirosol sobre los niveles de glucosa en sangre, por lo que descartamos una posible influencia a nivel del estímulo de todo el proceso de daño vascular. Sin embargo, hidroxitirosol reduce el estrés oxidativo y la activación leucocitaria, como podemos comprobar mediante la disminución de la concentración de TBARS (Tabla 4.6., Figura 4.9) y de algunos biomarcadores relacionados con la función leucocitaria, tales como la mieloperoxidasa (MPOx) (Tabla 4.8., Figura 4.10.) y la proteína adhesiva VCAM-1 (Tabla 4.8., Figura 4.11.).

El efecto antioxidante de hidroxitirosol ha sido ampliamente descrito en la bibliografía, tanto en modelos químicos como en biológicos (véase revisiones de Granados-Principal, Quiles, Ramirez-Tortosa, Sanchez-Rovira, & Ramirez-Tortosa, 2010b; Raederstorff, 2009). Asimismo, en estudios previos de nuestro grupo se ha descrito una ausencia de efecto antioxidante en tejido cerebral de rata sin inducción, mientras que este efecto se observó tras estimulación del estrés oxidativo de forma química o mediante un modelo de hipoxia-reoxigenación cerebral (Cabrerizo et al., 2013; Guerrero et al., 2012). En el modelo de diabetes experimental se observa una mayor concentración de peróxidos lipídicos que en los animales no diabético, por lo que se considera un modelo de estimulación y por ello el hidroxitirosol muestra un claro efecto antiperoxidativo lipídico.

Si consideramos la formación de estrés oxidativo el centro y uno de los pasos iniciales de la vasculopatía diabética, el hecho de inhibir su formación es un punto importante para explicar el efecto beneficioso de hidroxitirosol en la disfunción endotelial y en el propio desarrollo posterior de la vasculopatía (Storniolo, Roselló-Catafau, Pintó, Mitjavila, & Moreno, 2014). Pero además, nuestro estudio demuestra que en el modelo de diabetes experimental, la administración preventiva de hidroxitirosol también modifica algunos parámetros representativos de activación leucocitaria, de importancia en las fases iniciales de la vasculopatía (Stulc et al., 2012).

La expresión y formación endotelial de proteínas adhesivas, como la VCAM-1, es fundamental para explicar la primera fase de “acercamiento” e interacción de los leucocitos con el endotelio para posteriormente comenzar el complejo bioquímico inflamatorio vascular. Como hemos comentado anteriormente, la concentración sérica de

VCAM-1 es significativamente superior en los animales diabéticos que en los normoglucémicos. La administración preventiva de hidroxitirosol redujo significativamente esta variable, llegando a normalizar sus niveles, ya que alcanzaron valores alrededor de los obtenidos en los animales no diabéticos. Este efecto ha sido previamente descrito en la bibliografía en experimentos *in vitro* en cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano inducidas con homocisteína o TNF α (Carluccio et al., 2007; Catalán et al., 2015; Dell’Agli et al., 2006). Es estos casos se postula que hidroxitirosol regula a la baja al factor nuclear NF κ B, disminuyendo de esta forma la expresión de esta proteína adhesiva. Nuestro trabajo demuestra que en un modelo *in vivo* de Diabetes Mellitus, la administración preventiva de hidroxitirosol disminuye la producción de VCAM-1, posiblemente por su efecto regulador nuclear, si bien esta aseveración requiere un trabajo de investigación adicional.

Pero no solo hidroxitirosol disminuye la formación de proteínas que atraen leucocitos hacia el endotelio vascular, sino que también reduce de forma general la actividad de dichos leucocitos, como se puede observar al determinar una disminución de la concentración de MPOx, como índice inespecífico de activación leucocitaria. Algunos trabajos apuntan de forma indirecta hacia estos resultados, ya que la administración a ratas de *Lippia citriodora* aporta hidroxitirosol, entre otros polifenoles, observándose una reducción de casi un 75% en los niveles de MPOx en neutrófilos circulantes (Quirantes-Piné et al., 2013). Respecto a estudios con hidroxitirosol como tal, se ha demostrado un descenso de MPOx en pared intestinal de ratones a los que se ha producido un estado de enfermedad inflamatoria intestinal con sulfato sódico dextrano (DSS) (Sánchez-Fidalgo et al., 2015).

Ambas variables, tal y como indicamos anteriormente, se imbrican en las primeras fases de la vasculopatía diabética, aunque también son índices del proceso de inflamación vascular, que analizaremos posteriormente. Sea como sea, la administración de hidroxitirosol reduce la activación endotelial para atraer leucocitos así como la propia actividad leucocitaria. La inhibición del estrés oxidativo posiblemente reduzca la estimulación de los radicales libres sobre los factores nucleares (tipo NfκB) que regulan la formación de proteínas adhesivas (tipo VCAM-1). Es decir, la administración preventiva de hidroxitirosol frena la fase inicial de las alteraciones vasculares en el modelo experimental de diabetes utilizado en el presente estudio.

Fase de inflamación vascular: propagación y autoalimentación de las alteraciones bioquímicas vasculares

En esta fase consideramos los fenómenos de entrada de leucocitos al espesor de la pared arterial, así como de las moléculas de LDL. Esto, junto al mantenimiento del estrés oxidativo, origina dos hechos fundamentales: la oxidación de las LDL y la aparición de mediadores inflamatorios en la pared vascular, los cuales establecen un círculo vicioso de inflamación-estrés oxidativo-inflamación, que abocará a la siguiente fase de daño funcional y morfológico vascular.

En términos generales, la administración preventiva de hidroxitirosol reduce la concentración de LDL oxidada (Tabla 4.6. y Figura 4.8.) y de 3-nitrotirosina (Tabla 4.8. y Figura 4.13), pero no modifica la de IL-6 (Tabla 4.8. y Figura 4.12.), la cual no se modificó en los animales diabéticos sin tratamiento. Asimismo, como indicamos anteriormente, el efecto observado en la VCAM-1 y en la MPOx podría también

incluirse dentro del efecto antiinflamatorio de hidroxitirosol, además de considerarlo en la fase inicial de daño bioquímico vascular.

En todos estos efectos, la inhibición del estrés oxidativo juega un papel fundamental en el esquema de acción de hidroxitirosol, ya que la formación de radicales libres condiciona la síntesis y activación de elementos inflamatorios, tales como VCAM-1, MPOx, IL, radicales peroxinitritos, además de ser responsables de la oxidación de la LDL (Angeli et al., 2015). En el modelo experimental utilizado en nuestro estudio se puede comprobar esta relación al observar el perfil de comportamiento de los grupos de animales respecto a estas variables. En este modelo experimental, la inhibición de los peróxidos lipídicos por hidroxitirosol pudiera condicionar la formación de LDLox, VCAM-1 y MPOx, pudiendo ejercer un efecto directo sobre la formación de peroxinitritos, independientemente de su efecto antioxidante, tal y como comentaremos posteriormente.

En primer lugar, hidroxitirosol reduce la concentración de LDLox, lo cual coincide con diversos estudios publicados en los que se demuestra que los polifenoles del aceite de oliva virgen previenen de la oxidación de la LDL en humanos, tanto sanos como afectados de factores de riesgo cardiovascular (Castañer et al., 2012; Covas, Nyssönen, et al., 2006). La oxidación de la LDL es un punto clave en la génesis y evolución de la enfermedad arterial, sea cual sea el origen de la misma (Rafieian-Kopaei, Setorki, Doudi, Baradaran, & Nasri, 2014), por lo que la protección de la LDL ante la oxidación se considera un efecto muy beneficioso en la prevención de la enfermedad cardiovascular, ya sea de forma directa o posiblemente más óptimo, mediante una inhibición del estrés oxidativo (Dimitris Tousoulis et al., 2013).

En segundo lugar, la formación de peroxinitritos se relaciona con la de óxido nítrico y la de aniones superóxidos, pero de forma paralela a una activación de la iNOS, la cual produce grandes cantidades de óxido nítrico, asimismo estos peroxinitritos inducen la formación de nuevos mediadores inflamatorios. La activación de la iNOS se enmarca dentro de un ambiente pro-inflamatorio, de ahí que la concentración de 3-nitrotirosina (índice indirecto de la producción de peroxinitritos) la incluyamos en esta fase del análisis y discusión de los resultados. La administración de hidroxitirosol produce una disminución de la producción de peroxinitritos, alcanzando incluso los valores de los animales normoglucémicos.

Debido a que la producción de peroxinitritos está en directa relación con la producción de estrés oxidativo, no extraña un efecto sobre la producción de los mismos. No obstante, también podemos observar que no existe una relación directa cualitativa entre el potencial antioxidante de estos compuestos (TBARS) y su efecto sobre la producción de peroxinitritos. Esta misma falta de relación se ha descrito en tejido cerebral de rata sometido a un modelo de hipoxia-reoxigenación (de La Cruz et al., 2015).

Respecto al efecto de hidroxitirosol sobre la formación de peroxinitritos, se ha demostrado lo siguiente:

- No presenta un efecto directo sobre la actividad óxido nítrico sintasa constitutiva endotelial (eNOS) (Schmitt, Handler, Heiss, Erker, & Dirsch, 2007).

- Hidroxitirosol disminuye en tejido vascular la producción de radicales derivados del óxido nítrico y del daño producido por éstos (Rietjens, Bast, de Vente, & Haenen, 2007).
- Hidroxitirosol capta especies reactivas de nitrógeno, pero solo en medio extracelular (de la Puerta, Martínez Domínguez, Ruíz-Gutiérrez, Flavill, & Hoult, 2001).
- Hidroxitirosol previene la nitración de proteínas inducida por peroxinitritos (Deiana et al., 1999).
- Hidroxitirosol inhibe la expresión de enzimas inducibles (iNOS, COX-2) por mediadores inflamatorios en macrófagos (Richard et al., 2011; Zhang et al., 2009) y en células endoteliales humanas (Scoditti et al., 2012).
- Diversos compuestos fenólicos (resveratrol, flavonoides, ácidos hidroxibenzoicos, etc), son capaces de captar radicales peroxinitritos en relación con un efecto neuroprotector en diversos modelos animales, si bien no se puede concluir si este efecto se debe a un mecanismo directo sobre los radicales de nitrógeno o indirecto, sobre los mecanismos de control de la producción de los mismos (Chen, Chen, Xu, & Shen, 2013).

Este último análisis nos puede orientar hacia un efecto de hidroxitirosol sobre la formación de peroxinitritos, pero con independencia de su efecto antioxidante. Es decir, se trataría de un efecto independiente de su potencial antioxidante. Es más, como analizaremos posteriormente, la hiperproducción de óxido nítrico, posiblemente debida a un estímulo de la iNOS por el estado inflamatorio vascular, es frenada por hidroxitirosol, lo cual ayuda a una reducción del sustrato indispensable para reaccionar con los aniones superóxidos y formar peroxinitritos.

En tercer lugar, cabría esperar un efecto a nivel de la producción de IL-6, pero no es así. Como discutimos anteriormente, en los animales diabéticos no se observó un incremento de este mediador respecto a los animales normoglucémicos, por lo que parece lógico que hidroxitirosol no modifique su síntesis. Es conocido que este polifenol disminuye la producción de citoquinas y TNF α en diversos tejidos, fundamentalmente en macrófagos estimulados (Richard et al., 2011) y suero de ratas hipercolesterolémicas (Tabernerero et al., 2014) y se acepta que regula a la baja factores nucleares que modulan su síntesis (Rosillo et al., 2015). Algunos estudios demuestran que hidroxitirosol puede disminuir también los niveles séricos de interleucina 6 en un modelo de artritis en rata (Rosillo et al., 2015). No obstante, siendo esta citoquina importante en la enfermedad cardiovascular humana, no parece jugar un papel importante en el modelo experimental utilizado en este estudio.

Fase de afectación de capas celulares adyacentes

Todo el complejo bioquímico de afectación vascular produce mediadores citotóxicos que intentan autoalimentar su propia síntesis y activación. Las citoquinas, radicales libres, LDL oxidada y peroxinitritos, afectan a dos tipos celulares básicos adyacentes al espesor vascular: la fibra muscular lisa y el endotelio. Al igual que indicamos con anterioridad, la propia hiperglucemia mantenida afecta directamente al endotelio desde el primer momento, si bien las alteraciones más claras y evidentes se producen en esta fase más tardía. Las dos principales consecuencias de este daño bioquímico son: disfunción endotelial y proliferación de capa muscular vascular.

La disfunción endotelial se puede cuantificar de diferentes formas, pero quizás la mejor es valorar sustancias endoteliales que definen una de sus principales funciones, la antitrombótica. PGI₂ y óxido nítrico son dos mediadores reconocidos como fundamentales para explicar la capacidad del endotelio para frenar el fenómeno de la activación plaquetaria, la cual es el inicio de la trombosis arterial.

La PGI₂ se produce en el endotelio vascular a partir del ácido araquidónico libre y por intervención primaria de la enzima COX. Estas características coinciden con la producción de tromboxano en la plaqueta, prostanoide de efectos contrarios a los de la PGI₂ en cuanto a la capacidad vasodilatadora (PGI₂) o vasoconstrictora (TxA₂) y antiagregante plaquetaria (PGI₂) o proagregante plaquetaria (TxA₂). Es por ello que se utilice el cociente tromboxano/prostaciclina como índice indirecto del estado pro- o anti-trombótico en un medio vascular determinado. Los resultados de realizar este cociente en nuestro estudio es el siguiente:

Grupo	TxB₂ / 6-keto-PGF_{1α}
CND	60.60 ± 12.00
CD	195 ± 16*
HT-0.5	162 ± 15
HT-1	143 ± 32
HT-2.5	57.05 ± 4.27†
HT-5	68.11 ± 3.67†
HT-10	66.85 ± 3.13†

*P < 0.0001 respecto a CND. †P < 0.0001 respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día p.o.)

La diabetes experimental eleva este cociente, lo cual es debido a un incremento en la producción plaquetaria de tromboxano (Tabla 4.2. y Figura 4.5.) y a una disminución en la vascular de PGI₂ (Tabla 4.4. y Figura 4.6.). Los animales tratados con hidroxitirosol muestran una reducción dosis-dependiente de este cociente por un efecto doble: inhibición de la producción plaquetaria de tromboxano y freno en la caída de síntesis de PGI₂ debida a la diabetes.

La importancia de la COX en el mantenimiento y/o activación de la actividad plaquetaria en el ser humano viene dada por la propia fisiología de los prostanoïdes que se derivan de su intervención: el tromboxano es un potente agregante plaquetario, vasoconstrictor y estimulante de la proliferación de las fibras musculares vasculares, mientras que la PGI₂ es un potente agente inhibidor del funcionalismo plaquetario, vasodilatador e inhibidor de la proliferación celular vascular (FitzGerald, Austin, Egan, Cheng, & Pratico, 2000). Al proceder ambos prostanoïdes del mismo origen químico, el ácido araquidónico, se planteó el concepto de “balanza tromboxano/prostaciclina” como eje sobre el que giraba la fisiología, fisiopatología y farmacología de la interacción plaqueta-pared vascular y de los eventos trombóticos, hasta tal punto de concluir ya en trabajos clásicos (Bunting, Moncada, & Vane, 1983) que “un balance entre la cantidad de TxA₂ formado en las plaquetas y de PGI₂ sintetizada en los vasos sanguíneos, es crítico en la formación de un trombo arterial”, afirmación válida hoy día en todas sus partes.

No obstante, este concepto de “balanza tromboxano/prostaciclina” es una simplificación del complejo proceso de la trombogénesis, ya que es solo un componente, aunque importante, de una intrincada, organizada y exquisita regulación de la bioquímica y fisiología vascular para mantener un correcto funcionalismo cardiovascular. Se han descrito y demostrado otros mecanismos que participan en ambos platillos de esta hipotética balanza, tanto en su vertiente antitrombótica (óxido nítrico, ADPasa, trombomodulina, proteoglicanos similares a la heparina, inhibidor de la vía del factor tisular y el activador tisular del plasminógeno) como en la protrombótica (trombina, ADP, factor tisular, inhibidor del activador del plasminógeno, factor de von Willebrand, colágeno y P-selectina) (Funk & FitzGerald, 2007). Por último, se ha demostrado que la producción de prostaciclina en el ser humano dependen en gran medida de la activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) o inducible, la cual también es inhibida por hidroxitirosol (véase más adelante).

Por todos estos motivos, respecto a hidroxitirosol, no quiere decir que la inhibición de la síntesis de tromboxano sea el único mecanismo por el que presente un potencial efecto antitrombótico *in vivo*, ya que, por ejemplo, se ha demostrado un efecto inhibidor de la expresión de proteínas de adhesión en la superficie endotelial, tales como ICAM-1 y VCAM-1 (Dell’Agli et al., 2006).

Respecto a la PGI₂, se acepta que en las complicaciones vasculares de la Diabetes Mellitus existe un déficit en su síntesis, posiblemente por un doble mecanismo: la propia disfunción endotelial que reduce todas las funciones de este tipo celular y, de otra parte, el estrés oxidativo que disminuye claramente la actividad prostaciclín-sintetasa (Giacco & Brownlee, 2010; Dimitris Tousoulis et al., 2013). La administración de hidroxitirosol



a los animales diabéticos frena el descenso de la síntesis de PGI₂ observado en los animales no tratados, llegando incluso a evitarlo con las dosis mayores de 2.5 mg/kg/día. No se ha descrito un efecto estimulante de la actividad ciclooxygenasa (COX) por parte de hidroxitirosol, más bien lo contrario, tanto en experimentos *in vitro* (Correa et al., 2009) como tras su administración oral a animales sanos (González-Correa, Navas, Muñoz-Marín, et al., 2008). Por ello pensamos que el efecto encontrado en el presente estudio se derive de su acción antioxidante, de forma que al inhibir la producción de RL se reduce la influencia negativa de éstos sobre la síntesis de PGI₂.

Por lo tanto, la administración de hidroxitirosol a animales diabéticos protege de la reducción de la síntesis de PGI₂, lo cual añadido a la inhibición de la plaquetaria de tromboxano, ejerce un efecto beneficioso sobre el cociente tromboxano/prostaciclina, ayudando de esta forma a frenar parte de la disfunción endotelial y sus consecuencias.

Otro factor relacionado con la disfunción endotelial es el déficit del óxido nítrico endotelial. Como ya comentamos anteriormente, en la disfunción endotelial descrita en la fisiopatología de la vasculopatía diabética existe un desacoplamiento de la enzima eNOS, debido fundamentalmente a la producción de estrés oxidativo intracelular, lo cual llevaría a una disminución en la síntesis de óxido nítrico (Triggle & Ding, 2010). No obstante, la existencia de un claro estatus inflamatorio origina la activación de enzimas inducibles, tales como la iNOS, la cual en presencia de óxido nítrico y radicales superóxidos, forma peroxinitritos (Di Pietro et al., 2013). Esta situación es la que encontramos en nuestro estudio: un acumulo de óxido nítrico y peroxinitritos, así como un claro estrés oxidativo.

La administración de hidroxitirosol ya vimos que frenaba la formación de peroxinitritos (Tabla 4.8. y Figura 4.13.), lo cual puede deberse a dos factores: de una parte al freno en el acúmulo excesivo de óxido nítrico (Tabla 4.4. y Figura 4.7.) y de otra, a la disminución del estrés oxidativo (Tabla 4.6. y Figura 4.9.). Asimismo, la disminución del estado inflamatorio producido por hidroxitirosol podría inhibir la activación de estos mediadores sobre las actividades inducibles y así frenar, por ejemplo, la producción excesiva de óxido nítrico (Killeen, Linder, Pontoniere, & Crea, 2014). Podríamos pensar que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico es un efecto negativo, ya que es un mediador vasodilatador y antiagregante plaquetario, pero esta reducción la observamos hasta llegar a niveles de “normalidad”, es decir, en ningún caso los valores de este mediador son menores que los de los animales no diabéticos: normaliza sus valores pero no los inhibe.

Por lo tanto, podemos aseverar que, al menos desde un punto de vista bioquímico, la administración de hidroxitirosol reduce la disfunción endotelial producida en la evolución de la vasculopatía diabética.

Como expusimos anteriormente, todo el complejo bioquímico formado en la pared vascular en la Diabetes Mellitus, afecta al endotelio y a la capa muscular arterial, concretamente produciendo una **proliferación de las fibras musculares lisas**, lo cual origina un **engrosamiento de la pared** y por lo tanto un compromiso del flujo sanguíneo por reducción del calibre de la luz vascular (Komolafe et al., 2009). En el presente estudio hemos constatado un incremento del número de células y del área de la pared arterial en los animales diabéticos, respecto a los normoglucémicos (Tabla 4.10 y Figuras 4.74 y 4.15.). La administración de hidroxitirosol reduce ambas variables,



observándose una disminución aproximada de un 38% en el área parietal y de un 33% en el número de células de dicha pared vascular. En ambos casos, la tendencia final es conseguir unos valores similares a los de los animales no diabéticos.

Se ha descrito un efecto inhibitor de hidroxitirosol sobre la migración y proliferación de células musculares lisas inducidas con factor de crecimiento plaquetario (PDGF) en muestras de cultivos celulares *in vitro* (Zrelli, Matsuka, Araki, Zarrouk, & Miyazaki, 2011). Asimismo en conejos a los que se les somete a una dieta hiperlipémica, la suplementación oral con hidroxitirosol conduce a una disminución en el área de las lesiones arterioscleróticas aórticas (González-Santiago et al., 2006). En conejos hiperlipémicos, nuestro grupo de mostró que la administración de aceite de oliva virgen (con un alto contenido en hidroxitirosol –aproximadamente 300 µg/kg aceite-) reducía el área de la pared vascular aórtica, el cual se incrementaba en los animales hiperlipémicos controles (De La Cruz et al., 2000).

No encontramos datos en la bibliografía consultada sobre el efecto de hidroxitirosol en la morfología de la pared arterial en la Diabetes Mellitus. Por ello este trabajo aporta el efecto normalizador de la estructura cuantitativa de la pared arterial en el modelo de diabetes experimental utilizado. Este efecto podría ser debido a una acción sobre los mecanismos de proliferación y multiplicación celular (Zrelli et al., 2011) o como consecuencia de la inhibición de las vías bioquímicas de inflamación y estrés oxidativo, las cuales estimulan dicha proliferación de la capa muscular arterial (Sena, Pereira, & Seiça, 2013).

Estadío ulterior: consecuencias del daño vascular arterial

En términos generales, una de las principales consecuencias de la vasculopatía, sea cual sea su origen, es el fallo en la capacidad antitrombótica del endotelio y en la transformación de la pared arterial en un material protrombogénico. Hasta este momento hemos analizado aquellas variables relacionadas con el funcionalismo de la pared arterial y hemos podido constatar que éstas se encuentran alteradas en el modelo experimental de diabetes, en el sentido de favorecer los mecanismos de activación trombogénica. Asimismo estas vías son re-equilibradas en parte por la administración preventiva de hidroxitirosol.

Pero en la fisiopatología final del proceso trombótico se encuentra una activación de la función plaquetaria, que constituye el núcleo fundamental del trombo arterial. En la Diabetes Mellitus, la hiperglucemia crónica origina *per se* una activación plaquetaria y ésta se ve incrementada por la falta de respuesta antiplaquetaria endotelial (Santilli, Simeone, Liani, & Davì, 2015). En el mismo modelo experimental utilizado en nuestro estudio se ha demostrado que existe una activación plaquetaria desde los primeros periodos de evolución de la diabetes (De La Cruz et al., 2012; Moreno, De La Cruz, Garcia Campos, & Sanchez De La Cuesta, 1995). Este incremento de la agregabilidad plaquetaria unido al déficit prostaciclínico vascular, se relaciona con eventos isquémicos en este modelo experimental, tales como la isquemia retiniana (De La Cruz et al., 2004).

La administración preventiva de hidroxitirosol redujo la hiperactividad plaquetaria observada en los animales diabéticos, tanto en su aspecto más general como en la síntesis del principal mecanismo activador plaquetario, como es el tromboxano (Tabla 4.2. y Figuras 4.4. y 4.5.). Algunos compuestos fenólicos presentes en el aceite de

oliva virgen presentan unos efectos inhibidores del funcionalismo plaquetario y la producción de tromboxano, tales como el propio hidroxitirosol (Dell'Agli et al., 2008; Petroni et al., 1995), oleuropeína (Petroni et al., 1997), compuestos fenólicos isocrománicos (Togna, Togna, Franconi, Marra, & Guiso, 2003), etc. Incluso la propia administración de aceite de oliva virgen a ratas o a conejos reduce significativamente la agregación de las plaquetas inducidas con colágeno (De La Cruz et al., 2000; González-Correa et al., 2006).

No encontramos datos en la bibliografía consultada con los que comparar nuestros resultados en animales diabéticos. Por lo tanto, nuestro trabajo demuestra un efecto antiagregante plaquetario de hidroxitirosol en el modelo experimental de Diabetes Mellitus.

Obviamente el último paso consistiría en la consecuencia final isquémica y su posible prevención. En este estudio no abordamos este aspecto, si bien se encuentra en el centro de los proyectos que abordaremos en un futuro cercano. No obstante, algunos datos indirectos de citoprotección en modelos isquémicos se han publicado por la administración de hidroxitirosol en hígado (Pan et al., 2013) o en tejido cerebral (González-Correa, Navas, Lopez-Villodres, et al., 2008), si bien estos estudios se centran en su efecto citoprotector tisular más que en su acción cardiovascular.

5.3. CONSIDERACIONES FINALES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio demuestra que el principal polifenol presente en el aceite de oliva virgen, hidroxitirosol, ejerce un efecto protector cardiovascular a nivel bioquímico y morfológico en un modelo experimental de Diabetes Mellitus. Además, este efecto se puede constatar en todas las fases reconocidas de enfermedad vascular, siempre administrado de forma preventiva. Por lo tanto, con independencia de la necesidad de estudios clínicos que lo demuestren, *a priori* podríamos pensar que los beneficios descritos a nivel cardiovascular de la Dieta Mediterránea y más concretamente del aceite de oliva virgen, podrían considerar al hidroxitirosol como uno (no el único) de los responsables de dicho efecto beneficioso.

Obviamente este estudio tiene una serie de limitaciones. Como hemos comentado anteriormente, nuestro análisis se centra en las vías bioquímicas de daño vascular, siendo necesarios estudios posteriores que demuestren un efecto en la consecuencia de este daño, es decir, en el proceso aterotrombótico-isquémico. Asimismo, hemos utilizado un modelo experimental que se asemeja a lo acontecido en la DM1, siendo necesario el estudio de estas vías en un modelo experimental de DM2, ya que es este tipo el que más se relaciona con el proceso de inflamación vascular en su conjunto, no obstante este modelo es válido para conseguir un estado bioquímico-morfológico de inflamación vascular, el cual también se relaciona con el desarrollo de la microangiopatía diabética, proporcionalmente más frecuente en la DM1. Por último, es necesario un estudio en el que todas las variables propuestas se realicen en el tejido arterial, ya que en el presente estudio algunas se han determinado en dicho tejido, pero otras a nivel circulante; la interpretación global no variaría, pero sería mucho más precisa y correcta.

Por último quisiéramos señalar el rango de dosis en el que los resultados obtenidos a nivel cardiovascular son más destacables. Los estudios que usan hidroxitirosol como tal, no incluido en el aceite de oliva virgen, lo hacen administrando dosis más altas de las que diariamente ingeriría un ser humano al seguir una Dieta Mediterránea. De hecho, la mayor parte de los trabajos citados en esta discusión administran dosis que oscilan entre 10 y 100 mg/kg/día. En nuestro estudio hemos demostrado que dosis de 0.5-2.5 mg/kg/día producen la mayor parte de las modificaciones descritas en cada uno de los mecanismos de daño vascular en el modelo experimental de diabetes. Pero en último término no hay que olvidar que cuando se ingiere aceite de oliva virgen no solo se adquiere hidroxitirosol, sino otros polifenoles, secoroides, etc. Posiblemente exista un efecto sinérgico entre ellos y sea responsable del beneficio cardiovascular final.

6. CONCLUSIONES





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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

La administración oral de hidroxitirosol en el modelo experimental de Diabetes Mellitus:

1. Reduce el estrés oxidativo, la oxidación de LDL y la activación leucocitaria de los animales diabéticos sin tratamiento.
2. Frena el estado bioquímico inflamatorio y el estrés nitrosativo de estos animales.
3. Modula positivamente la disfunción endotelial, acercando los valores bioquímicos endoteliales al nivel de los animales normoglucémicos.
4. Evita la proliferación y crecimiento global de la capa media de la pared arterial.
5. Disminuye de forma dosis-dependiente la activación plaquetaria.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

7. BIBLIOGRAFÍA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Albert Cuñat. (2001). DM: epidemia silenciosa. *Semergen*, 27, 115.
- Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of DM and its complications. Part 1: diagnosis and classification of DM provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 15(7), 539–553. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
- Andresen, B. T., Romero, G. G., & Jackson, E. K. (2004). AT2 receptors attenuate AT1 receptor-induced phospholipase D activation in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(1), 425–431. <http://doi.org/10.1124/jpet.103.061846>
- Angeli, F., Reboldi, G., Poltronieri, C., Lazzari, L., Sordi, M., Garofoli, M., ... Verdecchia, P. (2015). Hyperglycemia in acute coronary syndromes: from mechanisms to prognostic implications. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. <http://doi.org/10.1177/1753944715594528>
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., & Serraiocco, A. (2000). Virgin olive oil differentiation in relation to extraction methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(15), 2190–2195. [http://doi.org/10.1002/1097-0010\(200012\)80:15<2190::AID-JSFA770>3.0.CO;2-O](http://doi.org/10.1002/1097-0010(200012)80:15<2190::AID-JSFA770>3.0.CO;2-O)
- Antonio Moreno, J., López-Miranda, J., Gómez, P., Benkhalti, F., Boustani, E. E., & Pérez-Jiménez, F. (2003). Efecto de los compuestos fenólicos del AOV sobre la

resistencia de las lipoproteínas de baja densidad a la oxidación. *Medicina Clínica*, 120(04), 128–131.

Aronson, D. (2008). Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Advances in Cardiology*, 45, 1–16. <http://doi.org/10.1159/0000115118>

Bach-Faig, A., Berry, E. M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S., ... Serra-Majem, L. (2011). Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition*, 14(Special Issue 12A), 2274–2284. <http://doi.org/10.1017/S1368980011002515>

Bach-Faig, A., Fuentes-Bol, C., Ramos, D., Carrasco, J. L., Roman, B., Bertomeu, I. F., ... Serra-Majem, L. (2011). The Mediterranean diet in Spain: adherence trends during the past two decades using the Mediterranean Adequacy Index. *Public Health Nutrition*, 14(04), 622–628. <http://doi.org/10.1017/S1368980010002752>

Badimón, L., & Martínez-González, J. (2006). DE. *Revista Española de Cardiología*, 6(Supl.A), 21–30. <http://doi.org/10.1157/13087918>

Balsano, C., & Alisi, A. (2009). Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), 3063–3073.

Barton, M., & Yanagisawa, M. (2008). Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(8), 485–498. <http://doi.org/10.1139/Y08-059>

- Bazzano, L. A., Serdula, M. K., & Liu, S. (2003). Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 5(6), 492–499. <http://doi.org/10.1007/s11883-003-0040-z>
- Bernini, R., Merendino, N., Romani, A., & Velotti, F. (2013). Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 655–670.
- Berry, E. M., Arnoni, Y., & Aviram, M. (2011). The Middle Eastern and biblical origins of the Mediterranean diet. *Public Health Nutrition*, 14(Special Issue 12A), 2288–2295. <http://doi.org/10.1017/S1368980011002539>
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974.
- Bitler, C. M., Viale, T. M., Damaj, B., & Crea, R. (2005). Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. *The Journal of Nutrition*, 135(6), 1475–1479.
- Bonafonte S, Arévalo F, & García RA. (2006). Neovascularización del iris y glaucoma neovascular. In *Retinopatía Diabética (II)*. Madrid: Elsevier España.
- Bonafonte S, Arévalo F, & García RA. (n.d.). *Neovascularización del iris y glaucoma neovascular*.

- Bonanome, A., Pagnan, A., Caruso, D., Toia, A., Xamin, A., Fedeli, E., ... Galli, G. (2000). Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *10*(3), 111–120.
- Bos, M. B., de Vries, J. H. M., Feskens, E. J. M., van Dijk, S. J., Hoelen, D. W. M., Siebelink, E., ... de Groot, L. C. P. G. M. (2010). Effect of a high monounsaturated fatty acids diet and a Mediterranean diet on serum lipids and insulin sensitivity in adults with mild abdominal obesity. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *20*(8), 591–598.
<http://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.05.008>
- Brewer, J., Liu, R., Lu, Y., Scott, J., Wallace, K., Wallukat, G., ... Lamarca, B. (2013). Endothelin-1, oxidative stress, and endogenous angiotensin II: mechanisms of angiotensin II type I receptor autoantibody-enhanced renal and blood pressure response during pregnancy. *Hypertension*, *62*(5), 886–892.
<http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01648>
- Buendía, M. R. P., & Martínez, J. M. M. (2013). Historia del cultivo del olivo y el aceite; su expresión en la biblia. *Ensayos: Revista de La Facultad de Educación de Albacete*, (28), 155–181.
- Bullon, P., Quiles, J. L., Morillo, J. M., Rubini, C., Goteri, G., Granados-Principal, S., ... Ramirez-Tortosa, M. (2009). Gingival vascular damage in atherosclerotic rabbits: hydroxytyrosol and squalene benefits. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *47*(9), 2327–2331. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.026>

- Bunting, S., Moncada, S., & Vane, J. R. (1983). The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications. *British Medical Bulletin*, 39(3), 271–276.
- Burlingame, B., & Dernini, S. (2011). Sustainable diets: the Mediterranean diet as an example. *Public Health Nutrition*, 14(Special Issue 12A), 2285–2287.
<http://doi.org/10.1017/S1368980011002527>
- Buse, M. G. (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290(1), E1–E8. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00329.2005>
- Cabrerizo, S., De La Cruz, J. P., López-Villodres, J. A., Muñoz-Marín, J., Guerrero, A., Reyes, J. J., ... González-Correa, J. A. (2013). Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12), 2152–2157.
<http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.08.007>
- Cai, S., Khoo, J., Mussa, S., Alp, N. J., & Channon, K. M. (2005). Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation. *Diabetologia*, 48(9), 1933–1940.
<http://doi.org/10.1007/s00125-005-1857-5>
- Camargo, A., Delgado-Lista, J., Garcia-Rios, A., Cruz-Teno, C., Yubero-Serrano, E. M., Perez-Martinez, P., ... Lopez-Miranda, J. (2012). Expression of

proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *The British Journal of Nutrition*, 108(3), 500–508.

<http://doi.org/10.1017/S0007114511005812>

Cao, K., Xu, J., Zou, X., Li, Y., Chen, C., Zheng, A., ... Feng, Z. (2014).

Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 67, 396–407. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.029>

Carbone, F., & Montecucco, F. (2015). Inflammation in arterial diseases. *IUBMB Life*,

67(1), 18–28. <http://doi.org/10.1002/iub.1344>

Carluccio, M. A., Ancora, M. A., Massaro, M., Carluccio, M., Scoditti, E., Distante, A.,

... De Caterina, R. (2007). Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(4), H2344–2354.

<http://doi.org/10.1152/ajpheart.00432.2007>

Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., ...

De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4),

622–629. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000062884.69432.A0>

- Carr, M. E. (2001). DM: a hypercoagulable state. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 15(1), 44–54.
- Castañer, O., Covas, M.-I., Khymenets, O., Nyssonen, K., Konstantinidou, V., Zunft, H.-F., ... Fitó, M. (2012). Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(5), 1238–1244. <http://doi.org/10.3945/ajcn.111.029207>
- Catalán, Ú., López de Las Hazas, M.-C., Rubió, L., Fernández-Castillejo, S., Pedret, A., de la Torre, R., ... Solà, R. (2015). Protective effect of hydroxytyrosol and its predominant plasmatic human metabolites against endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201500361>
- Chen, X., Chen, H., Xu, M., & Shen, J. (2013). Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(1), 67–77. <http://doi.org/10.1038/aps.2012.82>
- Chistiakov, D. A., Revin, V. V., Sobenin, I. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2015). Vascular endothelium: functioning in norm, changes in atherosclerosis and current dietary approaches to improve endothelial function. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 15(4), 338–350.

- Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2010). Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(2), 458–479. <http://doi.org/10.3390/ijms11020458>
- Correa, J. A. G., López-Villodres, J. A., Asensi, R., Espartero, J. L., Rodríguez-Gutiérrez, G., & De La Cruz, J. P. (2009). Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *The British Journal of Nutrition*, *101*(8), 1157–1164. <http://doi.org/10.1017/S0007114508061539>
- Covas, M.-I., de la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., ... de la Torre, R. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, *40*(4), 608–616. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.027>
- Covas, M.-I., de la Torre, R., & Fitó, M. (2015). Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *The British Journal of Nutrition*, *113* Suppl 2, S19–28. <http://doi.org/10.1017/S0007114515000136>
- Covas, M.-I., Nyyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J. F., Kiesewetter, H., ... EUROLIVE Study Group. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, *145*(5), 333–341.

- Cruz Hernández, J., Licea Puig, M., Hernández García, P., Abraham Marcel, E., & Yanes Quesada, M. (2011). Estrés oxidativo y DM. *Rev Mex Patol Clin*, 58(1), 4–15.
- Cruz Hernández, J., Licea Puig, M., Hernández García, P., Yanes Quesada, M., & Salvato Dueñas, A. (2012). DE y DM. *Revista Cubana de Endocrinología*, 23(2), 166–185.
- Dalli, E. (2005). Evaluación de la DE en pacientes con diabetes., 21(4), 292–301.
- D'Angelo, S., Ingrosso, D., Migliardi, V., Sorrentino, A., Donnarumma, G., Baroni, A., ... Galletti, P. (2005). Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(7), 908–919.
<http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.015>
- Das Evcimen, N., & King, G. L. (2007). The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacological Research*, 55(6), 498–510.
<http://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.016>
- da Silva, R., Bach-Faig, A., Raidó Quintana, B., Buckland, G., Vaz de Almeida, M. D., & Serra-Majem, L. (2009). Worldwide variation of adherence to the Mediterranean diet, in 1961–1965 and 2000–2003. *Public Health Nutrition*, 12(Special Issue 9A), 1676–1684. <http://doi.org/10.1017/S1368980009990541>

- Deiana, M., Aruoma, O. I., Bianchi, M. L., Spencer, J. P., Kaur, H., Halliwell, B., ...
Corongiu, F. P. (1999). Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base
modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived
antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(5-6), 762–769.
- De La Cruz, J., González-Correa, J., Guerrero, A., & de la Cuesta, F. (2004).
Pharmacological approach to diabetic retinopathy. *Diabetes/Metabolism
Research and Reviews*, 20(2), 91–113. <http://doi.org/10.1002/dmrr.432>
- De La Cruz, J. P., Del Río, S., López-Villodres, J. A., Villalobos, M. A., Jebrouni, N., &
González-Correa, J. A. (2010). Virgin olive oil administration improves the
effect of aspirin on retinal vascular pattern in experimental DM. *The British
Journal of Nutrition*, 104(4), 560–565.
<http://doi.org/10.1017/S0007114510000929>
- De La Cruz, J. P., González-Correa, J. A., Guerrero, A., & de la Cuesta, F. S. (2004).
Pharmacological approach to diabetic retinopathy. *Diabetes/Metabolism
Research and Reviews*, 20(2), 91–113. <http://doi.org/10.1002/dmrr.432>
- De La Cruz, J. P., Jebrouni, N., López-Villodres, J. A., Muñoz-Marín, J., Guerrero, A.,
& González-Correa, J. A. (2012). Effects of terutroban, a
thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, on retinal
vascularity in diabetic rats. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(2),
132–138.

- De La Cruz, J. P., Ruiz-Moreno, M. I., Guerrero, A., López-Villodres, J. A., Reyes, J. J., Espartero, J. L., ... González-Correa, J. A. (2015). Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(5), 549–555.
<http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.12.013>
- De La Cruz, J. P., Villalobos, M. A., Carmona, J. A., Martín-Romero, M., Smith-Agreda, J. M., & de la Cuesta, F. S. (2000). Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thrombosis Research*, 100(4), 305–315.
- de la Puerta, R., Martínez-Domínguez, E., & Ruíz-Gutiérrez, V. (2000). Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 55(9-10), 814–819.
- de la Puerta, R., Martínez Domínguez, M. E., Ruíz-Gutiérrez, V., Flavill, J. A., & Houtl, J. R. (2001). Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitregeric neurotransmission. *Life Sciences*, 69(10), 1213–1222.
- Dell'Agli, M., Fagnani, R., Mitro, N., Scurati, S., Masciadri, M., Mussoni, L., ... Caruso, D. (2006). Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3259–3264. <http://doi.org/10.1021/jf0529161>

- Dell'Agli, M., Maschi, O., Galli, G. V., Fagnani, R., Dal Cero, E., Caruso, D., & Bosisio, E. (2008). Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *The British Journal of Nutrition*, 99(5), 945–951. <http://doi.org/10.1017/S0007114507837470>
- de Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Delaye, J., & Mamelle, N. (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, 99(6), 779–785.
- De Vriese, A. S., Verbeuren, T. J., Van de Voorde, J., Lameire, N. H., & Vanhoutte, P. M. (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *British Journal of Pharmacology*, 130(5), 963–974. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703393>
- de Zeeuw, P., Wong, B. W., & Carmeliet, P. (2015). Metabolic adaptations in diabetic endothelial cells. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 79(5), 934–941. <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-15-0230>
- Díaz-Flores, M., Baiza-Gutman, L. A., Ibáñez-Hernández, M. Á., Pascoe-Lira, D., Guzmán-Greenfel, A. M., & Kumate-Rodríguez, J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Médica de México*, 140(4), 437–447.
- Di Giovacchino, L., Sestili, S., & Di Vincenzo, D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*,

104(9-10), 587–601. [http://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M](http://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<587::AID-EJLT587>3.0.CO;2-M)

Dimitropoulou, C., Chatterjee, A., McCloud, L., Yetik-Anacak, G., & Catravas, J. D. (2006). Angiotensin, bradykinin and the endothelium. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (176 Pt 1), 255–294.

Di Pietro, N., Di Tomo, P., Di Silvestre, S., Giardinelli, A., Pipino, C., Morabito, C., ... Pandolfi, A. (2013). Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: potential role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKII δ (2)). *Atherosclerosis*, 226(1), 88–94. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.062>

Di Vaio, C., Nocerino, S., Paduano, A., & Sacchi, R. (2013). Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1134–1139. <http://doi.org/10.1002/jsfa.5863>

Dogné, J.-M., Hanson, J., de Leval, X., Pratico, D., Pace-Asciak, C. R., Drion, P., ... Ruan, K.-H. (2006). From the design to the clinical application of thromboxane modulators. *Current Pharmaceutical Design*, 12(8), 903–923.

Domenico, R. (2004). Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1667–1676.

- Donato, A. J., Gano, L. B., Eskurza, I., Silver, A. E., Gates, P. E., Jablonski, K., & Seals, D. R. (2009). Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 297(1), H425–432.
<http://doi.org/10.1152/ajpheart.00689.2008>
- Enns, J. E., Yeganeh, A., Zarychanski, R., Abou-Setta, A. M., Friesen, C., Zahradka, P., & Taylor, C. G. (2014). The impact of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the incidence of cardiovascular events and complications in peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders*, 14, 70. <http://doi.org/10.1186/1471-2261-14-70>
- Esper, R. J., Nordaby, R. A., Vilariño, J. O., Paragano, A., Cacharrón, J. L., & Machado, R. A. (2006). Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology*, 5(1), 4. <http://doi.org/10.1186/1475-2840-5-4>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., ... Martínez-González, M. A. (2013). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279–1290.
<http://doi.org/10.1056/NEJMoa1200303>
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567(1), 1–61.
<http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>

- Fernández-Bolaños, J., Heredia, A., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Jimenez, A., & Guillen, R. (2005). Method for obtaining purified hydroxytyrosol from products and by-products derived from the olive tree., *US 6,849,770 B2*.
- Fitó, M., de la Torre, R., Farré-Albaladejo, M., Khymenetz, O., Marrugat, J., & Covas, M.-I. (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*, *43*(4), 375–381.
- FitzGerald, G. A., Austin, S., Egan, K., Cheng, Y., & Pratico, D. (2000). Cyclooxygenase products and atherothrombosis. *Annals of Medicine*, *32 Suppl 1*, 21–26.
- Funk, C. D., & FitzGerald, G. A. (2007). COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *50*(5), 470–479.
<http://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318157f72d>
- Furneri, P. M., Piperno, A., Sajja, A., & Bisignano, G. (2004). Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(12), 4892–4894.
<http://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4892-4894.2004>
- García-Villalba, R., Larrosa, M., Possemiers, S., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2014). Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf extract and its acute effect on plasma antioxidant status: comparison between pre- and postmenopausal women. *European Journal of Nutrition*, *53*(4), 1015–1027. <http://doi.org/10.1007/s00394-013-0604-9>

Gerich, J. E. (2003). Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. *Archives of Internal Medicine*, 163(11), 1306–1316. <http://doi.org/10.1001/archinte.163.11.1306>

Gerstein, H. C., Santaguida, P., Raina, P., Morrison, K. M., Balion, C., Hunt, D., ... Booker, L. (2007). Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 78(3), 305–312. <http://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.05.004>

Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H., & Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3291–3340. <http://doi.org/10.3390/ijms13033291>

Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058–1070. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>

Giner, E., Andújar, I., Recio, M. C., Ríos, J. L., Cerdá-Nicolás, J. M., & Giner, R. M. (2011). Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12882–12892. <http://doi.org/10.1021/jf203715m>

Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., & Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury.

Circulation, 114(6), 597–605.

<http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854>

Gong, D., Geng, C., Jiang, L., Cao, J., Yoshimura, H., & Zhong, L. (2009). Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytotherapy Research: PTR*, 23(5), 646–650.

<http://doi.org/10.1002/ptr.2686>

González-Correa, J. A., Arrebola, M. M., Guerrero, A., Cañada, M. J., Muñoz Marín, J., Sánchez De la Cuesta, F., & De la Cruz, J. P. (2006). Antioxidant and antiplatelet effects of the alpha-tocopherol-aspirin combination in type 1-like diabetic rats.

Life Sciences, 79(15), 1405–1412. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.04.025>

González-Correa, J. A., Navas, M. D., Lopez-Villodres, J. A., Trujillo, M., Espartero, J. L., & De La Cruz, J. P. (2008). Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation.

Neuroscience Letters, 446(2-3), 143–146.

<http://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.022>

González-Correa, J. A., Navas, M. D., Muñoz-Marín, J., Trujillo, M., Fernández-Bolaños, J., & de la Cruz, J. P. (2008). Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7872–

7876. <http://doi.org/10.1021/jf801502z>

- González-Santiago, M., Martín-Bautista, E., Carrero, J. J., Fonollá, J., Baró, L., Bartolomé, M. V., ... López-Huertas, E. (2006). One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, *188*(1), 35–42.
<http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.022>
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P., & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010a). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*, *68*(4), 191–206.
<http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x>
- Grant, P. J. (2007). DM as a prothrombotic condition. *Journal of Internal Medicine*, *262*(2), 157–172. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01824.x>
- Grignaffini, P., Roma, P., Galli, C., & Catapano, A. L. (1994). Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol. *Lancet*, *343*(8908), 1296–1297.
- Guerrero, A., De la Cruz, J. P., Muñoz-Marín, J., López-Villodres, J. A., Madrona, A., Espartero, J. L., & González-Correa, J. A. (2012). Neuroprotective effect of alkyl hydroxytyrosyl ethers in rat brain slices subjected to a hypoxia-reoxygenation model. *Food Chemistry*, *134*(4), 2176–2183.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.022>

- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H., & Hagiwara, H. (2011). Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European Journal of Pharmacology*, 662(1-3), 78–84. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.023>
- Hall, J. E. (2011). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. Elsevier Health Sciences.
- Hamden, K., Allouche, N., Damak, M., & Elfeki, A. (2009). Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 180(3), 421–432. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.04.002>
- Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., Ben El Hadj, S., El Gazzah, M., & Bervillé, A. (2008). Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 116(3), 280–290. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.01.004>
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950–988. <http://doi.org/10.3390/i8090950>
- Hsueh, W. A., Jackson, S., & Law, R. E. (2001). Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care*, 24(2), 392–397.

- Hu, T., He, X.-W., Jiang, J.-G., & Xu, X.-L. (2014). Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1449–1455. <http://doi.org/10.1021/jf405820v>
- Jansen, F., Yang, X., Franklin, B. S., Hoelscher, M., Schmitz, T., Bedorf, J., ... Werner, N. (2013). High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovascular Research*, 98(1), 94–106. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvt013>
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2-3), 88–98. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.08.014>
- Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8798–8804. <http://doi.org/10.1021/jf901280r>
- Julio, R., & Galleguillos, I. (2009). Diabetes y enfermedad vascular periférica. *REV. MED. CLIN. CONDES*, 20(5), 687–697.
- Kang, K. B., Van Der Zypp, A., Iannazzo, L., & Majewski, H. (2006). Age-related changes in monocyte and platelet cyclooxygenase expression in healthy male humans and rats. *Translational Research*, 148(6), 289–294. <http://doi.org/10.1016/j.trsl.2006.06.004>

- Kannel, W. B. (1985). Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *American Heart Journal*, 110(5), 1100–1107.
- Killeen, M. J., Linder, M., Pontoniere, P., & Crea, R. (2014). NF- κ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today*, 19(4), 373–378. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.002>
- King, G. L., & Brownlee, M. (1996). The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 25(2), 255–270.
- Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R., & Schleicher, E. D. (1998). High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(1), 160–169. <http://doi.org/10.1172/JCI119875>
- Komolafe, O. A., Adeyemi, D. O., Adewole, O. S., Obuotor, E. M., & Abiodun, A. A. (2009). Morphological and morphometric studies of the aorta, pulmonary trunk, and heart of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Folia Morphologica*, 68(4), 207–214.
- Kontou, N. (2015). Chapter 36 - The Mediterranean Diet in Cancer Prevention. In V. R. P. R. Watson (Ed.), *The Mediterranean Diet* (pp. 393–406). San Diego: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124078499000361>

- Kracht, M., & Saklatvala, J. (2002). TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF GENE EXPRESSION IN INFLAMMATION. *Cytokine*, 20(3), 91–106.
<http://doi.org/10.1006/cyto.2002.0895>
- Kris-Etherton, P., Eckel, R. H., Howard, B. V., St Jeor, S., Bazzarre, T. L., & Nutrition Committee Population Science Committee and Clinical Science Committee of the American Heart Association. (2001). AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation*, 103(13), 1823–1825.
- Laakso, M., & Lehto, S. (1998). Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis*, 137 Suppl, S65–73.
- Ladeia, A. M., Sampaio, R. R., Hita, M. C., & Adan, L. F. (2014). Prognostic value of endothelial dysfunction in type 1 DM. *World Journal of Diabetes*, 5(5), 601–605.
<http://doi.org/10.4239/wjd.v5.i5.601>
- Lemkens, P., Nelissen, J., Meens, M., Janssen, B., Schiffers, P., & De Mey, J. (2012). Dual neural peptidase/endothelin-converting enzyme inhibition improves endothelial function in mesenteric resistance arteries of young spontaneously hypertensive rats: Erratum. *Journal of Hypertension*, 30(12), 2445.
<http://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32835baa7f>

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868–874.

<http://doi.org/10.1038/nature01323>

Liu, H., Huang, H., Li, B., Wu, D., Wang, F., Zheng, X. hua, ... Fan, X. (2014). Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause.

Clinical Interventions in Aging, 9, 2087–2095.

<http://doi.org/10.2147/CIA.S72006>

Mahía Vilas M, & Pérez Pérez L. (2000). La DM y sus complicaciones vasculares: un problema social de salud. *Rev Cubana Angiol Y Cir Vasc*, 1(1), 68–73.

Maiti, R., & Agrawal, N. K. (2007). Atherosclerosis in DM: role of inflammation. *Indian Journal of Medical Sciences*, 61(5), 292–306.

Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S., & Zappia, V. (2000).

Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters*, 470(3), 341–344.

Manna, C., Napoli, D., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., & Zappia, V. (2009). Olive oil phenolic compounds inhibit homocysteine-induced endothelial cell adhesion regardless of their different antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3478–3482. <http://doi.org/10.1021/jf8037659>

Marques-Vidal, P., Bastardot, F., von Känel, R., Paccaud, F., Preisig, M., Waeber, G., & Vollenweider, P. (2013). Association between circulating cytokine levels, diabetes and insulin resistance in a population-based sample (CoLaus study).

Clinical Endocrinology, 78(2), 232–241. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04384.x>

Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., Corella D, D., Fitó, M., Ros, E., & PREDIMED INVESTIGATORS. (2015). Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. *Progress in Cardiovascular Diseases*. <http://doi.org/10.1016/j.pcad.2015.04.003>

Melagarejo, E. (2005). DE, aterogénesis y aterotrombosis. In *Anticoagulación* (1st ed., pp. 5–12). Bogotá.

Migliori, M., Cantaluppi, V., Mannari, C., Bertelli, A. A. E., Medica, D., Quercia, A. D., ... Panichi, V. (2015). Caffeic Acid, a phenol found in white wine, modulates endothelial nitric oxide production and protects from oxidative stress-associated endothelial cell injury. *PloS One*, 10(4), e0117530. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0117530>

Miranda, M., Muriach, M., Johnsen, S., Bosch-Morell, F., Araiz, J., Romá, J., & Romero, F. J. (2004). Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental: tratamiento con antioxidantes. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*, 79(6), 289–294. <http://doi.org/10.4321/S0365-66912004000600007>

Miranda, M., Muriach, M., Roma, J., Bosch-Morell, F., Genovés, J. M., Barcia, J., ... Romero, F. J. (2006). Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental II: utilidad de agentes secuestrantes de peroxinitritos. *Archivos de*

La Sociedad Española de Oftalmología, 81(1), 27–32.

<http://doi.org/10.4321/S0365-66912006000100007>

Miro-Casas, E., Covas, M.-I., Farre, M., Fito, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., ... de la Torre, R. (2003). Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*, 49(6 Pt 1), 945–952.

Mitchell, J. A., Ahmetaj-Shala, B., Kirkby, N. S., Wright, W. R., Mackenzie, L. S., Reed, D. M., & Mohamed, N. (2014). Role of prostacyclin in pulmonary hypertension. *Global Cardiology Science & Practice*, 2014(4), 382–393.
<http://doi.org/10.5339/gcsp.2014.53>

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., & Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263(5579), 663–665.

Moncada, S., & Higgs, E. A. (1995). Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(13), 1319–1330.

Moreno, A., De La Cruz, J. P., Garcia Campos, J., & Sanchez De La Cuesta, F. (1995). Prostacyclin-thromboxane balance and retinal vascular pattern in rats with experimentally induced diabetes. *Canadian Journal of Ophthalmology. Journal Canadien D'ophtalmologie*, 30(3), 117–123.

Muniz, F. J. S. (2009). Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 73(3). Retrieved from <http://analesranf.com/index.php/aranf/article/view/100>

Muñoz-Marín, J., De La Cruz, J. P., Guerrero, A., López-Leiva, I., López-Villodres, J. A., Reyes, J. J., ... González-Correa, J. A. (2012). Cytoprotective effect of hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives after oral administration to rats in a model of glucose-oxygen deprivation in brain slices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7659–7664. <http://doi.org/10.1021/jf3007097>

Muñoz-Marín, J., De la Cruz, J. P., Reyes, J. J., López-Villodres, J. A., Guerrero, A., López-Leiva, I., ... González-Correa, J. A. (2013). Hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives inhibit platelet activation after oral administration to rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 58, 295–300. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.045>

Nakahata, N. (2008). Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 118(1), 18–35. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.01.001>

Nitenberg, A., Cosson, E., & Pham, I. (2006). Postprandial endothelial dysfunction: role of glucose, lipids and insulin. *Diabetes & Metabolism*, 32 Spec No2, 2S28–33.

- Noah, A., & Truswell, A. S. (2001). There are many Mediterranean diets. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 10(1), 2–9. <http://doi.org/10.1046/j.1440-6047.2001.00198.x>
- Owen, R. W., Haubner, R., Würtele, G., Hull, E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2004). Olives and olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 13(4), 319–326.
- Pacheco, M. E., Beltrán, A., Redondo, J., Manso, A. M., Alonso, M. J., & Salaices, M. (2006). High glucose enhances inducible nitric oxide synthase expression. Role of protein kinase C-betaII. *European Journal of Pharmacology*, 538(1-3), 115–123. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.052>
- Padilla, E., Sanz, M., Ganado, P., & Tejerina, T. (2002). Efectos de irbesartán y losartán en conejos hipercolesterolémicos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 14(05), 230–238.
- Pan, S., Liu, L., Pan, H., Ma, Y., Wang, D., Kang, K., ... Jiang, H. (2013). Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(7), 1218–1227. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201300010>
- Pauwels, E. (2011). The protective effect of the Mediterranean diet: Focus on cancer and cardiovascular risk. *Med. Princ. Pract.*, 20, 103–111.

Pérez, A. E. (2005). Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. *NUTRICION HOSPITALARIA*, 20(n01). Retrieved from

<http://www.aulamedica.es/gdcr/index.php/nh/article/view/3518>

Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2005). Literature Data May Underestimate the Actual Antioxidant Capacity of Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5036–5040. <http://doi.org/10.1021/jf050049u>

Petroni, A., Blasevich, M., Papini, N., Salami, M., Sala, A., & Galli, C. (1997). Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Thrombosis Research*, 87(3), 315–322.

Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G. F., & Galli, C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, 78(2), 151–160.

Poudyal, H., Campbell, F., & Brown, L. (2010). Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *The Journal of Nutrition*, 140(5), 946–953. <http://doi.org/10.3945/jn.109.117812>

Puel, C., Mardon, J., Agalias, A., Davicco, M.-J., Lebecque, P., Mazur, A., ... Coxam, V. (2008). Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9417–9422. <http://doi.org/10.1021/jf801794q>

- Quirantes-Piné, R., Herranz-López, M., Funes, L., Borrás-Linares, I., Micol, V., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 20(12), 1112–1118. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.05.007>
- Raederstorff, D. (2009). Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Für Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*, 79(3), 152–165. <http://doi.org/10.1024/0300-9831.79.3.152>
- Rafehi, H., Ververis, K., & Karagiannis, T. C. (2012). Mechanisms of Action of Phenolic Compounds in Olive. *Journal of Dietary Supplements*, 9(2), 96–109. <http://doi.org/10.3109/19390211.2012.682644>
- Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Douidi, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927–946.
- Ramírez-Tortose, M. del C., Pulido-Moran, M., Granados, S., Gaforio, J. J., & Quiles, J. L. (2015). Chapter 20 - Hydroxytyrosol as a Component of the Mediterranean Diet and Its Role in Disease Prevention. In V. R. P. R. Watson (Ed.), *The Mediterranean Diet* (pp. 205–215). San Diego: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124078499000208>

- Rask-Madsen, C., & King, G. L. (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metabolism*, 17(1), 20–33. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.012>
- Reguant-Aleix, J., Arbore, M. R., Bach-Faig, A., & Serra-Majem, L. (2009). Mediterranean Heritage: an intangible cultural heritage. *Public Health Nutrition*, 12(Special Issue 9A), 1591–1594. <http://doi.org/10.1017/S1368980009990413>
- Reyes, J. J., De La Cruz, J. P., Muñoz-Marin, J., Guerrero, A., Lopez-Villodres, J. A., Madrona, A., ... Gonzalez-Correa, J. A. (2013). Antiplatelet effect of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. *European Journal of Nutrition*, 52(2), 591–599. <http://doi.org/10.1007/s00394-012-0361-1>
- Richard, N., Arnold, S., Hoeller, U., Kilpert, C., Wertz, K., & Schwager, J. (2011). Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Medica*, 77(17), 1890–1897. <http://doi.org/10.1055/s-0031-1280022>
- Rietjens, S. J., Bast, A., de Vente, J., & Haenen, G. R. M. M. (2007). The olive oil antioxidant hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NObullet response of isolated rat aorta. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292(4), H1931–1936. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00755.2006>
- Rigane, G., Boukhris, M., Bouaaziz, M., Sayadi, S., & Ben Salem, R. (2013). Analytical evaluation of two monovarietal virgin olive oils cultivated in the south of

Tunisia: Jemri-Bouchouka and Chemlali-Tataouin cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1249–1250.

<http://doi.org/10.1002/jsfa.6101>

Roberts, A. C., & Porter, K. E. (2013). Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 10(6), 472–482. <http://doi.org/10.1177/1479164113500680>

Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., & de la Torre, R. (2015). Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(3), 4655–4680. <http://doi.org/10.3390/molecules20034655>

Rooke, T. (2008). *Vascular Medicine and Endovascular Interventions*. John Wiley & Sons.

Rosado-Pérez, J., & Mendoza-Núñez, V. M. (n.d.). Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la DM. *Bioquímica*, 32(2), 58–69.

Ros, E., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Fitó, M., Martínez, J. A., & Corella, D. (2014). Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 5(3), 330S–6S. <http://doi.org/10.3945/an.113.005389>

Rosillo, M. A., Sánchez-Hidalgo, M., González-Benjumea, A., Fernández-Bolaños, J. G., Lubberts, E., & Alarcón-de-la-Lastra, C. (2015). Preventive effects of dietary

hydroxytyrosol acetate, an extra virgin olive oil polyphenol in murine collagen-induced arthritis. *Molecular Nutrition & Food Research*.

<http://doi.org/10.1002/mnfr.201500304>

Ruano, J., López-Miranda, J., Torre, R. de la, Delgado-Lista, J., Fernández, J., Caballero, J., ... Pérez-Jiménez, F. (2007). Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(2), 341–346.

Rubió, L., Macià, A., Valls, R. M., Pedret, A., Romero, M.-P., Solà, R., & Motilva, M.-J. (2012). A new hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: Hydroxytyrosol acetate sulphate. *Food Chemistry*, 134(2), 1132–1136.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.192>

Ruiz-Domínguez, M. L., Raigón, M. D., & Prohens, J. (2013). Diversity for olive oil composition in a collection of varieties from the region of Valencia (Spain). *Food Research International*, 54(2), 1941–1949.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.023>

Ruiz, E., Redondo, S., Padilla, E., Gordillo-Moscoso, A., Salaices, M., Balfagón, G., & Tejerina, T. (2007). Importance of intracellular Angiotensin II in vascular smooth muscle cell apoptosis: Inhibition by the Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan. *European Journal of Pharmacology*, 567(3), 231–239.
<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.03.053>

- Ruiz, J. (2009). *Control Global Del Riesgo Cardiometabolico*. Ediciones Díaz de Santos.
- Ruiz, M. (2013). *Importancia de los grupos hidroxilos en el efecto antioxidante y neuroprotector de algunos derivados de los polifenoles del aceite de oliva*. (Tesis Doctoral). Universidad de Málaga, Málaga.
- Ruiz-Ramos, M., Escolar-Pujolar, A., Mayoral-Sánchez, E., Corral-San Laureano, F., & Fernández-Fernández, I. (2006). La DM en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. *Gaceta Sanitaria*, 20, 15–24. <http://doi.org/10.1157/13086022>
- Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., & Robards, K. (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2532–2538. <http://doi.org/10.1021/jf0261351>
- Salami, M., Galli, C., De Angelis, L., & Visioli, F. (1995). Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 31(5), 275–279.
- Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., Aparicio-Soto, M., Cárdeno, A., Rosillo, M. Á., González-Benjumea, A., ... Alarcón de la Lastra, C. (2015). Effects of dietary virgin olive oil polyphenols: hydroxytyrosyl acetate and 3, 4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice. *The Journal of*

Nutritional Biochemistry, 26(5), 513–520.

<http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.12.001>

Santilli, F., Simeone, P., Liani, R., & Davì, G. (2015). Platelets and DM. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 120, 28–39.

<http://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.05.002>

Schaffer, S., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells.

Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society, 62(4), 322–327. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.06.004>

Schmitt, C. A., Handler, N., Heiss, E. H., Erker, T., & Dirsch, V. M. (2007). No evidence for modulation of endothelial nitric oxide synthase by the olive oil polyphenol hydroxytyrosol in human endothelial cells. *Atherosclerosis*, 195(1), e58–64. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.02.024>

Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Martines, G., ...

Carluccio, M. A. (2012). Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527(2), 81–89.

<http://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.003>

- Sena, C. M., Pereira, A. M., & Seica, R. (2013). Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1832(12), 2216–2231. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.08.006>
- Servili, M., Sordini, B., Esposito, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., ... Taticchi, A. (2013). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, 3(1), 1–23. <http://doi.org/10.3390/antiox3010001>
- Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Urbani, S., Selvaggini, R., & Montedoro, G. (2007). Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 7028–7035. <http://doi.org/10.1021/jf070600i>
- Shaw, A., Doherty, M. K., Mutch, N. J., MacRury, S. M., & Megson, I. L. (2014). Endothelial cell oxidative stress in diabetes: a key driver of cardiovascular complications? *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 928–933. <http://doi.org/10.1042/BST20140113>
- Sies, H. (2007). Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *The Journal of Nutrition*, 137(6), 1493–1495.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., & Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1013–1023. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C)

Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., & Crea, R. (2006). Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(7), 903–915.
<http://doi.org/10.1016/j.fct.2006.01.008>

St-Laurent-Thibault, C., Arseneault, M., Longpré, F., & Ramassamy, C. (2011). Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- β -induced toxicity. Involvement of the NF- κ B signaling. *Current Alzheimer Research*, 8(5), 543–551.

Storniolo, C. E., Roselló-Catafau, J., Pintó, X., Mitjavila, M. T., & Moreno, J. J. (2014). 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 Biology*, 2C, 971–977.
<http://doi.org/10.1016/j.redox.2014.07.001>

Stulc, T., Ceska, R., Marinov, I., & Skrha, J. (2012). The effect of simvastatin and fenofibrate on the expression of leukocyte adhesion molecules and lipopolysaccharide receptor CD14 in type 2 DM. *Neuro Endocrinology Letters*, 33 Suppl 2, 73–77.

Szmitko, P. E., Wang, C.-H., Weisel, R. D., Almeida, J. R. de, Anderson, T. J., & Verma, S. (2003). New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation

Part I. *Circulation*, 108(16), 1917–1923.

<http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000089190.95415.9F>

Tabernerero, M., Sarriá, B., Largo, C., Martínez-López, S., Madrona, A., Espartero, J. L., ... Mateos, R. (2014). Comparative evaluation of the metabolic effects of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives (hydroxytyrosyl acetate and ethyl hydroxytyrosyl ether) in hypercholesterolemic rats. *Food & Function*, 5(7), 1556–1563. <http://doi.org/10.1039/c3fo60677e>

Taher, M. M., Garcia, J. G., & Natarajan, V. (1993). Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 260–266. <http://doi.org/10.1006/abbi.1993.1281>

Terzuoli, E., Donnini, S., Giachetti, A., Iñiguez, M. A., Fresno, M., Melillo, G., & Ziche, M. (2010). Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(16), 4207–4216. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0156>

The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent DM. The Diabetes Control and Complications Trial. (1995). *Archives of Ophthalmology*, 113(1), 36–51.

The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent DM. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993). *The New England Journal of Medicine*, 329(14), 977–986. <http://doi.org/10.1056/NEJM199309303291401>

Togna, G. I., Togna, A. R., Franconi, M., Marra, C., & Guiso, M. (2003). Olive oil isochromans inhibit human platelet reactivity. *The Journal of Nutrition*, 133(8), 2532–2536.

Toledo, E., Salas-Salvadó, J., Donat-Vargas, C., Buil-Cosiales, P., Estruch, R., Ros, E., ... Martínez-González, M. A. (2015). Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Internal Medicine*, 175(11), 1752–1760. <http://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.4838>

Tousoulis, D., Davies, G., Stefanadis, C., Toutouzas, P., & Ambrose, J. A. (2003). Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart*, 89(9), 993–997.

Tousoulis, D., Papageorgiou, N., Androulakis, E., Siasos, G., Latsios, G., Tentolouris, K., & Stefanadis, C. (2013). DM-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(8), 667–676. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.089>

- Tresserra-Rimbau, A., Rimm, E. B., Medina-Remón, A., Martínez-González, M. A., de la Torre, R., Corella, D., ... PREDIMED Study Investigators. (2014). Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 24(6), 639–647. <http://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.12.014>
- Trichopoulou, A., & Lagiou, P. (1997). Worldwide patterns of dietary lipids intake and health implications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66(4), 961S–964S.
- Triggle, C. R., & Ding, H. (2010). A review of endothelial dysfunction in diabetes: a focus on the contribution of a dysfunctional eNOS. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH*, 4(3), 102–115. <http://doi.org/10.1016/j.jash.2010.02.004>
- UNESCO. (2010). *The Mediterranean diet*. Retrieved from <http://www.unesco.org/archives/multimedia/?s=flvplayer&pg=33&vo=2&vl=Eng&id=1680>
- Urpi-Sarda, M., Casas, R., Chiva-Blanch, G., Romero-Mamani, E. S., Valderas-Martínez, P., Arranz, S., ... Estruch, R. (2012). Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacological Research*, 65(6), 577–583. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.03.006>

- Vanhoutte, P. M., Feletou, M., & Taddei, S. (2005). Endothelium-dependent contractions in hypertension. *British Journal of Pharmacology*, *144*(4), 449–458. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706042>
- Villar, I. C., Francis, S., Webb, A., Hobbs, A. J., & Ahluwalia, A. (2006). Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney International*, *70*(5), 840–853. <http://doi.org/10.1038/sj.ki.5001680>
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., ... Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, *89*(4), 561–568. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.012>
- Visioli, F., & Galli, C. (2002). Biological Properties of Olive Oil Phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *42*(3), 209–221. <http://doi.org/10.1080/10408690290825529>
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., & Caruso, D. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, *468*(2-3), 159–160.
- Visioli, F., Galli, C., Grande, S., Colonnelli, K., Patelli, C., Galli, G., & Caruso, D. (2003). Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *The Journal of Nutrition*, *133*(8), 2612–2615.

- Vissers, M. N., Zock, P. L., & Katan, M. B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(6), 955–965. <http://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601917>
- Vossen, P. (2007). Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. *HortScience*, 42(5), 1093–1100.
- Wang, X., Bao, W., Liu, J., Ouyang, Y.-Y., Wang, D., Rong, S., ... Liu, L.-G. (2013). Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 36(1), 166–175. <http://doi.org/10.2337/dc12-0702>
- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 12(4), 331–342.
- WHO | Healthy diet. (n.d.). Retrieved April 14, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/>
- Wick, G., Knoflach, M., & Xu, Q. (2004). Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annual Review of Immunology*, 22, 361–403. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104644>
- Widyantoro, B., Emoto, N., Nakayama, K., Anggrahini, D. W., Adiarto, S., Iwasa, N., ... Hirata, K.-I. (2010). Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal

transition. *Circulation*, 121(22), 2407–2418.

<http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.938217>

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5), 1047–1053.

Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K. S., Ido, Y., Kawamura, T., ... Tilton, R. G. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42(6), 801–813.

Williams, S. B., Goldfine, A. B., Timimi, F. K., Ting, H. H., Roddy, M. A., Simonson, D. C., & Creager, M. A. (1998). Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*, 97(17), 1695–1701.

Wolff, S. P., & Dean, R. T. (1987). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of “autoxidative glycosylation” in diabetes. *Biochemical Journal*, 245(1), 243–250.

World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and classification of DM and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of DM. Retrieved January 30, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>

- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., ... Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163), 411–415. <http://doi.org/10.1038/332411a0>
- Zhang, X., Cao, J., & Zhong, L. (2009). Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379(6), 581–586. <http://doi.org/10.1007/s00210-009-0399-7>
- Zou, M.-H. (2007). Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 82(1–4), 119–127. <http://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2006.05.005>
- Zrelli, H., Matsuka, M., Araki, M., Zarrouk, M., & Miyazaki, H. (2011). Hydroxytyrosol induces vascular smooth muscle cells apoptosis through NO production and PP2A activation with subsequent inactivation of Akt. *Planta Medica*, 77(15), 1680–1686. <http://doi.org/10.1055/s-0030-1271073>



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

8. ANEXOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Ruiz Moreno María Isabel, Guerreo Loriguillo Ana, Guzmán Moscoso Rocio, Abdel Karim Miriam, Lopez Villodres Juan Antonio, Muñoz Marín Javier, Espartero Jose Luis, Gonzalez Correa Jose Antonio. Protección química de los grupos OH de derivados polifenólicos sobre su efecto antioxidante y neuroprotector. III Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Sevilla 16-17 Junio 2011.

Abdel Karim Ruiz, Miriam, Muñoz Marin, Javier, López Villodres, Juan Antonio, Guerrero Loriguillo, Ana M^a, Reyes de la Vega, Jose Julio, González Correa Jose Antonio, de la Cruz Jose Pedro: Neuroprotective Effect of Alkyl Hydroxytyrosyl Ethers in Rat Brain Slices Subjected to Hypoxia-Reoxygenation. Poster en Congreso. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Facultad de Medicina. Málaga. 2011. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 50. 50

Reyes de la Vega, Jose Julio, Ruiz Moreno, María Isabel, López Villodres, Juan Antonio, Muñoz Marin, Javier, Guerrero Loriguillo, Ana M^a, Abdel Karim Ruiz, Miriam, Espartero Jose Luis, González Correa Jose Antonio, de la Cruz Jose Pedro: Comunicación nacional: Antiplatelet effect os alkyl hydroxytyrosyl ethers after oral administation to rats. Poster en Congreso. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Facultad de Medicina. Málaga 2011. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 50. 50

Abdel Karim Ruiz, Miriam, Guerrero Loriguillo, Ana M^a , Reyes de la Vega, Jose Julio, López Villodres, Juan Antonio, Muñoz Marin, Javier, Gonazález Correa Jose Antonio, de la Cruz, Jose Pedro. Effect of hydroxytyrosol on some cardiovascular biomarkers in streptozotocin-diabetic rats. 6th European Congress of Pharmacology. Facultad de Farmacia. Granada. 20/07/2012

Abdel Karim Ruiz, Miriam; Guerrero Loriguillo, Ana M^a; Reyes de la Vega, Jose Julio; López Villodres, Juan Antonio; Muñoz Marin, Javier; Gonazález Correa Jose Antonio; de la Cruz, Jose Pedro. Efectos del hidroxitirosol sobre algunos biomarcadores cardiovasculares en ratas diabéticas por estreptozotocina. Comunicación oral. IV Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía. Facultad de Medicina. Granada 04/06/2012.

Abdel-Karim M., Reyes de la Vega J.L., Ruiz-Moreno M.I., Guzmán-Moscoso R., Villanueva B., Guerrero A., Villodres J.A., Gonzalez-Correa J.A., De la Cruz J.P. Oxidative Stress Inflammatory Market After Oral Treatment of Different Dose of Hydroxytyrosol. VI REUNIÓN DE JÓVENES FARMACÓLOGOS DE ANDALUCÍA. Comunicación. Sevilla 12/06/2014.

Jose Pedro De La Cruz Cortés, Miriam Abdel-Karim Ruiz, José Julio Reyes de la Vega¹, María Isabel Ruiz Moreno, Rocío Guzmán Moscoso¹, Beatriz Villanueva, Juan Antonio López Villodres, Ana Guerrero Loriguillo, José Antonio González Correa. Oxidative stress and inflammatory market after oral treatment of different dose of hydroxytyrosol. 35 Congreso Nacional de la Sociedad Española de *Farmacología* SEF. Madrid, 24-26 Septiembre 2014. Sede Facultad de Medicina. Universidad Complutense.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA