

UNIVERSIDAD DE GRANADA



DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Tesis Internacional

Evaluación clínica de dos aceites de oliva virgen optimizados enriquecidos en compuestos bioactivos de diferentes fracciones de la aceituna comparados con un aceite de oliva virgen control

Clinical evaluation of two optimized virgin olive oils enriched in bioactive compounds obtained from different fractions of the olive fruit compared to a control virgin olive oil

Estefanía Sánchez Rodríguez

Bajo la supervisión de:

María Dolores Mesa García

Ángel Gil Hernández

Granada, 30 de octubre de 2018



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Estefanía Sánchez Rodríguez
ISBN: 978-84-1306-048-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54441>

Publicaciones asociadas a esta tesis doctoral
Publications associated with this doctoral thesis

Estefania Sanchez-Rodriguez, Elena Lima-Cabello, Sara Biel-Glesson, Jose R. Fernandez-Navarro, Miguel A. Calleja, Maria Roca, Juan A. Espejo-Calvo, Blas Gil-Extremera, Maria Soria-Florido, Rafael de la Torre, Montserrat Fito, Maria-Isabel Covas, Juan de Dios Alche, Emilio Martinez de Victoria, Angel Gil and Maria D. Mesa. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on metabolic syndrome and endothelial functional risk biomarkers in healthy adults: a randomized double-blind controlled trial. *Nutrients* 2018, 10, 626; doi:10.3390/nu10050626

Índice de impacto (2017): 4.196 (Q1, 18/83, Nutrition & Dietetics).

Estefania Sanchez-Rodriguez y Maria D. Mesa. Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. *Nutrición Clínica en Medicina* 2018; XII (2): 80-94; doi:10.7400/NCM.2018.12.2.5064

Estefania Sanchez-Rodriguez, Sara Biel-Glesson, Jose R. Fernandez-Navarro, Miguel A. Calleja, Juan A. Espejo-Calvo, Blas Gil-Extremera, Rafael de la Torre, Montserrat Fito, Maria-Isabel Covas, Pedro Vilchez, Juan de Dios Alche, Emilio Martinez de Victoria, Angel Gil and Maria D. Mesa. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on oxidative stress and inflammation parameters in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients* 2018 (under review)

Índice de impacto (2017): 4.196 (Q1, 18/83, Nutrition & Dietetics).

Otras publicaciones NO directamente asociadas a esta tesis doctoral
Other publications NOT directly associated with this doctoral thesis

Sara Biel, Maria-Dolores Mesa, Rafael de la Torre, Juan-Antonio Espejo Jose-Ramón Fernández-Navarro, Montserrat Fitó, **Estefania Sanchez-Rodriguez**, Carmen Rosa, Rosa Marchal, Juan de Dios Alche, Manuela Expósito, Manuel Brenes, Beatriz Gandul, Miguel Angel Calleja and María-Isabel Covas. The NUTRAOLEOUM Study, a randomized controlled trial, for achieving nutritional added value for olive oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2016) 16:404; doi:10.1186/s12906-016-1376-6.

Índice de impacto (2017): 2.109 (Q2, 8/27, Integrative & Complementary Medicine).

Oscar J. Pozo, Mitona Pujadas, Sarah Biel Gleeson, Maria Dolores Mesa-García, Antoni Pastor, Aristotelis Kotronoulas, Montserrat Fito, Maria-Isabel Covas, Jose Ramon Fernandez Navarro, Juan Antonio Espejo, **Estefania Sanchez-Rodriguez**, Rosa Marchal, Miguel Angel Calleja, and Rafael de la Torre. Liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of triterpenes in human fluids: Evaluation of markers of dietary intake of olive oil and metabolic disposition of oleanolic acid and maslinic acid in humans. *Analytica Chimica Acta* (2017) 990, 84-95; 10.1016/j.aca.2017.07.041

Índice de impacto (2017): 5.123 (Q1, 8/80, Chemistry, Analytical Science).

Esta Tesis Doctoral es fruto del trabajo de investigación realizado gracias a la financiación recibida:

EXP 00064835 / ITC-20131031, programa FEDER-INTERCONECTA. Proyecto titulado “Nuevos procesos en la industria almazarera andaluza para la elaboración de nuevos productos de alto valor biológico con aplicaciones en salud humana, NUTRAOLEUM” liderado por la Cooperativa San Francisco de Asís de Montefrío S.C.A, y en el que participaron las empresas Acer Campestres SL, Agroinsur Ingenieros SL y Fluysur SL, y organismos públicos como la Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria (FIBAO), el Instituto Hospital Del Mar De Investigaciones Médicas (IMIM), el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y el Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos “José Mataix” Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular 2 de la Universidad de Granada.

Estancia cofinanciada por el Campus de Excelencia Internacional CEI Biotic y la Universidad de Granada, dentro del programa de “Movilidad Internacional de Jóvenes Investigadores de Programas de Doctorado Universidad de Granada y CEI Biotic Granada”. Estancia realizada en la “University of East Anglia”, Norwich (Inglaterra) durante 3 meses.

Quisiera agradecer a mi directora de tesis, María Dolores Mesa su apoyo y dedicación desde que comencé a trabajar en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular II con una beca de colaboración, que con suerte, recibimos de rebote. Fue un golpe de suerte, que me dió la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, y conocer más de cerca el mundo de la investigación. Muchas gracias por toda tu ayuda y por tu cariño, he aprendido mucho de tí y todavía me queda mucho más que aprender.

Me gustaría agradecer a mi segundo director de tesis, Ángel Gil Hernández, por darme la oportunidad de trabajar junto al grupo CTS 461, por querer ser director de esta tesis y por toda su dedicación y esfuerzo. Es un orgullo para mí ser tu última doctoranda.

A todos los que trabajaron para llevar a cabo el proyecto "NUTRAOLEUM", tanto a las cooperativas y demás empresas involucradas, voluntarios del estudio, investigadores, personal de los hospitales, a Llenalia por ayudarnos con la estadística del Proyecto, así como a los diferentes grupos del IMIM y del CSIC por los resultados aportados, muchas gracias.

A mis compañeros y amigos del INYTA y FINUT, que son muchos, gracias por vuestra ayuda y por vuestro cariño. También a los que ya no están pero siguen formando parte de nosotros, gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A mi jefe de "Mine", Alejandro Rodríguez Navarro, le doy las gracias por su comprensión y por haberme facilitado siempre el poder asistir a congresos, cursos y tareas relacionadas con mi doctorado.

Agradecer a mi otra familia, a mis "Pendejos", con los que he tenido la suerte de compartir momentos inolvidables, y en especial a mis niñas de los huevos y de los huesos, Nazaret y Cristina, por ser las mejores compañeras que una puede tener. Gracias por todo lo bueno que habéis hecho por mí.

A mis familiares y amigos, muchas gracias por preocuparos por mí, por ayudarme siempre, por vuestros mensajes de fuerza y apoyo cuando más los he necesitado, y por recordarme cada día que todo esfuerzo tiene su recompensa. No podía olvidarme de mi estimado (Manolo Yeste), gracias por todo el cariño recibido y por supuesto, gracias por dejarme ser tu estimado.

Finalmente agradecer a Alex, porque él mejor que nadie sabe el esfuerzo realizado, los fines de semana, festivos y vacaciones dedicados siempre al mismo fin. Gracias por sacrificar conmigo todo este tiempo y por ayudarme a ver las cosas más fáciles.

Gracias a todos de corazón.

Summary	5
Capítulo 1 - Introducción	11
1.1 Enfermedad cardiovascular: factores de riesgo y patologías asociadas	11
1.1.1 Síndrome metabólico	12
1.1.1.1 Obesidad	13
1.1.1.2 Hipertensión	16
1.1.1.3 Hiperglucemia	17
1.1.1.4 Dislipidemia	19
1.2 Fisiopatología de las ECV	21
1.2.1 Aterosclerosis	21
1.2.2 Estrés oxidativo	23
1.2.2.1 Aspectos generales	23
1.2.2.2 Sistema de defensa antioxidante	26
1.3 Dieta mediterránea	27
1.4 Aceite de oliva	28
1.4.1 Historia del olivo y de las aplicaciones del aceite de oliva	28
1.4.2 Producción de aceite de oliva	28
1.4.2.1 Producción de aceite de oliva en Andalucía	29
1.4.2.2 Variedades de aceitunas más comunes en Andalucía	29
1.4.3 Definición de aceite de oliva	30
1.4.4 Tipos de aceites de oliva	31
1.4.4.1 Denominación de Origen Protegida: Calidad garantizada	33
1.4.4.2 Factores que afectan a la calidad del aceite de oliva	34
1.4.5 Composición del aceite de oliva virgen	37
1.4.5.1 Lípidos del aceite de oliva	38
1.4.5.2 Compuestos bioactivos del aceite de oliva	39
1.4.5.3 Ácidos triterpénicos	41
1.4.6 Importancia del aceite de oliva con respecto a otros aceites	43
1.4.7 Efectos beneficiosos para la salud del aceite de oliva	43
1.4.7.1 Aspectos generales	43
1.4.7.2 Actividad protectora frente a la ECV	45
1.4.7.3 Actividad antidiabética	48
1.4.7.4 Actividad anticancerígena	49
1.4.7.5 Protección frente a las enfermedades neurodegenerativas	50
1.4.7.6 Actividad antimicrobiana	51
1.4.7.7 Protección frente a afecciones cutáneas	52
1.4.7.8 Protección frente a otras afecciones	52

Capítulo 2 – Materiales y métodos	55
2.1 Características de los aceites de oliva	55
2.2 Sujetos	56
2.2.1 Tamaño de muestra y análisis de potencia	56
2.2.2 Elegibilidad de sujetos y cumplimiento	57
2.2.3 Procedimientos de operación estándar para asegurar la calidad del estudio: aleatorización y ocultamiento de la asignación	58
2.2.4 Control de la dieta	59
2.3 Diseño del estudio	59
2.3.1 Intervención y recolección de muestras	60
2.4 Determinaciones analíticas	61
2.4.1 Marcadores de cumplimiento de intervención: análisis de triterpenos en orina	61
2.4.2 Evaluación de la ingesta	62
2.4.3 Experimentos <i>ex-vivo</i> : cultivos celulares de sangre completa	62
2.4.5 Determinación de medidas antropométricas y biomarcadores relacionados con el síndrome metabólico	63
2.4.6 Determinación de biomarcadores de función endotelial y adipoquinas	63
2.4.7 Determinación de marcadores de oxidación	63
2.4.8 Determinación de ácidos grasos en plasma	64
2.4.9 Determinación de biomarcadores del sistema de defensa antioxidante no enzimático	64
2.4.10 Determinación de biomarcadores de inflamación	64
2.5 Análisis estadístico	65
Capítulo 3 – Resultados	67
3.1 Estudio de consumo sostenido	67
3.1.1 Resultados basales	67
3.1.2 Resultados tras la intervención	70
3.1.2.1 Análisis nutricional	70
3.1.2.2 Biomarcadores de síndrome metabólico y función endotelial en plasma	71
3.1.2.3 Concentraciones de endotelina-1 en los experimentos <i>ex vivo</i>	73
3.1.2.4 Biomarcadores de inflamación en plasma de sujetos sanos	75
3.1.2.5 Perfil plasmático de ácidos grasos	75
3.1.2.6 Concentraciones urinarias de biomarcadores de estrés oxidativo	78
3.1.2.7 Vitaminas antioxidantes	78
3.1.2.8 Biomarcadores de cumplimiento de intervención	81

Capítulo 4 - Discusión	83
4.1 Efecto sobre el perfil lipídico	84
4.2 Efectos sobre la función endotelial	86
4.3 Efecto sobre el estado oxidativo	87
4.4 Efecto sobre el estado inflamatorio	89
4.5 Limitaciones del estudio	89
Capítulo 5 - Conclusiones	91
Abreviaciones	93
Lista de tablas	97
Lista de figuras	99
Anexos	101
I Consentimiento informado	101
II Registro de ingestas de alimentos	102
III Publicación	115
Bibliografía	137

Summary

Introduction

There is consolidated clinical evidence that the Mediterranean diet (MedDiet) is associated with a lower risk of cardiovascular diseases (CDV), including myocardial infarction, stroke and cardiovascular death (Gardener et al. 2011). A large study in a high cardiovascular risk population has found that the MedDiet supplemented with virgin olive oil protects people from vascular disease, suggesting a key role of olive oil (Martínez-González et al. 2015). A systematic review and meta-analysis have provided evidence that olive oil might exert beneficial effects on endothelial function and biomarkers of inflammation, thus representing a key ingredient contributing to the MedDiet cardiovascular-protective effects (Schwingshackl, Christoph, Hoffmann 2015). Olive oil is not only a source of monounsaturated fatty acids but also an important source of bioactive compounds, such as phenols and triterpenes (Covas et al. 2006). The content of the phenolic compounds (also known as polyphenols) of an olive oil depends of the cultivar, climate, olive variety and ripeness, and the type of processing, and virgin olive oil has the highest phenolic content (Covas, De la Torre, Fitó 2015). Triterpenic acids, mainly oleanolic and maslinic acids, are present mainly in the seeds and the skin of the olives. Virgin olive oil contains low amounts of triterpenic acids, that are more abundant in pomace olive oil.

Among these components from the unsaponifiable polar fraction that has demonstrated healthy beneficial effects stand up phenolic compounds, mainly oleuropein and hydroxytyrosol (Hohmann et al. 2015), and triterpenic acids, mainly oleanolic and maslinic acids that have also potential health benefits against CDV and its complications (Herrera, Rodriguez-Rodriguez, Ruiz-Gutierrez 2006; Lou-Bonafonte et al. 2012; Sánchez-Quesada et al. 2013). Previous studies have suggested a protective effect of olive oil phenolic compounds on endothelial dysfunction (Storniolo et al. 2014), whereas olive oil triterpenes could be useful for the prevention of multiple diseases related to oxidative damage (Sánchez-Quesada et al. 2013). The potential of these olive oil triterpenic acids for use as a therapeutic strategy to improve vascular function and treating CDV has been recently reviewed (Rodriguez-Rodriguez 2015).

Randomized and controlled clinical studies evaluating olive oil, particularly the virgin one, rich in phenolic compounds, have reported benefits on different mechanisms key for atherosclerosis development, such as oxidative damage, inflammation, and endothelial dysfunction. In addition, a protection for hard primary endpoints such as atrial fibrillation and diabetes by virgin olive oil consumption has also been reported (Covas, De la Torre, Fitó 2015). On November 2011, the European Food Safety Authority (EFSA) released a claim concerning the benefits of the daily ingestion of olive oils rich in phenolic compounds on low-density lipoproteins (LDL) oxidation (EFSA Panel on Dietetic Products 2011), regulated by the Commission Regulation (EU) N° 432/2012 (2012). This claim indicates that olive oils containing at least 5 mg of hydroxytyrosol and its derivatives (e.g. oleuropein complex and tyrosol) per 20 g of olive oil may protect LDL against

oxidation. Due to the high caloric content of the olive oil, only high phenolic content olive oils can bear the claim. Therefore, to obtain high phenolic content olive oils, by optimizing the olive oil processing, is one of the current goals in terms of increasing the nutritional value of an olive oil.

However, the human health benefits of triterpenes from olive oil have not been evaluated at present. To our best knowledge, the present Thesis presents results from the first clinical trial (the NUTRAOLEUM study) performed to provide evidence of the benefits of olive triterpenic acids in healthy adults, according to EFSA requirement (EFSA Panel on Dietetic Products 2011).

We hypothesized that an optimized virgin olive oil with a high phenolic content and a functional olive oil rich in both phenolic compounds and triterpenic acids can provide additional benefits, to those provided by a standard virgin olive oil, on risk factors for coronary heart disease in humans. According to the Evidence Based Medicine (Woolf et al. 1990), the healthy properties of optimized and functional oils must be tested in proper clinical randomized trials, vs control oils obtained by traditional procedures, for ensuring that their benefits for health are really highlighted.

Aims

The aims of the present trial are to assess the benefits of the enrichment of optimized virgin olive oil with both olive oil polyphenols and triterpenes on selected biomarkers of CDV risk, namely lipid and DNA oxidation, inflammation, and endothelial function in healthy volunteers. Therefore, an optimized virgin olive oil with high phenolic content (429 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenic acids) and a functional one, rich in both phenolic compounds (429 ppm of phenolic compounds) and triterpenic acids (389 mg/kg), have been compared with a standard virgin olive oil (124 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenic acids).

The primary null hypothesis is: The efficacy for protecting against lipid and DNA oxidation, inflammation, and endothelial dysfunction of the olive oils will be as follows: functional oil > optimized virgin olive oil > control olive oil.

Material and Methods

A randomized, double-blind, crossover, controlled study has been conducted (Biel et al. 2016). Healthy volunteers (aged 20 to 50) were randomized into one of three groups of daily raw olive oil consumption: virgin olive oil, optimized virgin olive oil, rich in phenolic compounds, and a functional oil rich in phenolic compounds and enriched with triterpenic acids obtained from the olive exocarp. Control olive oil was obtained after washing the optimizing virgin olive oil. Thus oils only differed on the presence of bioactive compounds, i. e. they had similar fatty acid profile and micronutrients composition except the polyphenols and triterpenic acids. Daily, 30 ml of the correspondent olive oil were consumed over 3-week periods preceded by 2-week washout ones when participants were asked to use only sunflower oil and none olive-derived product. The main outcomes of the present study were markers of lipid and DNA oxidation, inflammation, and vascular damage. The Trial has been registered in ClinicalTrials.gov ID: NCT02520739.

Secondary outcomes were systolic and diastolic blood pressures, plasma antioxidant vitamins, fatty acids, endothelin-1 and an *ex vivo* cell immune response experiment. Compliance markers were also determined as plasma triterpenes and urinary tyrosol and hydroxytyrosol.

One-factor ANOVA or Kruskal-Wallis test were used for variables to determine differences among the three olive oil interventions, in terms of baseline characteristics, nutrient intake and for the *ex vivo* endothelin-1 experiment. Biochemical parameters were analyzed using a linear mixed-effects model (LMM), to compare variables before and after each intervention (pre- vs. post-interventions, intra-treatment effect) and to compare the results between the groups after the 3-week intervention (inter-treatment effect), adjusting for age, gender, pre-intervention and period as fixed effects and for subjects and hospital as random effects. The same model was also used to compare changes of the variables (post-intervention minus pre-intervention) without adjusting for pre-intervention. The multiple comparison post hoc is given by the estimated means in the model (adjusted by Sidak). The effect by gender and the carryover effects were also checked (Senn 2002). In addition, Pearson or Spearman correlations were evaluated. A $p < 0.05$ value was considered significant. Statistical Package for the Social Sciences version 20 software was used to perform the statistical analysis (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results and Discussion

The benefits of rich-phenolic natural olive oils on risk factors for chronic diseases have been established in human studies (Covas, De la Torre, Fitó 2015). The PREDIMED (*Prevención por Dieta Mediterránea*) Study reported a decrease in the atrial fibrillation in cardiovascular disease risk individuals when the MedDiet was supplemented with extra virgin olive oil (Martínez-González et al. 2014). The effect of olive oils polyphenols on plasma lipids is not completely clear (Sanchez-Rodriguez et al. 2018).

The present Thesis has reported that daily intake of virgin olive oil rich in phenolic compounds during three weeks may improve plasma high density lipoprotein cholesterol levels (HDLc), one of the features of metabolic syndrome, although no differences were found at the end of the three interventions (Sanchez-Rodriguez et al. 2018). In addition, the virgin olive oil with at least 124 ppm of phenolic compounds, regardless of the triterpenes content, improved the systemic endothelin-1 (a vasoconstrictor molecule) levels *in vivo* and endothelin-1 secreted *ex vivo* when extracted blood was cultured in the presence of phytohemagglutinin, *E. coli* lipopolysaccharide and phorbol 12-myristate 13-acetate plus ionomycin, while no additional effect of triterpenes was observed. These changes in endothelin-1 secretion did not modify blood pressure, suggesting that longer intervention periods would be needed to get the potential health benefits of polyphenols and triterpenic acids-rich olive oils (Sanchez-Rodriguez et al. 2018).

On the other hand, daily supplementation during 3-week with 30 ml of a functional olive oil providing 13.4 mg/d of phenolic compounds (487 ppm) and 4.7 mg/d of oleanolic acid and 6 mg/d of maslinic acid (171 and 218 ppm, respectively) may protect DNA against oxidative stress *in vivo*, by decreasing urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) concentrations compared to the same

virgin oil but without triterpenes. In this regard, *in vitro* (Fabiani et al. 2008; Quiles et al. 2002) and animal (Jacomelli et al. 2010) studies have reported that olive oil phenolic compounds protect DNA from oxidation, whereas *in vitro* studies have reported that also pentacyclic triterpenes are able to protect against oxidative DNA damage (Allouche et al. 2011). The 8-OHdG results of the present study agrees with observations made in the EUROLIVE study in which supplementation with olive oil protects DNA against oxidation after 3-wk of supplementation in healthy males (Machowetz et al. 2007). This effect was independent of the phenolic content and related to the monounsaturated fatty acid content of the olive oil (Machowetz et al. 2007). No additional effect was found in other oxidative stress biomarkers in this study.

The present study shows that daily supplementation during 3 weeks with 30 ml of a functional olive oil rich in phenolic compounds and enriched with olive triterpenic acids improve plasma inflammatory biomarkers, by decreasing plasma IL-8 and TNF- α concentrations, compared with the oils with less triterpenic acids. This is the first time than an "*in vivo*" effect of triterpenic acids from olive oil is described. The optimized oil improved the IL-8 concentration but did not modified the TNF- α . The MedDiet associated with a lower incidence of chronic inflammatory diseases (Alarcón de la Lastra et al. 2001). A recent review in human studies indicate that olive oil consumption reduces TNF- α and IL-6 levels when associated with MedDiet and lifestyle (Yarla, Polito, Peluso 2017). A systematic review has concluded that olive oil might exert beneficial effects on inflammatory biomarkers, such as C reactive protein and IL-6, after at least four weeks of intervention in individuals adhering to the Mediterranean diet (Schwingshackl, Christoph, Hoffmann 2015). In addition, long-term adherence to this Mediterranean diet decreases plasma concentrations of IL-6 and IL-8 related to different steps of atheroma plaque development in elderly subjects at high cardiovascular risk (Casas et al. 2017). The major anti-inflammatory components in olives are tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein, ligustroside, verbascoside and their derivatives (Di Nunzio et al. 2018). In particular, hydroxytyrosol is considered the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts (Richard et al. 2011). In agreement with our results, human studies, observed a decrease of IL-8 concentrations after an intake of 136.2 mg of oleuropein and 6.4 mg of hydroxytyrosol per day during an intervention of six weeks in pre-hypertension males (Lockyer et al. 2017).

Conclusions

The controlled intake of optimized virgin olive oil, rich in polyphenols, for 3 weeks increases the plasma concentrations of HDL cholesterol in healthy adult volunteers, especially in women.

The consumption of a virgin olive oil for 3 weeks decreases the plasma concentrations of endothelin-1, which may contribute to the improvement of the endothelial functionality. However, no additional benefits of a virgin olive oil enriched in triterpenes were observed in the endothelial functionality biomarkers after 3 weeks of supplementation.

Virgin olive oil can prevent DNA oxidation *in vivo*. This protective capacity seems to be related to the presence of oleic acid in plasma.

The functional olive oil presents anti-inflammatory activity, decreasing some biomarkers of inflammatory state such as IL-8 and TNF- α , compared with oils that do not contain triterpenes.

Our results are useful as hypotheses to propose new clinical studies of longer duration in elderly people and particularly in those affected by metabolic syndrome and endothelial dysfunction, as well as in subjects diagnosed with CVD, that would allow to evaluate the effects of AOV minor components, both polyphenols and triterpenes, on health.

Capítulo 1 - Introducción

1.1 Enfermedad cardiovascular: factores de riesgo y patologías asociadas

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, que al impedir la correcta circulación pueden afectar al funcionamiento de distintos órganos y tejidos, incluyendo el cerebro. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo, afectando en mayor medida a los países de ingresos medios y bajos. Se calcula que en 2015 murieron por este motivo 17.7 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo (7.4 millones de esas muertes se debieron a la cardiopatía coronaria y 6.7 millones, a los accidentes cerebrovasculares) (OMS 2016a). En España, a pesar de ser uno de los países con menor mortalidad por ECV, éstas siguen siendo la primera causa de muerte, representado el 29.2% del total de defunciones, según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) correspondientes al año 2016. Entre las ECV más frecuentes durante 2016 destacan las enfermedades isquémicas del corazón como primera causa de muerte en España y las enfermedades cerebrovasculares en segundo lugar (INE 2016).

Las ECV son enfermedades multifactoriales en las que influyen factores no modificables y modificables, que son diana de las recomendaciones generales para la población de riesgo (**Figura 1.1.**). Por otro lado, las enfermedades asociadas a la ECV, entre las que figuran el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) (**Figura 1.1.**).

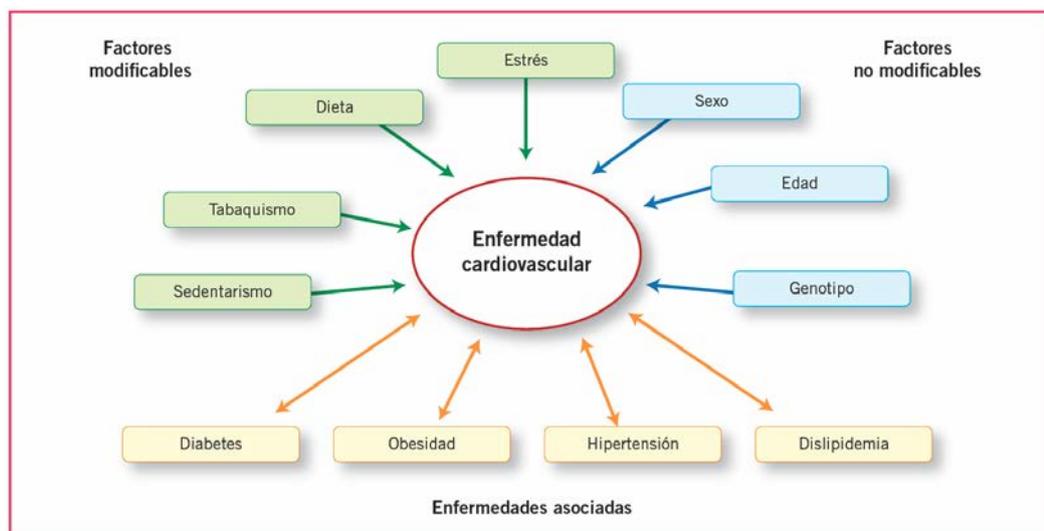


Figura 1.1. Factores de riesgo y patologías asociadas a la ECV. ECV, enfermedad cardiovascular. (Mesa, Sanchez-Rodriguez, de Luis 2017).

Considerando los factores de riesgo modificables, la OMS ha establecido que el 80% de los infartos de miocardio y de los accidentes cerebrovasculares prematuros son prevenibles (OMS 2016a), e

informa que el consumo de tabaco, una dieta no saludable y la inactividad física aumentan el riesgo de infarto de miocardio. Por este motivo la OMS recomienda:

1. La realización de actividad física durante al menos 30 minutos todos los días de la semana, ya que ayuda a la prevención de infartos de miocardio.
2. Comer al menos cinco raciones de frutas y hortalizas al día, así como limitar el consumo de sal añadida a menos de 5 g diarios (una cucharilla al día), lo que también ayuda a prevenir los infartos de miocardio y los accidentes cerebrovasculares.

De todos los tipos de ECV, destacamos algunos de ellos (Mesa, Sanchez-Rodriguez, de Luis 2017):

- Cardiopatía coronaria: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco (miocardio).
- Enfermedades cerebrovasculares: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- Arteriopatías periféricas: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.
- Cardiopatía reumática: lesiones del miocardio y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias denominadas estreptococos.
- Cardiopatías congénitas: malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.
- Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares: coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.

Actualmente, las estrategias terapéuticas principales para controlar las ECV se basan en la manipulación del metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, en la inhibición de la síntesis de colesterol celular y de sus modificaciones oxidativas, y en la reducción de los procesos inflamatorios asociados (Mesa, Sanchez-Rodriguez, de Luis 2017).

1.1.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico se define como una agrupación de manifestaciones clínicas y metabólicas que tienden a ocurrir juntas (Sarafidis, Nilsson 2006). Este síndrome está representado comúnmente por la combinación de obesidad abdominal, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensión arterial (Alberti et al. 2005) (**Figura 1.2.**). El síndrome metabólico está asociado con un riesgo aumentado de padecer ECV y relacionado con una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por una anormal producción de citoquinas que ocasionan disfunción endotelial (Freitas Lima et al. 2015). En los últimos años, la prevalencia de síndrome metabólico ha aumentado de forma paralela al incremento de la obesidad. Según la Federación Internacional de Diabetes (Sarafidis, Nilsson 2006), una persona con síndrome metabólico, será aquella que

presente obesidad abdominal, es decir, valores de circunferencia de cintura en hombres ≥ 94 cm y ≥ 80 cm en mujeres, además de dos de los siguientes cuatro factores de riesgo:

- Niveles de triacilglicéridos ≥ 150 mg/dl o 1.7 mmol/L, o tratamiento previo para esta hipertrigliceridemia
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL) ligadas al colesterol en hombres <40 mg/dl o 1.03 mmol/l y en mujeres <50 mg/dl o 1.29 mmol/L, o tratamiento específico para esta anomalía
- Presión sanguínea elevada. PAS ≥ 130 mmHg y PAD ≥ 85 mmHg o tratamiento diagnosticado previamente para hipertensión
- Glucosa plasmática en ayuno ≥ 100 mg/dl o 5.6 mmol/L, o previo diagnóstico de T2DM.

Una dieta baja en grasas y una reducción del peso corporal por la combinación de ingestas reducidas de calorías y un incremento de la actividad física son las principales recomendaciones de hábitos de vida saludables frente al síndrome metabólico (Mayneris-Perxachs et al. 2014)

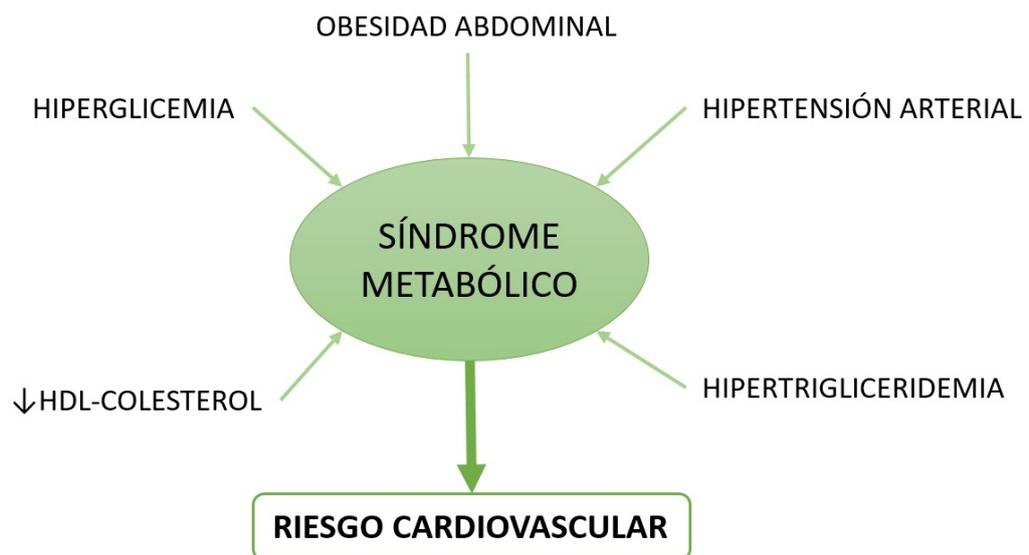


Figura 1.2. Síndrome metabólico y factores de riesgo asociados.

1.1.1.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por un aumento de la grasa corporal y, en consecuencia, un incremento del peso corporal con respecto al que le correspondería tener a una persona por su talla, edad y sexo. Además de la cantidad total de grasa corporal, su distribución en distintos compartimentos corporales (en especial el subcutáneo y el visceral) tiene gran importancia, ya que condiciona en gran medida el riesgo metabólico que supone esta enfermedad.

La incidencia de obesidad ha aumentado de manera drástica durante las últimas décadas, siendo hoy en día el triple que en el año 1975. El 39% de los adultos de edades superiores a los

18 años tienen sobrepeso y el 13% son obesos, según datos de la OMS referidos a 2016 (OMS 2016b). Resulta especialmente alarmante el aumento igualmente notable de la obesidad infantil considerado uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI (OMS 2016c).

El diagnóstico de obesidad se establece por la relación entre el peso y la talla, utilizando el índice de masa corporal (IMC), que se calcula dividiendo el peso en kg por el cuadrado de la talla en metros (**Tabla 1.1.**). Este cálculo permite definir los grados de la obesidad, que tienen implicaciones en el pronóstico del paciente.

La obesidad se asocia a muchos problemas de salud, entre los que se encuentran el aumento del riesgo de resistencia a la insulina, la T2DM, la hepatopatía grasa y la aterosclerosis, entre otras.

Tabla 1.1. Criterios de clasificación del peso corporal según la OMS en adultos según el IMC.	
IMC (kg/m²):	Grado de obesidad
<18.5	Peso bajo
18.5-24.9	Normopeso
25-29.9	Sobrepeso
30-34.9	Obesidad de grado I
35-39.9	Obesidad de grado II
≥40	Obesidad de grado III
IMC, índice de masa corporal; (OMS 2016b)	

La obesidad es un factor importante en el desarrollo del síndrome metabólico. Es interesante señalar que, para cualquier cantidad de grasa corporal total, los individuos con un exceso selectivo de tejido adiposo intraabdominal (visceral) presentan un riesgo sustancialmente superior de sufrir resistencia a la insulina y síndrome metabólico. El tejido adiposo no es tan sólo un tejido de almacenamiento de lípidos, sino también un importante «órgano» paracrino que libera numerosas citoquinas. La obesidad se caracteriza por una infiltración macrofágica en el tejido adiposo, que podría contribuir a producir el perfil inflamatorio en el plasma característico en los pacientes con obesidad visceral-abdominal, entre los que destaca el incremento de la concentración plasmática de la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), dos moléculas proinflamatorias. Otra molécula inflamatoria importante es la proteína-C reactiva (PCR), un marcador de riesgo cardiovascular claramente establecido, que está también aumentado en los pacientes con obesidad abdominal (Aronson et al. 2004). Todas estas moléculas dirigen una respuesta inflamatoria sistémica que puede afectar a determinados tejidos alterando su funcionamiento.

El tejido adiposo sintetiza también sustancias antiinflamatorias como la adiponectina, pero su producción y liberación se ve perjudicada en pacientes con obesidad visceral. Esta adiponectina

interviene en distintos mecanismos de señalización de la insulina y que posiblemente protejan frente a la aterosclerosis (Freitas Lima et al. 2015). Por tanto, la reducción de las concentraciones de adiponectina observada en los pacientes con obesidad abdominal podría constituir un factor clave responsable del aumento del riesgo de aterosclerosis y diabetes observado en estos pacientes. Así pues, el aumento de la presencia de PCR, IL-6 y TNF- α circulantes, asociado a una concentración reducida de adiponectina observado en los pacientes con un exceso de grasa visceral, puede explicar, al menos en parte, el alto riesgo de ECV observado en la población obesa.

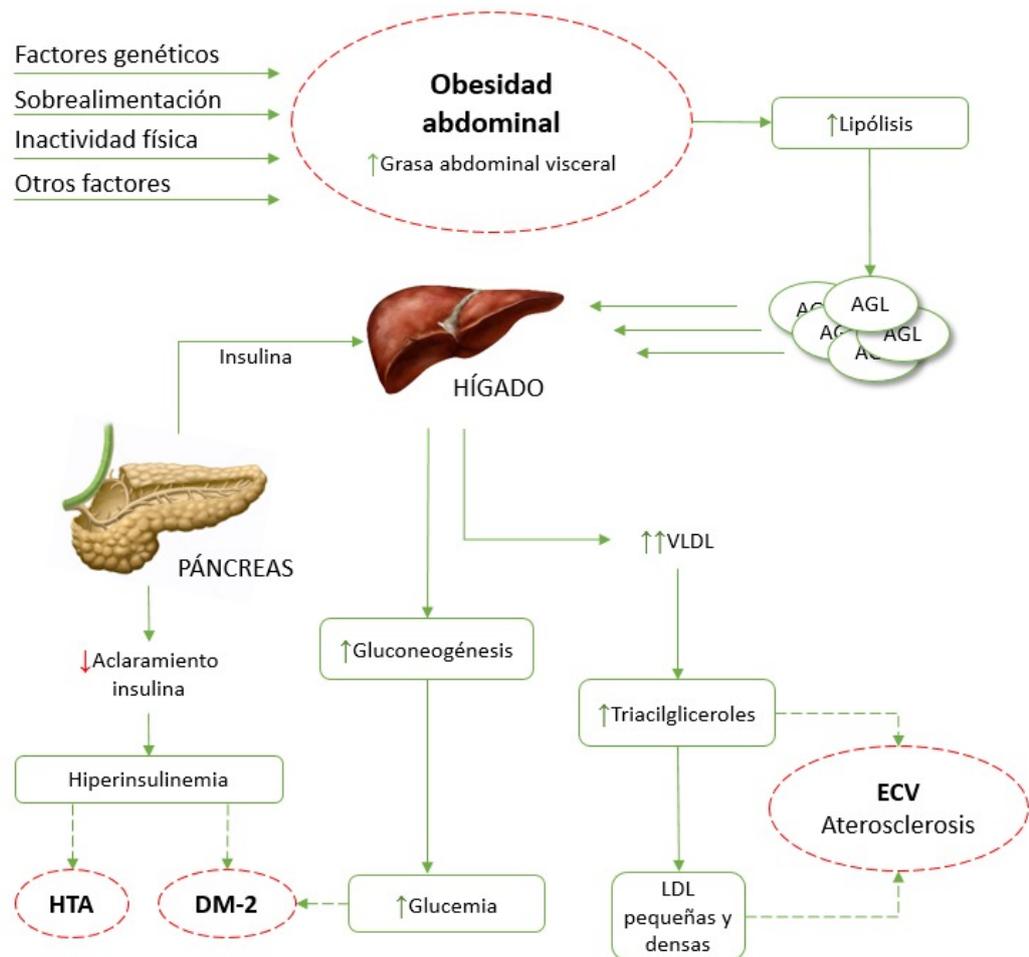


Figura 1.3. Alteraciones bioquímicas asociadas al síndrome metabólico. AGL, ácidos grasos libres; DM-2, diabetes mellitus tipo 2; ECV, enfermedad cardiovascular; HTA, hipertensión arterial; LDL, lipoproteínas de baja densidad; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Modificada de (Bretón Lesmes, Suárez Llanos, Pérez de la Cruz 2017).

En el estudio de Framingham, donde se realizó un seguimiento durante 26 años sobre individuos obesos, se demostró que el riesgo de presentar ECV era proporcional a la ganancia de peso (O'Donnell, Elosua 2008), y quienes perdían más de un 10% de su peso mostraban una moderada disminución del riesgo. Además, algunos autores han encontrado que los pacientes obesos sometidos a grandes y continuas fluctuaciones de peso tienen un riesgo mayor de sufrir episodios de cardiopatía isquémica, mortalidad por ECV y mortalidad total.

1.1.1.2 Hipertensión

La hipertensión arterial se define como una alteración caracterizada por un incremento crónico de la presión arterial o presión ejercida por la sangre sobre la pared arterial. Esta presión puede estar más elevada de lo normal cuando se produce la sístole del ventrículo izquierdo, a lo que se le llama presión arterial sistólica (PAS) y cuando el ventrículo está en diástole o relajación, se le llama presión arterial diastólica (PAD). Una presión arterial adecuada es imprescindible para garantizar la perfusión de todos los tejidos, asegurando el aporte de oxígeno y de todos los nutrientes. En la **tabla 1.2.** se muestran los valores de PAS y PAD en condiciones fisiológicas normales, así como en diferentes categorías de hipertensión (Mancia et al. 2013).

Tabla 1.2. Definición y clasificación de los diferentes tipos de presión sanguínea.

Categoría	PAS (mmHg)		PAD (mmHg)
Óptima	<120	y	< 80
Normal	120-129	y/o	80-84
Normal-Alta	130-139	y/o	85-89
Hipertensión, grado I	140-159	y/o	90-99
Hipertensión, grado II	160-179	y/o	100-109
Hipertensión, grado III	≥ 180	y/o	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	y	< 90

PAD, presión arterial diastólica; PAS, presión arterial sistólica; (Mancia et al. 2013)

Uno de los principales factores de riesgo para la aterosclerosis es la hipertensión, que ocasiona un aumento de la fuerza sanguínea en los lugares afectados por la acumulación de grasa, junto con una disminución en la velocidad de la sangre, lo que favorece el daño endotelial y la infiltración de componentes sanguíneos, células, lipoproteínas y distintas moléculas, al interior de la pared vascular, donde se producen procesos oxidativos e inflamatorios responsables del desarrollo de la aterosclerosis. Por otro lado, el engrosamiento de la pared arterial en los lugares afectados por la acumulación de grasa induce una disfunción vascular por la cual el organismo es incapaz de mantener la correcta presión sanguínea, y se ha comprobado que hay una predisposición genética para esta enfermedad (Mesa, Sanchez-Rodriguez, de Luis 2017). En personas de edad avanzada, el riesgo de sufrir ECV es directamente proporcional a la PAS, y además existe un fuerte valor predictivo con la presión de pulso (PAS - PAD) (Villa Estébanez et al. 2002).

Además, la hipertensión arterial ocasiona una excesiva carga de trabajo al corazón, pues tiene que impulsar la sangre a un lecho que ofrece una mayor resistencia debido a la presión arterial elevada. La superior carga de trabajo se compensa con un mayor desarrollo muscular del corazón, que se materializa en un aumento del espesor de la pared ventricular. La progresión de este

fenómeno provoca la dilatación de la cavidad, apareciendo los síntomas y signos propios de la insuficiencia cardiaca (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009)

La terapia no farmacológica contra la hipertensión arterial constituye una importante ayuda para el tratamiento de estos pacientes, y consiste en hábitos de vida saludables. Se recomienda controlar el peso corporal, el abandono del tabaco, la práctica de ejercicio físico moderado y la reducción del estrés mediante técnicas de relajación que consigan controlar todos los estímulos que pueden alterar la presión sanguínea; todo ésto acompañado de una terapia nutricional que controle la alimentación de la población hipertensa. Una de las recomendaciones más importantes es el control del sodio en la alimentación: hay que evitar la sal añadida a la hora de cocinar, aunque según el grado de la enfermedad la reducción deberá ser parcial o total. También se recomienda reducir la ingesta de grasas, principalmente saturadas e ingerir una dieta rica en frutas, vegetales y productos lácteos con bajo contenido en grasa (Mesa, Sanchez-Rodriguez, de Luis 2017).

1.1.1.3 Hiperglucemia

La hiperglucemia es el aumento anormal de la cantidad de glucosa que hay en la sangre. El estado hiperglucémico observado en la T2DM parece ser tan sólo la punta de un enorme iceberg dismetabólico, que es consecuencia en su mayor parte de una combinación de factores que se observan en pacientes con sobrepeso, con un exceso de grasa abdominal y resistencia a la insulina.

La diabetes mellitus es un trastorno endocrinometabólico complejo, en el que predomina una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono por disminución de la secreción pancreática de insulina, (se le conoce como diabetes tipo I) o por una disminución de la sensibilidad de los receptores periféricos a la hormona, un estado conocido como de resistencia a la insulina (T2DM) (International Diabetes Federation 2013; American Diabetes Association 2014). Concretamente, se sabe que la resistencia a la insulina es un factor importante que subyace a la patogénesis de la T2DM, y generalmente precede a la aparición de esta enfermedad (Xu et al. 2015). Una hiperglucemia crónica ocasiona nefropatía, retinopatía, neuropatía periférica y/o autónoma y ECV. Además, pueden aparecer complicaciones agudas como la hipoglucemia, la cetosis y la situación hiperosmolar. La mayoría de los individuos diabéticos padecen T2DM, una enfermedad que está relacionada con el estilo de vida y la obesidad.

En el año 2009, la International Diabetes Federation y la Asociación Europea para el estudio de la diabetes recomendaron el uso de la hemoglobina glicosilada A1c para el diagnóstico de diabetes mellitus, y fijaron un umbral superior al 6,5% como marcador de mal control glucémico. Para ello, la prueba diagnóstica debe ser realizada usando un método certificado por el Programa Nacional de Estandarización de la Hemoglobina Glicosilada (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) y estandarizado según el método referenciado en el estudio *Diabetes Control and Complications Trial* (Nathan 2014).

A continuación, se muestran posibles criterios diagnósticos de diabetes mellitus que se resumen en los siguientes puntos:

- Síntomas de hiperglucemia además de concentraciones de glucosa en plasma ≥ 200 mg/dl. Esta glucemia puede haber sido obtenida en cualquier momento del día, sin relación con la ingesta de alimentos
- Glucemia basal en ≥ 126 mg/dl. Se considera basal cuando no se han ingerido alimentos en las 8 horas previas
- Glucemia a las 2 horas de una sobrecarga oral de 75 g de glucosa ≥ 200 mg/dl
- Hemoglobina glicosilada A1c > 6.5 % (según método estandarizado)

Los procesos de inflamación son actualmente reconocidos como responsables del desarrollo y mantenimiento de diversas enfermedades crónicas, incluyendo la diabetes y la aterosclerosis (Freitas Lima *et al.* 2015). Se ha sugerido una interacción entre el sistema metabólico e inmunoinflamatorio, lo cual indica que estos procesos no corresponden a mecanismos diferentes sino a una manifestación diferente del mismo proceso. La ECV puede ser considerada la causa más importante de muerte en población diabética y la diabetes puede incrementar el riesgo de eventos cardiovasculares (Freitas Lima *et al.* 2015).

Los mecanismos homeostáticos que mantienen la glucemia en límites normales durante el ayuno y el período posprandial están alterados en el paciente diabético. En éste la glucemia puede estar elevada durante el ayuno o después de la ingesta por disminución de la secreción pancreática de insulina, exceso de liberación hepática de glucosa y disminución de la sensibilidad periférica a la insulina, especialmente en tejido adiposo y muscular. Tanto en pacientes diabéticos como en el enfermo crítico, la infusión exógena de glucosa no suprime la producción hepática por resistencia a la insulina en este órgano. No se inhibe la glucogenólisis, ni la gluconeogénesis de recursos como glicerol, lactato y alanina. Además, en estos pacientes los tejidos que necesitan insulina para captar glucosa presentan resistencia a su acción. Como consecuencia se produce hiperglucemia. Durante el estrés metabólico se liberan hormonas como glucagón, catecolaminas, cortisol, hormona del crecimiento y ciertas citoquinas, como la interleuquina 1 y el TNF- α . Estas sustancias aumentan la producción hepática de glucosa y disminuyen su captación por los tejidos periféricos. Si no se aumenta la secreción de insulina, como ocurre en el diabético de tipo 1, o si la secreción de la hormona es insuficiente para vencer la resistencia de los receptores periféricos como ocurre en la T2DM, sobreviene la hiperglucemia.

En general, el paciente diabético tipo 1 con buen control glucémico suele tener niveles normales de lípidos en plasma. En la diabetes tipo 1 sin insulino terapia hay disminución de la actividad lipoproteína lipasa. El déficit de la actividad de esta enzima produce disminución del catabolismo de los quilomicrones y del paso de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a LDL. Además, las VLDL están enriquecidas en colesterol tanto libre como esterificado y en apolipoproteína (apo) B. Estos cambios hacen que estas lipoproteínas sean más resistentes a la degradación por la lipoproteína lipasa, las partículas tienen mayor vida media y se acumulan más fácilmente en los macrófagos y, por lo tanto, son más aterogénicas. Por otra parte, las LDL son

más ricas en triacilgliceroles y más pobres en colesterol esterificado, siendo más frecuentes las LDL pequeñas y densas. Después del tratamiento con insulina se restablece la actividad lipoproteína lipasa y se normaliza el aclaramiento plasmático de los quilomicrones y de las VLDL.

Los pacientes con T2DM pueden mostrar un perfil lipídico alterado a pesar del buen control de la glucemia, ya que en la mayoría de las ocasiones presentan otros factores de riesgo asociados, como la obesidad y la hipertensión arterial. En la T2DM el aclaramiento de quilomicrones es menor porque se produce una glicosilación de apo C-II apo C-III y apo E. Existe un aumento en la síntesis hepática de VLDL que son más ricas en triacilgliceroles, y por lo tanto son de mayor tamaño. Por otro lado, la síntesis de LDL está aumentada, y son más susceptibles de ser oxidadas y captadas por los macrófagos, formando células espumosas (Valero Zanuy, León Sanz 2017)

1.1.1.4 Dislipidemia

La dislipidemia es un trastorno de los lípidos y de las lipoproteínas en sangre. Se definen como trastornos en el metabolismo lipídico aquellos que inducen una alteración de los niveles normales de lípidos plasmáticos como resultado de múltiples factores como son la predisposición genética, la capacidad metabólica y la ingesta de la dieta. La dislipidemia puede ser diagnosticada por una elevada concentración de colesterol total, LDL y triacilglicéridos en sangre, o por una baja concentración de HDL colesterol en sangre (Hannon, Khan, Teran-Garcia 2018).

Concentraciones elevadas de triacilglicéridos en sangre y bajos valores de HDL colesterol son consecuencia de un exceso de tejido adiposo visceral que está relacionado con la resistencia a la insulina e incrementa el riesgo de aterosclerosis y de ECV (Miller et al. 2011; Wajchenberg 2000)

Un estado hipertriglicéridémico promueve el intercambio de triacilglicéridos desde las VLDL hacia LDL y HDL, formando pequeñas partículas pobres en lípidos. Las partículas pequeñas de HDL son más susceptibles a la degradación, contribuyendo así a las bajas concentraciones de HDL observadas en presencia de otras dislipidemias (Després, Lemieux 2006).

Concentraciones elevadas de HDL son generalmente reconocidas como cardioprotectoras, ya que estas lipoproteínas sirven para secuestrar el exceso de colesterol y lo trasladan al hígado para su excreción. Dentro de los trastornos lipídicos, el más frecuente es la hiperlipidemia familiar, de origen genético, que puede estar causada por alteraciones en distintas fracciones lipídicas. Existen casos de hipercolesterolemia, hipertriglicéridemia, hiperlipoproteinemia múltiple y también hiperlipoproteinemia tipo V. En todas ellas existe una alteración en el metabolismo lipoproteico, a la que el individuo está predispuesto genéticamente.

La concentración de lipoproteínas está directamente influenciada por el número de factores de riesgo asociados y la existencia de ECV previa. Así la **tabla 1.3**. indica los objetivos en cuanto a lipoproteínas LDL según el riesgo de ECV.

La clasificación de las dislipidemias varía en función de la sociedad científica que las publique. A continuación, en la **tabla 1.4.** se muestra una clasificación de los tipos de hipertrigliceridemia de acuerdo a la *Endocrine Society 2010*.

Tabla 1.3. Objetivos de LDL colesterol según el riesgo de ECV.

Riesgo	American Heart Association 2013
ECV (diabetes mellitus + 1FR)	< 70 mg/dl, estatina de alta potencia
Diabetes mellitus o >2 FR (riesgo a 10 años: >20%)	< 70 mg/dl, estatina de alta potencia
≥ 2 FR (riesgo a 10 años: 10-20%)	< 190 mg/dl, estatina de potencia moderada o alta
0-1 FR	< 190 mg/dl, estatina de potencia moderada

ECV, enfermedad cardiovascular; FR, factor de riesgo; LDL, lipoproteína de baja densidad; Modificada de (De Luis Román, Olivares Alcolea, López Gómez 2017)

Tabla 1.4. Estratificación del riesgo de hipertrigliceridemia.

Endocrine Society 2010

Valores de triacilgliceroles normales	< 150 mg/dL
Hipertrigliceridemia leve	150-199 mg/dL
Hipertrigliceridemia moderada	200-999 mg/dL
Hipertrigliceridemia grave	1000-1999 mg/dL
Hipertrigliceridemia muy grave	>2000 mg/dL

(De Luis Román, Olivares Alcolea, López Gómez 2017)

Las recomendaciones nutricionales para este tipo de enfermos están encaminadas a controlar los niveles de lípidos sanguíneos. Principalmente se recomienda controlar la cantidad y la calidad de la grasa ingerida; según el grado de la enfermedad, la dieta deberá ser más o menos estricta. En términos generales se recomienda disminuir hasta un 20% la ingesta de grasa en estos pacientes, principalmente la saturada. La **tabla 1.5.** muestra algunos ejemplos de como la grasa de la dieta puede modificar los lípidos plasmáticos.

Está demostrado científicamente que los ácidos grasos de la serie n-3 (omega-3) de cadena larga procedentes del pescado disminuyen los triacilgliceroles plasmáticos, por lo que es importante destacar la necesidad de incrementar esta fuente grasa en la alimentación de los individuos afectados por un trastorno lipídico. El control del colesterol en la dieta también es importante para conseguir disminuir sus niveles plasmáticos. Además, un incremento en la ingesta de fibra soluble, presente principalmente en frutas, salvado de avena y legumbres, resulta también de gran interés, ya que este tipo de fibra es capaz de disminuir la absorción de colesterol y glucosa,

favoreciendo el descenso de los niveles de lípidos plasmáticos (De Luis Román, Olivares Alcolea, López Gómez 2017).

Tabla 1.5. Modificaciones de los lípidos plasmáticos por los distintos tipos de grasa dietética.

Lípidos	TG	Colesterol total	HDL	LDL
Colesterol	=	+	(+)	+
Ácidos grasos saturados	(+)	+	(+)	+
AGMI	(-)	-	=	-
AGPI n-6	(-)	-	(-)	-
AGPI n-3	-	(-)	(-)	(+)
Ácidos grasos trans	=	+	-	(+)
TG de cadena media	-	=	(-)	(=)

AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; TG, triacilglicérolos; +, incremento; -, disminución; =, neutro; (), respuesta variable. Modificada de (De Luis Román, Olivares Alcolea, López Gómez 2017)

1.2 Fisiopatología de las ECV

1.2.1 Aterosclerosis

En la mayoría de las ECV existe un proceso patológico común, que es la aterosclerosis (**Figura 1.4.**) (Mesa et al. 2017), que se caracteriza por la acumulación de grasa y varios tipos de células en zonas específicas de la pared arterial, donde se desarrollan procesos oxidativos, inflamatorios, proliferativos y necróticos que conducen a la formación de la placa de ateroma. Ésta provoca el estrechamiento del vaso sanguíneo y, por lo tanto, la reducción del aporte sanguíneo a órganos como el corazón y el cerebro, dando lugar a lesiones que van desde una ligera disminución asintomática de la circulación, hasta la formación de trombos por rotura de la placa, e impiden la llegada de sangre a vasos más pequeños, provocando un episodio vascular isquémico agudo.

La aterosclerosis puede ser definida como una enfermedad crónica y progresiva caracterizada por una respuesta inflamatoria en la que juega un papel fundamental la capa más interna de los vasos sanguíneos, conocida como endotelio vascular (Ross 1999). Los procesos inflamatorios producidos en la pared endotelial están mediados por un gran número de moléculas y enzimas proinflamatorias que afectan a la funcionalidad vascular, y activan procesos fibróticos y trombóticos que ocasionan lesiones en las paredes arteriales promovidas por factores de riesgo como la dislipidemia, diabetes, hipertensión y otros; concentraciones altas de colesterol en sangre, junto con la intervención del sistema inmunitario innato y adaptivo dan lugar a la aterosclerosis (Ross 1999). Los procesos inflamatorios activan receptores celulares que desencadenan cascadas de

señalización mediadas por el factor nuclear kappa B (NF- κ B), que regulan la expresión de genes que codifican la síntesis de otros componentes proinflamatorios, moléculas de adhesión, la enzima ciclooxigenasa (COX) 2 y el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), así como moléculas implicadas en el desarrollo de procesos apoptóticos y de proliferación celular (de Winther et al. 2005). Entre otras, la IL-6 y PCR son claros biomarcadores predictores de aterosclerosis y ECV (Tzoulaki et al. 2005).

El desequilibrio entre las moléculas vasodilatadoras y vasoconstrictoras da lugar a la disfunción endotelial y sus complicaciones (Sánchez-Rodríguez, Mesa 2018), siendo éste un evento temprano que resulta crítico en el desarrollo de la hipertensión. Esta disfunción endotelial conduce a respuestas compensatorias que alteran las propiedades homeostáticas normales del endotelio, aumentando la adhesión de los leucocitos o plaquetas al endotelio, así como su permeabilidad, además de presentar propiedades procoagulantes en lugar de anticoagulantes y de formar moléculas vasoactivas, citoquinas y factores de crecimiento. Si la respuesta inflamatoria no neutraliza o elimina eficazmente los agentes ofensores, puede continuar indefinidamente (Ross 1999). Al hacerlo, la respuesta inflamatoria estimula la migración y la proliferación de células del músculo liso que se entremezclan con el área de la inflamación para formar una lesión intermedia. Si estas respuestas continúan sin cesar, pueden engrosar la pared arterial y esto se compensa con una dilatación gradual, de modo que, hasta cierto punto, el lumen permanece inalterado, un fenómeno denominado "remodelación". En cuanto a las células inflamatorias, los granulocitos rara vez están presentes durante cualquier fase de la aterogénesis. En cambio, la respuesta está mediada por macrófagos derivados de monocitos y subtipos específicos de linfocitos T en cada etapa de la enfermedad (Ross 1999).

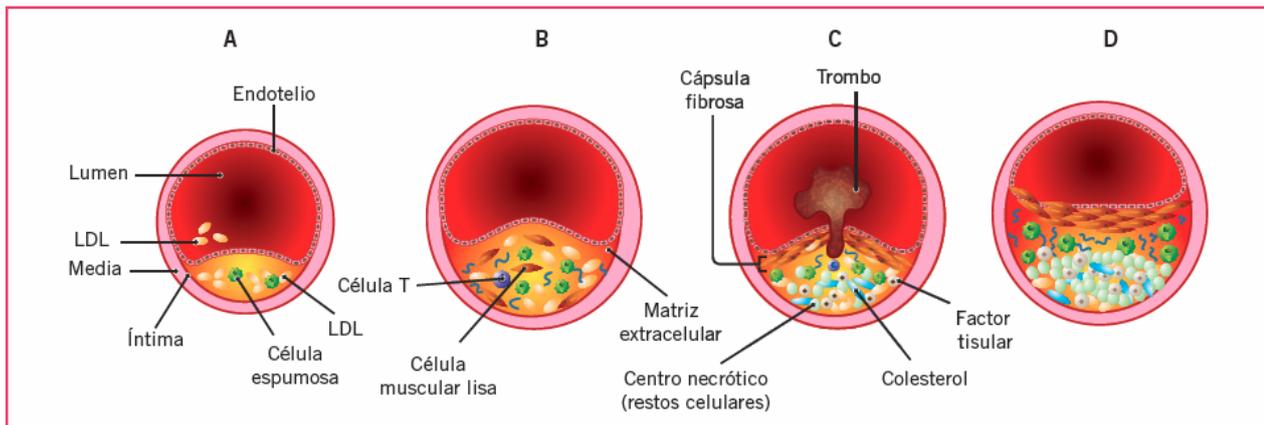


Figura 1.4. Evolución de la placa de ateroma. A) Iniciación de la lesión y formación de la estría grasa. B) Formación de la cápsula fibrosa. Esta cápsula da consistencia y estabilidad a la placa de ateroma (lesión esclerótica). C) Creación de un núcleo necrótico tóxico que conduce a la formación del trombo. D) Si la placa no se rompe, la lesión continúa creciendo y estrecha la luz del vaso hasta generar su obstrucción (Mesa, Sanchez-Rodriguez, de Luis 2017). LDL: lipoproteínas de baja densidad.

La placa de ateroma se inicia con la formación de la estría grasa. La disfunción endotelial induce la producción de moléculas de adhesión como la E-selectina, molécula de adhesión celular vascular de tipo 1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular de tipo 1 (ICAM-1). Por otro lado, la disfunción endotelial también permite la infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL), encargadas de transportar el colesterol a los tejidos periféricos (Tabas et al. 2007), y de monocitos que se diferencian a macrófagos capaces de capturar la LDL previamente modificada por oxidación, lo que lleva a la acumulación de colesterol en el interior de células espumosas y a la liberación de moléculas proinflamatorias/apoptóticas (Stephen et al. 2010). La respuesta inflamatoria atrae más células sanguíneas y hace migrar, además, células del músculo liso desde la capa media hacia la capa íntima del vaso, donde proliferan y secretan componentes de matriz extracelular (colágenos), para formar la cápsula fibrosa. Esta cápsula da consistencia y estabilidad a la placa de ateroma (Ross 1999). Sin embargo, la presencia de células del músculo liso incrementa la retención y la agregación de lipoproteínas aterogénicas. Además de los monocitos, otro tipo de leucocitos, en particular algunas subpoblaciones de linfocitos T, son reclutados en la lesión aterosclerótica, lo que ayuda a perpetuar el estado de inflamación crónica en el interior de la pared arterial. En las primeras fases de crecimiento de la placa se produce un remodelado de la pared vascular, con el aumento del diámetro total del vaso. De este modo, la luz vascular conserva así su tamaño al compensarse la obstrucción producida por la lesión aterosclerótica. La muerte de los macrófagos provoca la liberación de su contenido (colesterol) al espacio intracelular de la capa íntima, con lo que se crea un núcleo necrótico tóxico que promueve la migración de más células inflamatorias y células del músculo liso, así como la liberación de proteasas (metaloproteinasas) que degradan las proteínas de la matriz de la cápsula, provocando su rotura y la formación del trombo (Kumada et al. 2004; Van de Voorde et al. 2013). Si la placa no se rompe, la lesión continúa creciendo y estrechando la luz del vaso, generando cuadros clínicos de enfermedades obstructivas.

Clásicamente la aterosclerosis se ha asociado a alteraciones en el metabolismo lipídico, aunque hoy en día, el desarrollo de la placa de ateroma se considera un proceso complejo, siendo los procesos inflamatorios uno de sus principales componentes.

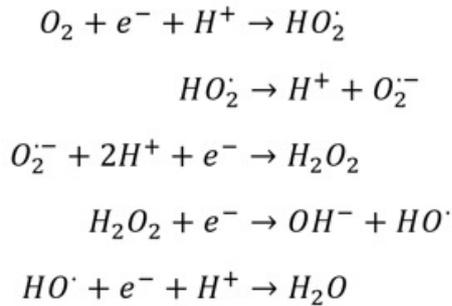
1.2.2 Estrés oxidativo

1.2.2.1 Aspectos generales

Según Harman (1965-1987), los radicales libres explicarían la evolución biológica de los seres vivos, el envejecimiento, y los mecanismos de producción de distintos tipos de enfermedades (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009). El estrés oxidativo se ha definido como una alteración en el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (o radicales libres) y defensas antioxidantes, que pueden conducir a lesiones en los tejidos. Los radicales libres son moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno y se forman en grandes cantidades como un inevitable subproducto de muchos procesos bioquímicos (**Figura 1.5.**) (Betteridge 2000). Los radicales libres contienen electrones desapareados que aumentan la reactividad química de un

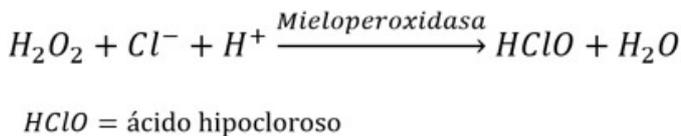
átomo o molécula. Si las defensas antioxidantes son deficientes, entonces el daño puede ocurrir en una variedad de tejidos, produciéndose daños en lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Algunos ejemplos de radicales libres comunes incluyen el radical hidroxilo (OH[•]), el anión superóxido (O₂^{•-}), metales de transición como el hierro y el cobre, óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO⁻) (Betteridge 2000).

a) Reducción de oxígeno molecular

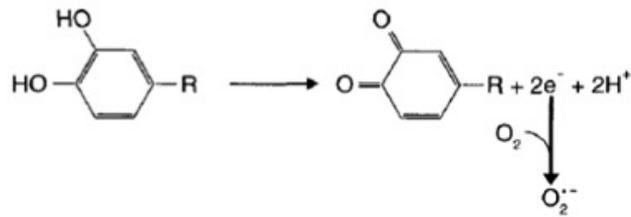


HO₂[•] = radical hidroperoxilo
 O₂^{•-} = radical superóxido
 H₂O₂ = peróxido de hidrógeno
 HO[•] = radical hidroxilo

b) Producción de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrógeno



c) Oxidación de catecolaminas



d) Activación de la formación en cascada del ácido araquidónico

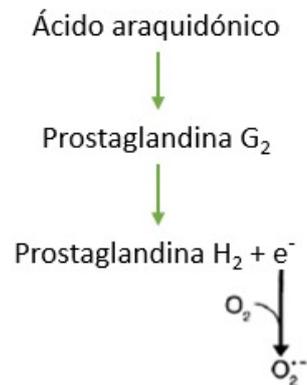


Figura 1.5. Ejemplos de producción de radicales libres por diferentes procesos bioquímicos. Modificada de (Betteridge 2000)

Uno de los procesos más importantes de estrés oxidativo es la peroxidación lipídica (**Figura 1.6.**), donde se produce una reacción entre los radicales libres y los ácidos grasos (ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)) dentro de la membrana citoplasmática, que da lugar a un radical peroxilo el cual puede atacar el lado adyacente de la cadena de ácidos grasos y comenzar la producción de otros radicales lipídicos que ocasionan disfunción de los receptores de unión a la membrana, alterando también su permeabilidad (Bayir 2005). Los radicales libres reactivos, por ejemplo, el radical hidroxilo, tiene la capacidad de extraer un átomo de hidrógeno (H) de un grupo metileno (CH₂) de ácidos grasos, quedando un electron desapareado (CH[•]). Los AGPI son particularmente propensos a los ataques de radicales libres porque la presencia de un doble enlace debilita el enlace carbono-hidrógeno en el átomo de carbono adyacente. El radical restante sufre un

reordenamiento molecular que da lugar a un dieno conjugado. Los dienos conjugados se pueden combinar con el oxígeno formando un radical peroxil, que puede captar un hidrógeno adicional y comenzar una reacción en cadena que continúa hasta que el sustrato se consume o la reacción se termina por la presencia de un antioxidante como la vitamina E.

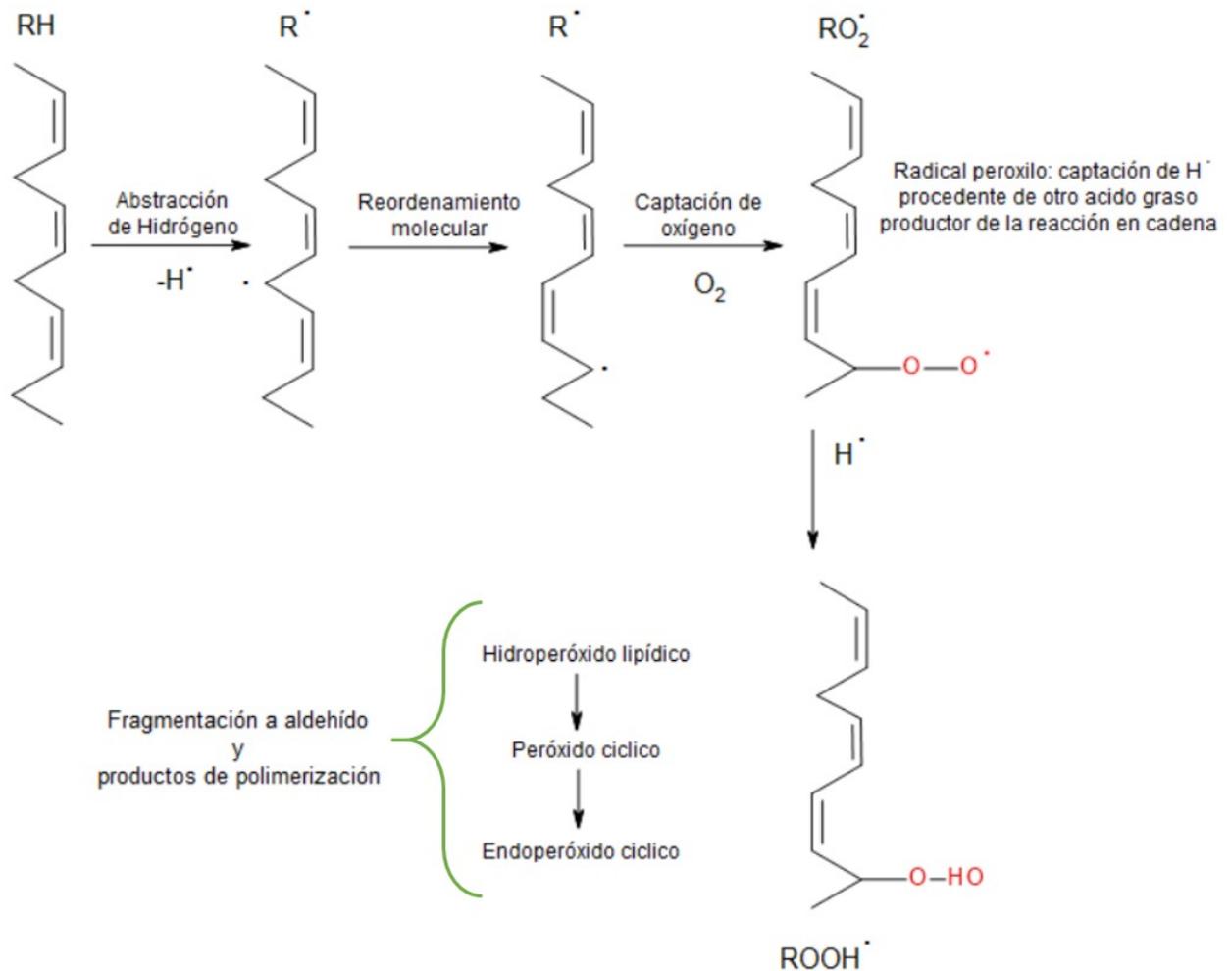


Figura 1.6. Mecanismo molecular de la peroxidación lipídica. Modificada de (Betteridge 2000)

Se ha establecido que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel vital en la progresión de ECV (Panth et al. 2016). Factores de riesgo como la diabetes, el hábito de fumar, la edad y la hipercolesterolemia incrementan la generación de radicales libres y desencadenan procesos de apoptosis de células endoteliales, aumentan la expresión de moléculas de adhesión, activan metaloproteinasas, inducen la proliferación y migración de células de músculo liso, ocasionando peroxidación lipídica y cambiando las funciones vasomotoras, y dando lugar a aterosclerosis y ECV (Vogiatzi, Tousoulis, Stefanadis 2009).

Concretamente, las especies reactivas de oxígeno pueden conducir a modificaciones del ADN de varias maneras, lo que implica la degradación de bases, roturas de ADN de cadena simple o doble, modificaciones en purinas, pirimidinas o azúcares, así como ocasionar mutaciones, deleciones o translocaciones (Birben et al. 2012). La mayoría de estas modificaciones del ADN

son muy importantes en procesos de carcinogénesis, envejecimiento, en enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y autoinmunes. El humo del tabaco, los metales redox y los metales no redox, como el hierro, el cadmio, el cromo y el arsénico, también están involucrados en la carcinogénesis y en el envejecimiento, al generar radicales libres o unirse a grupos tiol. La 8-hidroxi-2´deoxiguanosina (8-OHdG) es el biomarcador de daño al ADN más conocido que se produce a través del estrés oxidativo, y es un potencial biomarcador para la carcinogénesis (Birben et al. 2012).

1.2.2.2 Sistema de defensa antioxidante

El envejecimiento se explica como el resultado del agotamiento de los sistemas de protección del organismo frente a los radicales libres prooxidantes originados en el metabolismo intermediario de todas las células del organismo humano. En la protección frente a este proceso, podrían jugar un importante papel las sustancias antioxidantes. El organismo reacciona ante los radicales libres mediante mecanismos antioxidantes de protección. Se define un antioxidante como cualquier sustancia que presentada a baja concentración, retrasa o inhibe la oxidación de un sustrato. El sistema de defensa antioxidante celular está formado por enzimas como son la dismutasa, peroxidasa y catalasa que presentan función antioxidante. Además, la superóxido dismutasa es otra enzima antioxidante que contiene cobre y zinc y cataliza la transformación del ión superóxido hasta formar peróxido de hidrógeno y oxígeno.



El peróxido de hidrogeno es un oxidante débil y relativamente estable. Sin embargo, puede difundir rápidamente a través de las membranas celulares y en presencia de metales de transición puede convertirse en radical hidroxil.



Dos enzimas se encargan de la rotura del peróxido de hidrogeno. La glutatión peroxidasa presente en el citosol y en la mitocondria, que tiene el mayor papel en la eliminación de este compuesto generado por la superóxido dismutasa mediante la oxidación del glutatión (GSH).



La catalasa que está presenta en los peroxisomas en muchos tejidos donde elimina el peróxido de hidrógeno cuando se encuentra en elevadas concentraciones.



Antioxidantes como son la vitamina E, β caroteno y coenzima Q, están también presentes en las membranas celulares. La lipofílica vitamina E (α -tocoferol) es un antioxidante muy efectivo cuando se incorpora en el núcleo lipídico de las membranas celulares. Tiene la habilidad de neutralizar radicales peroxil e interrumpen la reacción en cadena de la peroxidación lipídica

(Burton, Joyce, Ingold 1982). El radical tocoferilo es mucho menos reactivo y es convertido de nuevo en α -tocoferol por la vitamina C.

Además de la presencia de antioxidantes, la estructura de la membrana con apropiadas proporciones de colesterol y fosfolípidos es importante en la resistencia al ataque de radicales libres. Metales libres como hierro y cobre también pueden promover el daño por radicales libres, acelerando la peroxidación lipídica y catalizando la formación de radicales hidroxil. El sistema de defensa del organismo protege frente a estos procesos adversos mediante unión a proteínas (transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina) las cuales aseguran que estos metales están mantenidos en un estado no reactivo.

1.3 Dieta mediterránea

La dieta mediterránea tradicional se caracteriza por una alta ingesta de aceite de oliva, frutas, nueces, verduras y cereales, por una ingesta moderada de pescado y aves de corral y por una baja ingesta de productos lácteos, carnes rojas, carnes procesadas y dulces. Además, contempla el consumo de vino tomado con moderación junto con las comidas (Schulze et al. 2005). Estudios tales como el Lyon Diet Heart Study (de Lorigeril et al. 1999) y el estudio de prevención con dieta mediterránea (PREDIMED), entre otros realizados en humanos, han asociado la adherencia a la dieta mediterránea con un menor riesgo cardiovascular (Estruch et al. 2018; Martínez-González et al. 2017; Sofi et al. 2010) y por tanto es considerada como la más adecuada para prevenir ECV (Mente et al. 2009).

Durante las últimas décadas la dieta mediterránea ha ganado popularidad debido a su contribución a disminuir la morbilidad y mortalidad por distintas causas, particularmente ECV, ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades crónicas, así como una mejor salud y calidad de vida a aquellos que se adhieren a ella.

A pesar de ser una dieta con un elevado contenido en grasa, Mayneris et al (2014) han propuesto a la dieta mediterránea como una exitosa herramienta para la prevención y tratamiento del síndrome metabólico y sus comorbilidades relacionadas. A pesar de que la dieta mediterránea aporta más del 40% de la energía en forma de grasa, se ha observado que su consumo puede reducir la prevalencia de síndrome metabólico sin necesidad de perder peso o prescribir actividad física. Este estudio PREDIMED demuestra que los participantes con alto consumo de aceite de oliva virgen (AOV) o consumo de nueces no aumentan de peso y, sin embargo, dietas bajas en grasas con y sin restricción de carbohidratos han resultado disminuir los niveles de HDL colesterol y aumentar los triacilglicéridos, lo que empeora el status del síndrome metabólico. Por último, al ser una dieta altamente palatable, que decrece el hambre y promueve la saciedad, mejora la adherencia a largo plazo comparado con las dietas de restricción energética bajas en grasa. Estos resultados sugieren que la dieta mediterránea rica en grasas pueda ser una alternativa útil para tratamientos de síndrome metabólico (Mayneris-Perxachs et al. 2014).

El estudio PREDIMED se diseñó para evaluar el efecto del consumo prolongado de la dieta mediterránea en la prevención de ECVs en individuos con alto riesgo cardiovascular. Los participantes fueron distribuidos en tres grupos: un grupo control que tomó una dieta baja en grasas, un grupo de participantes que tomaron diariamente 30 gramos de frutos secos y un tercer grupo suplementado con AOV al que se le proporcionó la cantidad de un litro a la semana para la unidad familiar. Los datos mostraron que la dieta mediterránea suplementada con nueces o AOV disminuye en aproximadamente un 30% el riesgo de sufrir ECV (Estruch et al. 2018).

En 2011, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió una opinión sobre los beneficios a nivel cardiovascular del consumo diario de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos (5 mg de hidroxitirosol y sus derivados, por ejemplo, oleuropeína, en 20 g de aceite) en la prevención de la oxidación de las partículas LDL (EFSA Panel on Dietetic Products 2011) para el mantenimiento de las concentraciones normales de colesterol unido a HDL en sangre (EFSA Panel on Dietetic Products 2012). Sin embargo, todavía queda mucho que estudiar para poder demostrar científicamente los efectos funcionales del AOV y sus componentes.

1.4 Aceite de oliva

1.4.1 Historia del olivo y de las aplicaciones del aceite de oliva

El olivo es conocido como el árbol paradigmático del Mediterráneo, productor de lo que los árabes llamaron *azzaít* o “jugo de oliva”. Algunos autores lo consideran originario del Asia Menor, otros de las costas de Siria y Palestina, aunque según parece llegó a Europa con los fenicios en sus periplos por Chipre, Creta e Islas del Egeo desde donde pasaría a Grecia y, posteriormente, a Italia. Los romanos se encargaron de introducir el olivo a gran escala en la Península Ibérica. Según yacimientos arqueológicos encontrados en diversos puntos del Mediterráneo, la existencia del olivo se remonta al menos hasta hace 12 milenios. El olivo cultivado “*Olea Europea L.*” puede referirse a unos 6000 años atrás (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009).

Desde la antigüedad, el aceite de oliva y los subproductos del olivo, como por ejemplo los extractos de hojas, han sido utilizados como remedios tradicionales para el tratamiento de múltiples dolencias gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Concretamente, el aceite de oliva era muy apreciado como un remedio para curar las quemaduras, llagas, escalofríos y para fortalecer la piel y los músculos, para aliviar los dolores de estómago e hígado, y evitar los dolores de cabeza, siendo también eficaz para el tratamiento de las úlceras (Sánchez-Rodríguez, Mesa 2018).

1.4.2 Producción de aceite de oliva

Según la información más actual aportada por el Comité Oleícola Internacional (COI) con fecha de 2018, de acuerdo con datos provisionales, la producción mundial alcanzó 3.315.000 de toneladas en la cosecha 2017/2018. Esto indica un aumento del 28% más que la cosecha anterior. El consumo se sitúa en torno a las 2.958.000 de toneladas. En España, la producción cayó un

2.7% hasta 1.256.200 de toneladas, mientras que se observaron incrementos en Italia, con 428.900 toneladas (+ 135,3%); Grecia, con 346.000 t (+ 77,4%); y Portugal, con 134.800 t (+ 94.2%)(COI 2018).

1.4.2.1 Producción de aceite de oliva en Andalucía

La enorme importancia del olivar en Andalucía no es sólo consecuencia del proceso histórico. En la actualidad el papel del sistema oleícola es sobresaliente por ser una parte esencial de nuestra economía (representa casi el 30% de la producción final agraria andaluza), por su papel decisivo en la creación de empleo, por ser un elemento primordial en la cohesión social y territorial, y por formar parte de nuestra cultura y de nuestra dieta (Junta de Andalucía 2002). En Andalucía la superficie de olivar se ha incrementado más de un 5% en el período 2000-2014, concentrando más del 60% del total de hectáreas de cultivo de olivar de almazara a nivel nacional. La producción media andaluza de AOV del período 2009/10-2013/14 supera 1.100.000 toneladas anuales, representando alrededor del 80% del total nacional. Jaén con el 40% de la superficie y Córdoba con otro 24% son las dos principales productoras de aceite en Andalucía.

1.4.2.2 Variedades de aceitunas más comunes en Andalucía

La variedad predominante en Andalucía es “Picual”, con 857.746 hectáreas cultivadas (58.2% de la superficie total), siendo también la variedad más extendida, empleándose en gran medida en nuevas plantaciones por su productividad y alto rendimiento graso. Su importancia en el total del olivar andaluz viene dada por el peso que tiene en las provincias de Jaén, donde supone casi la totalidad del olivar (98.6% de la superficie), Granada (69.3%) y Córdoba (39.8%) (Junta de Andalucía - Consejería de Agricultura y Pesca 2002). Le sigue en importancia la variedad “Hojiblanca” con 267.199 hectáreas (18.1% de la superficie total), que se distribuye mayoritariamente entre el sur de Córdoba, norte de Málaga, y sudeste de Sevilla. Otra variedad muy conocida y de amplia extensión en Andalucía es la arbequina y destaca por subuen rendimiento graso y excelente calidad. La **figura 1.7.** muestra algunas de las variedades de aceitunas más importantes en cuanto a producción.

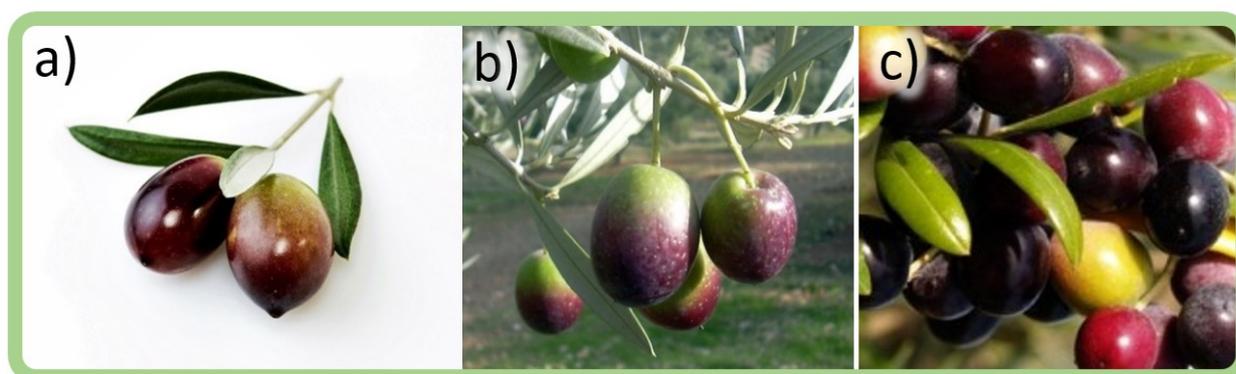


Figura 1.7. Variedades de aceitunas picual (a), hojiblanca (b), arbequina (c).

1.4.3 Definición de aceite de oliva

Según el convenio Internacional del aceite de oliva, los “aceites de oliva” son aquellos aceites procedentes únicamente del fruto del olivo, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolventes o procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Debido a los diferentes procesos de recolección, transporte, almacenamiento, etc, existen distintos tipos de aceite de oliva que se clasifican según sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas (1348/2013/EC). La **figura 1.8.** muestra un esquema del proceso de elaboración del AOV.

En cuanto a las propiedades sensoriales de los aceites de oliva, se establecen mediante personal cualificado en paneles de cata específicos. El panel de cata está compuesto por ocho o diez catadores entrenados según la normativa vigente. Aquí se evalúan los atributos positivos y negativos para así poder clasificar los aceites (1348/2013/EC). Concretamente los paneles de cata pueden ser de tres tipos diferentes:

- Analítico: es el que realiza el análisis sensorial, como un parámetro más del análisis químico del aceite, siguiendo la normativa establecida por el Consejo Oleícola Internacional (COI) (COI 2005).
- De calidad: panel que poseen algunas marcas comerciales, para clasificar sus aceites, según las afinidades del consumidor.
- De consumo: paneles formados por consumidores elegidos al azar, para estudiar la aceptación o rechazo de algún aceite. Estos se realizan en grandes superficies.

Además de los análisis sensoriales de los aceites, éstos también están sometidos a análisis físico-químicos para evaluar su calidad. Dentro de estas características destaca la acidez, que mide la cantidad de ácidos grasos libres, el índice de peróxidos que mide el estado de oxidación de un aceite y el K_{270} y K_{232} que miden el estado de oxidación y la presencia de compuestos oxidados (COI 2008).

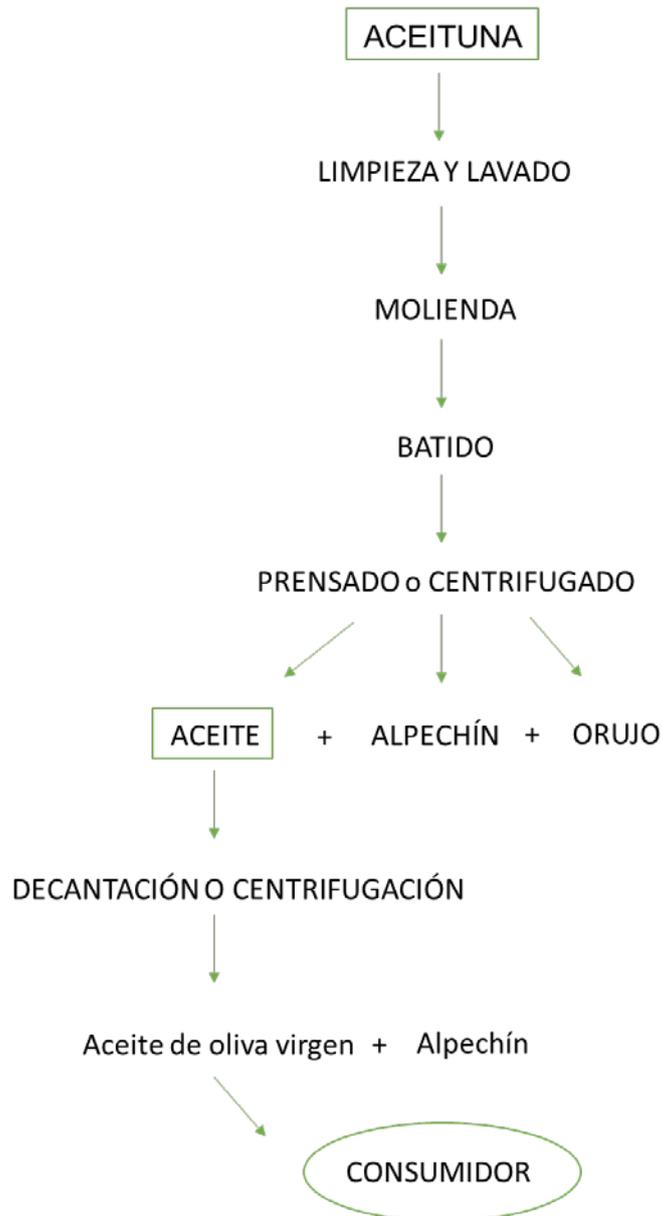


Figura 1.8. Esquema del proceso de elaboración del AOV. AOV, aceite de oliva virgen.

1.4.4 Tipos de aceites de oliva

A continuación, describimos las características más importantes de los distintos tipos de aceite de oliva. (COI 2008; Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009).

AOV: es el zumo oleoso obtenido mediante el prensado en frío del fruto del olivo, en perfectas condiciones de madurez, procedentes de un olivo sano, que no haya sido tratado o manipulado mecánica, física o térmicamente, de manera que no se altere la naturaleza química de sus componentes. Los aceites con denominación de vírgen son aquellos que se obtienen en la almazara tras procedimientos exclusivamente físicos y/o mecánicos: molido, batido, prensado y/o centrifugación. Este aceite presenta defectos casi imperceptibles y se recomienda para consumo

directo, bien en crudo o en fritos. Se le permite una acidez libre expresada en ácido oleico máximo de 2 gramos por 100 gramos.

Dentro de los AOV podríamos obtener el AOV extra (AOVE), que será aquel que presenta unos resultados óptimos tanto en el análisis químico, como en el sensorial, con una acidez libre expresada en ácido oleico máxima de 0.8 gramos por 100 gramos. Por tanto, la denominación de extra se da a los aceites de mayor calidad.

Aceite de oliva lampante: es el AOV no apto para el consumo en la forma en que se obtiene y su acidez libre expresada en ácido oleico es superior a 2 gramos por 100 gramos (1348/2013/EC) o superior a 3.3 gramos por 100 gramos (BOE 2005; COI 2008). Presenta un olor y sabor claramente inadmisibles, junto a un análisis químico con valores inadecuados. Se destina a las industrias de refinado o a usos técnicos para que mediante un proceso físicoquímico, se eliminen los productos inadecuados, el mal olor y el sabor. Pero también se perderán compuestos beneficiosos como los antioxidantes naturales dando lugar finalmente a un aceite inodoro e insípido.

Aceite de oliva refinado: es el aceite que se obtiene tras el refinamiento del aceite lampante. Es aún beneficioso para la salud ya que aún posee compuestos beneficiosos como los AGMI y otros componentes bioactivos, pero no es el más recomendable para el consumo ya que ha perdido los antioxidantes naturales. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0.3 gramos por 100 gramos.

Aceite de oliva: es el aceite constituido por la mezcla de aceite de oliva refinado y de AOV aptos para el consumo en la forma en la que se obtienen. Es un aceite de gran consumo y la forma en la que se ha comercializado habitualmente. Es un buen aceite y tiene un ligero olor y sabor, procedente del AOV. Presenta menos antioxidantes naturales, pero mantiene la composición en ácido grasos monoinsaturados. Tradicionalmente se ha usado para todo tipo de consumo. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 gramo por 100 gramos.

Aceite de orujo refinado: el orujo, es el subproducto sólido resultante de la obtención del aceite de oliva (que contiene restos de piel, hueso y pulpa) que se vuelve a prensar o centrifugar. Contiene aún algo de aceite, de un 3% a un 6%, según el sistema de elaboración. Este tipo de aceite se extrae con disolvente orgánico, generalmente hexano. El aceite de orujo huele y sabe mal y necesariamente se procesa en una refinería donde se eliminarán los restos de disolvente, y los productos indeseables, así como el mal olor y sabor. Tras este proceso obtenemos el aceite de orujo refinado que es un aceite inodoro e insípido (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009). Este proceso de preparación hace que el aceite de orujo contenga pocos componentes minoritarios de la pulpa de la aceituna, los compuestos fenólicos, pero que se enriquezca en los compuestos presentes en la piel y el hueso, principalmente ácidos triterpénicos (Sánchez-Rodríguez, Mesa 2018).

Aceite de orujo de oliva: es una mezcla de aceite de orujo refinado al 90% y AOV al 10%. Es un aceite de segunda calidad que no se recomienda para su consumo en crudo, pero si se recomienda para fritos, sartén y sobre todo para freidora.

La **tabla 1.6.** muestra los valores que deben presentar los diferentes aceites de oliva según sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales más importantes (1348/2013/EC).

Tabla 1.6. Propiedades fisicoquímicas y sensoriales más importantes de los distintos tipos de aceites de oliva.						
Categoría	Acidez (%)	IP mEq O ₂ /kg	K ₂₃₂	K _{268 o270}	Eval. Org (Md)	Eval. Org (Mf)
AOV extra	≤0.8	≤20	≤2.50	≤0.22	Md =0	Mf >0
AOV	≤2.0	≤20	≤2.60	≤0.25	Md ≤3.5	Mf >0
Aceite de oliva lampante	>2.0	-	-	-	Md >3.5	-
Aceite de oliva refinado	≤0.3	≤5	-	≤1.10	-	-
Aceite de oliva	≤1.0	≤15	-	≤0.90	-	-
Aceite de orujo de oliva refinado	≤0.3	≤5	-	≤2.0	-	-
Aceite de orujo de oliva	≤1.0	≤15	-	≤1.70	-	-

AOV, aceite de oliva virgen; Eval. Org, evaluación organoléptica; IP, índice de peróxidos; Md, mediana de los defectos; MF, mediana del frutado; Modificada de (1348/2013/EC)

1.4.4.1 Denominación de Origen Protegida: Calidad garantizada

Una de las peculiaridades más destacadas de la producción aceitera andaluza es, sin duda, el peso que va adquiriendo el AOVE, en una apuesta conjunta por ofrecer una gran calidad y conservar todas las propiedades saludables y organolépticas naturales de las aceitunas de las que procede, ya que el AOVE únicamente se somete a procesos mecánicos en su extracción.

Las aceitunas son recogidas directamente del árbol en su momento óptimo de maduración y se molturan en un plazo máximo de 48 horas, para garantizar que se mantenga toda la calidad que la aceituna tiene en el olivo. El AOVE se almacena en bodega, en depósitos de acero inoxidable, trujales o depósitos metálicos revestidos interiormente por materiales inertes para no alterar sus propiedades. El proceso de elaboración es un proceso totalmente natural, sin ningún tratamiento químico ni aditivos. Tanto la producción como la elaboración de los AOVE con Denominación de Origen Protegida (DOP) deben realizarse en el ámbito territorial de la Denominación. La extensión de las ocho provincias andaluzas marcadas por las diferencias climáticas y orográficas favorece la existencia de una amplia variedad de aceites, cada uno con su personalidad propia. La riqueza y variedad de los aceites andaluces se refleja en el reconocimiento de doce DOP (**Figura 1.9.**), cada una de ellas con características propias (Junta de Andalucía - Consejería de Agricultura y Pesca 2002)

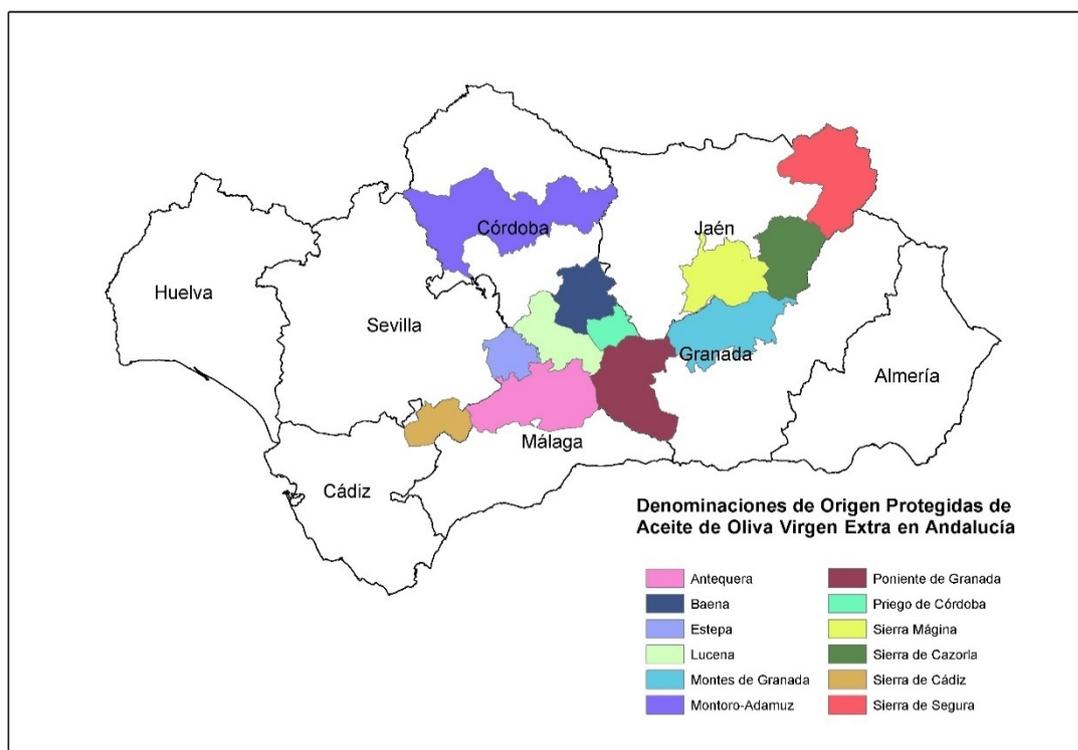


Figura 1.9. DOPs de AOVE en Andalucía. AOVE, aceite de oliva virgen extra; DOP, denominación de origen protegida. (Web de la Junta de Andalucía - DOPs)

La relación por provincias es la siguiente: Cádiz (DOP ‘Sierra de Cádiz’); Córdoba (DOP ‘Baena’, DOP ‘Montoro-Adamuz’, DOP ‘Priego de Córdoba’ y DOP ‘Aceite de Lucena’); Granada (DOP ‘Poniente de Granada’ y DOP ‘Montes de Granada’); Jaén (DOP ‘Sierra de Cazorla’, DOP ‘Sierra Mágina’, DOP ‘Sierra de Segura’); en Málaga (DOP ‘Antequera’); y en Sevilla (DOP ‘Estepa’). Todos los AOVE de las diferentes DOP de Andalucía pueden solicitar la autorización del uso de la marca “Calidad Certificada” en sus etiquetados (Web de la Junta de Andalucía - DOPs).

1.4.4.2 Factores que afectan a la calidad del aceite de oliva

La calidad del AOV depende de diferentes factores, que influyen desde el tipo de variedad del olivo, las operaciones de recolección, almacenamiento y procesamiento de la aceituna. En relación al cultivar del olivo destacamos los siguientes factores que influyen en la calidad del aceite:

- Condiciones climáticas. Los cultivos no siempre crecen en las mismas condiciones climáticas ya que las zonas de olivar se diseminan en un amplio rango de altitudes donde las condiciones climáticas (lluvia, temperatura, humedad) pueden ser muy diferentes. Estas variables tienen una gran influencia en la madurez y, por lo tanto, en la composición química de los aceites vegetales. En consecuencia, esto tiene un impacto en los perfiles químicos y sensoriales. Aparicio y Luna (2002) publicaron una revisión que concluía que los cultivos de zonas costeras (altitud <100 m) presentaban el doble de contenido en polifenoles que los de zonas más elevadas. Otros autores encontraron que los AOV de las

frutas recolectadas de baja altitud tienen mayores cantidades de esteroides, polifenoles y tocoferoles, pero menores contenidos de clorofilas y ácidos grasos insaturados que los aceites de las montañas (Aparicio and Luna 2002). Es bien conocido que el porcentaje de ácidos grasos insaturados es mayor cuando desciende la temperatura y aumenta la altitud (Osman et al. 1994).

- Temperatura ambiental. Se ha demostrado que el aumento de la temperatura media diaria disminuye la concentración de aceite en el fruto de la aceituna. Estos resultados se han obtenido en cultivos de diferentes países en comparación con la cuenca Mediterránea (Torres et al. 2017).
- Estrés hídrico e irrigación. El mayor o menor riego de los cultivos puede cambiar la calidad del aceite. Previos estudios han evaluado que el riego adicional (además del aportado por la lluvia) ocasionó un aumento de peso y un mayor contenido de aceite sobre aceitunas en una adecuada etapa de madurez comparándolos con cultivos que solo recibieron agua de lluvia. Sin embargo, no se modificaron parámetros como son los ácidos grasos libres, el índice de peróxidos, y otros marcadores (K_{232} y K_{270}) del aceite. Por otro lado, el riego si afectó algunos aspectos de composición del aceite de oliva, con cambios en las proporciones de AGPI, especies moleculares de triacilglicerol, esteroides y alcoholes alifáticos. Además, el tocoferol y los volátiles totales fueron mayores en el aceite producido a partir de los árboles no irrigados (Stefanoudaki et al. 2009).
- Salinidad del suelo. La salinidad del suelo afecta también a la calidad del aceite de oliva. Se ha demostrado que un aumento en la salinidad del suelo provoca un aumento en el contenido de alcoholes alifáticos y triterpénicos, aumentando la maduración de los frutos (Cresti et al. 1994).
- Control de plagas y enfermedades. Es necesario tener bajo control las plagas y enfermedades que directa o indirectamente influyen en la calidad del aceite. Las más importantes son (**Figura 1.10.**):
 - Vivillo o aceituna jabonosa (*Gloesporium olivarum* Alm)
 - Mosca de la aceituna (*Dacus oleae* Bem)
 - Polilla del olivo (*Prays oleae* Bernard)
 - Repilo (*Cicloconium oleaginum* Cast)

Estudios donde se ha evaluado la infestación por *Dacus* y el almacenamiento de la fruta antes de la molienda se ha observado presentar un efecto adverso sobre la calidad del aceite, que se mide por el aumento de la acidez del aceite (Neuenschwander, Michelakis 2009).



Figura 1.10. Enfermedades que afectan a la calidad del aceite de oliva: vivillo (a), mosca de la aceituna (b), polilla del olivo (c) y repilo (d).

- **Madurez del fruto.** La fase adecuada de recolección de la aceituna es la fase de maduración, justo cuando la fruta cambia su coloración de verde-lima oscuro a verde-púrpura más claro, aunque puede determinarse con mayor precisión en el campo observando el inicio del ablandamiento de la fruta. Durante esta fase que dura de 1 a 2 semanas, se produce un cambio rápido en la textura de la fruta desde una fruta dura y difícil de aplastar (etapa verde), hasta una textura más suave en la que la fruta se aplasta fácilmente. A medida que la fruta madura, la materia seca continúa aumentando junto con la síntesis de aceite, aunque a un ritmo más lento que en la fase anterior a la maduración. Éste es considerado el mejor momento de recolección, cuando la pulpa de oliva tiene un equilibrio perfecto de ácidos grasos, tanto desde el punto de vista nutricional como de estabilidad oxidativa, así como el mayor poder antioxidante debido al alto contenido de fenoles totales y tocoferoles (Rotondi *et al.* 2004). Además, los altos niveles de sustancias fenólicas presentes en estas aceitunas mejoran las propiedades nutricionales del aceite resultante. Sin embargo, en la etapa de maduración, el contenido total de fenol de oliva disminuye significativamente, alcanzando la mitad de los valores iniciales (Conde, Delrot, Gerós 2008).

En relación a las operaciones de recolección, destacamos los siguientes factores que influyen en la calidad del aceite:

- **Lugar de recolección.** Para que el fruto sea de buena calidad se debe separar el recolectado del árbol, de los procedentes del suelo, ya que éstos proporcionan aceites de una calidad netamente inferior, con mayor acidez y presencia de defectos.

- Método de recolección. El método de recolección recomendable es aquel que ocasione menor daño a la piel del fruto, ya que evitará pérdidas de aceite y alteraciones en el mismo. Por ello es aconsejable la recolección mecanizada con vibradores frente al método de vareo.

En relación al procesamiento de la aceituna, influyen:

- Operaciones tecnológicas. La eliminación de hojas y el lavado de aceitunas son operaciones importantes para la seguridad mecánica de los equipos de extracción de aceitunas que funcionan a alta velocidad y para la calidad organoléptica del aceite de oliva. Las hojas mezcladas con aceitunas pueden aumentar, de hecho, los atributos organolépticos de la hierba "recién cortada" o "verde", especialmente si se utilizan trituradoras metálicas para preparar pasta de aceituna (Di Giovacchino, Sestili, Di Vincenzo 2002).

La trituración del olivo tiene una influencia importante en las cualidades organolépticas y nutricionales del aceite de oliva virgen. Cuando se usan piedras de molino, los aceites obtenidos tienen una intensidad más baja de amargor y pungencia porque este método de trituración ayuda a producir aceite con un contenido más bajo de sustancias fenólicas. Cuando se usan trituradores metálicos, los aceites tienen, debido a la acción violenta, un mayor contenido de compuestos fenólicos y son más amargos y picantes.

La separación del aceite de las fases sólidas y líquidas de la pasta de olivo se realiza mediante el uso de sistemas de presión, percolación o centrifugación. Todos los sistemas pueden proporcionar aceite de buena calidad si los frutos de olivo son sanos y se encuentran en el momento de madurez correcta, pero el sistema de centrifugación ayuda a evitar o reducir el riesgo de contaminación organoléptica. Los nuevos decantadores centrífugos, que funcionan sin agregar agua (o solo una cantidad mínima de agua) a la pasta de olivo, ahorran energía térmica y los aceites obtenidos son más afrutados y tienen un mayor contenido de antioxidantes fenólicos naturales (Di Giovacchino, Sestili, Di Vincenzo 2002).

1.4.5 Composición del aceite de oliva virgen

El AOV está mayoritariamente formado por una fracción saponificable formada por triacilglicéoles (97-99%) (**Figura 1.11.**), en los que el principal ácido graso es el ácido oleico (C18:1 n-9) (**Figura 1.11.**) que se encuentra esterificando estas moléculas entre un 68 y un 81,5%. Por otro lado, el aceite de oliva contiene una fracción minoritaria (2%), no saponificable, que incluye más de 230 compuestos, como vitaminas y algunos antioxidantes (Ramírez-Tortosa, Granados, Quiles 2006), que además de aportar aroma, gusto y color al aceite, son responsables de la mayoría de sus actividades biológicas y propiedades funcionales (Estruch et al. 2018).

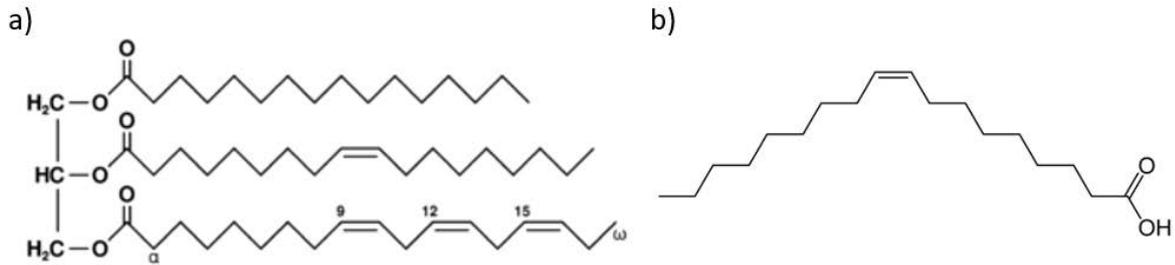


Figura 1.11. Molécula de triacilglicerol (a), molécula de ácido oleico (C18:1 n-9) (b).

1.4.5.1 Lípidos del aceite de oliva

Desde el punto de vista gastronómico, las grasas, por sus características organolépticas, proporcionan a los alimentos un alto grado de palatabilidad (sabor agradable), que aumenta su grado de aceptación, y, además, son fundamentales a la hora de preparación, condimentación y cocinado de todos los alimentos (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009)

Desde el punto de vista bioquímico, las grasas básicamente pueden ser de tres tipos: colesterol, fosfolípidos o triacilglicérols, éstos últimos formados por tres moléculas de ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol (**Figura 1.11.**) (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009).

Las funciones de los lípidos dentro del organismo son varias:

- Función energética. Proporcionan energía, siendo los nutrientes que más calorías aportan por gramo (9 kcal/g)
- Son componentes de la estructura celular y mantienen la integridad estructural y funcional de las membranas
- Son elementos importantes del sistema nervioso ya que constituyen los fosfolípidos
- Son una fuente de ácidos grasos esenciales que nuestro organismo no puede sintetizar y deben aportarse en la dieta como por ejemplo el ácido linoleico y el ácido linolénico
- Vehiculizan las vitaminas liposolubles y
- Proporcionan las estructuras bioquímicas para un buen grupo de hormonas (esteroides)

Los ácidos grasos a su vez pueden clasificarse como:

- Saturados: cuando en su estructura no existe ningún doble enlace
- Insaturados: cuando en su estructura existen dobles enlaces. Dependiendo del número de dobles enlaces que tengan en su molécula podrán ser ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), cuando solo tienen un doble enlace, por ejemplo el ácido oleico (18:1n-9) con 18 átomos de carbono y un doble enlace) y los AGPI, que son aquellos que tienen más de un doble enlace, por ejemplo el ácido linoleico con 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces, teniendo el α -linolénico también 18 átomos de carbono y tres dobles enlaces, o AGPI de cadena larga, aquellos que tienen más de 18 átomos de carbono (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009).

1.4.5.2 Compuestos bioactivos del aceite de oliva

Los compuestos bioactivos del aceite de oliva representan una fracción minoritaria en el aceite de oliva, alrededor del 2%. Su naturaleza es muy variada y muchos de ellos se eliminan durante el procesado y almacenamiento del aceite (Sanchez-Rodriguez, Mesa 2018).

Entre los componentes minoritarios del aceite de oliva, los más conocidos por sus propiedades antioxidantes, son los compuestos fenólicos, unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y que comúnmente se les llaman “polifenoles” (Sánchez-Rodríguez, Mesa 2018). El contenido de polifenoles de un AOV varía dependiendo de la variedad de la aceituna (Picual, Hojiblanca, Arbequina, etc), de su madurez en el momento de su recolección, del área de cultivo, del clima, y del tipo de proceso utilizado para extraer el aceite. Como regla general, el contenido de polifenoles de un AOV es mayor que el de un aceite de oliva o de un aceite de orujo.

Fenoles hidrofílicos

Estos compuestos son característicos del AOV y no están presentes en otros aceites vegetales. Su concentración varía entre 40-1000 ppm, y son los responsables de la mayoría de las propiedades antioxidantes atribuidas a este aceite (Ramírez-Tortosa, Granados, Quiles 2006). Estas moléculas poseen al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, en formas simples o formando polímeros. Se pueden dividir en varias clases (Sanchez-Rodriguez, Mesa 2018) (**Figura 1.12.**):

a) Ácidos fenólicos: presentes en cantidades pequeñas, que pueden ser de la serie de los ácidos benzoicos (ácido benzoico, p-hidroxibenzoico, protocatéquico, gálico, vanílico y siríngico) y de los ácidos cinámicos (cinámico, p-cumárico, o-cumárico, cafeico, felúlico, u sinápico).

b) Alcoholes fenólicos como el (p-hidroxifenil) etanol o tirosol, el (3,4-dihidroxifenil) etanol o hidroxitirosol, y el (3,4-dihidroxifenil) etanol-glucósido.

c) Secoiridoides que se caracterizan por la presencia de ácido elenólico o alguno de sus derivados. Entre ellos destaca la oleuropeína, molécula responsable del amargor del AOV, que se forma mediante la unión del ácido elenólico al hidroxitirosol, mediante un enlace éster, y a la glucosa mediante un enlace glicosídico (**Figura 1.12.**); su hidrólisis libera hidroxitirosol. También encontramos la aglicona de oleuropeína y otros glicósidos.

d) Oleocantal, que es un éster del tirosol y que destaca porque es responsable del picor que ocasiona el AOV en la garganta y que recientemente está siendo objeto de muchas investigaciones por sus excelentes propiedades funcionales (**Figura 1.12.**) (Sanchez-Rodriguez, Mesa 2018).

En humanos, la absorción de compuestos fenólicos del AOV, especialmente hidroxitirosol y tirosol, es de al menos 55-66% de la dosis presente en el AOV. Ésta absorción depende de la dosis y de la matriz alimentaria, es decir, se han observado mayores porcentajes de excreción urinaria después de la ingesta de hidroxitirosol como componente natural de AOV (42% del hidroxitirosol

ingerido) que como componente añadido a otros alimentos (Visioli et al. 2003). Una vez absorbidos, son metabolizados a nivel intestinal y hepático y eliminados por la orina en una forma conjugada, principalmente glucurono-conjugada o, en menor medida sulfatada (Estruch et al. 2018). Considerando este fuerte metabolismo, algunos autores han propuesto que la actividad biológica de hidroxitirosol y tirosol podría deberse a sus metabolitos (Sanchez-Rodriguez, Mesa 2018).

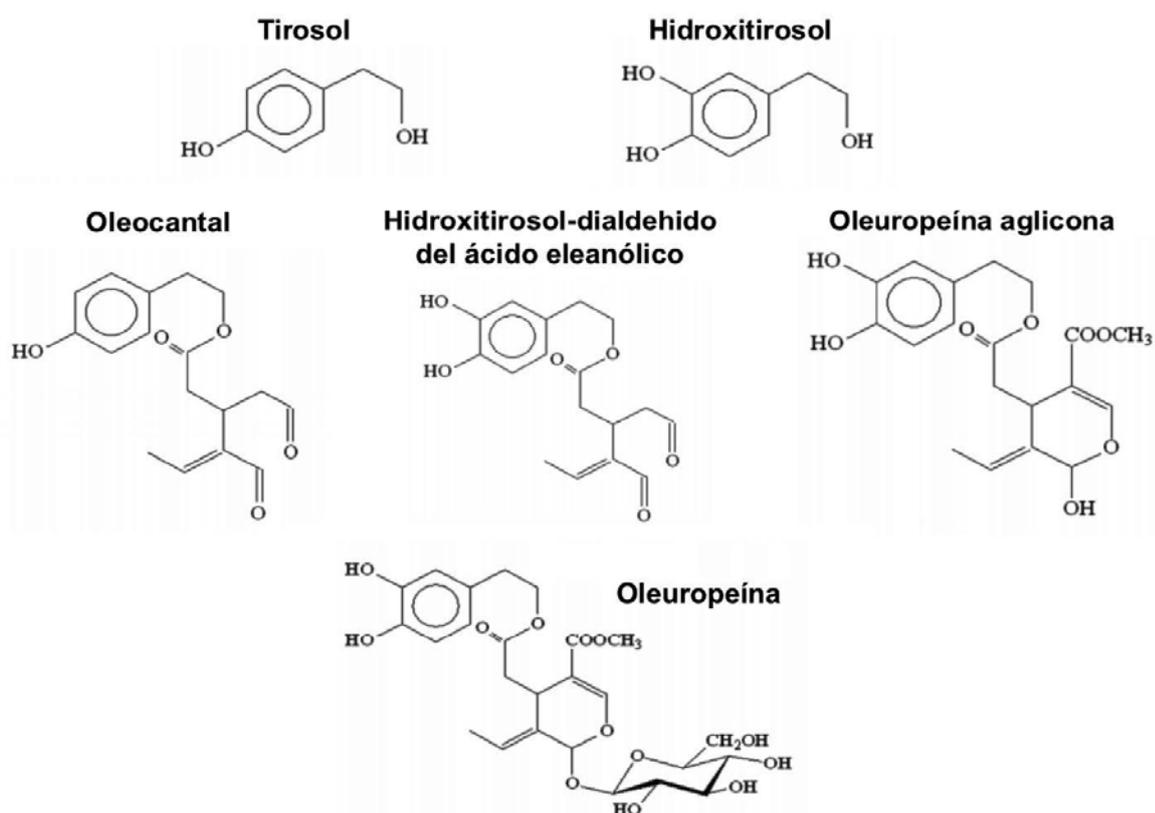
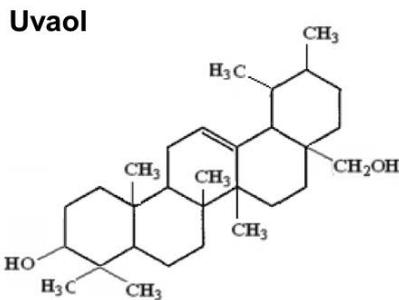
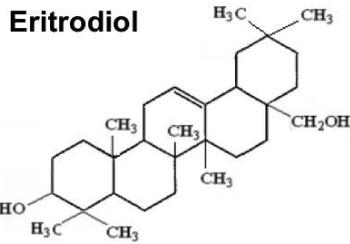


Figura 1.12. Estructura química de los principales alcoholes fenólicos. (Sanchez-Rodriguez, Mesa 2018)

Derivados terpénicos

Los derivados terpénicos son compuestos minoritarios del AOV (0.05-3%) que se concentran en la piel y el hueso del fruto, por lo que se encuentran principalmente en los aceites de orujo. Los más importantes son dos dihidroxiterpenos: eritrodíol (homo-olestranol, 5 α -olean-12-en-3 β , 28-diol) y el uvaol (Δ -12-ursen-3 β , 28diol) (**Figura 1.13.**) (Ramírez-Tortosa, Granados, Quiles 2006), y los ácidos hidroxiterpénicos pentacíclicos, que son la forma oxidada de los dialcoholes triterpénicos, por ejemplo, el ácido oleanólico, ácido maslínico, ácido ursólico, ácido botulínico, ácido 2 α -hidroxi-ursólico y ácido deoxiursólico (**Figura 1.13.**).

Dihidroxitерpenos



Ácidos hidroxiterpénicos pentacíclicos

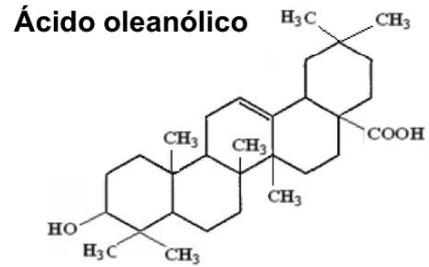


Figura 1.13. Estructura química de los principales derivados terpénicos. (Sanchez-Rodriguez, Mesa 2018)

1.4.5.3 Ácidos triterpénicos

Los ácidos triterpénicos son biosintetizados por las plantas a través del ciclo del escualeno (**Figura 1.14.**). Se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal y son los componentes principales de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional y también se utilizan como componentes dietéticos. En el caso de las aceitunas, *Olea europaea* es una fuente rica en ácidos terpénicos pentacíclicos (ácido oleanólico y maslínico) y dioles (eritrodiol y uvaol), que son los más abundantes triterpenos en la fracción insaponificable del AOV (Rodríguez-Rodríguez 2015).

Estos ácidos triterpénicos y dioles están diferenciados según el grupo funcional presente en la posición C-17. El ácido maslínico tiene dos grupos hidroxilo vecinos en posiciones C-2 y C-3 además de un grupo carboxilo. El eritrodiol y uvaol presentan dos grupos hidroxilo y difieren en la ubicación del grupo metilo (Rodríguez-Rodríguez 2015) (**Figura 1.13.**).

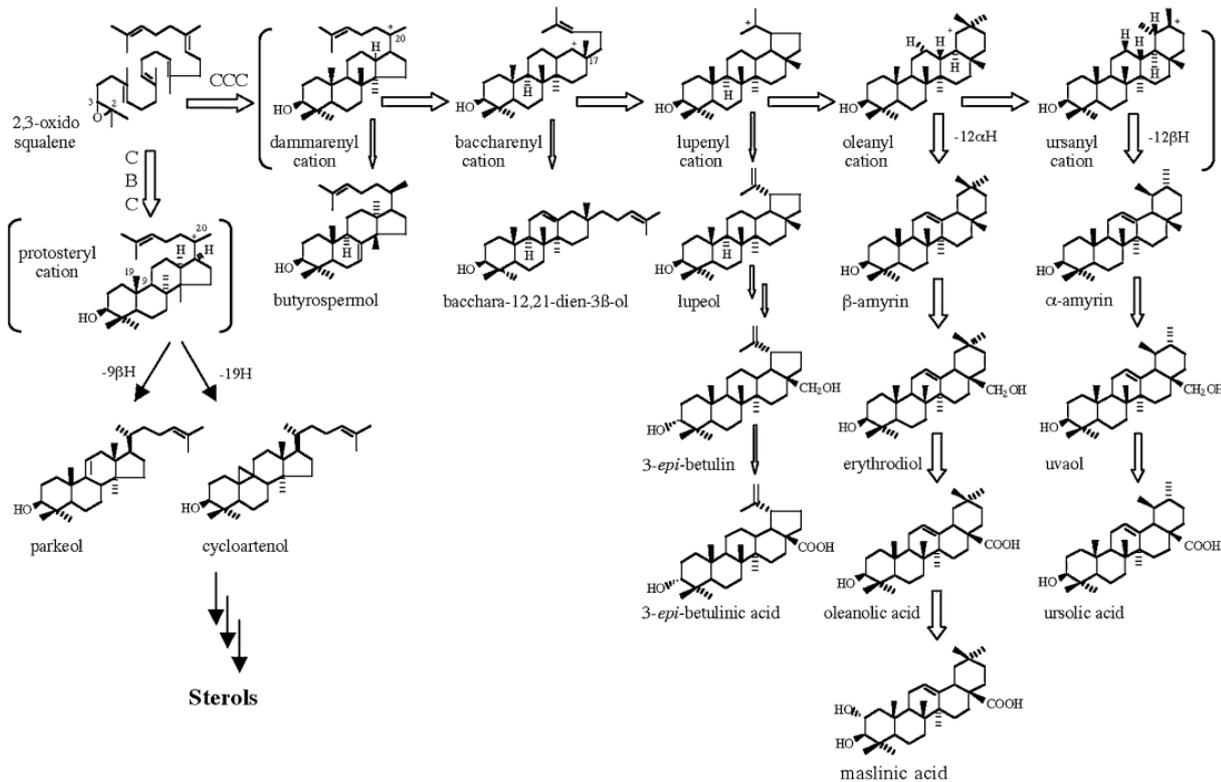


Figura 1.14 Posible vía biosintética de los triterpenoides no esteroideos. CCC y CBC se refieren a las diferentes conformaciones que conducen a triterpenos y esteroides no esteroideos, respectivamente. Productos intermedios están representados entre paréntesis. (Stiti, Triki, Hartmann 2007)

El rango de concentración de estos triterpenoides alcanza valores de hasta 400 mg/kg en la piel de la aceituna mientras que las concentraciones en el aceite de oliva son menores 25-50 mg/kg para ácidos triterpénicos y 6-18 mg/kg para eritrodiol y uvaol, dependiendo de la acidez y variedad de aceituna (Allouche et al. 2009; Pérez-Camino, Cert 1999). El procedimiento aplicado para la extracción de aceite de oliva es también decisivo para el contenido en menores constituyentes (Rodríguez-Rodríguez 2015). Estos triterpenos presentan actividad antitumoral, cardioprotectora, inflamatoria y antioxidante (Dzubak et al. 2006; Hill, Connolly 2013; Sánchez-Quesada et al. 2013).

El aceite de "orujo", que se obtiene del residuo que queda tras la extracción mecánica de AOV, comprende una mezcla de hojas de olivo, cutícula y piel. A diferencia del AOV, el aceite de orujo presenta bajas concentraciones de polifenoles, pero alto contenido de triterpenoides pentacíclicos, ya que pueden llegar a 120 mg/kg (Pérez-Camino, Cert 1999). Por esta razón, la concentración de alcoholes triterpénicos es comúnmente utilizado como parámetro de calidad para el AOV, evaluación de pureza, con la presencia de estos alcoholes siendo un indicador de la mezcla con aceite de orujo de oliva (Pérez-Camino, Cert 1999).

Biodisponibilidad de triterpenos

Para poder obtener declaraciones de salud futuras por parte de las autoridades sanitarias EFSA o la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para productos de alimentación o nutracéuticos, se debe evaluar la biodisponibilidad en humanos. Por lo tanto, existía la necesidad de desarrollar una metodología analítica para el análisis de triterpenos en fluidos corporales aplicables a estudios en humanos.

Esta metodología analítica ha sido publicada recientemente, en un trabajo que ha demostrado que los triterpenos del AOV son metabolizados tras su absorción y eliminados por la orina (Pozo et al. 2017). En este estudio se han cuantificado dos ácidos triterpénicos, el ácido maslínico y el ácido oleanólico ambos evaluados en plasma y en orina. Sus resultados indican que el ácido oleanólico es metabolizado como conjugado sulfatado o como glucurónido mientras que el ácido maslínico es principalmente excretado como forma glucurónida. Este ha sido el primer método capaz de cuantificar los bajos valores de concentración de triterpenos presentes en orina (Pozo et al. 2017).

1.4.6 Importancia del aceite de oliva con respecto a otros aceites

Los aceites de oliva más recomendables para la salud ordenados de mayor a menor interés son el AOVE, el AOV, aceite de oliva y aceite de orujo de oliva. Si los comparamos con el resto de aceites, los aceites de oliva son más recomendables que los aceites vegetales de girasol, maíz, colza etc, encontrándose en última posición las grasas animales, las menos recomendables para la salud.

Más adelante se comentará por qué los aceites de oliva son más saludables que el resto, pero una de las ventajas es su resistencia a la fritura (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009). El aceite de oliva en el proceso de fritura penetra menos que otros aceites, ya que se forma una costra en el exterior de los fritos, consiguiendo una mayor digestibilidad y, como es lógico, un menor consumo del mismo, lo cual lleva a un menor aporte calórico para la persona (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009).

1.4.7 Efectos beneficiosos para la salud del aceite de oliva

1.4.7.1 Aspectos generales

La gran importancia del aceite de oliva se fundamenta en sus características inigualables como grasa alimenticia y por sus propiedades organolépticas, pero sin lugar a duda ha sido a partir de los beneficios demostrados en el campo de la salud, cuando el interés de este aceite se ha visto multiplicado, convirtiéndolo en un alimento único, y proporcionando grandes expectativas para su comercialización (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009).

Su actividad antioxidante y antiinflamatoria hace que sea una excelente ayuda para la prevención y el tratamiento de enfermedades crónicas, donde los procesos oxidativos e

inflamatorios constituyen un factor importante en su desarrollo, como son las ECV, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Los efectos beneficiosos atribuidos al AOV están resumidos en la **Figura 1.15**.

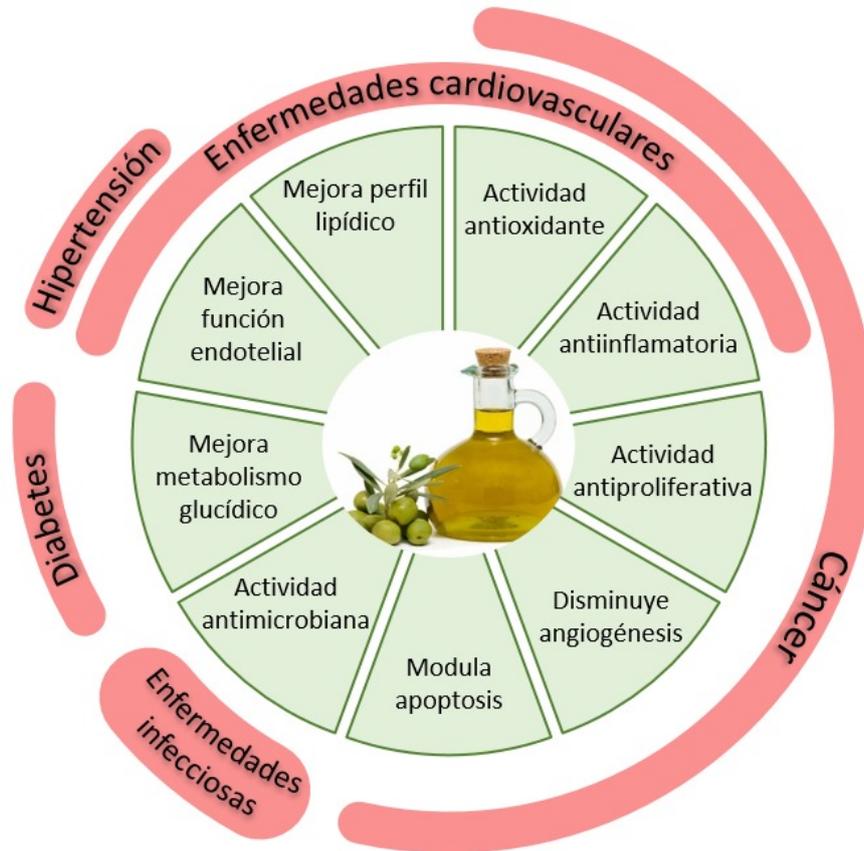


Figura 1.15. Resumen de los efectos beneficiosos atribuidos al AOV. Modificada de (Sanchez-Rodriguez, Mesa 2018)

1) Importancia de la grasa monoinsaturada

Las propiedades que sobre la salud se atribuyen al aceite de oliva se han relacionado tradicionalmente con su alto contenido en ácido oleico (18:1 n-9), un AGMI que proporciona a las membranas celulares la fluidez adecuada para facilitar su funcionalidad, sin aumentar su inestabilidad ya que es menos oxidable.

2) Importancia de los compuestos fenólicos

Los compuestos de naturaleza fenólica son los principales contribuyentes de los efectos preventivos y terapéuticos del AOV, por sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antiproliferativas (EFSA Panel on Dietetic Products 2012; 2011; Estruch et al. 2018). Los principales compuestos que han mostrado actividades beneficiosas son el hidroxitirosol y la oleuropeína, que comparten una estructura ortodifenólica que contribuye a su función antioxidante (Gorzynik-Debicka et al. 2018). El hidroxitirosol es el compuesto más estudiado por

su gran potencial antioxidante y antiinflamatorio. Este compuesto puede controlar el estado redox intracelular, regulando así el daño oxidativo inducido en las células, y ejercer una acción antiinflamatoria, que contribuye a la prevención de ECVs, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, cuya etiología y progresión está relacionada con estos procesos. Además, se absorbe rápidamente y no se acumula en el organismo, por lo que no ocasiona efectos tóxicos (Robles-Almazan et al. 2018).

La oleuropeína es el componente mayoritario en la fracción insaponificable del aceite y de las hojas del olivo y responsable del sabor amargo del AOV. Este compuesto es importante por su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral (Robles-Almazan et al. 2018). Finalmente, estudios recientes con oleocantal han mostrado su gran potencial antiinflamatorio, anticancerígeno y neuroprotector (Lucas, Russell, Keast 2011).

3) Importancia de los ácidos triterpénicos

Los estudios con ácido oleanólico y otros derivados triterpénicos han mostrado su efecto beneficioso como antioxidantes, antiinflamatorios y antitumorales (Sánchez-Quesada et al. 2013), así como para restaurar los trastornos vasculares asociados a factores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión, la obesidad, la diabetes y la aterosclerosis, mostrándolos como una estrategia terapéutica prometedora para prevenir la disfunción vascular (Rodríguez-Rodríguez 2015)

1.4.7.2 Actividad protectora frente a la ECV

Una serie de estudios epidemiológicos desarrollados en diferentes países constituyen una base experimental firme y confiable que respalda los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea, rica en aceite de oliva, con respecto a la reducción de la ECV (Wahrburg, Kratz, Cullen 2002). El estudio de los siete países, iniciado en 1970 (Keys et al. 1986), se diseñó para investigar las relaciones entre la dieta y la ECV, mediante la comparación de diferentes poblaciones. Los resultados de ese estudio mostraron que la población de la isla mediterránea de Creta tenía las tasas más bajas de ECV y cáncer, concluyendo que la causa podría ser debida a la baja ingesta de grasas saturadas y a la alta ingesta de ácido oleico, en forma de aceite de oliva, dentro de la dieta mediterránea.

Posteriormente, el *Lyon Diet Heart Study* (de Lorgeril et al. 1994), desarrollado en pacientes que se recuperan de un infarto de miocardio, fue la primera evidencia clínica en apoyo de los beneficios para la salud de una dieta de estilo mediterráneo, similar a la de Creta. Los efectos protectores se atribuyeron a una mayor ingesta de ácido oleico y ácido α -linoléico (18: 3, n-3) y una menor ingesta de ácidos grasos saturados y ácido linoleico (18: 2, n-6). Trichopoulou et al. (2003) demostraron que la adherencia a una dieta mediterránea reducía la mortalidad por cáncer y enfermedad coronaria (cardiopatía coronaria) en una población griega de más de 22,000 individuos. Los resultados se confirmaron posteriormente en sujetos diagnosticados de cardiopatía coronaria (Trichopoulou, Bamia, Trichopoulos 2005).

La sustitución de grasa saturada con aceites enriquecidos en AGMI comparados con aceites enriquecidos en AGPI tiene efectos similares en las concentraciones plasmáticas de colesterol total, colesterol LDL y HDL, aunque parece que cuando se usa AOV como vehículo de los AGMI se produce un aumento del colesterol HDL que no ocurre con otros tipos de aceite de oliva con menor contenido en compuestos fenólicos, lo que reduce la relación LDL/HDL que se asocia con un menor riesgo cardiovascular (Covas et al. 2006). La mayoría de los estudios han demostrado que las dietas ricas en AGMI reducen la susceptibilidad a la oxidación de las LDL (EFSA Panel on Dietetic Products 2011), un factor de riesgo independiente asociado al desarrollo de enfermedades coronarias en la población general. Además de este papel estabilizador de los AGMI en las LDL, la presencia de compuestos fenólicos con actividad antioxidante también contribuye a la estabilización oxidativa de estas partículas *in vivo*, y se ha demostrado que los compuestos fenólicos del AOV mejoran la funcionalidad de las HDL, y por tanto su efecto antiaterogénico, aumentando el tamaño, la estabilidad y su capacidad antioxidante gracias a su enriquecimiento en estos compuestos (Hernaiz et al. 2014). Además, aumentan la expresión de los genes involucrados en la eliminación de colesterol celular mediante HDL (Farràs et al. 2013).

En 2004, la FDA, institución encargada de autorizar y definir la competencia de los fármacos y alimentos en relación con la salud, autorizó la definición de aceite de oliva como alimento saludable, y recomienda el consumo de 23 g/día de aceite de oliva en sustitución de grasa saturada para disminuir el riesgo coronario (FDA 2003). Posteriormente, en 2011, la EFSA corroboró esta alegación de salud que indicaba que la ingesta de 20 g/d que contuvieran al menos 5 mg de hidroxitirosol previene la oxidación de las LDL y por lo tanto tiene un efecto cardioprotector (EFSA Journal 2011)

Se ha observado que la suplementación con aceite de oliva rico en compuestos minoritarios puede disminuir el número y el tamaño de las partículas ricas en triacilglicéridos postprandiales que constituyen un factor de riesgo cardiovascular, mientras que otros estudios muestran una disminución de la hiperlipemia e hiperglucemia postprandial después de la ingesta de AOV. Por otro lado, algunos estudios clínicos muestran un aumento en la capacidad antioxidante del suero después de la ingesta de AOV en comparación con aceite de oliva corriente y aceite de maíz, así como una disminución de la oxidación lipídica, a pesar del incremento del estrés oxidativo postprandial, sugiriendo un papel específico para los compuestos fenólicos del AOV (Estruch et al. 2013).

La actividad antioxidante del AOV y sus componentes minoritarios ha sido ampliamente demostrada en estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, y también en estudios clínicos de intervención (Covas et al. 2006). Sin embargo, la dificultad para homogeneizar los diseños clínicos y controlar la dieta, las características de los participantes incluidos en los estudios y la variabilidad de los biomarcadores de oxidación seleccionados hace que los resultados sean difíciles de interpretar. Los resultados del estudio EUROLIVE (estudio multicéntrico europeo que evaluó el efecto del consumo de aceite de oliva sobre el daño oxidativo) proporcionó evidencia científica del papel protector de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre el daño oxidativo

de los lípidos en humanos, utilizando dosis de AOV comparables con las ingestas diarias habituales. Este estudio comparó el efecto de la ingesta de 25 ml/día de tres aceites similares en cuanto al perfil de ácidos grasos, pero con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos (2.7 ppm, 164 y 366 ppm para contenido fenólico bajo, medio y alto, respectivamente, durante 3 semanas precedidos por periodos de lavado de 2 semanas en adultos sanos. Este estudio mostró que la disminución del daño oxidativo de los lípidos y el aumento del colesterol HDL fue proporcional al contenido fenólico del aceite de oliva consumido (Covas et al. 2006). Este estudio proporcionó evidencia de primer nivel acerca de que el aceite de oliva es más que una grasa monoinsaturada y que la presencia de otros componentes minoritarios contribuía a la actividad funcional del aceite (Covas et al. 2006). Sin embargo, la limitación de este estudio es su corto periodo de intervención, lo que hace necesario el planteamiento de estudios más largos que aporten más evidencias sobre los efectos antioxidantes del AOV.

Importancia sobre la inflamación y la función endotelial

Los procesos inflamatorios producidos en la pared endotelial, mediados por un gran número de moléculas y enzimas proinflamatorias, están asociados al desarrollo de ECV, afectando a la funcionalidad vascular y activando procesos fibróticos y trombóticos. Los mecanismos moleculares por los cuales los polifenoles del AOV pueden ejercer un efecto antiinflamatorio están mediados por la modificación de la cascada de señalización del NF- κ B, y consecuentemente por la disminución de una serie de mediadores proinflamatorios y moléculas de adhesión que permiten la interacción de células inmunitarias con el endotelio (Tangney, Rasmussen 2013). Esas moléculas activan receptores celulares y desencadenan cascadas de señalización mediadas por el NF- κ B, que regula la expresión de genes que codifican la síntesis de otros componentes proinflamatorios, moléculas de adhesión, la enzima COX-2 y la iNOS, y moléculas implicadas en el desarrollo de procesos apoptóticos y de proliferación celular (de Winther et al. 2005). Los estudios *in vitro* sugieren que el hidroxitirosol, tirosol, sus derivados secoiridoides (oleuropeína) y algunos de sus metabolitos endógenos, dependiendo del modelo celular utilizado, pueden reducir la producción de óxido nítrico, eicosanoides (inhibiendo la expresión de COX2), moléculas de adhesión y algunos mediadores inflamatorios, reduciendo así la inflamación, la angiogénesis y mejorando la funcionalidad vascular (Souza, Marcadenti, Portal 2017). La oleuropeína puede inhibir la proliferación de las células del músculo liso (Abe et al. 2011), y el oleocantal ha demostrado una gran capacidad para inhibir la COX-1 y COX-2 *in vitro* (Lucas, Russell, Keast 2011). Por otro lado, estudios experimentales *in vivo* en modelos animales también han mostrado la capacidad del AOV y algunos de sus compuestos fenólicos para disminuir algunas citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión vascular (Souza, Marcadenti, Portal 2017). Los estudios clínicos han demostrado que los AOV con alto contenido fenólico pueden reducir los mediadores inflamatorios derivados del ácido araquidónico y otros como la PCR o la IL-6 (EFSA Panel on Dietetic Products 2011), y también el estudio PREDIMED concluyó que la ingesta de dieta mediterránea suplementada con AOV puede disminuir las concentraciones plasmáticas de citoquinas proinflamatorias (Casas et al. 2016).

Perona et al. (2006) revisaron las evidencias clínicas que confirman que el consumo diario de AOV rico en compuestos fenólicos además de modular algunas citoquinas y biomarcadores inflamatorios, puede mejorar la función endotelial en humanos. Sin embargo, los resultados *in vivo* no son concluyentes. El AOV disminuyó la ICAM-1 soluble (sICAM-1) y la VCAM-1 soluble (sVCAM-1) en estado postprandial en comparación con un aceite refinado, sin embargo, otros autores no encontraron efecto en las concentraciones plasmáticas de sICAM-1 o sVCAM-1 después del consumo de AOV o aceite de oliva refinado en pacientes con enfermedad coronaria (Estruch et al. 2018). Un metanálisis posterior encontró una reducción significativa en sICAM-1 pero no en las concentraciones de sVCAM-1 tras la intervención con AOV durante al menos cuatro semanas (Papageorgiou et al. 2011). Sin embargo, en 2015, un metanálisis concluyó que los aceites de oliva con alto contenido en polifenoles ejercen un efecto moderado sobre la disminución de la PAS sin afectar a la PAD (Hohmann et al. 2015). Recientemente, se ha propuesto que la ingesta de AOV rico en polifenoles modula la expresión de varios genes relacionados con el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Martín-Peláez et al. 2017). Por lo tanto, se necesitan estudios clínicos bien diseñados para llegar a conclusiones finales sobre el efecto de los polifenoles del AOV sobre la función endotelial y la tensión arterial.

Con respecto a los triterpenos, se han descrito efectos beneficiosos de estos compuestos sobre la función endotelial y la presión arterial (Valero-Muñoz et al. 2014) en modelos animales de hipertensión, por lo que parece que estos componentes pueden ser los responsables, en gran medida, de esta actividad vasoprotectora atribuida al AOV (Rodríguez-Rodríguez 2015). Sin embargo, se requieren más estudios aleatorizados y controlados en humanos para determinar los efectos beneficiosos de los ácidos triterpénicos del aceite de oliva.

Importancia sobre la tensión arterial

La tensión arterial también es un factor de riesgo de la ECV, y recientes estudios han mostrado que el consumo de aceite de oliva mejora la presión arterial cuando se compara con dietas bajas en grasa o ricas en grasa saturadas, tal como se ha puesto de manifiesto en estudios observacionales como el de la cohorte SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) realizado en España (Martínez-González 2006). Este beneficio sobre la tensión arterial no se mantiene cuando se consumen aceites de oliva refinados, o cuando se consume aceite de girasol rico en oleico, lo cual confirma que otros componentes del AOV tienen un efecto sinérgico al del ácido oleico (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009).

1.4.7.3 Actividad antidiabética

La dieta mediterránea ha demostrado ser beneficiosa para el control glucémico y la T2DM. El estudio PREDIMED demostró que la dieta mediterránea suplementada con AOV redujo el riesgo de T2DM en un 40% en participantes con alto riesgo cardiovascular (Salas-Salvadó et al. 2014), redujo la glucosa plasmática en ayunas y mejoró la resistencia a la insulina así como los biomarcadores inflamatorios en individuos diabéticos (Lasa et al. 2014). Sin embargo, cuando la

población estudiada son voluntarios sanos, no se ha podido observar ningún efecto sobre las concentraciones de glucosa séricas (Covas *et al.* 2006).

Pocos estudios han evaluado los efectos de polifenoles específicos del AOV sobre la resistencia a la insulina y la T2DM. El consumo diario de AOV rico en polifenoles durante 8 semanas redujo significativamente la glucosa plasmática en ayunas y la hemoglobina glicosilada, así como algunas adipoquinas inflamatorias circulantes, en pacientes con sobrepeso y T2DM (Santangelo *et al.* 2016). Al contrario, en voluntarios sanos no se observaron efectos sobre la glucosa sérica en ayunas tras la suplementación con 20 ml/d de AOV rico en polifenoles durante 6 semanas (Silva *et al.* 2015). Por otro lado, se han publicado dos ensayos aleatorizados en pacientes diabéticos que evalúan el efecto de los polifenoles de la hoja de olivo (oleuropeína e hidroxitirosol en altas concentraciones) sobre los marcadores de sensibilidad a la insulina, mostrando una disminución de las concentraciones sanguíneas de insulina y hemoglobina glicosilada (Wainstein *et al.* 2012), y una mejora en la función de las células β pancreáticas y en la sensibilidad a la insulina, en comparación con un placebo, a pesar de no modificar sus valores plasmáticos (de Bock *et al.* 2013).

Por lo tanto, los datos obtenidos hasta la fecha son esperanzadores para los pacientes diabéticos, pero se necesitan más estudios clínicos que puedan demostrar el efecto del AOV y sus componentes la prevención de la T2DM.

1.4.7.4 Actividad anticancerígena

El consumo en exceso de ciertos tipos de grasas se ha relacionado directamente con la aparición de tumores como el de mama, colon y próstata, entre otros. Sin embargo, se comprobó que la restricción en la dieta de estas grasas y la disminución de las calorías totales ingeridas, inhibía el desarrollo de estos procesos. En un estudio de casos y controles publicado en 2008 y realizado en Francia (Bessaoud, Daurès, Gerber 2008), se reconoce como el cáncer de mama se asocia de forma inversa con el consumo de aceite de oliva.

Un metanálisis publicado en 2015, concluyó que una mayor adherencia a la dieta mediterránea se asocia significativamente a una reducción del 13% de mortalidad por cáncer, concretamente se reduce el riesgo para el cáncer colorectal (17%), mama (7%), estómago (27%), próstata (4%), hígado (42%), cabeza y cuello (60%), páncreas (52%) y sistema respiratorio (90%) (Schwingshackl, Christoph, Hoffmann 2015).

La importancia del aceite de oliva en la prevención del cáncer ha sido sugerida por varios estudios y puede deberse, al menos en parte, a los compuestos fenólicos presentes: hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína, oleuropeína aglicona, ligstrosido, aglicona y al oleocanta (Fabiani 2016), además de a los derivados triterpénicos (Sánchez-Quesada *et al.* 2013). Además de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos del AOV, varios estudios han demostrado que estos compuestos, principalmente el hidroxitirosol, la oleuropeína y más recientemente el oleocantal, son capaces de inhibir la proliferación, inducir la apoptosis y la diferenciación, disminuir

la angiogénesis y detener el ciclo celular de las células tumorales (Gorzynik-Debicka et al. 2018). Estudios experimentales en ratones han demostrado que la oleuropeína induce una regresión de tumores (Bulotta et al. 2013), y que ésta actúa como un agente anticancerígeno por varios mecanismos principales, que incluyen la interferencia con el receptor de crecimiento epidérmico humano (HER2), modificaciones epigenéticas, interferencia con la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la modulación de la apoptosis y el eje de señalización PI3K/AKT, así como la reducción de la producción de radicales de oxígeno en diferentes tipos de células (Ahmad-Farooqi et al. 2017). Recientemente una revisión sistemática ha confirmado la capacidad del hidroxitirosol y la oleuropeína para inhibir las fases de iniciación y progresión del tumor, en modelos animales (Fabiani 2016). El oleocantal es capaz de reducir el crecimiento del tumor, la supervivencia, la angiogénesis e incluso se ha mostrado su potencial antimetastásico (Pei et al. 2016). Por otro lado, estudios clínicos realizados en voluntarios sanos sólo han mostrado la capacidad del AOV para disminuir los biomarcadores de daño del ADN relacionados con el riesgo de desarrollar cáncer (Fabiani 2016), por lo que se necesitan más estudios clínicos en pacientes con cáncer que evalúen estos efectos, así como las dosis efectivas.

1.4.7.5 Protección frente a las enfermedades neurodegenerativas

Los trastornos neurodegenerativos se caracterizan por un incremento de estrés oxidativo (elevadas concentraciones de anión superóxido y óxido nítrico), inflamación, agregación anormal de proteínas, alteración de la homeostasis de calcio, excitotoxicidad y apoptosis, procesos que, pueden ser mejorados tras la ingesta de AOV. Cada vez hay más evidencias del papel protector que puede ejercer el AOV y sus componentes minoritarios en la prevención de estas alteraciones, gracias a su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Angeloni et al. 2017).

Son muchos los estudios que han demostrado el potencial antioxidante en el tejido cerebral del AOV y sus componentes minoritarios, la oleuropeína y el hidroxitirosol para eliminar directamente los radicales libres, así como del hidroxitirosol y el oleocantal para inhibir las COXs (Angeloni et al. 2017). La administración de AOV en animales de experimentación disminuye el estrés oxidativo y el daño cerebral en situaciones de hipoxia. En situaciones de toxicidad inducida por arsénico, la oleuropeína y el hidroxitirosol protegen frente al estrés oxidativo, mientras que el hidroxitirosol también mejora la disfunción mitocondrial (Soni et al. 2017).

Por otro lado, el papel del AOV y sus componentes sobre otros mecanismos neurodegenerativos está siendo estudiado. Los resultados relativos a la modulación de la autofagia son contradictorios, ya que algunos experimentos han mostrado que dosis micromolares de oleuropeína aglicona activan la autofagia, mientras que dosis picomolares de oleuropeína inhiben este proceso (Angeloni et al. 2017). Otro estudio ha comprobado que la oleuropeína es capaz de activar la actividad proteosómica encargada de eliminar proteínas intracelulares responsables de la patogénesis de algunas alteraciones neurodegenerativas (Katsiki et al. 2007). Esta información está abriendo un campo nuevo de investigación sobre los posibles mecanismos neuroprotectores del AOV y sus componentes.

Los beneficiosos que aporta la dieta mediterránea y en particular los compuestos fenólicos del AOV frente al deterioro cognitivo y al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer son cada vez más evidentes (Angeloni et al. 2017). La administración crónica de AOV en un modelo experimental de Alzheimer, mejora el aprendizaje y la memoria asociada a la acumulación de las proteínas amiloides A β y al daño oxidativo cerebral, aumentando los niveles de glutatión en el cerebro y la actividad glutatión reductasa y supeóxido dismutasa, y disminuyendo el depósito de proteínas A β (Farr et al. 2012). Varios modelos experimentales celulares y animales han mostrado que la oleuropeína aglicona evita la agregación de las proteínas A β (Farr et al. 2012) evitando su citotoxicidad, mientras que el tirosol y el hidroxitirosol también reducen el daño causado por la acumulación de proteínas A β (Angeloni et al. 2017).

Por otro lado, el oleocantal evita la agregación de la proteína Tau característica de la enfermedad de Alzheimer (Monti et al. 2012), además de mejorar varios biomarcadores relacionados con el desarrollo de esta enfermedad (Angeloni et al. 2017). En conjunto, los resultados obtenidos hasta la fecha son esperanzadores y evidencian que el AOV y sus componentes fenólicos tienen un efecto beneficioso sobre la enfermedad de Alzheimer a través de varios mecanismos que confirman la hipótesis de que el consumo de aceite de oliva está fuertemente asociado con un efecto positivo. Por otro lado, el Parkinson, la segunda enfermedad neurodegenerativa crónica más prevalente en las sociedades actuales, se caracteriza por una progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra cerebral y por la presencia de agregados proteicos en las neuronas. Estudios en modelos celulares de Parkinson han mostrado que el tirosol, el hidroxitirosol y la oleuropeína pueden atenuar el daño celular mediante distintos mecanismos (Angeloni et al. 2017). Sin embargo, son necesarios estudios *in vivo* que evalúen el efectoprotector del AOV en esta enfermedad.

1.4.7.6 Actividad antimicrobiana

El aceite de oliva y los extractos de hojas de olivo han sido utilizados desde la antigüedad para paliar patologías asociadas a microorganismos. Se ha descrito actividad antimicrobiana de estos extractos y del hidroxitirosol puro para evitar infecciones en los sistemas respiratorio, intestinal y genital y fortalecer el sistema inmunitario, concretamente frente a microorganismos como *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Yersinia sp.*, *Shigella sonnei* y *Helicobacter pylori* (Conde, Delrot, Gerós 2008; Medina et al. 2006). Además, la presencia de ácido elenólico como parte de la estructura de ciertos compuestos fenólicos aporta una actividad antimicrobiana diferencial (Conde, Delrot, Gerós 2008) frente a patógenos transmitidos por alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica*, *Vibrio cholerae*) y agentes infecciosos del tracto respiratorio (*Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*) (Medina et al. 2006), siendo efectivos incluso en dosis más bajas que algunos antibióticos como la ampicilina. Un estudio reciente ha mostrado el posible efecto beneficioso para evitar la infección nosocomial relacionada con dispositivos médicos o heridas crónicas provocados por *Staphylococcus aureus* en hospitales y otras instituciones de cuidados intensivos (Crisante et al.

2015). Sin embargo, algunos estudios no han podido demostrar esta capacidad antimicrobiana del hidroxitirosol, mostrando ciertas contradicciones que deben seguir siendo estudiadas.

1.4.7.7 Protección frente a afecciones cutáneas

Otra aplicación tradicional de los aceites vegetales es la de tratar una gama de afecciones cutáneas, desde erupciones hasta tumores. Las propiedades beneficiosas del aceite de oliva como agente tópico se deben a su actividad como antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio y emoliente. La capacidad de reparación del ácido oleico y de los antioxidantes presentes en el AOV lo dotan de una capacidad única para tratar las afecciones cutáneas. Además, la presencia de polifenoles y derivados terpénicos contribuyen a la mejora de estas afecciones (Lin, Zhong, Santiago 2017). Los mecanismos moleculares responsables de este efecto reparador cutáneo de los fenoles del AOV han sido ampliamente revisados (EFSA Panel on Dietetic Products 2011).

1.4.7.8 Protección frente a otras afecciones

Dadas las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los componentes del AOV, el potencial terapéutico de esta grasa alimentaria podría llegar a todas las enfermedades que comparten estos componentes (Sánchez-Rodríguez, Mesa 2018).

Artritis: El hidroxitirosol estimula la producción de condrocitos mediante la regeneración y la reparación del cartílago articular, por lo que ha sido utilizado en modelos experimentales de artritis que muestran resultados interesantes reduciendo el daño tisular y restaurando la homeostasis del cartílago, e incluso disminuyendo los niveles de ácido úrico (Oliviero et al. 2018). Además, el oleocantal inhibe la iNOS en los condrocitos, contribuyendo a la mejora de la artritis (de Winther et al. 2005)

Osteoporosis: Los factores dietéticos que tradicionalmente se han asociado con la osteoporosis son el calcio y la vitamina D. Sin embargo, recientes estudios han puesto en evidencia que el tipo de grasa ingerida también pueden influir. Así se ha comprobado, que el consumo de grasa saturada contribuye a disminuir la masa ósea y el riesgo de fracturas (Hsu et al. 2006), mientras que una dieta con alto consumo de AGMI en relación a AGPI ha sido asociado con un menor riesgo de osteoporosis en personas de edad avanzada (Martínez-Ramírez et al. 2007). Al parecer los AGMI inhiben la acción de las prostaglandinas, que favorecen la destrucción ósea, y también podrían inducir la secreción de factores de crecimiento que favorecerían la producción de tejido óseo (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009). El hidroxitirosol también ayuda a prevenir la osteoporosis ya que su consume tiene efectos positivos en la formación y crecimiento de los huesos (Hagiwara et al. 2011).

Enfermedades oculares: El hidroxitirosol protege la retina y la salud ocular específicamente, mejorando la regeneración del epitelio pigmentario de la retina, la degeneración macular y el glaucoma, causados por el estrés oxidativo (Zhu et al. 2010).

Terapias combinadas: Un estudio reciente ha demostrado la actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria del AOV, así como su capacidad para actuar de forma sinérgica con el ibuprofeno mejorando sus propiedades, lo que, como ya se ha comentado, plantea la posibilidad de aplicar terapias combinadas para así poder disminuir dosis de fármacos y por consiguiente sus efectos secundarios (Osman et al. 2017).

En resumen, las propiedades del AOV en el campo de la salud son realmente significativas, y su influencia abarca las enfermedades más prevalentes en el mundo desarrollado, siendo la mejor estudiada la que ejerce en la protección de la ECV, pero cada vez más se demuestra su influencia positiva frente a la enfermedad del cáncer, la demencia y la osteoporosis. Pueden afirmarse además que las propiedades que en el campo de la salud presenta el AOV, no se debe exclusivamente al ácido oleico sino a la presencia de otros componentes minoritarios que potencian sus efectos beneficiosos, lo que hace que el AOV pueda ser definido como un alimento excepcional, imposible de ser sustituido por otros aceites también ricos en ácido oleico (Mataix-Verdú, Solá-Alberich 2009).

Son muchos los estudios experimentales realizados hasta la fecha en este campo, y los resultados, algunas veces contradictorios, no siempre son fáciles de interpretar. Por otro lado la variabilidad en los diseños experimentales de los ensayos clínicos en humanos, en las características de la población estudiada, en los tiempos de intervención y en la composición de los distintos aceites utilizados, así como en el tipo y las dosis de compuestos aislados utilizados, hace que los resultados *in vivo* sean muy variables, y plantea la necesidad de iniciar estudios aleatorizados, bien diseñados y controlados para poder evidenciar correctamente las actividades funcionales del AOV y sus componentes.

1.5 Hipótesis y objetivos

1.5.1 Hipótesis

La hipótesis de este estudio es que el enriquecimiento del AOV con componentes bioactivos de la aceituna incrementa la protección de los aceites frente al desarrollo de factores de riesgo de las ECV.

1.5.2 Objetivo general

El objetivo general del presente estudio es evaluar los beneficios cardiovasculares del AOV enriquecido en compuestos fenólicos y ácidos triterpénicos de la propia aceituna sobre marcadores de riesgo cardiovascular en adultos sanos suplementados con 30 ml de un aceite de oliva optimizado rico en compuestos fenólicos (AOVO) y otro que además de los compuestos fenólicos contiene ácidos triterpénicos obtenidos de la piel de las aceitunas (AF), comparándolos con un aceite de oliva control con bajo contenido en componentes bioactivos (AC).

1.5.3 Objetivos específicos

Objetivo 1. Obtener evidencia científica de los efectos de un AOVO y un AF frente a un AC sobre la función endotelial y los biomarcadores de daño endotelial en voluntarios sanos.

Objetivo 2. Obtener evidencia científica de los efectos de un AOVO y un AF frente a un AC sobre el estado oxidativo y el sistema de defensa no enzimático en voluntarios sanos.

Objetivo 3. Obtener evidencia científica de efectos de un AOVO y un AF frente a un AC sobre biomarcadores de inflamación en plasma de voluntarios sanos.

Objetivo 4. Obtener conclusiones sobre los efectos de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre factores de riesgo cardiovascular en adultos sanos.

Objetivo 5. Obtener conclusiones sobre los efectos de los ácidos triterpénicos del aceite de oliva sobre factores de riesgo cardiovascular en adultos sanos.

Capítulo 2 – Materiales y métodos

2.1 Características de los aceites de oliva

Los aceites de oliva utilizados en este estudio fueron producidos en la Cooperativa de San Francisco de Asís de Montefrío (Andalucía, España) a partir de aceitunas de la variedad Picual y consiguieron la denominación de virgen extra dada su elevada calidad y a la ausencia de defectos.

Los tres aceites de oliva que se evaluaron en este estudio fueron los siguientes:

1) El aceite de oliva optimizado (AOVO) se preparó a partir de una mezcla de AOVE para conseguir un aceite optimizado con un elevado contenido en compuestos fenólicos (490 ppm de compuestos fenólicos) y que contiene 86 ppm de ácidos triterpénicos.

2) El aceite funcional (AF) se preparó a partir del mismo AOVO, con 487 ppm de compuestos fenólicos, que fue enriquecido con triterpenos (389 ppm) provenientes del exocarpo del fruto de la aceituna.

3) El AOV control se preparó a partir del AOVO sometido a un proceso de lavado para eliminar la mayor parte de los compuestos fenólicos, obteniéndose un aceite con 124 ppm de compuestos fenólicos y 86 ppm de triterpenos.

De esta manera se consiguió que todos los aceites presentaran una composición similar en cuanto al perfil de ácidos grasos y micronutrientes (vitamina E, fitosteroles, etc.) y que sólo fueran diferentes en su contenido en compuestos fenólicos y ácidos triterpénicos. La composición detallada de estos aceites de oliva se muestra en la **Tabla 2.1**.

Los aceites fueron preparados en recipientes oscuros sellados y similares en apariencia y color, y fueron etiquetados como “A”, “B” y “C”, de manera que se aseguró que ni los voluntarios que los consumían, ni los investigadores responsables del estudio conocieran la identidad del aceite. La identificación de cada uno de los aceites se conservó en un sobre cerrado hasta la finalización del análisis estadístico de los datos obtenidos.

La determinación de ácidos grasos y componentes bioactivos de los aceites se realizó en CM Europa S.L. (Jaén, España) y en el Instituto de la Grasa (Sevilla, España), al comienzo de la intervención y tras su finalización, para comprobar los parámetros de calidad del aceite y que la composición del mismo no se había modificado durante el tiempo de intervención.

Tabla 2.1. Características de los aceites de oliva administrados.

	AOV	AOVO	AF
Perfil de ácidos grasos (%)			
Ácido esteárico, C18:0	2.3	2.2	2.1
Ácido oleico, C18:1	78.9	78.2	78.4
Ácido linoleico, C18:2	6.6	6.8	6.9
Ácido linolénico, C18:3	0.6	0.7	0.7
Ácido araquidónico, C20:0	0.4	0.4	0.4
Ácido eicosanoico, C20:1	0.3	0.4	0.4
Ácido behénico, C22:0	0.1	0.1	0.1
Ácido lignocérico, C24:0	<0.1	<0.1	<0.1
Compuestos fenólicos totales (ppm)	124	490	487
Hydroxytyrosol y derivados	105	424.0	423.0
Lignanos	18.2	61.3	59.2
Flavonoides	0.7	3.4	3.2
Fenoles simples	0.0	0.9	0.9
Triterpenos totales (ppm)	86.5	86.3	388.8
Ácido maslínico	47.3	47.3	217.7
Ácido oleanólico	39.2	39.1	171.1
Ácido ursólico	<10	<10	<10
α-tocoferol (ppm)	174	183	176
Escualeno (mg/100g)	529.2	536.2	545.5
Pigmentos totales (ppm)	15.73	17.59	16.78
Pigmentos carotenoides totales (ppm)	7.08	6.79	6.97
Esteroles totales (ppm)	1437	1396	1460
AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado. (Sanchez-Rodriguez et al. 2018)			

2.2 Sujetos

2.2.1 Tamaño de muestra y análisis de potencia

Se calculó que se necesitarían al menos 40 sujetos para obtener una diferencia estadísticamente significativa mayor o igual a 10 unidades en la LDL oxidada considerando un riesgo α de 0.05 y un riesgo β de 0.20 en una prueba de dos lados. Asimismo, se anticipó una tasa de abandono del 15%, por lo que se aumentó el número mínimo de sujetos hasta 46; los abandonos antes del primer período de intervención fueron reemplazados. Finalmente, se pudo aumentar el tamaño de la muestra a 58 para conseguir mayor poder estadístico en los resultados.

2.2.2 Elegibilidad de sujetos y cumplimiento

Los sujetos del estudio fueron reclutados de la población general de Granada (España) que acudía a la consulta de atención primaria en el hospital y de familiares y conocidos de esos sujetos. Cincuenta y ocho sujetos (29 hombres y 29 mujeres) fueron seleccionados para iniciar el estudio (**Figura 2.1**).

Los criterios de inclusión fueron: presentar un buen estado de salud según un examen físico, bioquímico y hematológico y aportar el documento de consentimiento informado debidamente cumplimentado y firmado (**Anexo I**).

Los criterios de exclusión fueron: fumar, ingerir suplementos antioxidantes, aspirina o algún otro medicamento con reconocida capacidad antioxidante, hiperlipidemia, obesidad ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), diabetes, hipertensión, enfermedad celiaca, cualquier otra enfermedad intestinal, cualquier afección que limite la movilidad, enfermedades potencialmente mortales o cualquier otra enfermedad o condición que perjudique el cumplimiento.

Los sujetos podían retirarse del ensayo clínico en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Además, si se detectaba algún evento adverso grave relacionado con la intervención o algún problema de salud durante el periodo de intervención, el sujeto era retirado del estudio. Por otro lado, los participantes que no cumplían con el procedimiento del estudio eran invitados a abandonarlo.

Al final de cada periodo de intervención, los participantes devolvían los recipientes individuales de aceite de oliva para registrar la cantidad de aceite de oliva no consumida. Aquellos en los que el consumo de aceite fuese inferior o igual al 80% se consideraban como que abandonaron el estudio. Del total de 58 sujetos, cinco de ellos decidieron no participar en el estudio por razones personales antes de realizarse la distribución en grupos. Por lo tanto, 53 sujetos (27 hombres y 26 mujeres) de edades entre los 20 y 50 años fueron finalmente incluidos en el estudio que tuvo lugar desde febrero a julio de 2014 (**Figura 2.1**).

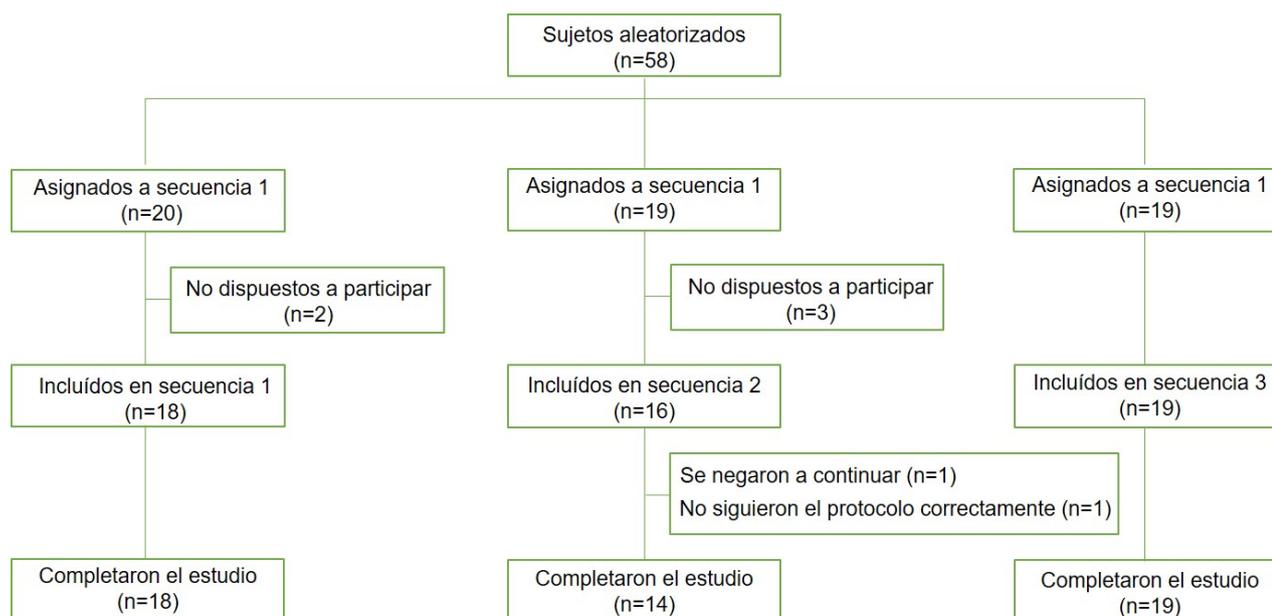


Figura 2.1 Diagrama de flujo de los sujetos del estudio.

2.2.3 Procedimientos de operación estándar para asegurar la calidad del estudio: aleatorización y ocultamiento de la asignación

Se utilizó un método de aleatorización estratificado en bloque para la asignación de los sujetos a uno de los tres grupos de administración de aceite de oliva, pareados por sexo y edad. Para ello se utilizó un programa informático que generaba números aleatorios de asignación (Biel et al. 2016). Esto lo realizó una persona ajena al estudio y mantuvo la lista de aleatorización en sobre cerrado hasta que finalizó el análisis estadístico de los datos. De esta manera, se garantizó que los participantes, los investigadores y técnicos que participaron en el estudio no conocieran el aceite asignado en cada momento. Tras finalizar el análisis de las muestras del estudio se descifraron las codificaciones de los aceites: aceite A (AOVO), aceite B (AOV) y aceite C (AF). Así como los grupos de administración de aceite: grupo 1 (A, B, C) grupo 2 (B, C, A) y grupo 3 (C, A, B).

Una vez comenzado el estudio de intervención uno de los sujetos decidió no continuar por razones personales y el otro sujeto no siguió el protocolo del estudio como correspondía. Por tanto, 51 sujetos finalizaron el estudio (**Figura 2.1**) (Biel et al. 2016). Todos los sujetos aportaron el consentimiento (**Anexo I**) debidamente firmado de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki y la institución local y el comité de ética de investigación del centro de Granada aprobó el protocolo.

Se establecieron procedimientos operativos estándar detallados para este ensayo clínico y se educaron a todos los profesionales, enfermeras y técnicos, para asegurarse de que los participantes fuesen tratados con altos estándares y de conformidad con el protocolo de prueba.

Aunque las intervenciones involucraron alimentos naturales como son los aceites de oliva, todos los eventos adversos que pudieran estar relacionados con las intervenciones tenían que ser comunicados a los investigadores y éstos debían de reflejarlos en el formulario individual de cada sujeto.

2.2.4 Control de la dieta

Se informó debidamente a los sujetos acerca de las recomendaciones dietéticas a tener en cuenta durante el estudio para evitar una ingesta excesiva de antioxidantes y compuestos fenólicos durante los periodos de intervención. Por tanto, los sujetos limitaron el consumo de los siguientes alimentos a:

- 2 porciones de verduras o legumbres / día
- 3 porciones de frutas (incluyendo zumos) / día
- 3 tazas de té o café / día
- 1 porción de una barra de chocolate (15 g) / día
- 2 copas de vino / día
- 30 g / semana de nueces
- Se les recomendó consumir pescado preferentemente blanco, hasta un máximo de 2 porciones (150 g / porción) / semana
- Debían evitar productos enlatados con aceites, como sardinas, pimientos, etc.
- En los períodos de lavado los sujetos debían evitar el consumo de aceitunas y aceite de oliva

También se informó a los sujetos que debían evitar comer fuera de casa, y si no era posible, que llevaran consigo los recipientes individuales de aceite de oliva para su uso en las comidas.

Para garantizar que durante las intervenciones se utilizaran únicamente el aceite asignado, un nutricionista se encargó de indicar a los voluntarios como reemplazar todos los tipos de grasa cruda consumida habitualmente en cada periodo de intervención, tanto los aceites de oliva como el de girasol durante los periodos de lavado.

2.3 Diseño del estudio

El estudio fue un ensayo clínico de intervención nutricional, aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado. Se realizó en dos hospitales Universitarios de Granada, el hospital Virgen de las Nieves y el hospital Clínico San Cecilio. La ventaja de usar un diseño cruzado es que cada sujeto sirve como su propio control.

El protocolo se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las guías de buenas prácticas (Vijayanathan, Nawawi 2008). Todos los profesionales implicados en el estudio estaban cualificados para llevar a cabo y supervisar el estudio. El ensayo ha sido registrado en ClinicalTrials.gov ID: NCT02520739.

Todo el personal implicado en el ensayo clínico asistió a un taller de capacitación sobre los procedimientos a realizar y estuvieron al tanto de cualquier cambio en el protocolo. Se proporcionó un protocolo escrito y documentos de registro estandarizados. Todo el personal involucrado en el estudio fue ciego a las asignaciones grupales. Se realizó una primera visita de monitorización de datos y una visita de control de calidad de campo a la mitad del estudio por una auditoría externa (NUPROAS HB), independiente de los investigadores del trabajo de campo y del patrocinador.

2.3.1 Intervención y recolección de muestras

La **Figura 2.2** representa un esquema de la secuencia de intervenciones del ensayo clínico. El ensayo clínico comenzó con la primera toma de muestra de sangre y orina realizada en la “visita 0” o basal, después de un ayuno nocturno. En este momento se les proporcionó a cada sujeto aceite de girasol para las siguientes 2 semanas del primer periodo de lavado. Durante este periodo los voluntarios debían consumir el aceite de girasol como grasa habitual en la dieta y evitar el consumo de aceite de oliva y cualquier producto derivado de la aceituna.

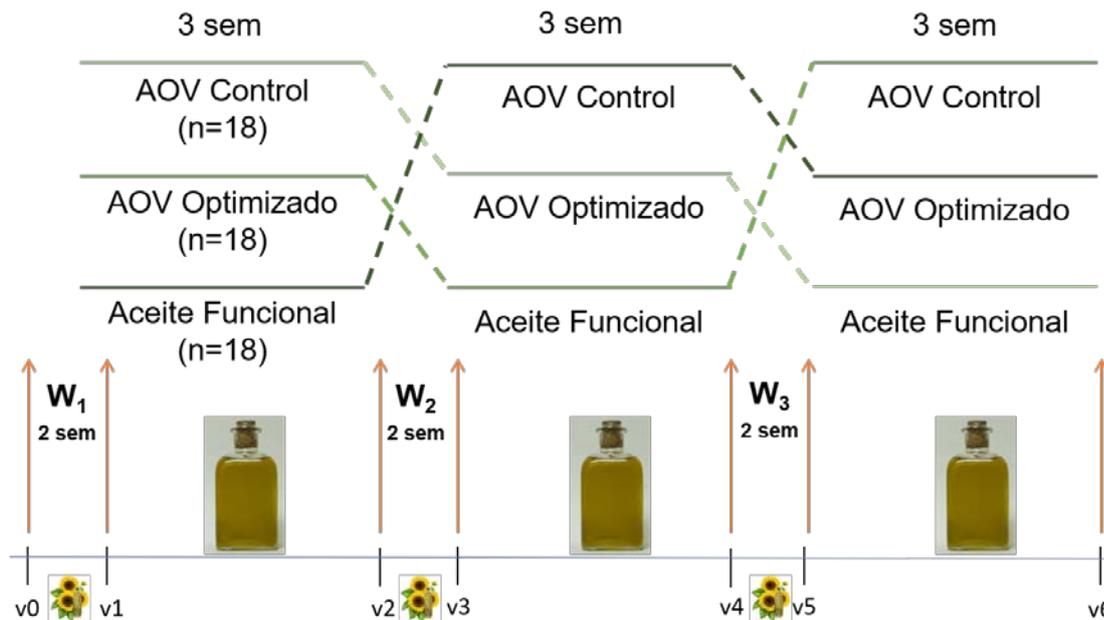


Figura 2.2. Esquema de la secuencia de intervenciones del ensayo clínico. AOV, aceite de oliva virgen; v, visita; W, lavado.

En la “visita 1” se realizó la segunda toma de muestra (pre-intervención) y comenzó el primer periodo de intervención con el aceite asignado según el orden de administración de aceite. A cada uno de los sujetos se les proporcionó una botella con 30 ml del aceite de oliva asignado, una para cada día de las tres semanas de intervención (FDA 2003). Esta cantidad de aceite debían de ingerirla en crudo y en una sola dosis o bien distribuida hasta en las tres comidas del día. También disponían de aceite del mismo tipo suficiente para cocinar durante ese periodo de tiempo. Una vez finalizadas las tres semanas, los voluntarios fueron citados para la “visita 2”, en la que se realizó la tercera toma de muestra (post-intervención). Posteriormente, se llevó a cabo el segundo periodo de dos semanas de lavado en el que los voluntarios recibieron el aceite de girasol para cocinar y

no tomaron productos procedentes de la aceituna, seguido de la segunda intervención con el segundo aceite de oliva asignado durante las 3 semanas siguientes, desde la “visita 3” hasta la “visita 4”. Después el tercer periodo de lavado de dos semanas con aceite de girasol y sin consumo de productos procedentes de la aceituna, y finalmente, en la “visita 5” los voluntarios recibieron el tercer aceite para la 3 tercera intervención de tres semanas, que terminó con la “visita 6” para la que se realizó la última toma de muestra tras las 15 semanas totales de intervención.

En todas las visitas los voluntarios eran citados a primera hora de la mañana en ayunas de un mínimo de 10 horas para la extracción de sangre (**Figura 2.2**), que tuvo lugar al comienzo del estudio (basal) y antes (pre-intervención, después del periodo de lavado) y después (post-intervención) de cada periodo de intervención. Se tomaron muestras de sangre en tubos con EDTA y sin anticoagulante, que fueron centrifugadas a 4 °C, 1750 x g durante 10 min. El plasma fue separado, alícuotado y congelado a -80 °C hasta su análisis. Además, se tomó un tubo de 3 ml de sangre que fue conservada a 4 °C para realizar los experimentos *in vitro*.

Los voluntarios trajeron la orina recogida durante las 24 h previas a la visita (para ello cada sujeto tenía a su disposición una botella de 4 l de capacidad), cuyo volumen era medido y posteriormente se hicieron alícuotas que se fueron congeladas a -80°C hasta su análisis.

2.4 Determinaciones analíticas

2.4.1 Marcadores de cumplimiento de intervención: análisis de triterpenos en orina

Para asegurar el cumplimiento de intervención, se determinaron concentraciones de triterpenos (ácidos maslínico y ácido oleanólico) derivatizados con 2-picolilamina y compuestos fenólicos del aceite de oliva (hidroxitirosol y sus metabolitos) en orina de 24 h, en una submuestra de 12 sujetos elegidos al azar mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Pozo et al. 2017). Estos análisis fueron realizados en el Instituto de Investigación del Hospital del Mar (IMIM).

Para el análisis de ácido maslínico y oleanólico, se transfirieron alícuotas de 250 ml de orina a tubos de vidrio de 15 ml junto con 1 ng/ml de d3-OA, 20 ml de glucuronidasa procedente de *Escherichia coli* y 200 ml de 0.1 M tampón de fosfato a pH=6. Tras incubar durante una noche y en un baño de agua a 37 °C, se añadieron 50 mg de NaHCO₃/Na₂CO₃ (1:2, w/w) a cada tubo antes de la extracción. Las muestras fueron sometidas después a una extracción líquido-líquido con 2 ml de metil tert-butil éter. La mezcla fue homogeneizada en un agitador durante 20 min y centrifugada a 3500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

La fase orgánica fue transferida a tubos limpios y evaporada a 40 °C bajo corriente de nitrógeno. Los extractos fueron después derivatizados con 50 ml de 2-picolamina (1 g/l en acetonitrilo, ACN). La mezcla de reacción fue incubada durante 10 min a 60 °C en un bloque calentador y luego secados bajo corriente de nitrógeno. Las muestras fueron reconstituidas en 100 ml de ACN-H₂O Milli Q grade (1:1). Los ácidos triterpénicos maslínico y oleanólico presentes en

orina derivatizados fueron cuantificados usando un Sistema Acquity UPLC, (Waters Associates, Milford, MA, USA); para la separación cromatográfica, la columna estaba acoplada con un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo (Quattro Premier) junto a un electrospray ortogonal (ESI) (Waters Associates).

El nitrógeno fue utilizado como gas para secar y nebulizar. El flujo de gas utilizado fue aproximadamente 1200 l/h, y el flujo de gas del cono fue de 50 l/h. Los voltajes de los capilares de 3 kV y 2.5 kV fueron usados para ionización en modo positivo y negativo, respectivamente. La temperatura de desolvatación del nitrógeno fue de 450 °C y la temperatura de la fuente de 120 °C.

El gas de colisión fue el argón y el flujo fue de 0.21 ml/min. La separación por cromatografía líquida fue realizada a 55 °C usando una columna Acquity CSH phenyl-hexyl (100 mm, 2.1 mm i.d., 1.7 m) (Waters Associates) operando con un flujo de 300 ml/min. Se seleccionó agua y metanol, ambos conteniendo ácido fórmico al 0.01% v/v y amoníaco 1 mM como solventes de fase móvil. Para la detección de los triterpenos derivatizados, se utilizó un gradiente para la separación de los analitos. El porcentaje de solvente orgánico fue cambiando linealmente tal y como se indica a continuación: 0 min, 70%; 0.5 min, 70%; 7 min, 98%; 9 min, 98%; 9.5 min, 70%; and 11 min, 70%.

2.4.2 Evaluación de la ingesta

Los sujetos, asesorados por un nutricionista, completaron un registro dietético de 3 días (**Anexo II**) (2 laborables y 1 festivo) al comienzo del estudio y durante cada periodo de intervención (Yang et al. 2010). Los alimentos consumidos fueron convertidos en energía, macronutrientes y micronutrientes mediante un programa específico CSG (General ASDE), utilizando la base de datos española de composición de alimentos (BEDCA 2006). Sólo se pudieron analizar los datos de ingesta de 51 sujetos.

2.4.3 Experimentos *ex-vivo*: cultivos celulares de sangre completa

Se recogieron alícuotas de sangre completa de una submuestra de 36 sujetos usando para ello tubos con heparina (BD Vacutainer System, Heidelberg, Germany). En las tres primeras horas tras obtención de la muestra, la sangre se diluyó tres veces con Dulbecco's modified Eagle's medium y se agitaron fuertemente en tubos de 3 ml (Greiner Bio-one, Solingen, Germany).

Se sembraron alícuotas de 1 ml en placas de 24 pocillos (Nunc, VWR International GmbH, Langenfeld, Alemania) y se cultivaron durante 24 h a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. De cada extracción de sangre, se realizaron incubaciones por triplicado en paralelo con controles positivos y negativos, cultivos separados que incluyeron fitohemaglutinina (PHA, 10 g/mL), lipopolisacárido de *E. coli* (LPS, 1 g/ml) y forbol 12-miristato 13- acetato más ionomicina (PMA, 25 ng/ml + IO, 1 g). Se utilizaron los mismos lotes de PHA, LPS, PMA + IO y solución salina tamponada con fosfato para todos los experimentos. Los hemocultivos se eliminaron de cada pocillo y se centrifugaron a 700 xg durante 5 min a 20 °C. Los sobrenadantes resultantes (plasma) se alicuotaron y se conservaron a -20 °C hasta análisis de la endotelina-1. Se hicieron

agrupaciones de sobrenadantes de 8 sujetos para cada uno de los tres órdenes de administración de aceites (Huisman et al. 2009; Walter et al. 1999). Estos análisis fueron realizados en el CSIC (Centro Superior de Investigaciones Científicas).

2.4.5 Determinación de medidas antropométricas y biomarcadores relacionados con el síndrome metabólico

Se determinaron el peso, altura y la circunferencia de cintura en los sujetos sin calzado, y siempre por el mismo profesional. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) como el peso (kg) dividido por la altura al cuadrado (m²).

Las concentraciones plasmáticas de colesterol total, triacilglicéridos y glucosa fueron determinadas por métodos enzimáticos usando para ello un autoanalizador PENTRA-400 (ABX-Horiba Diagnostics, Montpellier, France). Las concentraciones de HDL colesterol fueron calculadas tras determinar el colesterol total en el plasma después de haber solubilizado el colesterol contenido en las HDL con detergente selectivo acelerador (ABX-Horiba Diagnostics). Las concentraciones plasmáticas de LDL colesterol se calcularon usando la fórmula de Friedewald: $LDL\text{ colesterol} = (\text{Colesterol total}/5) - \text{HDL colesterol}$.

La presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) fueron medidas con un manómetro de mercurio tras mantener al sujeto un mínimo de 10 min en posición sentada y relajado. Se registró el promedio de dos mediciones. La presión de pulso fue calculada como diferencia entre la PAS y la PAD. Las concentraciones de colesterol total, triacilglicéridos, glucosa, HDL-colesterol y LDL-colesterol se determinaron sólo en 46 sujetos.

2.4.6 Determinación de biomarcadores de función endotelial y adipoquinas

La endotelina-1 se determinó mediante técnicas de ELISA (CV): 7,2% (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU., Cat. DET100) tanto en plasma como en sobrenadantes del hemocultivo. Se usaron kits de anticuerpos monoclonales humanos (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EE. UU.) junto con un sistema Luminex® 200 con tecnología XMap (Luminex Corporation, Austin, TX, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para determinar las concentraciones de adiponectina (coeficiente de variación (CV): 10.3%), resistina (CV: 7.7%), molécula soluble de adhesión intercelular (sICAM-1) (CV: 6,1%) y molécula soluble de adhesión vascular (sVCAM-1) (CV: 5,4%), (Cat. # HADK1MAG-61K).

2.4.7 Determinación de marcadores de oxidación

Está bien documentado que la producción de isoprostanos aumenta en proporción directa al nivel de estrés oxidativo. La medición de la concentración del 15F2t-Isoprostano en sangre u orina es ahora un método bien establecido para la evaluación diagnóstica del estrés oxidativo (Awad et al. 1993; Roberts, Morrow 2000).

Se utilizaron kits de ELISA comerciales para las determinaciones de las concentraciones urinarias de 15-F2t-isoprostano (EA85 Oxford Biomedical Research, Michigan, USA) y 8-hidroxi-2´deoxiguanosina (8-OHdG) (KOG-200S/E JalCA, Fukuroi, Japan), según las instrucciones del fabricante.

Las concentraciones de estos biomarcadores se normalizaron por creatinina en orina y se expresaron como ng/mg de creatinina. Para ello se determinaron las concentraciones de creatinina en orina mediante un kit colorimétrico (Ref. 1001115, Spinreact, España).

2.4.8 Determinación de ácidos grasos en plasma

Los porcentajes de ácidos grasos plasmáticos se cuantificaron mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, tras su metilación con cloruro de acetilo utilizando el método de (Lepage, Roy 1986). Las muestras se extrajeron con hexano y se disolvieron en 2 ml de metanol:benceno (4:1 v/v). El proceso de metilación se llevó a cabo a añadiendo 200 µl de cloruro de acetilo e incubando a 100 °C durante 1 h. Tras enfriar las muestras en un baño de hielo, se añadió 5 µl de K₂CO₃ 0.43 M para parar la reacción y neutralizar la mezcla. Los tubos se agitaron y se centrifugaron y la fase superior correspondiente a la fase del benceno se secó bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió con 100 µl de hexano. Se inyectó 1 µl en el cromatógrafo de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases de alta resolución (7890A, Agilent, USA) con una columna capilar de 30 metros de longitud (ZB-FAME, 25 mm de diámetro interno y 25 µm de espesor) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Quattro microGC, Waters, USA). Las condiciones cromatográficas fueron: inyector en modo Split (10:1), temperatura del inyector (250 °C), temperatura de la línea de transferencia (240 °C), gas portador (Helio (1 ml/min), se utilizó un programa de temperatura desde 100 °C (2 min) hasta 210 °C (5 min) a 4°/min. Las condiciones de la espectrometría de masas fueron: temperatura de la fuente (240 °C), escaneo completo desde 45 Da hasta 450 Da mediante ionización por impacto electrónico (EI+) a 70 eV.

2.4.9 Determinación de biomarcadores del sistema de defensa antioxidante no enzimático

Las concentraciones plasmáticas de retinol, tocoferol, carotenos y coenzimas Q₉ y Q₁₀ se determinaron tras la extracción con 1-propanol mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS) utilizando metanol al 0.1% y ácido fórmico como solvente, con un flujo de 0.5 ml/min en una columna ACQUITY UPLCr BEH C18 50 mm (diámetro interno de 2.1 mm y tamaño de partícula de 1.7 µm) (Rangel-Huerta et al. 2015). Las concentraciones se expresaron en µg/l para CoQ₉ y en mg/l para el resto de los analitos.

2.4.10 Determinación de biomarcadores de inflamación

Se usaron kits de anticuerpos monoclonales humanos (Bio-Rad Laboratories S.A., Madrid, Spain) de acuerdo con las instrucciones del fabricante junto con un sistema Luminex® 200 con tecnología XMap (Luminex Corporation, Austin, TX, EE. UU.) para determinar las concentraciones

de interleuquinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8) (coeficiente de variación (CV): 10.93%), y TNF- α (CV: 10.71%) (Cat. YZ0-0008J28BE66). Los valores de IL-6 estaban por debajo del límite de detección, por lo que no pudieron ser analizadas en estas muestras.

2.5 Análisis estadístico

Los datos basales son presentados como los valores medios y el error estándar de la media a menos se indique otra cosa en cada caso. La normalidad de las variables se evaluó mediante gráficos Q-Q. El test de chi-cuadrado se utilizó para variables categóricas para determinar diferencias en situación basal. Se usó análisis de la varianza (ANOVA) de un factor o el test de Kruskal-Wallis para variables continuas dependiendo si éstas eran normales o no, para evaluar diferencias a tiempo basal para evaluar la ingesta de nutrientes y también para los experimentos *ex vivo* de cultivos de sangre completa.

Los datos pre y post-intervención se presentan como valores medios ajustados junto con el error estándar de la media y se analizaron usando un modelo lineal de efectos mixtos. La normalidad de los residuos se evaluó usando gráficos Q-Q. Las variables con una distribución asimétrica se transformaron en logaritmos para su análisis (variables nutricionales, resistina, 15-F2t-isoprostano, 8-OHdG, CoQ₉, CoQ₁₀, carotenos, ácido linolénico y EPA). Se utilizó un modelo lineal mixto para comparar las variables antes y después de cada intervención (pre-tratamiento vs post-intervención, efecto intra-tratamiento) y para comparar los resultados entre los grupos después de la intervención de 3 semanas (efecto inter-tratamientos), utilizando el test de Sidak para realizar las comparaciones múltiples, ajustando por edad, género, pre-intervención y período como efectos fijos, y teniendo en cuenta a las variables sujetos y hospital como efectos aleatorios. El mismo modelo se utilizó para comparar diferencias o cambios entre las variables (post-intervención menos pre-intervención) sin ajustar en este caso por pre-intervención. El efecto de arrastre o “carryover” fue evaluado como la interacción entre periodo e intervención (Senn 2002).

Este modelo estadístico (LMM) tiene en cuenta todos los posibles factores de confusión (covariables), además de los datos basales que actúan como un control para evitar un posible efecto de arrastre (Liu et al. 2009). Dentro de los LMM, el factor de tratamiento, el tiempo y el efecto aleatorio considerado por el participante se tienen en cuenta en la estructura de los datos.

También se realizaron interacciones entre factores para detectar diferencias por género y se correlacionaron variables mediante el test de Pearson o Spearman para variables normales o no normales, respectivamente. La bondad de ajuste del modelo se probó usando gráficos residuales. El Criterio de Información Bayesiano se utilizó para evaluar la reducción del modelo y la selección de variables e interacciones. Todos los análisis se realizaron con intención de tratar. Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. Para el análisis estadístico se utilizó el software Statistical Package for the Social Sciences versión 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Capítulo 3 – Resultados

3.1 Estudio de consumo sostenido

3.1.1 Resultados basales

La **tabla 3.1.** muestra las ingestas diarias medias de energía y de nutrientes seleccionados de los sujetos agrupados de acuerdo con la secuencia de administración de aceite de oliva al inicio del estudio (tiempo basal). No se observaron diferencias entre los tres grupos de intervención al inicio del estudio.

Tabla 3.1. Energía e ingesta de nutrientes diaria a tiempo basal de los sujetos agrupados según la secuencia de administración de aceite en adultos sanos.

Ingestas nutricionales	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Energía, kcal	1976 ± 90	2151 ± 138	2074 ± 109
Carbohidratos totales, g	200 ± 10	213 ± 16	214 ± 13
Proteínas totales, g	80 [16-222]	96 [37-258]	93 [21-215]
Grasa total, g	86 ± 4	102 ± 10	89 ± 6
AGMI, g	31 [12-80]	33 [6-85]	33[6-89]
AGPI, g	13 [3-43]	11 [1-44]	14 [2-49]
AGS, g	21 [6-64]	27 [11-80]	26 [4-66]
Vitamina A, µg equivalentes de retinol	440 [111-1552]	512 [109-1581]	539 [7-1669]
Vitamina C, mg ácido ascórbico	70 [4-400]	88 [11-428]	81 [3-335]
Vitamina D, µg	2 [0-41]	2 [0-40]	2 [0-34]
Vitamina E, mg equivalentes de α-tocoferol	9 [2-29]	9 [1-67]	11 [1-39]
Colesterol, mg	284 ± 26	354 ± 31	287 ± 24
Alcohol, g	0 [0-52]	0 [0-48]	0 [0-84]
Selenio, µg	31 [5-130]	34 [1-114]	36 [3-117]

Los valores se expresan como media ± SEM o como la mediana [rango]. El test ANOVA se utilizó para comparar resultados entre grupos para variables normales, y el test de Kruskal Wallis para variables no normales. $p < 0.05$ se consideró significativo. Datos de 51 sujetos obtenidos de recordatorios dietéticos de 3 días, a tiempo basal. La secuencia de administración de los aceites fue: Grupo 1: AOVO, AOV y AF, $n=18$; Grupo 2: AOV, AF y AOVO, $n=14$; Grupo 3: AF, AOVO y AOV, $n=19$. AF, aceite funcional; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; SEM, error estándar de la media.

La **tabla 3.2.** muestra las características clínicas de los voluntarios y los biomarcadores de síndrome metabólico, función endotelial e inflamación, al inicio del estudio. No se observaron diferencias entre los tres grupos de intervención a tiempo basal para ninguna de las variables a excepción de IL-8 entre el grupo 1 vs 2 y 3 ($p=0.005$, $p=0.028$, respectivamente). Todos estos biomarcadores se encontraban dentro de los valores normales de referencia para la población sana.

Tabla 3.2. Características clínicas y biomarcadores de síndrome metabólico, función endotelial e inflamación al inicio del estudio de los sujetos agrupados según la secuencia de administración de aceite de oliva en adultos sanos.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Edad, años	32 ± 2	29 ± 2	28 ± 2
Género, hombres/mujeres n (%)	12/8 (60/40)	10/9 (53/47)	8/11 (42/58)
IMC, kg/m ²	24 ± 1	24 ± 1	24 ± 1
Circunferencia cintura, cm	80 ± 2	78 ± 3	77 ± 2
HDL-colesterol, mg/dl	58 ± 2	58 ± 3	59 ± 2
LDL-colesterol, mg/dl	117 ± 9	107 ± 7	102 ± 5
Colesterol total, mg/dl	192 ± 10	180 ± 7	175 ± 7
Triacilglicéridos, mg/dl	87 ± 7	81 ± 13	67 ± 5
Glucosa, mg/dl	90 ± 2	92 ± 2	87 ± 2
Adiponectina, mg/l	11.4 ± 1.38	12.49 ± 1.69	17.2 ± 2.78
Resistina, µg/l	16.38 ± 1.88	16.57 ± 1.82	15.26 ± 1.69
PAS, mm Hg	121 ± 2	120 ± 3	118 ± 3
PAD, mmHg	77 ± 2	74 ± 2	71 ± 2
Presión de pulso, mmHg	44 ± 2	46 ± 3	47 ± 2
Endotelina-1, pg/mL	1.35 ± 0.08	1.36 ± 0.1	1.38 ± 0.12
sICAM, ng/mL	74.48 ± 4.5	62.26 ± 3.16	66.1 ± 4.63
sVCAM, ng/mL	459 ± 21	459 ± 30	443 ± 25
IL-8, pg/mL	2.14 ± 0.21 ^b	1.32 ± 0.12 ^a	1.48 ± 0.18 ^a
TNF-α, pg/mL	2.14 ± 0.23	1.87 ± 0.18	1.95 ± 0.20

Los valores están expresados como media ± SEM. Los test ANOVA y χ^2 se utilizaron para comparar resultados entre grupos. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos (^{a,b}). $p < 0.05$ se consideró significativo. La secuencia de administración de los aceites fue: Grupo 1: AOVO, AOV y AF, n=20; Grupo 2: AOV, AF y AOVO, n=19; Grupo 3: AF, AOVO y AOV, n=19. AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; HDL, lipoproteínas de alta densidad; IL-8, interleuquina-8; IMC, índice de masa corporal; LDL, lipoproteínas de baja densidad; PAD, presión arterial diastólica; PAS, presión arterial sistólica; SEM, error estándar de la media; sICAM-1, moléculas solubles de adhesión intercelular; sVCAM-1, molécula soluble de adhesión vascular 1; TNF-α, factor de necrosis tumoral-α.

La **tabla 3.3.** muestra el perfil de ácidos grasos en plasma, los marcadores de estrés oxidativo en orina y vitaminas antioxidantes en plasma de los sujetos al inicio del estudio. El perfil de ácidos grasos en plasma fue similar para todos los sujetos incluidos en el estudio al inicio del periodo de intervención. Se observaron diferencias en las concentraciones urinarias de 15-F2t-isoprostano entre el grupo 2 y 3 ($p=0.025$). También se observaron diferencias entre el grupo 1 y 2 en las concentraciones plasmáticas de coenzima Q-9 (CoQ₉) y Q-10 (CoQ₁₀) ($p=0.002$ y $p=0.015$, respectivamente), y de carotenos entre el grupo 1 y 3 ($p=0.005$) y entre el 2 y 3 ($p=0.022$).

Tabla 3.3. Perfil de ácidos grasos y concentración de vitaminas antioxidantes en plasma, y concentraciones urinarias de biomarcadores de estrés oxidativo, al inicio del estudio, de los sujetos agrupados según la secuencia de administración de aceite de oliva en adultos sanos.

Ácidos grasos (%)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Ácido palmítico, C16:0	21.01 ± 0.54	21.34 ± 0.67	21.5 ± 0.57
Ácido esteárico, C18:0	6.16 ± 0.19	5.67 ± 0.14	5.76 ± 0.16
Ácido oleico, C18:1	20.43 ± 1.08	18.97 ± 1.03	18.2 ± 0.72
Ácido linoleico, C18:2	40.42 ± 1.15	40.95 ± 1.41	41.38 ± 1.04
Ácido linolénico, C18:3	1.43 ± 0.34	2.47 ± 0.37	2.15 ± 0.3
Ácido araquidónico, C20:4	6.08 ± 0.31	5.68 ± 0.31	5.6 ± 0.25
Ácido eicosapentaenoico, C20:5	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.02
Ácido docosahexaenoico, C22:6	0.86 ± 0.06	0.8 ± 0.07	0.87 ± 0.07
Biomarcadores de estrés oxidativo en orina			
8-OHdG, ng/mg creatinina	7.39 ± 0.42	7.57 ± 0.68	8.67 ± 0.66
15-F2t-isoprostano, ng/mg creatinina	2.71 ± 0.28 ^{ab}	2.35 ± 0.27 ^a	3.52 ± 0.35 ^b
Vitaminas antioxidantes en plasma			
Retinol, mg/L	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Tocoferoles, mg/L	5.83 ± 0.27	5.19 ± 0.22	5.34 ± 0.19
CoQ ₉ , µg/L	96 ± 7 ^a	62 ± 5 ^b	81 ± 7 ^{ab}
CoQ ₁₀ , mg/L	1.87 ± 0.11 ^a	1.4 ± 0.12 ^b	1.62 ± 0.1 ^{ab}
Carotenos, mg/L	0.25 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.03 ^a	0.11 ± 0.03 ^b

Los valores están expresados como media ± SEM. El test ANOVA se utilizó para comparar resultados entre grupos. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos (a,b). $p<0.05$ se consideró significativo. La secuencia de administración de los aceites fue: Grupo 1: AOVO, AOV y AF, $n=20$; Grupo 2: AOV, AF y AOVO, $n=19$; Grupo 3: AF, AOVO y AOV, $n=19$. 8-OHdG, 8-hidroxi-2' deoxiguanosina; AA, ácido araquidónico; AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; CoQ₉, coenzima Q₉; CoQ₁₀, coenzima Q₁₀; SEM, error estándar de la media.

3.1.2 Resultados tras la intervención

Los resultados de los tres grupos de voluntarios se han agrupado según el aceite de oliva ingerido, independientemente del orden en que haya sido tomado. Dicho orden de administración se ha incluido en el modelo estadístico como una variable independiente.

3.1.2.1 Análisis nutricional

La **tabla 3.4.** muestra las ingestas diarias medias de energía y de nutrientes seleccionados tras las tres intervenciones, obtenidos a partir de los datos de los recordatorios dietéticos de 3 días tras cada periodo de intervención. No se observaron diferencias de consumo de nutrientes durante el estudio de intervención con los tres aceites experimentales.

Tabla 3.4. Ingesta diaria de energía y nutrientes seleccionados tras las tres intervenciones con los tres aceites experimentales en adultos sanos.

Ingestas nutricionales	AOV	AOVO	AF
Energía, kcal	1983 [873-4342]	2006 [697-4561]	1914 [780-3457]
Carbohidratos totales, g	199 [47-408]	203 [30-531]	175 [38-533]
Proteínas totales, g	77 [24-180]	80 [17-200]	73 [25-207]
Grasa total, g	89 [27-244]	94 [24-257]	91 [20-227]
AGMI, g	44 [8-119]	44 [8-113]	45 [9-123]
AGPI, g	11 [4-37]	12 [4-36]	13 [3-41]
AGS, g	25 [7-74]	27 [6-82]	24 [5-69]
Vitamina A, µg equivalentes de retinol	433 [34-1477]	427 [26-1504]	452 [39-1515]
Vitamina C, mg ácido ascórbico	48 [0-280]	60 [0-255]	55 [1-305]
Vitamina D, µg	1.5 [0-32]	1.2 [0-82]	1.2 [0-81]
Vitamina E, mg equivalentes de α-tocoferol	10 [2-30]	11 [3-32]	11 [2-32]
Colesterol, mg	285 [11-981]	253 [28-853]	272 [15-1011]
Alcohol, g etanol	0 [0-97]	0 [0-54]	0 [0-78]
Selenio, µg	30 [0-260]	31 [0-198]	31 [1-160]

Los valores están expresados como la mediana [rango]. El test ANOVA se utilizó para comparar resultados entre grupos de intervención. $p < 0.05$ se consideró significativo. Datos de 51 sujetos obtenidos de recordatorios dietéticos tras las tres intervenciones. AF, aceite funcional; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado.

3.1.2.2 Biomarcadores de síndrome metabólico y función endotelial en plasma

La **tabla 3.5.** muestra las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores de síndrome metabólico y función endotelial antes y después de las tres intervenciones. Todos los marcadores clínicos y bioquímicos presentaron valores normales durante todo el periodo de intervención del estudio. El IMC, circunferencia de cintura, presión de pulso, concentraciones de glucosa, adiponectina y resistina no se modificaron durante todo el estudio.

Las concentraciones plasmáticas de colesterol total aumentaron tras la intervención con el AF (efecto intra-tratamiento, $p=0.021$), mientras que las concentraciones plasmáticas de HDL colesterol aumentaron sólo tras la ingesta del AOVO ($p=0.041$) y sólo en mujeres ($p=0.005$), y sin diferencias entre las tres intervenciones. Las concentraciones de LDL colesterol no se vieron afectadas. Las concentraciones de triacilglicéridos en plasma aumentaron tras la intervención con AOV y con AOVO ($p=0.037$ y $p=0.002$, respectivamente) pero no tras la intervención con el AF. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de los triacilglicéridos en plasma fueron bajas al principio del estudio (78.5 mg/dl).

Por otro lado, la PAS disminuyó tras la intervención con el AOV ($p=0.019$) e incrementó tras la intervención con el AF ($p=0.004$), mientras que la PAD y la presión de pulso se mantuvo sin cambios tras las tres intervenciones. Las concentraciones de endotelina-1 en plasma disminuyeron tras las tres intervenciones con AOV, AOVO y AF ($p=0.006$, $p=0.006$ and $p=0.014$, respectivamente), mientras que las concentraciones plasmáticas de sICAM-1 y sVCAM-1 se mantuvieron sin cambios durante todo el estudio.

Cuando analizamos el efecto inter-tratamiento, las concentraciones de LDL colesterol fueron mayores tras la intervención con AF comparadas con el AOVO ($p=0.033$) y la PAS fue mayor tras la intervención con AF comparada con el AOV ($p=0.001$).

Los cambios observados en variables metabólicas clínicas y en biomarcadores de función endotelial fueron similares en todos los sujetos tras las tres intervenciones a excepción de la PAS, la cual aumentó hasta de 118 mm Hg tras el consumo de AF pero disminuyó tras las intervenciones con el AOV y AOVO (hasta 115 y 116 mm Hg, respectivamente) ($p<0.001$). Los resultados muestran diferencias por género para todas las intervenciones. Sin embargo, no se observaron interacciones entre intervención y sexo.

Tabla 3.5. Biomarcadores de síndrome metabólico y función endotelial antes y después de cada intervención con los tres aceites de oliva en adultos sanos.

	AOV		AOVO		AF	
	Pre-intervención	Post-intervención	Pre-intervención	Post-intervención	Pre-intervención	Post-intervención
IMC, kg/m ²	23.9 ± 0.1	24 ± 0.1	23.9 ± 0.1	24 ± 0.1	24 ± 0.1	24 ± 0.1
Circunferencia de cintura, cm	77.4 ± 0.7	77.2 ± 0.7	77.2 ± 0.7	76.8 ± 0.7	77.4 ± 0.7	76.9 ± 0.7
HDL colesterol, mg/dl	58 ± 2	59 ± 2	57 ± 2	60 ± 2*	58 ± 2	60 ± 2
LDL colesterol, mg/dl	105 ± 4	108 ± 4 ^{ab}	104 ± 4	106 ± 4 ^a	104 ± 4	111 ± 4 ^b
Colesterol total, mg/dl	179 ± 5	182 ± 5	177 ± 5	183 ± 5	178 ± 5	186 ± 5*
Triacilglicéridos, mg/dl	72 ± 7	75 ± 7*	74 ± 7	81 ± 7*	75 ± 7	75 ± 7
Glucosa, mg/dl	91 ± 2	91 ± 2	91 ± 2	91 ± 2	90 ± 2	91 ± 2
Adiponectina, mg/l	13.74 ± 1.7	12.8 ± 1.7	12.48 ± 1.7	13.6 ± 1.71	12.62 ± 1.7	13.74 ± 1.71
Resistina, µg/l	14.1 ± 1.1	14.1 ± 1.1	14.5 ± 1.1	13.8 ± 1.1	13.8 ± 1.1	14.1 ± 1.1
PAS, mm Hg	117 ± 3	115 ± 3 ^a	119 ± 3	116 ± 3 ^{ab}	114 ± 3	118 ± 3 ^b
PAD, mm Hg	72 ± 2	72 ± 2	75 ± 2	73 ± 2	72 ± 2	74 ± 2
Presión de pulso, mm Hg	45 ± 1	43 ± 1	44 ± 1	42 ± 1	42 ± 1	45 ± 1
Endotelina-1, pg/ml	1.53 ± 0.2	1.38 ± 0.15*	1.58 ± 0.2	1.41 ± 0.15*	1.49 ± 0.2	1.35 ± 0.15*
sICAM-1, ng/ml	68.09 ± 3.2	67.11 ± 3.19	65.17 ± 3.2	67.73 ± 3.19	65.1 ± 3.2	66.7 ± 3.21
sVCAM-1, ng/ml	451 ± 22	443 ± 23	435 ± 22	451 ± 22	431 ± 22	442 ± 23

Los valores están expresados como medias ajustadas ± SEMs. Se utilizó un modelo lineal mixto para comparar pre-intervención vs post-intervención con cada aceite, y datos tras las tres intervenciones (post-intervenciones). (*) muestra diferencias significativas entre pre-intervención vs post-intervención tras la ingesta de los tres aceites de oliva (efecto intra-tratamiento). Letras diferentes indican diferencias significativas entre resultados post-intervención (^{a,b}) (efecto inter-tratamiento). p<0.05 se consideró significativo. AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; PAD, presión arterial diastólica; PAS, presión arterial sistólica; SEM, error estándar de la media; sICAM-1, moléculas solubles de adhesión celular de tipo 1; sVCAM-1, moléculas solubles de adhesión vascular de tipo 1.

3.1.2.3 Concentraciones de endotelina-1 en los experimentos *ex vivo*

La **figura 3.1.** muestra que los cambios en la concentración de endotelina-1 (post- menos pre-intervención) en cultivos de sangre completa de sujetos incubados con PHA, LPS y PMA+IO fueron similares tras las intervenciones con AOV y con AOVO y fueron significativamente más bajos tras la intervención con AF: -26.7 ± 15.3 pg/ml, -41.0 ± 12.9 pg/ml, and -119.5 ± 28.5 pg/ml para el AOV, AOVO y AF, respectivamente ($p=0.035$), cuando estimulamos con PHA; -30.3 ± 6.5 pg/ml, -58.2 ± 10.1 pg/ml y -109.6 ± 9.7 pg/ml para la intervención con AOV, AOVO y AF, respectivamente, cuando estimulamos con LPS ($p=0.002$); y -38.9 ± 3.4 pg/ml, -50.8 ± 8.5 pg/ml and -87.0 ± 11.1 pg/ml para la intervención con AOV, AOVO y AF, respectivamente, cuando estimulamos con PMA+IO ($p=0.015$).

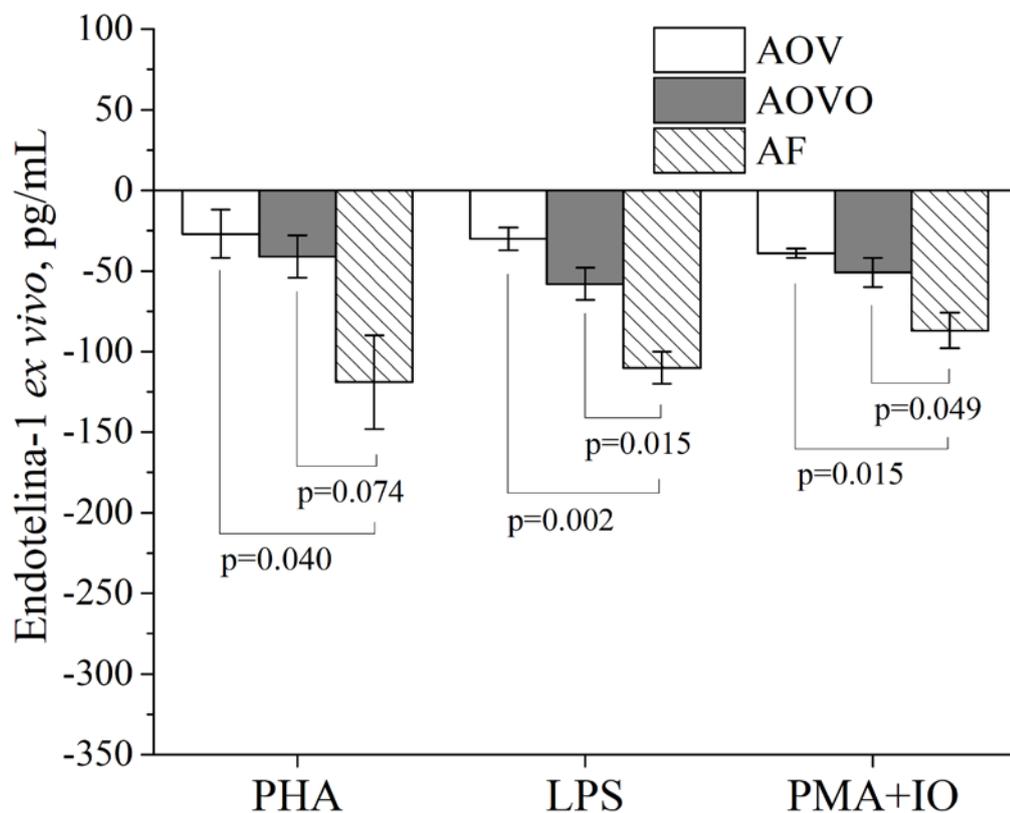


Figura 3.1. Cambios en las concentraciones de endotelina-1 secretadas *ex vivo* (post-intervención menos pre-intervención) en cultivos de sangre completa de adultos sanos estimulados con PHA, LPS o PMA+IO. Los valores se expresan como la media \pm SEM. El test ANOVA se utilizó para comparar diferencias entre intervenciones e inducciones. El test Tukey se usó para comparaciones múltiples entre grupos. $p < 0.05$ se consideró significativo. AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; IO, ionomicina; LPS, lipopolisacárido; PHA, fitohemaglutinina; PMA, forbol 12-miristato 13-acetato.

La **figura 3.2.** muestra las concentraciones de endotelina-1 en los sobrenadantes de los cultivos celulares de sangre completa de los sujetos antes y después de las tres intervenciones que fueron inducidos *ex vivo* con PHA, LPS y PMA+IO. La secreción de endotelina-1 en los hemocultivos de sangre inducidos con LPS y PMA+IO fue menor tras las intervenciones con los tres aceites, comparada con la secreción antes de dichas intervenciones, mientras que la

disminución de la secreción de endotelina-1 inducida con PMA sólo fue significativamente menor en los sujetos que habían recibido el AOVO y el AF.

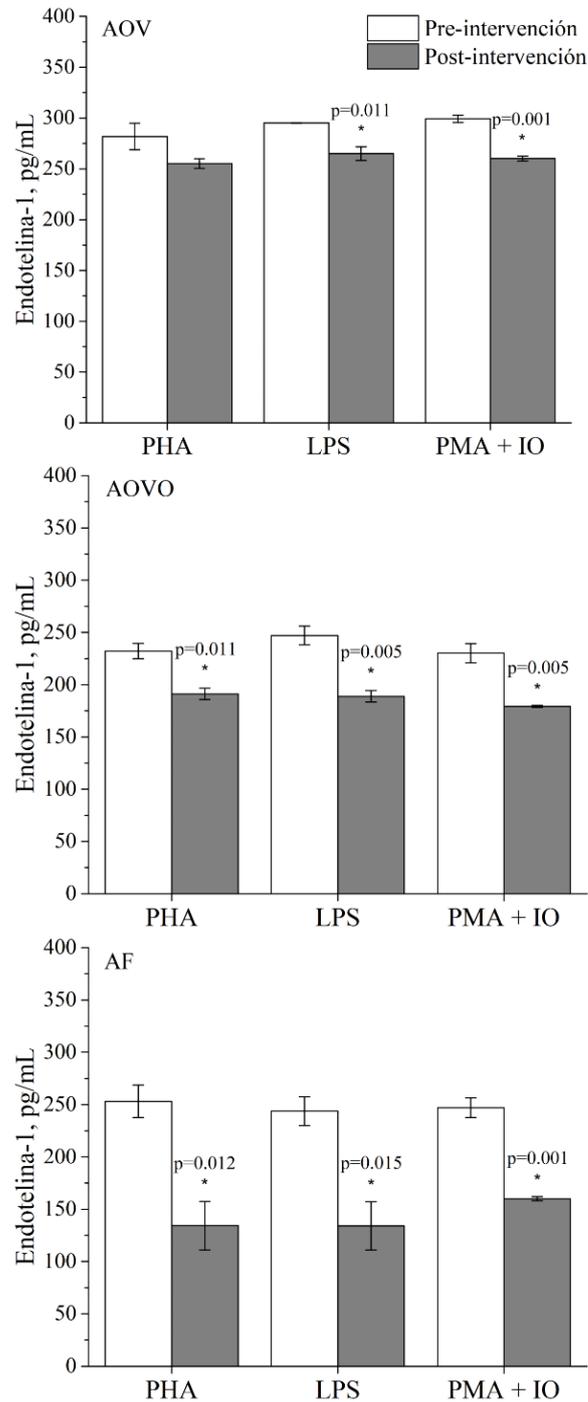


Figura 3.2. Secreción de endotelina-1 plasmática en el estudio ex vivo realizado sobre cultivos celulares de sangre completa de adultos sanos antes y después de las tres semanas de intervención con los tres aceites de oliva y con los tres tipos de estimulación (PHA, LPS o PMA+IO). Los valores se expresan como la media \pm SEM. El test ANOVA se utilizó para comparar pre- vs post intervenciones para cada aceite. (*) muestra diferencias significativas antes y después de cada intervención. $p < 0.05$ se consideró significativo. AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; IO, ionomicina; LPS, lipopolisacárido; PHA, fitohemaglutinina; PMA, forbol 12-miristato 13-acetato.

3.1.2.4 Biomarcadores de inflamación en plasma de sujetos sanos

La **tabla 3.6.** muestra los las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores de inflamación seleccionados (IL-8 y TNF- α) antes y después de las tres intervenciones, separados en hombres y en mujeres. Cuando comparamos pre- vs post-intervención (efecto intra-tratamiento), las concentraciones de IL-8 incrementaron solo en mujeres tras la intervención con el AOVO ($p=0.025$). Cuando analizamos los efectos inter-tratamiento, las concentraciones de IL-8 fueron más bajas tras la intervención con el AF que con el AOV ($p=0.002$) y AOVO ($p=0.011$). Las concentraciones de TNF- α plasmático fueron más bajas tras la intervención con el AF que tras la intervención con el AOVO ($p=0.020$). En hombres, las concentraciones de IL-8 fueron solamente más bajas tras la intervención con el AF que tras el AOV ($p=0.022$). Sin embargo, en mujeres, las concentraciones de IL-8 fueron más bajas tras la intervención con el AF que tras el AOV y AOVO ($p=0.055$ y $p=0.017$, respectivamente) y el TNF- α fue más bajo tras la intervención con el AF que con el AOVO ($p=0.037$).

3.1.2.5 Perfil plasmático de ácidos grasos

La **tabla 3.7.** muestra el perfil de los porcentajes de los principales ácidos grasos antes y después de las tres intervenciones. Se han encontrado diferencias en los resultados de pre-intervención para los porcentajes de ácido araquidónico (C 20:4 n-6) plasmático entre el AOV con respecto al AOVO y al AF ($p=0.032$ y $p=0.015$, respectivamente) y de ácido palmítico (C 16:0) plasmático entre el AOV y el AF ($p=0.046$).

El porcentaje de ácido oleico (C18:1 n-9) se incrementó tras las tres semanas de intervención con los tres aceites de oliva (todos ellos $p<0.001$), mientras que el ácido linoleico (C18:2 n-6) disminuyó significativamente tras las tres semanas de intervención con el AOV y con el AOVO (todos $p<0.001$), pero no significativamente tras el consumo del AF ($p=0.054$). Los porcentajes de ácido esteárico (C18:0), araquidónico (C20:4 n-6), palmítico (C16:0), linolénico (C18:3 n-3), eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3) no cambiaron tras las tres intervenciones.

Por otra parte, el porcentaje de ácido oleico en plasma tendió a ser mayor tras la intervención con el AOV comparada con el AF ($p=0.050$), mientras que el porcentaje de ácido linoleico tendió a ser mayor tras la intervención con el AF en comparación con el AOVO y AOV ($p=0.062$ and $p=0.057$, respectivamente).

Tabla 3.6. Concentraciones plasmáticas de IL-8 y TNF- α como biomarcadores de inflamación antes y después de cada intervención en adultos sanos, hombres y mujeres.

	AOV		AOVO		AF	
	Pre-intervención	Post-intervención	Pre-intervención	Post-intervención	Pre-intervención	Post-intervención
IL-8, pg/mL	1.72 \pm 0.2	1.78 \pm 0.2 ^a	1.53 \pm 0.2	1.74 \pm 0.2 ^a	1.57 \pm 0.2	1.45 \pm 0.2 ^b
Hombres	1.91 \pm 0.24	1.85 \pm 0.24 ^a	1.53 \pm 0.24	1.71 \pm 0.25 ^{ab}	1.69 \pm 0.24	1.43 \pm 0.25 ^b
Mujeres	1.52 \pm 0.19	1.71 \pm 0.19 ^a	1.51 \pm 0.19	1.76 \pm 0.19 ^{*a}	1.43 \pm 0.19	1.46 \pm 0.19 ^b
TNF- α , pg/mL	1.97 \pm 0.24	1.96 \pm 0.24 ^{ab}	1.91 \pm 0.24	2.11 \pm 0.24 ^a	1.91 \pm 0.24	1.85 \pm 0.24 ^b
Hombres	1.91 \pm 0.26	1.86 \pm 0.26	1.72 \pm 0.26	2.03 \pm 0.26	1.9 \pm 0.26	1.82 \pm 0.26
Mujeres	2.04 \pm 0.27	2.08 \pm 0.27 ^{ab}	2.12 \pm 0.27	2.2 \pm 0.27 ^a	1.91 \pm 0.26	1.88 \pm 0.27 ^b

Los valores están expresados como medias ajustadas \pm SEMs. Se utilizó un modelo lineal mixto para comparar pre-intervención vs post-intervención con cada aceite, y datos tras las tres intervenciones (post-intervenciones). (*) muestra diferencias significativas entre pre-intervención vs post-intervención tras la ingesta de los tres aceites de oliva (efecto intra-tratamiento). Letras diferentes indican diferencias significativas entre resultados post-intervención (^{a,b}) (efecto inter-tratamiento). $p < 0.05$ se consideró significativo. AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; IL-8, interleuquina-8; SEM, error estándar de la media; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α .

Tabla 3.7. Perfil plasmático de ácidos grasos durante la intervención.

Ácidos grasos (%)	AOV		AOVO		AF	
	Pre-intervención	Post-intervención	Pre-intervención	Post-intervención	Pre-intervención	Post-intervención
Ácido palmítico, C16:0	20.5 ± 1.1	20.3 ± 1.1	20.9 ± 1.1	20.8 ± 1.1	21.7 ± 1.1	20.7 ± 1.1
Ácido esteárico, C18:0	5.3 ± 0.4	5.2 ± 0.4	5.3 ± 0.4	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.4	5.1 ± 0.4
Ácido oleico, C18:1	16 ± 1.5	22 ± 1.5*	16.8 ± 1.5	21.6 ± 1.5*	16.5 ± 1.5	20.3 ± 1.5*
Ácido linoleico, C18:2	47.4 ± 2.5	41.2 ± 2.6*	46.9 ± 2.5	41.5 ± 2.6*	46 ± 2.5	43.6 ± 2.6
Ácido linolénico, C18:3	0.18 [0.04-0.58]	0.20 [0.07-0.53]	0.17 [0.01-0.79]	0.14 [0.05-0.46]	0.19 [0.08-0.37]	0.24 [0.12-0.56]
AA, C20:4	6.1 ± 0.4	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.4	5.6 ± 0.4	5.6 ± 0.4	5.7 ± 0.4
EPA, C20:5	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.03
DHA, C22:6	0.83 ± 0.09	0.87 ± 0.09	0.83 ± 0.09	0.83 ± 0.01	0.87 ± 0.09	0.88 ± 0.01

Los valores están expresados como medias ajustadas ± SEMs o como medianas ajustadas [rango] para variables no normales. Se utilizó un modelo lineal mixto para comparar pre-intervención vs post-intervención con cada aceite, y datos tras las tres intervenciones (post-intervenciones). (*) muestra diferencias significativas entre pre-intervención vs post-intervención tras la ingesta de los tres aceites de oliva (efecto intra-tratamiento). p<0.05 se consideró significativo. AA, ácido araquidónico; AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; DHA, ácido docosahexaenoico; EPA, ácido eicosapentaenoico.

3.1.2.6 Concentraciones urinarias de biomarcadores de estrés oxidativo

La **Tabla 3.8.** muestra las concentraciones en orina de los biomarcadores de estrés oxidativo antes y después de las tres intervenciones. Cuando comparamos resultados pre- vs post-intervención (efecto intra-tratamiento), observamos que las concentraciones de 8-OHdG disminuyeron tras las tres semanas de intervención con el AOV y el AF, pero no lo hizo significativamente. Al analizar los efectos inter-tratamiento, las concentraciones en orina de 8-OHdG tendieron a ser más bajas tras la intervención con el AF que con el AOV ($p=0.068$). Además, las concentraciones de 8-OHdG en orina fueron más bajas en hombres que en mujeres para todas las intervenciones ($p<0.001$). Sin embargo, no se observaron interacciones entre el género y la intervención. Los cambios observados en 8-OHdG mostraron una mayor disminución tras la intervención con el AF que tras el AOVO ($p=0.033$, **Figura 3.3.**).

Las concentraciones de 15-F2t-isoprostano en orina se mantuvieron sin cambios tras las intervenciones con el AOV, AOVO y AF ($p=0.053$, $p=0.070$ y $p=0.179$, respectivamente). Se ha observado una correlación negativa entre los porcentajes de ácido oleico en plasma y las concentraciones 15-F2t-isoprostano en orina ($r=-0.132$; $p=0.015$).

3.1.2.7 Vitaminas antioxidantes

La **tabla 3.8.** muestra las concentraciones plasmáticas de algunos compuestos antioxidantes en plasma. Se encontraron diferencias pre-intervención para carotenos en plasma tras la intervención con AOV con respecto al AOVO y AF ($p=0.037$ y $p=0.019$, respectivamente). Las concentraciones de retinol, tocoferoles y CoQ₉ y CoQ₁₀ en plasma no cambiaron tras las tres intervenciones. Cuando analizamos el efecto inter-tratamiento, no se observaron diferencias para ningún biomarcador con la excepción de los tocoferoles, los cuales mostraron valores más altos tras la intervención con el AOVO que con el AOV ($p=0.007$). Al separar por sexo, se observó que los hombres presentaban valores más altos de retinol que las mujeres para todas las intervenciones ($p=0.014$), además de una interacción significativa entre el género y la intervención para las concentraciones plasmáticas de retinol ($p=0.021$), que son más altos en hombres tras la ingesta de AF en relación a las mujeres.

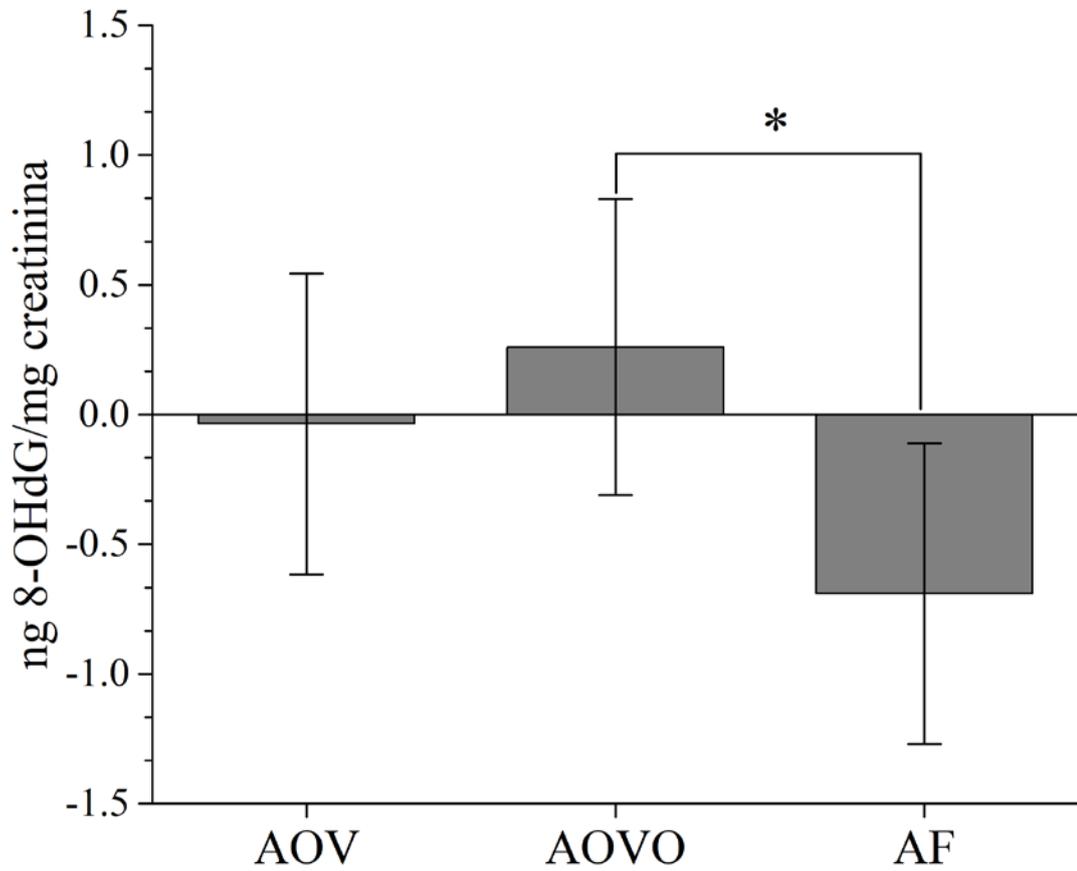


Figura 3.3. Diferencias post- menos pre-intervención de las concentraciones de 8-OHdG en orina tras las tres intervenciones. (*) Indica diferencias significativas, $p < 0.05$ se consideró significativo. AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado.

Tabla 3.8. Biomarcadores de estrés oxidativo en orina y vitaminas antioxidantes en plasma.

	AOV		AOVO		AF	
	Pre-intervención	Post-intervención	Pre-intervención	Post-intervención	Pre-intervención	Post-intervención
8-OHdG, ng/mg creatinina	7.8 [5.5-12.0]	7.3 [5.1-11.3]	7.0 [4.3-10.4]	7.3 [5.0-11.0]	7.2 [4.8-11.1]	6.7 [4.2-10.3]
15-F2t-isoprostano, ng/mg creatinina	2.3 [1.3-3.7]	2.4 [1.1-4.3]	2.4 [1.2-3.9]	2.4 [0.9-4.3]	2.5 [1.2-3.9]	2.5 [1.0-4.4]
	Vitaminas antioxidantes en plasma					
Retinol, mg/L	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Tocoferoles, mg/L	5.5 ± 0.2	5.3 ± 0.2	5.5 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.5 ± 0.2	5.5 ± 0.2
CoQ ₉ , µg/L	78 [43-141]	74 [34-124]	93 [37-139]	79 [36-129]	85 [41-142]	76 [35-125]
CoQ ₁₀ , mg/L	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Carotenos, mg/L	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01

Los valores se expresan como medias ajustadas ± SEMs o como medianas ajustadas [rango] para variables no normales. Se utilizó un modelo lineal mixto para comparar pre-intervención vs post-intervención con cada aceite, y datos tras las tres intervenciones (post-intervenciones). p<0.05 se consideró significativo. 8-OHdG, 8-hidroxy-2'-deoxyguanosina; AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado; CoQ₉, coenzima Q₉; CoQ₁₀, coenzima Q₁₀.

3.1.2.8 Biomarcadores de cumplimiento de intervención

Las recuperaciones de triterpenos en la orina reflejaron el contenido en dichos compuestos de los aceites de oliva consumidos en cada intervención. La **Figura 3.4.** muestra los cambios en los triterpenos urinarios (post-intervención menos pre-intervención) para cada aceite de oliva. Las cantidades de ambos ácidos triterpénicos encontradas en la orina después de la intervención con AF fueron aproximadamente cuatro veces más altas que las recuperadas después de las intervenciones con AOV y AOVO ($p=0.004$ y $p < 0.001$, respectivamente, para el ácido maslínico, y $p=0.026$ y $p < 0.001$, respectivamente, para el ácido oleanólico). Por otro lado, las concentraciones en orina de hidroxitirosol (la suma de hidroxitirosol y su glucurónido y conjugados de sulfato) fueron mayores después de las intervenciones con AOVO (2444 mM, $p=0.003$) y AF (2876 mM, $p=0.002$) que después de la intervención con AOV (115mM, $p=0.011$).

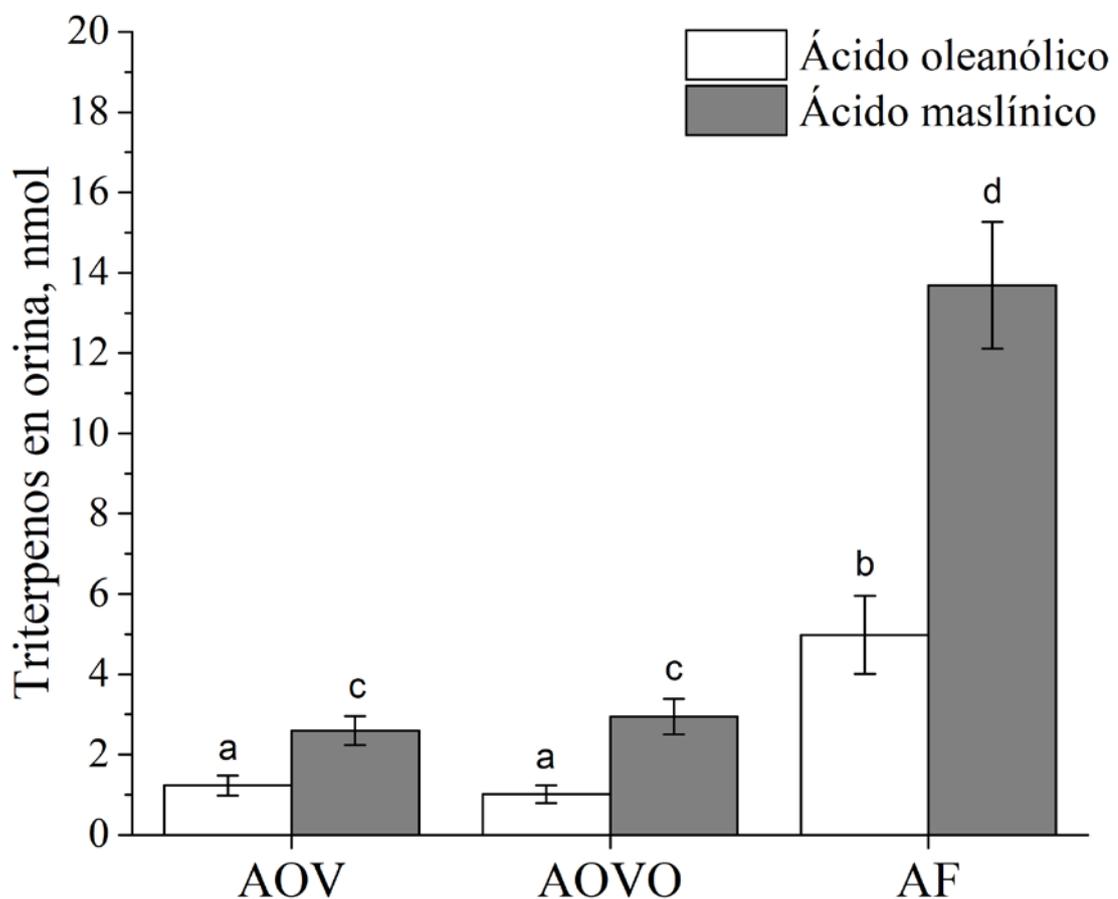


Figura 3.4. Diferencias post- menos pre-intervención de las concentraciones de ácidos triterpénicos en orina tras las tres intervenciones. Letras diferentes indican diferencias significativas (a,b) para ácido oleanólico y (c,d) para ácido maslínico. $p < 0.05$ se consideró significativo. AF, aceite funcional; AOV, aceite de oliva virgen; AOVO, aceite de oliva virgen optimizado.

Capítulo 4 - Discusión

El estudio NUTRAOLEUM es el primer ensayo clínico en humanos que estudia el efecto del AOV con alto contenido en compuestos fenólicos y enriquecido en triterpenos, ácido maslínico y oleanólico, provenientes del exocarpo del propio fruto de la oliva, sobre biomarcadores de síndrome metabólico y función endotelial en comparación con un AOV control con el mismo perfil lipídico y menor contenido en compuestos bioactivos, en adultos sanos. Este estudio ha sido diseñado para comprobar si el enriquecimiento con otros componentes bioactivos presentes en las aceitunas y que no son extraídos con el aceite, puede tener un efecto beneficioso adicional al que ya se ha descrito para los polifenoles que están presentes en el aceite (Sánchez-Rodríguez, Mesa 2018). Los beneficios descritos para los AOV ricos en compuestos fenólicos van desde la mejora del perfil lipídico (Covas et al. 2006b), la mejora del estado oxidativo (Aguilera et al. 2004), la modulación de los factores de riesgo inflamatorios (Covas et al. 2006a), el beneficio como protector de la funcionalidad vascular (Nocella et al. 2017), la modulación de la expresión de genes relacionados con el desarrollo de la aterosclerosis (Covas, De La Torre, Fitó 2015; López-Miranda et al. 2010) y la reducción postprandial del estrés producido en el retículo endoplásmico en personas obesas (Rangel-Zuñiga et al. 2014), entre otros. Hasta la fecha, algunos estudios de investigación han demostrado que el enriquecimiento del AOV en sus propios componentes bioactivos puede mejorar las propiedades beneficiosas de los aceites de partida (Farràs et al. 2015; Farràs et al. 2013; Fernández-Castillejo et al. 2016; Valls et al. 2015). La particularidad del presente estudio, es que el aceite optimizado que se ha evaluado no ha sido enriquecido mediante la adición de compuestos o extractos aislados, sino que se ha preparado mezclando aceites de distintas variedades con elevado contenido en compuestos fenólicos para conseguir una alta concentración, pero manteniendo las propiedades organolépticas de un excelente AOVE. Además, para la preparación del AF se ha utilizado el mismo AOVO al que se le han añadido los extractos de piel de aceituna micronizados ricos en compuestos triterpénicos. La preparación del aceite control también se realizó a partir del AOVO que se lavó con objeto de reducir en lo posible la cantidad de compuestos fenólicos. De esta manera se garantiza el mismo perfil lipídico en los aceites y que éstos sólo difieran en el contenido de compuestos bioactivos.

Basándose en la evidencia, en noviembre de 2004, la FDA aprobó una declaración de salud en la que recomendaba el consumo de 23 g/día de aceite de oliva como alimento rico en grasa monoinsaturada, ya que considera demostrada la mejora del perfil lipídico en plasma en múltiples ensayos clínicos (FDA, 2003). Por su parte, en 2011 la EFSA aprobó una alegación de salud que indicaba que el consumo de al menos 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados en 20 g de AOV protege de la oxidación de las LDL y mantiene las concentraciones plasmáticas de HDL colesterol (EFSA Journal, 2011). Por otro lado, estudios experimentales con los triterpenos del aceite de oliva han mostrado beneficios contra la ECV y sus complicaciones (Herrera, Rodríguez-Rodríguez, Ruiz-Gutierrez 2006; Lou-Bonafonte et al. 2012; Rodríguez-Rodríguez 2015; Sánchez-Quesada et al. 2013).

El presente proyecto incluía una fase experimental para evaluar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y de los triterpenos que eran ingeridos con los aceites. Se ha demostrado que el ácido oleanólico y maslínico son absorbidos, metabolizados en el hígado y eliminados por la orina, confirmando que los efectos observados en los voluntarios que tomaban el AF pueden ser atribuidos a la presencia de estos compuestos en el aceite (Pozo et al. 2017). También se realizó un estudio de biodisponibilidad en una submuestra de 18 voluntarios del presente estudio. Éstos tomaron los tres tipos de aceites y los resultados han sido evaluados y enviados para su publicación (de la Torre et al. 2018, datos no publicados). Por otro lado, el perfil de ácidos grasos tras las tres intervenciones confirma la adherencia de los participantes al estudio ya que refleja la composición lipídica de la dieta (Raatz et al. 2001), mostrando un aumento de ácido oleico en el plasma sanguíneo tras las tres intervenciones con los aceites de oliva, y un descenso en su concentración tras los periodos de lavado del estudio junto con el aumento del porcentaje de ácido linoleico procedente del aceite de girasol.

4.1 Efecto sobre el perfil lipídico

El estudio PREDIMED ha demostrado que la dieta mediterránea suplementada con al menos 50 g de AOV podía revertir el SM tras un seguimiento de 4.8 años (Estruch, Salas-Salvadó 2013), reduciendo el número de eventos cardiovasculares en un 30% comparado con un grupo control que tomaba una dieta baja en grasa (Babio et al. 2014). Además, esta dieta mediterránea enriquecida en AOV y sin restricciones de energía reducía el riesgo de diabetes entre individuos con alto riesgo de ECV (Salas-Salvadó et al. 2018; Salas-Salvadó et al. 2014). El consumo de AOV con 2.7, 164 o 366 ppm/día de compuestos fenólicos en humanos (Covas et al. 2006), una suplementación con hidroxitirosol del 0.03% de la dieta durante 8 semanas (Giordano, Dávalos, Visioli 2014), o 50 ppm/día durante 17 semanas (Cao et al. 2014) en dos modelos murinos, han mostrado capacidad para mejorar el perfil lipídico en sangre, aunque los resultados en ratones no fueron concluyentes, posiblemente debido a las diferencias en el contenido de polifenoles del aceite de oliva y también debido a la fisiopatología de los animales estudiados (Peyrol, Riva, Amiot 2017). Además del efecto beneficioso observado sobre las concentraciones plasmáticas de HDL colesterol de los AGMI del aceite de oliva, se ha descrito que los polifenoles del aceite también son capaces de mejorarlas, aunque los datos todavía son contradictorios. En 2015, un metanálisis concluyó que una ingesta de AOV con al menos 150 ppm de compuestos fenólicos no producía ningún efecto en las concentraciones plasmáticas de HDL colesterol (Hohmann et al. 2015), mientras que una revisión sistemática posterior mostró que las concentraciones plasmáticas de estas lipoproteínas aumentan tras la ingesta de 2.28 a 75 g/d de aceite de oliva (Rondanelli et al. 2016), tal y como ocurre en los voluntarios que han participado en nuestro estudio. Igualmente, el estudio EUROLIVE, un estudio multicéntrico Europeo que evaluó el efecto de 3 aceites de oliva que diferían en el contenido de compuestos fenólicos (bajo, medio y alto: 2.7, 164 y 366 ppm/d de contenido fenólico, respectivamente) describió un incremento del HDL colesterol y una disminución de la concentración de triacilglicéridos tras la intervención durante 3 semanas (Covas et al. 2006b); en este caso, el incremento de HDL colesterol fue proporcional al contenido en compuestos fenólicos. Este beneficio adicional ha sido también descrito en adultos sanos y en sujetos

hipercolesterolémicos sin tratamiento hipolipemiante, que tomaron AOV enriquecido en compuestos fenólicos (Farràs et al. 2015). Además, el incremento de compuestos fenólicos del aceite de oliva en esta fracción de lipoproteínas puede incrementar el tamaño de las HDL, la estabilidad y su capacidad antioxidante (Hernaiz et al. 2014). Otros estudios ha concluido que la ingesta diaria de aceite de oliva enriquecido con sus propios polifenoles (250 o 500 ppm) o enriquecido en polifenoles obtenidos del tomillo (250 ppm/día) disminuye las concentraciones plasmáticas de LDL y mejoró la distribución de subclases y los ratios asociados de estas partículas (Fernández-Castillejo et al. 2016), mientras que también se ha descrito que una intervención de un año de duración con dieta mediterránea enriquecida con AOV mejoró algunas características de las LDL relacionadas con su aterogenicidad (resistencia a la oxidación, tamaño, composición y citotoxicidad) sin ser capaz de modificar las concentraciones de LDL colesterol en plasma en una submuestra de sujetos con alto riesgo de ECV participantes en el estudio PREDIMED (Hernández et al. 2017). Nuestros resultados son consistentes con este efecto nulo del AOV sobre las concentraciones plasmáticas de LDL colesterol, destacando que en nuestro caso los voluntarios tenían concentraciones de esta subfracción dentro de los valores recomendados de normalidad.

Por otro lado, nuestros datos muestran un leve incremento de triacilglicéridos en plasma tras las intervenciones con el AOV y con el AOVO, que siguen dentro de los valores de referencia considerados como normales (<150 mg/dl) durante todo el periodo de intervención, por lo que ésta modificación no ocasionó un incremento del riesgo cardiovascular en estos sujetos sanos (Nordestgaard et al. 2016). Este efecto no coincide con lo anteriormente observado en el estudio EUROLIVE que observó una disminución de las concentraciones plasmáticas de triacilglicéridos (Covas et al. 2006b). A diferencia de nuestro estudio, el estudio EUROLIVE tenía la ventaja de que incluyó 200 voluntarios, mientras que una de las limitaciones de nuestro estudio es que sólo se reclutaron 54 voluntarios para el estudio. Sin embargo, nuestros datos coinciden con lo descrito en un metanálisis que evaluó el efecto de AOVs con alto contenido en compuestos fenólicos y concluyó que no existía efecto sobre las concentraciones plasmáticas de triacilglicéridos (Hohmann et al. 2015), así como con lo descrito por Saibandith et al. (2017), autores que concluyeron que el efecto de los polifenoles del aceite de oliva sobre los triacilglicéridos no estaban claros. Por lo tanto, son necesarios estudios de mayor duración para clarificar este efecto.

Nuestro estudio es el primer ensayo clínico que evalúa el efecto de triterpenos del aceite de oliva en lípidos plasmáticos y en biomarcadores de función endotelial. Estudios previos realizados en animales han mostrado efectos diferentes del ácido oleanólico en los lípidos plasmáticos, que depende del modelo animal experimental estudiado (Luo et al. 2017). Nuestros resultados muestran que tras la suplementación con el AF enriquecido con triterpenos no se modificaron las concentraciones plasmáticas de HDL colesterol, LDL colesterol ni de triacilglicéridos, mientras que aumentaron las concentraciones de colesterol total en plasma aunque no hubo diferencias entre los tres grupos de intervención. Sin embargo, aunque estas modificaciones no representaron un incremento en el riesgo cardiovascular, ya que los valores eran suficientemente bajos (<190 mg/dl) para considerarlos seguros (Nordestgaard et al. 2016). Por tanto, es necesario realizar más

ensayos clínicos de mayor duración para demostrar los beneficios de los compuestos fenólicos del aceite de oliva y los triterpenos sobre el perfil lipídico del plasma.

4.2 Efectos sobre la función endotelial

La disfunción endotelial es un evento temprano crítico en el desarrollo de aterosclerosis (Ross 1993). Un desbalance entre moléculas vasodilatadoras y vasoconstrictoras, como el óxido nítrico y la endotelina-1, respectivamente, contribuye a favorecer la hipertensión y sus complicaciones (Gkaliagkousi et al. 2015). Nuestros resultados indican que las concentraciones de endotelina-1 en plasma disminuyen tras las intervenciones con AOV, AOVO y AF, resultados que fueron confirmados con los experimentos realizados *ex vivo*. Aunque la endotelina-1 es principalmente producida por las células del endotelio vascular, múltiples estudios han sugerido que las células de la sangre, como son los neutrófilos polimorfonucleados (Cambiaggi et al. 2001), las células T (Shinagawa et al. 2017) y también los macrófagos (Massai et al. 2003), son responsables de las concentraciones circulantes de endotelina-1. Los experimentos *in vitro* permiten estudiar posibles mecanismos que no es posible estudiar en estudios *in vivo*. Además, otros experimentos *ex vivo* han demostrado la liberación del péptido maduro después de la estimulación con LPS y PMA+IO (Cambiaggi et al., 2001; Mencarelli et al., 2009), lo que justifica la validez de nuestros experimentos. Como se demuestra en este trabajo de Tesis, la producción de endotelina-1 disminuyó después de las intervenciones con los tres aceites. Este efecto puede ser beneficioso para las personas con riesgo cardiovascular, ya que la endotelina-1 es una molécula vasoconstrictora que contribuye a procesos fisiopatológicos como la hipertrofia vascular, la proliferación celular, la fibrosis y la inflamación, mediante mecanismos que implican la activación de células endoteliales e inflamatorias (Achmad, Rao 1992; Ruetten, Thiernemann 1997; Zouki et al. 1999). En humanos, el consumo de AOV ha demostrado beneficios para disminuir la presión arterial y mejorar la función endotelial (Zern, Fernandez 2005). Sin embargo, a pesar de haber disminuido la secreción de endotelina-1, la suplementación durante 3 semanas con nuestros aceites no ha sido capaz de modificar la tensión arterial, en unos sujetos que, desde el inicio del estudio, tenían valores normales de este parámetro clínico. Un metanálisis previó concluyó que los aceites de oliva con al menos 150 ppm de compuestos fenólicos ejercen un efecto moderado sobre la disminución de la PAS, sin modificar la PAD (Hohmann et al. 2015). Por lo tanto, es necesario realizar otros estudios de mayor duración para comprobar el efecto hipotensor del AOV rico en compuestos fenólicos así como sus mecanismos de acción.

Con respecto a los triterpenos, el pequeño aumento de la PAS observado después de esta intervención, no conlleva relevancia clínica ya que la PAS se mantuvo por debajo de 130 mm Hg, por lo que no supone un aumento del riesgo cardiovascular (Nordestgaard et al. 2016). Además se conoce que la variabilidad de la PAS es mayor que la variabilidad en la PAD (Handler 2009; Musini, Wright 2009). Por esta razón, para evaluar si el efecto podría tener algún efecto clínico calculamos la presión de pulso, y no encontramos ningún efecto significativo del AF en este parámetro, confirmando que esta modificación de la PAS no tiene relevancia clínica. El efecto beneficioso de los triterpenos sobre la función endotelial (Rodríguez-Rodríguez et al. 2007) y en la

presión sanguínea (Valero-Muñoz et al. 2014) ha sido previamente descrito en modelos animales de hipertensión. A pesar de esto se necesitan más estudios para explorar los mecanismos moleculares relacionados en el efecto de componentes específicos del AOV en la regulación de la endotelina-1.

Estudios previos *in vitro* han mostrado que los componentes minoritarios del aceite de oliva, específicamente hidroxitirosol y sus metabolitos, regulan negativamente la secreción de E-selectina, p-selectina, sICAM-1 y sVCAM-1, modulando la función endotelial (Dell'Agli et al. 2006). Sin embargo, y de acuerdo con nuestros resultados, otros estudios no han encontrado diferencias en las concentraciones plasmáticas de sICAM-1 o sVCAM-1 después de la ingesta de 50 ml/día de AOV (161 ppm/d de compuestos fenólicos) o tras el consumo de aceite de oliva refinado (14.67 ppm/d de compuestos fenólicos) en pacientes con enfermedad coronaria (Fitó et al. 2008). Otro estudio posterior observó una reducción significativa de sICAM-1, pero no observó cambios en las concentraciones plasmáticas de sVCAM-1 después de la ingesta de 50 ml/d de aceite de oliva del que no se describe su contenido fenólico (Papageorgiou et al. 2011). Por otro lado, recientemente, se ha propuesto que la ingesta de 25 ml/día de AOV que contiene 366 ppm de compuestos fenólicos modula la expresión de varios genes relacionados con el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Martín-Peláez et al. 2017). Por lo tanto, se necesitan estudios de mayor duración para poder establecer conclusiones finales sobre el efecto de los compuestos minoritarios del AOV sobre las moléculas que modulan la función endotelial y los sistemas de regulación de la presión arterial.

4.3 Efecto sobre el estado oxidativo

El presente estudio muestra que una ingesta diaria de 30 ml de un AF durante 3 semanas conteniendo 13.4 mg/día de compuestos fenólicos (487 ppm) y 4.7 mg/día de ácido oleanólico y 6 mg/día de ácido maslínico (171 y 218 ppm, respectivamente) disminuye las concentraciones de 8-OHdG en orina en relación a lo observado tras el consumo del mismo aceite sin triterpenos, protegiendo frente a la oxidación del ADN. La 8-OHdG se produce por oxidación del nucleósido deoxiguanosina que es secretado directamente a la orina y ha sido descrito como un biomarcador de daño oxidativo del DNA (Poulsen, 2005). Un reciente metanálisis publicó que las concentraciones de 8-OHdG son mayores en pacientes con ECV que en individuos sanos (Di Minno et al., 2016). En este sentido, por un lado, estudios *in vitro* (Fabiani et al. 2008; Quiles et al. 2002) y estudios animales (Jacomelli et al. 2010) han mostrado que los compuestos fenólicos del aceite de oliva protegen frente a la oxidación del ADN. Por otro lado, estudios *in vitro* han indicado que también los ácidos triterpénicos son capaces de proteger contra el daño oxidativo del DNA (Allouche et al. 2011). Los resultados del presente estudio en relación con la 8-OHdG coinciden con los observados en el estudio EUROLIVE donde la suplementación con aceite de oliva protegía contra la oxidación del DNA tras 3 semanas de ingesta de aceites en hombres sanos (Machowetz et al. 2007). Este efecto fue independiente del contenido en compuestos fenólicos del aceite, y se relacionó con la presencia de AGMI (Machowetz et al. 2007). Por otro lado, la protección frente a la oxidación del DNA fue observada también en sujetos hiperlipidémicos tras la ingesta de AOV

suplementado con compuestos fenólicos procedentes de la planta del tomillo (Romeu et al. 2016), y también tras 8 semanas de suplementación con 50 g/día de un aceite de oliva con 592 ppm de compuestos fenólicos en mujeres postmenopáusicas (Salvini et al. 2006). Otro estudio llevado a cabo en hombres sanos que ingerían 11.13 mg/d de compuestos fenólicos ha demostrado protección postprandial contra la oxidación tras 4 días de suplementación (Weinbrenner et al. 2004). Nuestros resultados no muestran un efecto positivo tras la ingesta del AOV y del AOVO. Es posible que la situación fisiológica de nuestros voluntarios afecte a los resultados obtenidos, y hay que considerar la posibilidad de que la cantidad de compuestos sea baja para unos sujetos que antes de iniciar el estudio ya tomaban aceite de oliva en su dieta habitual, por lo que se necesitaría una intervención más larga con el AOVO para observar un mayor impacto sobre estos adultos sanos. Por lo tanto, se necesita seguir investigando el efecto antioxidante de los ácidos triterpénicos frente a la oxidación del DNA para poder tener conclusiones definitivas.

Los isoprostanos son moléculas generadas *in vivo* tras la oxidación del ácido araquidónico inducida por radicales libres (Basu 2004). Uno de los isoprostanos más importantes, y el más abundante, el 15-F2t-isoprostano incrementa en algunas situaciones asociadas con el estrés oxidativo, incluyendo durante la aterosclerosis, diabetes, obesidad, con el consumo de tabaco, en enfermedades neurodegenerativas y en situaciones de asma (Basu, Helmersson 2005). El presente estudio no muestra ningún efecto sobre las concentraciones de 15-F2t-isoprostano en orina tras una suplementación con AOV enriquecido en compuestos fenólicos y triterpenos en adultos sanos. El efecto sobre la oxidación de los lípidos de los compuestos fenólicos del aceite de oliva no está bien demostrado. Al igual que lo observado en nuestros resultados, otros trabajos han mostrado un efecto nulo sobre las concentraciones de isoprostanos en sujetos dislipidémicos (Visioli et al. 2005). También un estudio previo, cruzado, aleatorizado y con un gran tamaño de muestra, demostró que el daño oxidativo en lípidos se correlacionaba de manera proporcional con el contenido fenólico del aceite de oliva, particularmente la oxidación de LDL, pero no la concentración de isoprostanos en adultos sanos (Covas *et al.*, 2006). Por otro lado, un estudio *in vitro* (Allouche et al. 2010) y estudios *in vivo* (Fitó et al. 2007; Somova et al. 2003) han demostrado un efecto antioxidante de los ácidos triterpénicos. En concreto, el ácido oleanólico ha mostrado protección contra la peroxidación lipídica *in vitro* en microsomas aislados de hígados de ratas (Balanehru, Nagarajan 1991), y en modelos de isquemia cerebral en animales (Rong et al. 2011). Se ha propuesto que el ácido oleanólico no solo actúa sobre los radicales libres, sino que también puede mejorar el sistema de defensa antioxidante (Rong et al. 2011; Wang et al. 2010). Además, el ácido maslínico es un potente inhibidor de estrés oxidativo y estimula la producción de citoquinas en macrófagos de modelos murinos *in vitro* (Márquez Martín et al. 2006). De hecho, nuestros datos muestran una correlación negativa entre el porcentaje de ácido oleico y la concentración de isoprostanos en orina, lo que sugiere un posible papel antioxidante de la fracción lipídica, concretamente del ácido oleico presente en el aceite de oliva que necesita de estudios a largo plazo para poder ser demostrada.

Cuando analizamos el sistema de defensa antioxidante no enzimático observamos que no se produjeron cambios tras las tres intervenciones. De acuerdo con los datos de ingesta de nutrientes,

los voluntarios del estudio no modificaron la dieta y, por tanto, un cambio en la concentración de moléculas antioxidantes en el plasma no es un cambio esperado. Además, la ausencia de cambios sugiere que la mejora del estado oxidativo observada tras la ingesta de los tres aceites de oliva podría deberse principalmente a los macro y micro componentes presentes en el aceite de oliva.

4.4 Efecto sobre el estado inflamatorio

La suplementación diaria durante 3 semanas con 30 ml del AF rico en compuestos fenólicos y enriquecido con triterpenos obtenidos de la propia aceituna puede disminuir la concentración de biomarcadores de inflamación en plasma, concretamente de IL-8 y TNF- α , comparados con los aceites que no contienen triterpenos. El presente estudio es el primero que describe el efecto de los triterpenos presentes en el aceite de oliva sobre biomarcadores de inflamación *in vivo*. El AOVO mejoró la concentración de IL-8 pero no modificó la del TNF- α . La dieta mediterránea está asociada con una menor incidencia de enfermedades inflamatorias crónicas (Alarcón de la Lastra et al. 2001). Una reciente revisión sobre estudios humanos indica que el consumo de aceite de oliva reduce las concentraciones de TNF- α y de IL-6, asociándolo a la dieta mediterránea y al estilo de vida (Yarla, Polito, Peluso 2017). En 2015, una revisión sistemática concluyó que la intervención durante al menos 4 semanas con aceite de oliva puede ejercer efectos beneficiosos sobre algunos biomarcadores de inflamación, como la PCR y la IL-6, en individuos que presentan adherencia a la dieta mediterránea (Schwingshackl, Christoph, Hoffmann 2015). Además, la adherencia a la dieta mediterránea a largo plazo ha demostrado que puede disminuir las concentraciones plasmáticas de IL-6 y IL-8, dos moléculas que intervienen en los mecanismos relacionados con el desarrollo de placa de ateroma en sujetos de edad avanzada con alto riesgo de ECV (Casas et al. 2017). Se ha descrito que los principales componentes con actividad antiinflamatoria presentes en las aceitunas son el tirosol, el hidroxitirosol, la oleuropeína, el ligustrósido, el verbascósido y sus derivados (Rigacci, Stefani 2016). En particular, el hidroxitirosol se ha considerado el mayor compuesto antiinflamatorio presente en los extractos acuosos de aceitunas (Richard et al. 2011). De acuerdo con nuestros resultados, otros estudios en humanos describieron la disminución de las concentraciones plasmáticas de IL-8 tras la ingesta de 136.2 mg/d de oleuropeína y 6.4 mg/d de hidroxitirosol durante una intervención de 6 semanas en hombres hipertensos (Lockyer et al. 2017). Sin embargo, se necesitan más estudios clínicos y de mecanismos de acción que permitan establecer el papel antiinflamatorio del aceite de oliva e identificar los componentes responsables de esta actividad.

4.5 Limitaciones del estudio

Una de las limitaciones del presente estudio es que los sujetos incluidos son adultos jóvenes y sanos, por lo que es posible que tres semanas de intervención sea un periodo demasiado corto para poder observar cambios sobre los factores de riesgo de la ECV y establecer conclusiones definitivas. Por otro lado, aunque no se observaron diferencias en la ingesta dietética durante las tres intervenciones, los datos recogidos en las encuestas no dejan de ser subjetivos y relativamente imprecisos, a pesar de que se utilizaron cuestionarios validados. Además, otra limitación de este estudio es que no se registraron los recordatorios dietéticos de los períodos de

lavado, por lo que no se pueden analizar las ingestas dietéticas durante estos períodos. Finalmente, hay que mencionar que los sujetos incluidos en este estudio viven en el sur de España, donde la dieta mediterránea y el AOV son altamente consumidos, de manera que es posible que la ingesta de aceite de oliva ya haya podido influir en el estado basal de los voluntarios. Por lo tanto, nuestros resultados permiten establecer hipótesis para nuevos estudios diseñados con una mayor duración y en voluntarios de mayor edad con factores de riesgo cardiovascular como disfunción endotelial y síndrome metabólico, en los que se pueda evaluar el efecto beneficioso de los componentes del AOVO y del AF, así como los mecanismos específicos responsables de estos efectos.

Capítulo 5 - Conclusiones

La ingesta controlada de AOVO, rico en polifenoles, durante tres semanas incrementa las concentraciones plasmáticas de HDL colesterol en voluntarios sanos adultos, especialmente en las mujeres.

El consumo de AOV durante tres semanas disminuye las concentraciones plasmáticas de endotelina-1, pudiendo contribuir a la mejora de la funcionalidad endotelial. Sin embargo, no se observan beneficios adicionales en la funcionalidad endotelial del AOV enriquecido en triterpenos tras las tres semanas de suplementación.

El AOV puede prevenir la oxidación del DNA *in vivo*. Dicha capacidad protectora parece estar relacionada con la presencia de ácido oleico en el plasma.

El AF puede ejercer una actividad antiinflamatoria, disminuyendo algunos biomarcadores de estado inflamatorio como la IL-8 y el TNF- α , comparados con los aceites que no contienen triterpenos.

Nuestros resultados sirven de hipótesis para plantear nuevos estudios clínicos de mayor duración en personas de avanzada edad y particularmente en aquellos afectados por síndrome metabólico y disfunción endotelial, así como en sujetos diagnosticados de ECV, que permitan evaluar los efectos de los componentes minoritarios del AOV, tanto polifenoles como triterpenos, sobre la salud.

Abreviaciones

- 8-OHdG, 8-hidroxi-2´deoxiguanosina
- ACN, acetonitrilo
- ADH, hormona antidiurética
- AF, aceite funcional
- AGMI, ácidos grasos monoinsaturados
- AGPI, ácidos grasos poliinsaturados
- ANOVA, análisis de la varianza
- AOV, aceite de oliva virgen
- AOVE, aceite de oliva virgen extra
- AOVO, aceite de oliva virgen optimizado
- Apo, apolipoproteína
- BEDCA, base de datos española de composición de alimentos
- COI, Consejo Oleícola Internacional
- COX, ciclooxigenasa
- CoQ₉, coenzima Q₉
- CoQ₁₀, coenzima Q₁₀
- DHA, ácido docosahexaenoico
- DOP, denominación de origen protegida
- ECV, enfermedad cardiovascular
- EDTA, ácido etilendiaminotetraacético
- EFSA, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- EPA, ácido eicosapentaenoico
- ESI, ionización por electrospray; electrospray ionization

EUROLIVE, estudio multicéntrico europeo que evaluó el efecto del consumo de aceite de oliva sobre el daño oxidativo

FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos; Food and Drug Administration

HDL, lipoproteínas de alta densidad

HER2, receptor de crecimiento epidérmico humano

ICAM-1, molécula de adhesión intercelular de tipo 1

IL-6, interleuquina 6

IL-8, interleuquina 8

IMIM, Instituto de Investigación del Hospital del Mar

IMC, índice de masa corporal

INE, instituto nacional de estadística

iNOS, óxido nítrico sintasa inducible

IO, ionomicina

LDL, lipoproteínas de baja densidad

LMM, modelo lineal mixto; linear mixed model

LPS, lipopolisacárido de *E. coli*

MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos

NF- κ B, factor nuclear kappa B

PAD, presión arterial diastólica

PAS, presión arterial sistólica

PCR, proteína-C reactiva

PREDIMED, estudio de prevención con dieta mediterránea

OMS, organización mundial de la salud

PHA, fitohemaglutinina

PMA, forbol 12 miristato-13 acetato

sICAM-1, ICAM-1 soluble

SPSS, Statistical Package for the Social Sciences

SUN, seguimiento Universidad de Navarra

sVCAM-1, VCAM-1 soluble

T2DM, diabetes mellitus tipo II

TNF- α , factor de necrosis tumoral- α

UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography; cromatografía líquida de alta resolución

UHPLC-MS, Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled mass spectrometry; cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas

VCAM-1, molécula de adhesión celular vascular de tipo 1

VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad

Lista de tablas

Tabla 1.1. Criterios de clasificación del peso corporal según la OMS en adultos según el IMC.

Tabla 1.2. Definición y clasificación de los diferentes tipos de presión sanguínea.

Tabla 1.3. Objetivos de LDL colesterol según el riesgo de ECV.

Tabla 1.4. Estratificación del riesgo de hipertrigliceridemia.

Tabla 1.5. Modificaciones de los lípidos plasmáticos por los distintos tipos de grasa dietética.

Tabla 1.6. Propiedades fisicoquímicas y sensoriales más importantes de los distintos tipos de aceites de oliva.

Tabla 2.1. Características de los aceites de oliva administrados.

Tabla 3.1. Energía e ingesta de nutrientes diaria a tiempo basal, de los sujetos agrupados según la secuencia de administración de aceite en adultos sanos.

Tabla 3.2. Características clínicas y biomarcadores de síndrome metabólico, función endotelial e inflamación al inicio del estudio de los sujetos agrupados según la secuencia de administración de aceite de oliva en adultos sanos.

Tabla 3.3. Perfil de ácidos grasos y concentración de vitaminas antioxidantes en plasma, y concentraciones urinarias de biomarcadores de estrés oxidativo, al inicio del estudio, de los sujetos agrupados según la secuencia de administración de aceite de oliva en adultos sanos.

Tabla 3.4. Ingesta de energía y nutrientes seleccionados tras las tres intervenciones con los tres aceites experimentales en adultos sanos.

Tabla 3.5. Biomarcadores de síndrome metabólico y función endotelial antes y después de cada intervención con los tres aceites de oliva en adultos sanos.

Tabla 3.6. Concentraciones plasmáticas de IL-8 y TNF- α como biomarcadores de inflamación antes y después de cada intervención en adultos sanos, hombres y mujeres.

Tabla 3.7. Perfil plasmático de ácidos grasos durante la intervención.

Tabla 3.8. Biomarcadores de estrés oxidativo en orina y vitaminas antioxidantes en plasma.

Lista de figuras

Figura 1.1. Factores de riesgo y patologías asociadas a la ECV. ECV, enfermedad cardiovascular.

Figura 1.2. Síndrome metabólico y factores de riesgo asociados.

Figura 1.3. Alteraciones bioquímicas asociadas al síndrome metabólico. AGL, ácidos grasos libres; DM-2, diabetes mellitus tipo 2; ECV, enfermedad cardiovascular; HTA, hipertensión arterial; LDL, lipoproteínas de baja densidad; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

Figura 1.4. Evolución de la placa de ateroma. A) Iniciación de la lesión y formación de la estría grasa. B) Formación de la cápsula fibrosa. Esta cápsula da consistencia y estabilidad a la placa de ateroma (lesión esclerótica). C) Creación de un núcleo necrótico tóxico que conduce a la formación del trombo. D) Si la placa no se rompe, la lesión continúa creciendo y estrecha la luz del vaso hasta generar su obstrucción.

Figura 1.5. Ejemplos de producción de radicales libres por diferentes procesos bioquímicos.

Figura 1.6. Mecanismo molecular de la peroxidación lipídica.

Figura 1.7. Variedades de aceitunas picual (a), hojiblanca (b), arbequina (c).

Figura 1.8. Esquema del proceso de elaboración del AOV. AOV, aceite de oliva virgen.

Figura 1.9. DOPs de AOVE en Andalucía. AOVE, aceite de oliva virgen extra; DOP, denominación de origen protegida.

Figura 1.10. Enfermedades que afectan a la calidad del aceite de oliva: vivillo (a), mosca de la aceituna (b), polilla del olivo (c) y repilo (d).

Figura 1.11. Molécula de triacilglicerol (a), molécula de ácido oleico (C18:1 n-9) (b).

Figura 1.12. Estructura química de los principales alcoholes fenólicos.

Figura 1.13. Estructura química de los principales derivados terpénicos.

Figura 1.14. Posible vía biosintética de los triterpenoides no esteroideos. CCC y CBC se refieren a las diferentes conformaciones que conducen a triterpenos y esteroides no esteroideos, respectivamente. Productos intermedios están representados entre paréntesis.

Figura 1.15. Resumen de los efectos beneficiosos atribuidos al AOV.

Figura 2.1 Diagrama de flujo de los sujetos del estudio.

Figura 2.2. Esquema de la secuencia de intervenciones del ensayo clínico.

Figura 3.1. Cambios en las concentraciones de endotelina-1 secretadas *ex vivo* (post-intervención menos pre-intervención) en cultivos de sangre completa de adultos sanos estimulados con PHA, LPS o PMA+IO.

Figura 3.2: Secreción de endotelina-1 plasmática en el estudio *ex vivo* realizado sobre cultivos celulares de sangre completa de adultos sanos antes y después de las tres semanas de intervención con los tres aceites de oliva y con los tres tipos de estimulación (PHA, LPS o PMA+IO).

Figura 3.3. Diferencias post- menos pre-intervención de las concentraciones de 8-OHdG en orina tras las tres intervenciones.

Figura 3.4. Diferencias post- menos pre-intervención de las concentraciones de ácidos triterpénicos en orina tras las tres intervenciones.

Anexos

I. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de proyecto: **Nuevos procesos en la industria almazarrera Andaluza para la elaboración de nuevos productos de alto valor biológico con aplicaciones en salud humana.**

Estudio NUTRAOLEUM de Consumo Sostenido

Centro (s) Participante (s) e Investigador (es) Principal (es):

- *(Anotar nombre)*

Yo,.....

(nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con.....

(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- cuando quiera.
- sin tener que dar explicaciones
- sin que repercuta en mis cuidados médicos

Doy mi conformidad para participar en el estudio

Fecha

Firma del participante

Fecha

Firma del investigador

II. Registros de ingesta de alimentos

ESTUDIO NUTRAOLEUM

REGISTRO DE INGESTA DE ALIMENTOS de 3 DIAS

Identificación

|_|_|_|_|_|_|_|_| / |_|_|

Identificador

Visita (1-7)

Fecha |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|_|

INSTRUCCIONES

En el presente cuestionario se deben anotar todos los alimentos, bebidas, suplementos dietéticos y preparados consumidos durante el plazo de 24 horas. Dispone para ellos de varias hojas para anotar los alimentos consumidos por la mañana, por la tarde y por la noche. Se deben registrar **TODOS LOS ALIMENTOS, BEBIDAS Y PREPARADOS**, sin olvidar aquellos que hayan sido tomados entre horas: cafés, cervezas, aperitivos, comprimidos, soluciones, golosinas... No olvide los vasos de agua o de otras bebidas tomados en las comidas o entre comidas.

En la primera columna de cada hoja se deberán apuntar: la hora del comienzo y finalización de cada comida, el lugar (casa, cafetería, restaurante,...) y el menú global indicando el modo de cocinado de los alimentos (patatas fritas, filete a la plancha...).

En la segunda columna de cada hoja se detallarán todos los ingredientes de cada una de las comidas del día, aportando el máximo número de datos que sea posible sobre los alimentos consumidos:

- Especifique si el alimento es **normal, bajo en calorías o enriquecido**. Por ejemplo si la leche es entera, desnatada o semidesnatada o el yogur entero, desnatado o enriquecido.
- Tipo de queso (manchego, en porciones, roquefort...).
- Tipo de aceite (oliva, girasol...).
- Mantequilla o margarina.
- Tipo de pan (blanco, integral o de molde).

En la tercera columna se indicará, en caso de tenerla, la **marca comercial**.

En la cuarta columna se debe anotar el tipo de preparación del alimento: crudo, a la plancha, hervido, frito, rebozado y/o empanado, horno, microondas.

En las dos últimas columnas se debe indicar con la mayor precisión la cantidad de cada alimento que se ha tomado.

Los mejores resultados se obtienen por pesada de cada uno de los productos consumidos, indicando si el alimento ha sido **pesado en crudo o cocinado**, y no olvide descontar o anotar como sobras los restos que deje sin consumir. En caso de que sea imposible proceder a pesar los alimentos, especifique la cantidad en **medidas caseras**: vasos, tazas, cucharadas... por ejemplo:

- Bebidas: Las cantidades se pueden expresar en vasos, tazas, copas..., si no se dispone de medidas de volumen.
- Sopas, caldos o purés: Emplee tazas o platos (grande, mediano o pequeño).
- Carnes, pescados, verduras, hortalizas y frutas: Estime la cantidad consumida teniendo en cuenta la cantidad comprada y el número de piezas o porciones que entraron en la compra. De no tener esos datos, indique número y tamaño de las porciones consumidas. Indique también si la fruta se consume entera o pelada.
- Legumbres: Considere el tamaño del envase del que se partía y divídalo entre el número de raciones resultantes en el caso de que fueran todas iguales. O bien señale el tamaño

aproximado de la ración indicando número de cucharadas o cazos servidos, tamaño del plato...

- Aceite: Indique el número de cucharadas, tamaño y si son rasas o colmadas. Para las salsas especifique si se tomaron o se dejaron, total o parcialmente en el plato.
- Pan: Indique número de rebanadas o trozos y tamaño aproximado de las porciones.
- Embutidos: Anote el número de lonchas y su grosor.
- En los alimentos precocinados, indique la marca y adjunte la composición, en caso de tenerla.
- Cuando se trata de **preparados, suplementos o dietéticos**, indique el número de comprimidos, sobres, cucharas... y la marca. De no ser posible, adjunte una fotocopia de la composición.

Cualquier duda o aclaración puede anotarla en las últimas hojas del cuestionario.

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

PESOS Y BEBIDAS HABITUALES DE DIVERSOS ALIMENTOS

ALIMENTO	UNIDAD	CANTIDAD (g)
Aceite	1 cucharada sopera	10
Albaricoque	2 unidades	150
Alubias	3 cucharadas soperas	60
Arroz (crudo)	3 cucharadas soperas	60
Atún en conserva	1 lata	80
Azúcar	1 terrón	5
	1 cucharadita de postre	7
Biscote	1 unidad	7
Brik de zumo	1 unidad	200
Cereales desayuno	2 cucharadas soperas	20
Cerezas	12 unidades	100
Cuajada	1 unidad	150
Champiñones	1 lata	190
Espárrago grueso	1 unidad	40
Galletas María	2 unidades	15
Garbanzos	3 cucharadas soperas	60
Harina	1 cucharada sopera	20
Huevo	1 unidad	60
Jamón serrano	2 lonchas finas	30
Kiwi	1 unidad	100
Lentejas	3 cucharadas soperas	60
Maíz	1 lata	340
Mandarina	2 unidades	150
Manzana	1 unidad pequeña	125
Mejillones	1 lata	90-110
Melocotón	1 unidad pequeña	175
Melón	2 tajadas medianas	250
Mermelada	3 cucharaditas postre	15
Miel	3 cucharaditas postre	15
Naranja	1 unidad mediana	175
Pan	1 rebanada mediana	30

Pan de molde	2 rebanadas	50
Pasta espagueti fino	25-28 fideos	20
Pasta macarrones	2 cucharadas soperas	20
Pasta de sopa	1 cucharada sopera	20
Patata	1 unidad mediana	160
Pera	1 unidad mediana	150
Plátano	1 unidad pequeña	75
Quesito	1 porción	20
Queso semicurado	1 porción pequeña	30
Queso fresco	1 unidad	25
Sardinias conserva	1 lata	110
Uvas	15 granos	100
Yogurt	1 unidad	125

Día recordado:

Fecha:

APERITIVO	Alimentos (ingredientes del menú)
Hora:	
Lugar:	
Menú:	
ALMUERZO	
Hora:	
Lugar:	
Menú:	

Día recordado:

Fecha:

MERIENDA	Alimentos (ingredientes del menú)
Hora:	
Lugar:	
Menú:	
APERITIVO	
Hora:	
Lugar:	
Menú:	

Día recordado:

Fecha:

CENA	Alimentos (ingredientes del menú)
Hora:	
Lugar:	
Menú:	
RE-CENA	
Hora:	
Lugar:	
Menú:	

III. Publicación

Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Metabolic Syndrome and Endothelial Functional Risk Biomarkers in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial

Estefania Sanchez-Rodriguez¹, Elena Lima-Cabello², Sara Biel-Glesson³, Jose R. Fernandez-Navarro³, Miguel A. Calleja³, Maria Roca⁴, Juan A. Espejo-Calvo⁵, Blas Gil-Extremera⁶, Maria Soria-Florido⁷, Rafael de la Torre⁸, Montserrat Fito^{7,9}, Maria-Isabel Covas^{9,10}, Juan de Dios Alche², Emilio Martinez de Victoria¹¹, Angel Gil^{1,9,*} and Maria D. Mesa¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain; estefaniasr@outlook.com (E.S.-R.); mdmesa@ugr.es (M.D.M.)

² Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain; elimacabello@gmail.com (E.L.-C.); juandedios.alche@eez.csic.es (J.d.D.A.)

³ Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental “Alejandro Otero” (FIBAO), Avenida de Madrid 15, 18012 Granada, Spain; sbiel@fibao.es (S.B.-G.); estrategia@innofood.es (J.R.F.-N.); mangel.calleja.sspa@juntadeandalucia.es (M.A.C.)

⁴ Food Phytochemistry Department, Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), University Campus Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Spain; mroca@ig.csic.es

⁵ Instituto para la Calidad y Seguridad Alimentaria (ICSA), Avenida de la Hispanidad 17, 18320 Santa Fe, Granada, Spain; jaespejo@hotmail.com

⁶ Department of Medicine, University of Granada, Avenida de la Investigación 11, 18071 Granada, Spain; blasgil@ugr.es

⁷ Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain; mariat.soria@gmail.com (M.S.-F.); mfito@imim.es (M.F.)

⁸ Integrative Pharmacology and Systems Neuroscience Research Group, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain; rtorre@imim.es

⁹ Spanish Biomedical Research Networking Centre, Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain; maria.nuproas@gmail.com

¹⁰ NUPROAS Handelsbolag, Nackã, Sweden, NUPROAS HB, Apartado de Correos 93, 17242 Girona, Spain

¹¹ Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain; emiliom@ugr.es

* Correspondence: agil@ugr.es; Tel.: +34-958-246-187

Received: 10 April 2018; Accepted: 14 May 2018; Published: 16 May 2018

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of virgin olive oils (VOOs) enriched with phenolic compounds and triterpenes on metabolic syndrome and endothelial function biomarkers in healthy adults. The trial was a three-week randomized, crossover, controlled, double-blind, intervention study involving 58 subjects supplemented with a daily dose (30 mL) of three oils: (1) a VOO (124 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenes); (2) an optimized VOO (OVOO) (490 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenes); and (3) a functional olive oil (FOO) high in phenolic compounds (487 ppm) and enriched with triterpenes (389 ppm). Metabolic syndrome and endothelial function biomarkers were determined *in vivo* and *ex vivo*. Plasma high density lipoprotein cholesterol (HDLc) increased after the OVOO intake. Plasma endothelin-1 levels decreased after the intake of the three olive oils, and in blood cell cultures challenged. Daily intake of VOO enriched in phenolic compounds improved plasma HDLc, although no differences were found at the end of the three interventions, while VOO with at least 124 ppm of phenolic compounds, regardless of the triterpenes content improved the systemic endothelin-1 levels *in vivo* and *ex vivo*. No effect of triterpenes was observed after three weeks of interventions. Results need to be confirmed in subjects with metabolic syndrome and impaired endothelial function (Clinical Trials number NCT02520739).

Keywords: olive oil; virgin olive oil; olive oil polyphenols; maslinic acid; oleanolic acid; cardiovascular diseases; endothelial function; phenolic compounds; triterpenes; metabolic syndrome

1. Introduction

Metabolic syndrome (MS) is a cluster of associated metabolic and clinical disturbances that tend to occur together [1]. This syndrome is commonly represented by the combination of obesity (particularly abdominal), hyperglycemia, dyslipidemia, and hypertension [2]. MS is associated with an increased risk of cardiovascular disease (CVD), which is the main cause of disability and mortality in industrialized countries, and is associated with a chronic inflammatory response characterized by abnormal cytokine production leading to endothelial dysfunction [3]. There is consolidated clinical evidence that the Mediterranean diet (MD) is associated with a lower risk of CVDs, including myocardial infarction, stroke and cardiovascular death [4]. Mayneris-Perxachs et al. [5] proposed the MD as a successful tool for the prevention and treatment of MS and related comorbidities. A large study in a high cardiovascular risk population has found that the MD supplemented with virgin olive oil (VOO) protects people from vascular disease, suggesting a key role of olive oil [6]. A recent systematic review and meta-analysis provided evidence that olive oil might exert beneficial effects on endothelial function and biomarkers of inflammation, thus

representing a key ingredient contributing to the MD cardiovascular-protective effects [7]. Olive oil is not only a source of monounsaturated fatty acids (MUFAs) but also an important source of bioactive compounds, such as phenols and triterpenes [8,9]. Previous studies suggested a protective effect of olive oil phenolic compounds on endothelial dysfunction [10], whereas olive oil triterpenes could be useful for the prevention of multiple diseases related to cell oxidative damage [11]. Maslinic and oleanolic acids are the principal triterpenes found in VOO. The potential of these olive oil triterpenic acids for use as a therapeutic strategy to improve vascular function and treating CVD has been recently reviewed [12]. However, to our best knowledge, no clinical trial has been performed to provide evidence of their benefits in healthy adults, according to EFSA requirement [13]. The present study which acronym is NUTRAOLEUM, aimed to evaluate the effect of VOO enriched with bioactive compounds, such as phenolic compounds and triterpenes, on MS and endothelial function biomarkers in healthy adults. We reported that daily intake of VOO enriched in phenolic compounds during three weeks improved plasma high density lipoprotein cholesterol levels (HDLc), one of the features of metabolic syndrome, although no differences were found at the end of the three interventions. In addition, VOO with at least 124 ppm of phenolic compounds, regardless of the triterpenes content, improved the systemic endothelin-1 levels in vivo and ex vivo, while no additional effect of triterpenes was observed.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Information about subjects, sample size and their eligibility and dietary control have been referenced in detail elsewhere [14]. In brief, fifty-eight intention-to-treat subjects were eligible. Inclusion criteria were as follows: people in good health on the basis of a physical examination and basic biochemical and hematological analyses, and willingness to provide written informed consent. The exclusion criteria were as follows: smoking, intake of antioxidant supplements, aspirin or any other drug with established antioxidant properties, hyperlipidemia, obesity (body mass index (BMI) >30 kg/m²), diabetes, hypertension, celiac or other intestinal disease, any condition limiting mobility, life-threatening diseases, or any other disease or condition that would impair compliance. Five subjects declined to participate for personal reasons before olive oil type allocation. Fifty-three subjects (27 men and 26 women) aged from 20 to 50 years from the general population of Granada were enrolled in the study from February 2014 to July 2014 and were assigned into groups. Two subjects did not complete the study. After the first intervention, one subject refused to continue for personal reasons, and the other did not follow the protocol correctly. At the end of the experimental period, 51 subjects remained in the study (Figure 1) [14]. All subjects provided written informed consent according to the principles of the Declaration of Helsinki, and the local institutional review board, the Ethics Committee Research Centre of Granada, approved the protocol (13/11 C38).

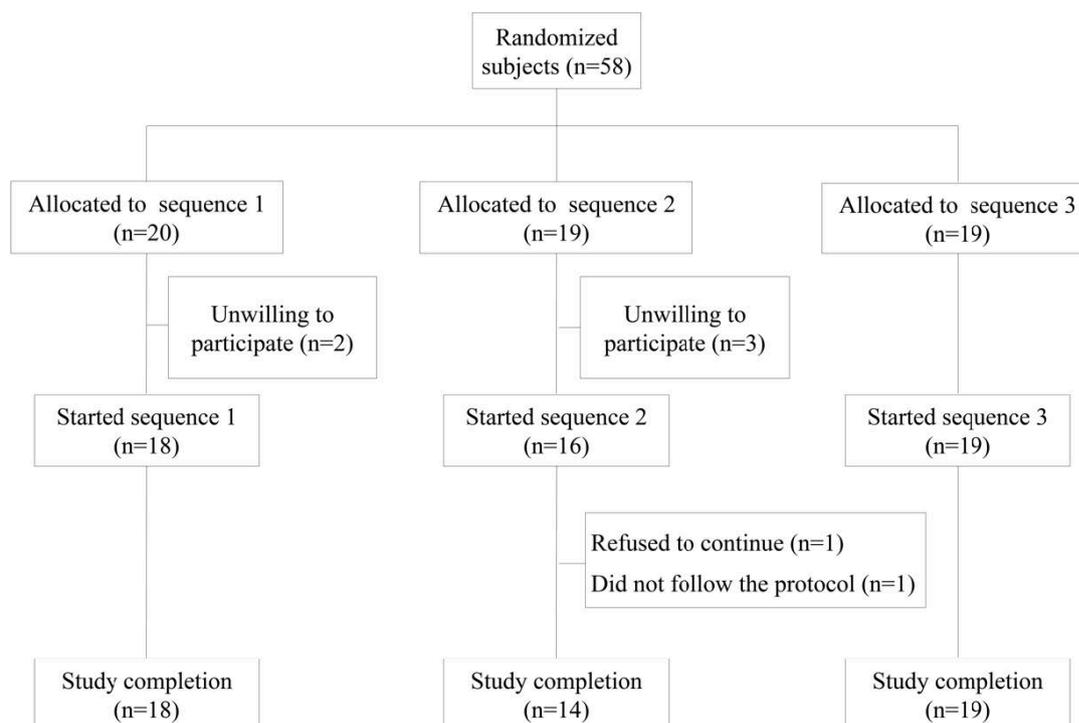


Figure 1. CONSORT Based Flow Diagram of the recruitment, enrollment and randomization process.

2.2. Study Design

The NUTRAOLEUM study has been designed to evaluate the effects of VOO high in phenolic compounds and enriched with triterpenes, maslinic and oleanolic acids, from olive exocarp, on MS features and endothelial function risk biomarkers in comparison with a standard VOO. The characteristics of the olive oils used in the study, the design of the study, and the detailed study procedures of the sustained consumption study have been previously published [14]. In brief, the trial was a randomized, crossover, controlled and double-blind clinical trial involving three oils: (1) an optimized VOO high in phenolic compounds (OVOO) (490 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenes) produced from Picual olives (Andalucía, Spain); (2) a functional olive oil (FOO), that was the same OVOO high in phenolic compounds (487 ppm) and enriched with triterpenes (389 ppm) from olive exocarp; and (3) a VOO obtained from the OVOO after washing to eliminate the majority of phenolic compounds (124 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenes).

San Francisco de Asís Cooperative (Montefrío (Granada), Spain) provided the olive oils used in the present study. Daily doses of 30 mL of the three types of raw olive oils, as recommended by the US Food and Drug Administration [15], were distributed over three meals. Olive oils were blindly prepared in special containers; the three types of olive oil were labeled “A”, “B”, and “C”. Containers with the corresponding 30 mL olive oil daily dose and enough amount of the same oil for cooking during each intervention period were delivered to the subjects at the beginning of each intervention

period. The subjects were randomly assigned to three orders of administration of olive oil, paired by gender and age, using the block-randomization method of a software program for sequence generation [14]. The randomization lists were concealed in a lightproof sealed envelope. The sealed envelopes were kept by the independent statistician during the study, avoiding the breaking of the seal. Thus, the subjects, investigators, and outcome assessors were blinded and could not foresee the treatment allocation throughout the study. Hence, blinding of outcome assessment was also ensured. According to previous published studies, olive oils were sequentially administered over three periods of 3 weeks [16] preceded by two weeks of washout periods [17] during which the subjects were requested to avoid olives and olive oil consumption. A nutritionist personally advised subjects on replacing all types of habitually consumed raw fats using only the assigned oil. The advantage of using a crossover design is that each subject served as his or her own control. Olive oils were specially prepared for the trial and differed only in phenolic compound and triterpenes contents (Table 1). The oils were prepared in dark, sealed containers and were similar in appearance and color, thus ensuring blinding of the subjects and study personnel. The trial has been registered at ClinicalTrials.gov ID: NCT02520739.

Table 1. Characteristics of the administered olive oils.

	VOO	OVOO	FOO
Fatty Acid Profile (%)			
C18:0	2.3	2.2	2.1
C18:1n9	78.9	78.2	78.4
C18:2n6	6.6	6.8	6.9
C18:3n3	0.6	0.7	0.7
C20:0	0.4	0.4	0.4
C20:1	0.3	0.4	0.4
C22:0	0.1	0.1	0.1
C24:0	<0.1	<0.1	<0.1
Total phenolic compounds (ppm)			
Hydroxytyrosol and derivates	105	424.0	423.0
Lignanes	18.2	61.3	59.2
Flavonoids	0.7	3.4	3.2
Simple phenols	0.0	0.9	0.9
Total triterpenes (mg/kg)			
Maslinic acid	47.3	47.3	217.7
Oleanolic acid	39.2	39.1	171.1
Ursolic acid	<10	<10	<10
α-tocopherol (ppm)			
Squalene (mg/100 g)	529.2	536.2	545.5
Total pigments (ppm)	15.73	17.59	16.78
Total carotenoid pigments (ppm)	7.08	6.79	6.97
Total sterols (ppm)	1437	1396	1460

FOO, functional olive oil; OVOO, optimized virgin olive oil; VOO, virgin olive oil.

2.3. Evaluation of Dietary Intake

Subjects completed a 3-day dietary record at baseline and during each intervention period [18]. Energy consumption and dietary intakes of macro- and micronutrients data were processed using

CSG software (General ASDE) and the Spanish Food Composition Database (BEDCA) for the subjects who completed the intervention [19].

2.4. Blood Sample Collection

Fasting venous blood samples were collected at the beginning of the study (baseline) and before (pre-intervention, after the washout period) and at the end (post-intervention) of each olive oil intervention period using EDTA-coated tubes. Three-milliliter aliquots were stored at 4°C for the ex vivo experiments. The rest of the blood samples were centrifuged (4°C, 10 min at 1750 x g), and plasma aliquots were immediately frozen and stored at -80° C until analysis.

2.5. Ex-Vivo Whole Blood Cultures

An aliquot of blood samples (as indicated above) were collected using lithium–heparin tubes (BD Vacutainer System, Heidelberg, Germany) from a subsample of 36 subjects. Blood was diluted 1:3 with Dulbecco's modified Eagle's medium and agitated gently in 3-mL tubes (Greiner Bio-one, Solingen, Germany) within 3 h after collection. One-milliliter aliquots were seeded in each well of 24-well plates (Nunc, VWR International GmbH, Langenfeld, Germany) and cultured for 24 h at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂. From each blood drawing, we performed triplicate incubations in parallel with positive and negative controls, separate cultures that included phytohaemagglutinin (PHA, 10 µg/mL), E. coli lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL) and phorbol 12-myristate 13-acetate plus ionomycin (PMA, 25 ng/mL + IO, 1 µg). The same lots of PHA, LPS, PMA + IO and phosphate buffered saline were used in all experiments. Blood cultures were removed from each well and centrifuged at 700 x g for 5 min at 20°C. The resulting supernatants (plasma) were aliquoted and pooled from eight subjects from each of the three assigned orders of administration of olive oil and stored at -20°C until further analysis of endothelin-1 [20,21].

2.6. Measurement of Metabolic Syndrome Biomarkers

In the fasting state, anthropometric measurements (weight, height and waist circumference) were determined at baseline and before and after each intervention period by the same member of the professional staff. For all measurements, the subjects did not wear shoes. MS biomarkers were determined as primary outcomes. BMI was calculated as weight (kg) divided by height squared (m²). Total cholesterol, triacylglycerols and serum glucose were determined by standard enzymatic methods using a PENTRA-400 autoanalyzer (ABX-Horiba Diagnostics, Montpellier, France). Plasma HDLc was measured as soluble HDLc as determined using an accelerator selective detergent method (ABX-Horiba Diagnostics). Plasma low density lipoprotein cholesterol (LDLc) concentrations were calculated using the Friedewald formula. Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were measured with a mercury sphygmomanometer after a minimum of 10 min resting in the seated position; the average of two measurements was recorded. The pulse pressure was calculated as the difference between SBP and DBP. Total cholesterol, triacylglycerols, serum glucose, HDLc and LDLc could only be measured for 46 subjects.

2.7. Measurement of Selected Plasma Hormones and Endothelial Function Biomarkers

A Milliplex Map Kit, human monoclonal antibody kits (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) were used according to the manufacturer's instructions in conjunction with a Luminex® 200 system with the XMap technology (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) to determine the concentrations of the following biomarkers as secondary outcomes: adiponectin (coefficient of variation (CV): 10.3%), resistin (CV: 7.7%), soluble intercellular adhesion molecule (sICAM-1) (CV: 6.1%) and soluble vascular adhesion molecule (sVCAM-1) (CV: 5.4%), (Cat. #HADK1MAG-61K). Endothelin-1 was determined as a secondary outcome by ELISA (CV: 7.2%) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Cat. DET100) in both plasma and whole blood culture supernatants.

2.8. Measurements of Triterpenes and Phenolic Compounds in Urine

To ensure the subjects' compliance with the assigned intervention, triterpenes (maslinic and oleanolic acid) derivatized with 2-picolylamine (see Appendix A) and olive oil phenolic compounds (hydroxytyrosol and metabolites) were analyzed in 24-h urine from 12 random subjects by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer [22].

2.9. Statistical Analysis

Baseline data are presented as the mean values standard error of the mean (SEMs) unless otherwise indicated. The normality of variables was assessed using Q-Q graphs. The 2 test was used for categorical variables to determine differences in the baseline. One-factor ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used (depending on whether the normality assumption was met) for continuous variables to determine differences among the three olive oil interventions, in terms of baseline characteristics, nutrient intake and for the ex vivo endothelin-1 experiment. Biochemical parameters are presented as adjusted mean values \pm SEMs and were analyzed using a linear mixed-effects model (LMM). The normality of the residues was evaluated using Q-Q graphs. Missing data were imputed using appropriate methods. The outliers for each intervention were removed if kurtosis > 1 and asymmetry > 1 in the distribution of the responses. In all cases, more than 80% of the data were analyzed. Variables with a skewed distribution were logarithm-transformed for analysis (nutritional variables and resistin). A LMM was used to compare variables before and after each intervention (pre- vs. post-interventions, intra-treatment effect) and to compare the results between the groups after the 3-week intervention (inter-treatment effect), adjusting for age, gender, pre-intervention and period as fixed effects and for subjects and hospital as random effects. The same model was also used to compare changes of the variables (post-intervention minus pre-intervention) without adjusting for pre-intervention. Carryover effects were assessed as the interaction between period and intervention [23]. The multiple comparison post hoc is given by the estimated means in the model (adjusted by Sidak). This statistical model (LMM) takes into account all the possible confounders (covariates) which are included on it. In addition, the baselines are used as outcomes but without effect, so they can act as a control and take into account a possible carryover effect [24]. Within the LMMs, the factor treatment, time and the random effect considered by participant are taken into account in the structure of the data.

In addition, an interaction term was checked for differences on the effect part intervention by gender. Model goodness-of-fit was tested using residual plots. The Bayesian Information Criterion was used to assess model reduction and the selection of variables and interactions. We performed all analysis on an intention-to-treat basis. A $p < 0.05$ value was considered significant. Statistical Package for the Social Sciences version 20 software was used to perform the statistical analysis (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Baseline Characteristics

Tables 2 and 3 show the clinical and biochemical characteristics, and the average daily nutritional intakes, respectively, of the subjects grouped according to the sequence of olive oil administration at the beginning of the study. No differences were observed among the three groups of subjects at baseline.

Table 2. Clinical and biochemical characteristics of subjects at baseline according to olive oil administration sequence.

Characteristics	Sequence 1	Sequence 2	Sequence 3
Age, years	32 ± 2	29 ± 2	28 ± 2
Gender, male <i>n</i> (%)	12 (60)	10 (53)	8 (42)
BMI, kg/m ²	24 ± 1	24 ± 1	24 ± 1
Waist circumference, cm	80 ± 2	78 ± 3	77 ± 2
Males	80 ± 3	82 ± 4	82 ± 2
Females	81 ± 5	73 ± 3	73 ± 2
HDLc, mg/dL	58 ± 2	58 ± 3	59 ± 2
Males	55 ± 3	51 ± 3	52 ± 3
Females	64 ± 2	65 ± 5	64 ± 3
LDLc, mg/dL	117 ± 9	107 ± 7	102 ± 5
Total cholesterol, mg/dL	192 ± 10	180 ± 7	175 ± 7
Triacylglycerols, mg/dL	87 ± 7	81 ± 13	67 ± 5
Glucose, mg/dL	90 ± 2	92 ± 2	87 ± 2
Adiponectin, mg/L	11.40 ± 1.38	12.49 ± 1.69	17.20 ± 2.78
Resistin, µg/L	16.38 ± 1.88	16.57 ± 1.82	15.26 ± 1.69
SBP, mmHg	121 ± 2	120 ± 3	118 ± 3
DBP, mmHg	77 ± 2	74 ± 2	71 ± 2
Pulse pressure, mmHg	44 ± 2	46 ± 3	47 ± 2
Endothelin-1, pg/mL	1.35 ± 0.08	1.36 ± 0.10	1.38 ± 0.12
sICAM, ng/mL	74.48 ± 4.50	62.26 ± 3.16	66.10 ± 4.63
sVCAM, ng/mL	459 ± 21	459 ± 30	443 ± 25

Values are expressed as the means ± SEMs. ANOVA and χ^2 tests were used to compare results between groups. Sequence 1: OVOO, VOO and FOO olive oil, $n = 20$; Sequence 2: VOO, FOO and OVOO olive oil, $n = 19$; Sequence 3: FOO, OVOO and VOO olive oil, $n = 19$. BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; FOO, functional olive oil; HDLc, high density lipoprotein cholesterol; LDLc, low density lipoprotein cholesterol; n , number of observations; OVOO, optimized virgin olive oil; SBP, systolic blood pressure; SEM, standard error of the mean; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule; VOO, virgin olive oil.

Table 3. Average daily energy and selected nutrient intake of subjects at baseline according to olive oil administration sequence.

Nutritional Characteristics	Sequence 1	Sequence 2	Sequence 3
Energy, kcal	1976 ± 90	2151 ± 138	2074 ± 109
Total carbohydrates, g	200 ± 10	213 ± 16	214 ± 13
Proteins, g	80 (16–222)	96 (37–258)	93 (21–215)
Total fat, g	86 ± 4	102 ± 10	89 ± 6
MUFA, g	31 (12–80)	33 (6–85)	33(6–89)
PUFA, g	13 (3–43)	11 (1–44)	14 (2–49)
SFA, g	21 (6–64)	27 (11–80)	26 (4–66)
Vitamin A, µg retinol equivalents	440 (111–1552)	512 (109–158)	539 (7–1669)
Vitamin C, mg ascorbic acid	70 (4–400)	88 (11–428)	81 (3–335)
Vitamin D, µg	2 (0–41)	2 (0–40)	2 (0–34)
Vitamin E, mg α-tocopherol equivalents	9 (2–29)	9 (1–67)	11 (1–39)
Cholesterol, mg	284 ± 26	354 ± 31	287 ± 24
Alcohol, g	0 (0–52)	0 (0–48)	0 (0–84)
Selenium, µg	31 (5–130)	34 (1–114)	36 (3–117)

Values are expressed as the means ± SEMs or as medians (range). ANOVA was used to compare results between groups for those variables that followed normality, and the Kruskal Wallis test was used for those that did not. Data of 51 subjects were obtained from the 3-day dietary record at baseline. Sequence 1: OVOO, VOO and FOO olive oil, $n = 54$; Sequence 2: VOO, FOO and OVOO olive oil, $n = 42$; Sequence 3: FOO, OVOO and VOO olive oil, $n = 57$. FOO, functional olive oil; MUFA, monounsaturated fatty acids; n , number of observations; OVOO, optimized virgin olive oil; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SEM, standard error of the mean; SFA, saturated fatty acids; VOO, virgin olive oil.

3.2. Nutritional Analysis

Table 4 shows the average daily energy and selected nutrient intakes after the three olive oil interventions. No differences were observed among the three interventions (Table 4).

Table 4. Average daily energy and selected nutrient intake of subjects after the three olive oil interventions.

Nutritional Characteristics	VOO	OVOO	FOO
Energy, kcal	1983 (873–4342)	2006 (697–4561)	1914 (780–3457)
Total carbohydrates, g	199 (47–408)	203 (30–531)	175 (38–533)
Proteins, g	77 (24–180)	80 (17–200)	73 (25–207)
Total fat, g	89 (27–244)	94 (24–257)	91 (20–227)
MUFA, g	44 (8–119)	44 (8–113)	45 (9–123)
PUFA, g	11 (4–37)	12 (4–36)	13 (3–41)
SFA, g	25 (7–74)	27 (6–82)	24 (5–69)
Vitamin A, µg retinol equivalents	433 (34–1477)	427 (26–1504)	452 (39–1515)
Vitamin C, mg ascorbic acid	48 (0–280)	60 (0–255)	55 (1–305)
Vitamin D, µg	1.5 (0–32)	1.2 (0–82)	1.2 (0–81)
Vitamin E, mg α-tocopherol equivalents	10 (2–30)	11 (3–32)	11 (2–32)
Cholesterol, mg	285 (11–981)	253 (28–853)	272 (15–1011)
Alcohol, g ethanol	0 (0–97)	0 (0–54)	0 (0–78)
Selenium, µg	30 (0–260)	31 (0–198)	31 (1–160)

Values are expressed as median (range). ANOVA was used to compare intakes between interventions. Data for 51 subjects were obtained from the 3-day dietary record at baseline. Data for 51 subjects were obtained from the 3-day dietary record at baseline. FOO, functional olive oil; MUFA, monounsaturated fatty acids; n , number of observations; OVOO, optimized virgin olive oil; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; VOO, virgin olive oil.

3.3. Plasma Metabolic Syndrome and Endothelial Function Biomarkers

Table 5 shows MS and endothelial function biomarker data before and after the three interventions. All clinical and biochemical MS biomarkers were within normal values at the beginning and at the end of the study. BMI, waist circumference, pulse pressure, and fasting plasma glucose, adiponectin and resistin concentrations were unchanged during the study.

When comparing pre- vs. post-intervention data (intra-treatment effect), HDLc levels significantly increased only after the OVOO intervention ($p = 0.041$), and only in females ($p = 0.005$). However, no differences were observed between the three interventions. Total cholesterol increased after the FOO intervention ($p = 0.021$). LDLc was unaffected. Fasting plasma triacylglycerol concentrations increased after the VOO and OVOO interventions ($p = 0.037$ and $p = 0.002$, respectively) but not after the FOO intervention. However, plasma triacylglycerols were low at the beginning of the study (78 ± 5 mg/dL). On the other hand, SBP decreased after the VOO intervention ($p = 0.019$) and increased after the FOO intervention ($p = 0.004$), while DBP and pulse pressure were unchanged after the three interventions. Plasma endothelin-1 concentrations decreased after the VOO, OVOO, and FOO interventions ($p = 0.006$, $p = 0.006$ and $p = 0.014$, respectively), and the plasma concentrations of sICAM-1 and sVCAM-1 were unchanged after the three interventions.

When analyzing the inter-treatment effects, LDLc levels were higher after the FOO intervention compared with the OVOO intervention ($p = 0.033$), and SBP was higher after the FOO intervention compared with the VOO intervention ($p = 0.001$). The changes in metabolic clinical variables and endothelial function biomarkers (Supplementary Table S1) were similar in all the subjects after the three interventions except SBP, which increased up to 118 mmHg after the FOO but decreased after the VOO and OVOO interventions (up to 115 and 116 mmHg, respectively) ($p < 0.001$). The results show differences by gender for all interventions. However, no interactions were observed between gender and intervention.

3.4. Plasma Endothelin-1 Ex Vivo Experiments

Before the three interventions, pooled blood cultures challenging with PHA, LPS, or PMA + IO induced a potent increase in the supernatant concentrations of endothelin-1 in whole blood cultures.

Figure 2 shows that the supernatant endothelin-1 concentration changes (post-intervention minus pre-intervention data) in whole blood cultures from the subjects were similar after the VOO and OVOO interventions and were significantly lower after the FOO intervention: -26.7 ± 15.3 pg/mL, -41.0 ± 12.9 pg/mL, and -119.5 ± 28.5 pg/mL for the VOO, OVOO and FOO interventions, respectively ($p = 0.035$), when stimulating with PHA; -30.3 ± 6.5 pg/mL, -58.2 ± 10.1 pg/mL and -109.6 ± 9.7 pg/mL for the VOO, OVOO, and FOO interventions, respectively, when stimulating with LPS ($p = 0.002$); and -38.9 ± 3.4 pg/mL, -50.8 ± 8.5 pg/mL and -87.0 ± 11.1 pg/mL for the VOO, OVOO, and FOO interventions, respectively, when stimulating with PMA+IO ($p = 0.015$).

Table 5. Metabolic syndrome and endothelial function biomarkers before and after each olive oil intervention in healthy adults.

Characteristics	VOO			OVOO			FOO		
	Pre-Intervention	Post-Intervention	Pre-Intervention	Post-Intervention	Pre-Intervention	Post-Intervention	Pre-Intervention	Post-Intervention	
BMI, kg/m ²	23.9 ± 0.1	24 ± 0.1	23.9 ± 0.1	24 ± 0.1	24 ± 0.1	24 ± 0.1	24 ± 0.1	24 ± 0.1	
Waist circumference, cm	77.4 ± 0.7	77.2 ± 0.7	77.2 ± 0.7	76.8 ± 0.7	77.4 ± 0.7	76.9 ± 0.7	77.4 ± 0.7	76.9 ± 0.7	
HDLc, mg/dL	58 ± 2	59 ± 2	57 ± 2	60 ± 2*	58 ± 2	60 ± 2	58 ± 2	60 ± 2	
Males	52 ± 2	53 ± 2	52 ± 2	52 ± 2	52 ± 2	54 ± 2	52 ± 2	54 ± 2	
Females	64 ± 2	65 ± 2	63 ± 2	67 ± 2*	65 ± 2	66 ± 2	65 ± 2	66 ± 2	
LDLc, mg/dL	105 ± 4	108 ± 4 ^{a,b}	104 ± 4	106 ± 4 ^a	104 ± 4	111 ± 4 ^b	104 ± 4	111 ± 4 ^b	
Total cholesterol, mg/dL	179 ± 5	182 ± 5	177 ± 5	183 ± 5	178 ± 5	186 ± 5*	178 ± 5	186 ± 5*	
Triacylglycerols, mg/dL	72 ± 7	75 ± 7*	74 ± 7	81 ± 7*	75 ± 7	75 ± 7	75 ± 7	75 ± 7	
Glucose, mg/dL	91 ± 2	91 ± 2	91 ± 2	91 ± 2	90 ± 2	91 ± 2	90 ± 2	91 ± 2	
Adiponectin, mg/L	13.74 ± 1.7	12.8 ± 1.7	12.48 ± 1.7	13.6 ± 1.71	12.62 ± 1.71	13.74 ± 1.71	12.62 ± 1.71	13.74 ± 1.71	
Resistin, µg/L	14.1 ± 1.1	14.1 ± 1.1	14.5 ± 1.1	13.8 ± 1.1	13.8 ± 1.1	14.1 ± 1.1	13.8 ± 1.1	14.1 ± 1.1	
SBP, mmHg	117 ± 3	115 ± 3 ^{*a}	119 ± 3	116 ± 3 ^{a,b}	114 ± 3	118 ± 3 ^{*b}	114 ± 3	118 ± 3 ^{*b}	
DBP, mmHg	72 ± 2	72 ± 2	75 ± 2	73 ± 2	72 ± 2	74 ± 2	72 ± 2	74 ± 2	
Pulse pressure, mmHg	45 ± 1	43 ± 1	44 ± 1	42 ± 1	42 ± 1	45 ± 1	42 ± 1	45 ± 1	
Endothelin-1, pg/mL	1.53 ± 0.15	1.38 ± 0.15*	1.58 ± 0.15	1.41 ± 0.15*	1.49 ± 0.15	1.35 ± 0.15*	1.49 ± 0.15	1.35 ± 0.15*	
sICAM-1, ng/mL	68.09 ± 3.19	67.11 ± 3.19	65.17 ± 3.20	67.73 ± 3.19	65.1 ± 3.20	66.7 ± 3.21	65.1 ± 3.20	66.7 ± 3.21	
sVCAM-1, ng/mL	451 ± 22	443 ± 23	435 ± 22	451 ± 22	431 ± 22	442 ± 23	431 ± 22	442 ± 23	

Values are expressed as the adjusted means ± SEMs. LMM was used to compare pre-intervention vs. post-intervention with each oil data, and data after the three interventions (post-interventions). * Significant differences between pre-intervention vs. post-intervention data within each intervention with the three olive oils. Different superscript letters indicate significant differences between post-intervention results (^{a,b}). $p < 0.05$ was considered significant. DBP, diastolic blood pressure; FOO, functional olive oil; HDLc, high density lipoprotein cholesterol; LDLc, low density lipoprotein cholesterol; OVOO, optimized virgin olive oil; SBP, systolic blood pressure; SEM, standard error of the mean; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule; VOO, virgin olive oil.

Supplemental Figure S1 shows the supernatant endothelin-1 concentrations that were induced ex vivo with PHA, LPS, and PMA + IO in whole blood cultures from the subjects before and after the three interventions. After the VOO, OVOO, and FOO interventions, challenging with LPS or PMA + IO induced a significantly lower increase of endothelin-1 secretion in whole blood cultures, while challenging with PHA induced a significantly lower increase of endothelin-1 secretion only after the OVOO and FOO interventions.

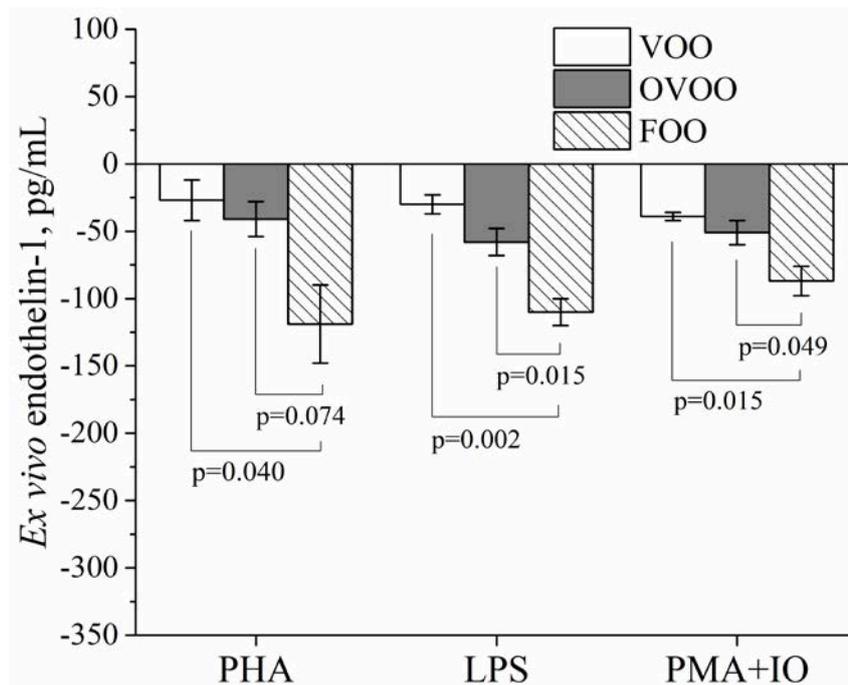


Figure 2. Plasma endothelin-1 ex vivo changes (post-intervention minus pre-intervention data) when stimulated with PHA, LPS or PMA + IO in whole blood cultures from healthy adults. Values are expressed as the means \pm SEMs. ANOVA was used to compare differences between interventions and induction treatments. The Tukey post-hoc test was used for multiple comparisons among groups. $p < 0.05$ was considered significant. FOO, functional olive oil; IO, ionomycin; OVOO, optimized virgin olive oil; PHA, phytohemagglutinin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; VOO, virgin olive oil.

3.5. Biomarkers of Intervention Compliance

Recoveries of triterpenes in urine were consistent with the olive oils consumed in each intervention. Figure 3 shows urinary triterpenes changes (post-intervention minus pre-intervention data) for each olive oil intervention. The amounts of both triterpenic acids in urine after the FOO intervention were about four times higher than those recovered after the VOO and OVOO interventions ($p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively, for maslinic acid, and $p = 0.026$ and $p < 0.001$, respectively, for oleanolic acid). Urine concentrations of total hydroxytyrosol (the sum of

hydroxytyrosol and its glucuronide and sulfate conjugates) were higher after the OVOO (2444 mM, $p = 0.003$) and FOO (2876 mM, $p = 0.002$) interventions than after the VOO (115 mM, $p = 0.011$) intervention.

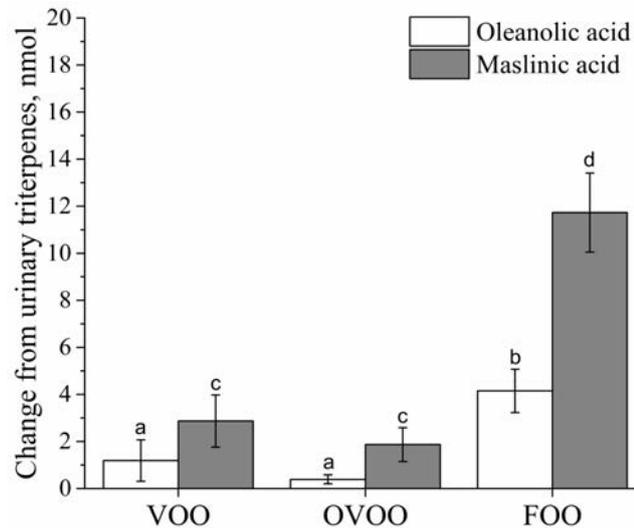


Figure 3. In vivo urinary triterpenes changes (post-intervention minus pre-intervention data) for each olive oil intervention in healthy adults. Values are expressed as the means \pm SEMs. ANOVA was used to compare differences between the three interventions. Different superscript letters indicate significant differences between the interventions for oleanolic acid (a,b) and for maslinic acid (c,d). $p < 0.05$ was considered significant. FOO, functional olive oil; OVOO, optimized virgin olive oil; VOO, virgin olive oil.

4. Discussion

The NUTRAOLEUM study is the first human nutritional clinical trial concerning the effects of VOO that is high in phenolic compounds and enriched with triterpenes, maslinic and oleanolic acids, from olive exocarp, on MS features and endothelial function risk biomarkers in comparison with standard VOO in healthy subjects. The PREDIMED study reported that a MD supplemented with at least 50 g of dietary VOO caused a reversion of MS after a median follow-up of 4.8 years [25], reducing the rate of CVD events by 30% compared with a low-fat diet control group [26]. In addition, this MD enriched with VOO and without energy restrictions reduced the diabetes risk among individuals at high cardiovascular risk [27]. Consumption of VOO close to 2.7, 164 or 366 ppm/day of phenolic compounds in humans, a 0.03% of hydroxytyrosol in a rodent model, and 50 ppm/day of hydroxytyrosol in a murine model have been reported to improve the blood lipid profile, although results in mice were not conclusive [28], possibly due to differences in the phenolic content of the olive oil and the physio-pathology of the studied animals. Polyphenols from olive oils have been shown to provide additional benefits on HDLc, other than those provided by the MUFA content. However, contradictory data exists on these benefits. In 2015, a meta-analysis reported no effect on HDLc concentration after the intake of VOO with at least 150 ppm of phenolic compounds [29], while, in accordance with our results, a recent systematic review [30] concluded that plasma HDLc

was increased in different studies consuming from 2.28 to 75 g/day of olive oil. In the EuroLIVE Study, a European multicenter study, three olive oils (refined, medium and high) differing in their phenolic compound content (2.7, 164 and 366 ppm/day of phenolic content, respectively) increased HDLc and decreased triacylglycerol concentrations [16]. The increase in HDLc was linear with the olive oil polyphenol content. This additional benefit has also been described in healthy and hypercholesterolemic subjects treated with polyphenol-enriched VOO [31] when excluding patients treated with hypolipidemic medication. Additionally, the increase of olive oil polyphenols in the lipoprotein fraction may increase HDL size, stability, and antioxidant status [32]. It has been reported that the daily intake of olive oils enriched with its own polyphenols (250 ppm or 500 ppm), as well as the intake of olive oil enriched in polyphenols from thyme (250 ppm/day) decrease LDLc and improve the lipoprotein subclass distribution and associated ratios [33]. Other authors have described that a one-year intervention with a MD enriched with VOO improved several LDL characteristics related to its atherogenicity (resistance against oxidation, size, composition, and cytotoxicity) but did not modify the plasma LDLc concentrations in a subsample of subjects at high cardiovascular risk in the PREDIMED study [34]. Our results are consistent with this null effect of VOO on LDLc. On the other hand, besides the weak increase in plasma triacylglycerols observed after interventions with both VOO and OVOO, this was without clinical significance given that levels were low at baseline and remain low at the end of the three interventions, and thus it did not increase cardiovascular risk in these healthy subjects (triacylglycerols < 150 mg/dL) [35]. Our results are in contrast with the triacylglycerol improvement reported in the EUROLIVE Study [16]. A recent meta-analysis and systematic review focused on high polyphenol VOO concluded no effect on plasma triacylglycerol concentrations [29]; in addition, Saibandith et al. [36] stated that the effect of olive oil polyphenols on plasma triacylglycerols remained unclear. However, longer studies are needed to clarify this issue. To the best of our knowledge, this is the first clinical trial evaluating the effect of olive oil triterpenes on plasma lipids and endothelial function biomarkers. Previous animal studies have reported different effects of oleanolic acid on plasma lipids, depending on the experimental animal model [37]. Based on our results, FOO enriched with triterpenes did not modify plasma HDLc, LDLc, or triacylglycerols, but increased plasma total cholesterol concentrations, although no inter-group significance was found. However, although these modifications do not represent an increase in cardiovascular risk since the values are low enough to be considered safe (total cholesterol < 190 mg/dL) [35], further human clinical trials are needed to demonstrate the potential benefit of olive phenolic compounds and triterpenes on plasma lipid concentrations over longer intervention periods.

Endothelial dysfunction is a critical early event in the development of atherosclerosis [38]. An imbalance between vasodilating and vasoconstricting molecules, such as nitric oxide and endothelin-1, respectively, contributes to the pathogenesis of hypertension and its complications [39]. Our results indicate that plasma endothelin-1 levels decreased after the VOO, OVOO and FOO

interventions, and these results were also confirmed throughout ex vivo blood culture experiments. Although endothelin-1 is mainly produced from vascular endothelial cell, several

studies have suggested that blood cells, such as polymorphonuclear neutrophils [40] and T-Cells [41], and also macrophages [42] are responsible from circulating levels of endothelin-1. In addition, *ex vivo* experiment has demonstrated the release of the mature peptide after LPS and LPS + PMA stimulation [40]; Mencarelli et al. [43] have confirmed these results. As demonstrated here, endothelin-1 production was decreased after the three interventions. This effect may be beneficial for cardiovascular risk affected people, since the effect of endothelin-1 has been documented on endothelial and inflammatory cells, which contributes to pathophysiological processes such as vascular hypertrophy, cell proliferation, fibrosis and inflammation [44–46]. In humans, the consumption of VOO has shown benefits on blood pressure and endothelial function [47]. In agreement with our results, a meta-analysis stated that olive oils with at least 150 ppm of phenolic compounds exert a moderate effect on lowering SBP and no effects on DBP [29]. Regarding triterpenes, besides the weak SBP increase observed after this intervention, no clinical significance was observed as blood pressure remained under 130 mmHg and did not increase cardiovascular risk [35]. It is reported that SBP varies to a greater degree than DBP [48,49]. For this reason, we calculated pulse pressure and found no significant effect of FOO. A beneficial effect of triterpenes on endothelial function [50] and blood pressure [51] has been described in animal models of hypertension, but further studies are required to explore the mechanisms involved in the effect of specific components of VOO on endothelin-1 regulation. *In vitro* studies showed that minor olive oil components, specifically hydroxytyrosol and its metabolites, down-regulate the secretion of E-selectin, p-selectin, sICAM-1, and sVCAM-1, affecting endothelial function [52]. However, and in agreement with our results, no differences in sICAM-1 or sVCAM-1 plasma concentrations were reported after 50 mL of VOO or refined olive oil consumption containing (161 or 14.67 ppm/day of phenolic compounds, respectively) in coronary heart disease patients [53]. Another study found a significant reduction in sICAM-1 but not in sVCAM-1 concentrations after the intake of 50 mL/day of olive oil [54]. Recently, it has been proposed that the intake of 25 mL/day of VOO containing 366 ppm of phenolic compounds modulates the expression of several genes related to the renin-angiotensin-aldosterone system [55]. Therefore, further longer studies are needed to reach final conclusions about the effect of VOO minor compounds on molecules modulating endothelial function. One of the limitations of the present study is that young and healthy subjects are recruited as target population. The present intervention does not appear sufficient to draw definitive conclusions. Therefore, new studies in older subject affected by metabolic syndrome and endothelial dysfunction would be interesting in order to evaluate the beneficial effect of VOO components. Although no differences in dietary intakes were observed during the three interventions, measurements of dietary intake relied on self-reporting and were therefore subjective. Another limitation of this study is that dietary records for the washout periods were not recorded, thus we cannot analyze dietary intakes during these periods. In addition, our subjects live in the south of Spain, where MD and VOO are highly consumed. Therefore, a 3-week intervention is not long enough to cause significant changes. Further studies are required to find conclusions related to the bioactive compounds present in olive oils, and to explore the mechanisms involved in these effects of specific components of VOO on MS and endothelial function.

5. Conclusions

In conclusion, olive oil rich in polyphenols increased HDLc levels in females, although no differences were found at the end of the three interventions, and improved an endothelial function biomarker both in vivo and ex vivo. No additional benefits were obtained from triterpenes VOO enrichment after 3-wk supplementation. However, further longer studies are warranted on olive oil triterpenes and their health benefits in older subjects particularly in those affected by metabolic syndrome and endothelial dysfunction. Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/5/626/s1>, Figure S1: Plasma endothelin-1 ex vivo secretion in whole blood cultures from healthy adults before and after 3 weeks of intervention with the three olive oils and PHA, LPS or PMA + IO stimulation. Table S1: CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomized trial. Author Contributions: J.A.E.-C., B.G.-E., M.S.-F., R.d.I.T., M.F., M.-I.C., J.d.D.A., E.M.d.V., A.G., and M.D.M. designed the research. E.S.-R., S.B.-G., J.R.F.-N., M.A.C., and M.D.M. conducted the research. E.L.-C. and J.d.D.A. were responsible for the ex vivo analyses. M.R. carried out the olive oil analyses. R.d.I.T. carried out urine phenolic and triterpenic acid measurements. E.S.-R. carried out biochemical analyses. E.S.-R., E.L.-C., R.d.I.T., J.d.D.A., E.M.d.V. and M.D.M. analyzed the data and performed the statistical analysis. E.S.-R. wrote the paper. E.S.-R., E.M.d.V., A.G. and M.D.M. had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript. This paper contains results included in the doctoral thesis of Estefanía Sánchez Rodríguez, which was written within the context of Nutrition and Food Sciences at the University of Granada. Acknowledgments: The “NUTRAOLEUM Study” has been supported by the grant ITC-20131031 from the I+D FEDER-INTERCONNECTA (CDTI) and Junta de Andalucía, Spain”. We thank ACER CAMPESTRES S.L., SAN FRANCISCO DE ASIS Coop and AGROINSUR S.L., for the funding provided. The authors thank Pilar Jiménez, Alberto Guarnido, María Molina and Elizabeth García for administering the questionnaires to the subjects; Isabel Mérida, Isabel Hinojosa, Agustín Martín García, and María Luz Abarca for collecting the biological samples; and Victoria Martín Laguna and Laura Campaña Martín for aliquoting the samples. The authors also thank María Cruz Rico Prados for sample analysis and Llenalia M. García Fernández for her contributions to the statistical analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

Appendix A

Analysis of Triterpenes in Urine

For the analysis of maslinic acid (MA) and oleanolic acid (OA), aliquots of 250 μ L of urine were transferred into 15-mL screw-capped glass tubes and spiked with 1 ng/mL of d_3 -OA, 20 μ L of glucuronidase from *Escherichia coli* and 200 μ L of 0.1 M phosphate buffer pH 6.0. After overnight incubation in a water bath at 37 °C, 50 mg of $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1:2, w/w) was added to each tube before extraction. The samples were then subjected to a liquid-liquid extraction with 2 mL of methyl

tert-butyl ether. The mixture was homogenized in a shaker rotator for 20 min and centrifuged at 3500 rpm for 5 min at room temperature. The organic phase was transferred to clean tubes and evaporated (40 °C) under a stream of nitrogen. The extracts were then derivatized with 50 µL of 2-picolylamine (1 µg/µL in ACN). The reaction mixture was incubated for 10 min at 60 °C on a heating block and then dried under a nitrogen stream. Samples were reconstituted in 100 µL of ACN-H₂O MilliQ grade (1:1). Derivatized OA and MA in urine was quantified using an Acquity UPLC system, (Waters Associates, Milford, MA, USA) for the chromatographic separation, the column was coupled to a triple quadrupole (Quattro Premier) mass spectrometer provided with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (ESI) (Waters Associates). Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. The desolvation gas flow was set to approximately 1200 L/h, and the cone gas flow was set to 50 L/h. Capillary voltages of 3 kV and 2.5 kV were used in positive and negative ionization mode, respectively. The nitrogen desolvation temperature was set to 450 °C, and the source temperature was set to 120 °C. The collision gas was argon, and the flow rate was 0.21 mL/min. The liquid chromatography separation was performed at 55 °C using an Acquity CSH phenyl-hexyl column (100 mm, 2.1 mm i.d., 1.7 µm) (Waters Associates) operating at a flow rate of 300 µL min⁻¹. Water and methanol, both containing formic acid (0.01% v/v) and ammonium formate (1 mM), were selected as mobile phase solvents. For the target detection of derivatized OA and MA, a gradient program was used to separate the analytes; the percentage of organic solvent was linearly changed as follows: 0 min, 70%; 0.5 min, 70%; 7 min, 98%; 9 min, 98%; 9.5 min, 70%; and 11 min, 70%.

References

1. Sarafidis, P.A.; Nilsson, P.M. The metabolic syndrome: A glance at its history. *J. Hypertens.* 2006, 24, 621–626.
2. Alberti, K.G.; Zimmet, P.; Shaw, J. The metabolic syndrome—A new worldwide definition. *Lancet* 2005, 366, 1059–1062.
3. Freitas Lima, L.C.; Braga, V.A.; do Socorro de França Silva, M.; Cruz, J.C.; Sousa Santos, S.H.; de Oliveira Monteiro, M.M.; Balarini, C.M. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: An inflammatory association. *Front. Physiol.* 2015, 6, 1–15.
4. Gardener, H.; Wright, C.B.; Gu, Y.; Demmer, R.T.; Boden-Albala, B.; Elkind, M.S.; Sacco, R.L.; Scarmeas, N. Mediterranean-style diet and risk of ischemic stroke, myocardial infarction, and vascular death: The Northern Manhattan Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011, 94, 1458–1464.
5. Mayneris-Perxachs, J.; Sala-Vila, A.; Chisaguano, M.; Castellote, A.I.; Estruch, R.; Covas, M.I.; Fitó, M.; Salas-Salvadó, J.; Martínez-González, M.A.; Lamuela-Raventós, R.; et al. Effects of 1-Year Intervention with a Mediterranean Diet on Plasma Fatty Acid Composition and Metabolic Syndrome in a Population at High Cardiovascular Risk. *PLoS ONE* 2014, 9, e85202.

6. Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N. Engl. J. Med.* 2013, 368, 1279–1290.
7. Schwingshackl, L.; Christoph, M.; Hoffmann, G. Effects of Olive Oil on Markers of Inflammation and Endothelial Function-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2015, 7, 7651–7675. [CrossRef]
8. Covas, M.I.; de la Torre, K.; Farré-Albaladejo, M.; Kaikkonen, J.; Fitó, M.; López-Sabater, C.; Pujadas-Bastardes, M.A.; Joglar, J.; Weinbrenner, T.; Lamuela-Raventós, R.M.; et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 40, 608–616.
9. Tresserra-Rimbau, A.; Medina-Remón, A.; Pérez-Jiménez, J.; Martínez-González, M.A.; Covas, M.I.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Gómez-Gracia, E.; Lapetra, J.; Arós, F.; et al. Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013, 23, 953–959.
10. Storniolo, C.E.; Roselló-Catafau, J.; Pintó, X.; Mitjavila, M.T.; Moreno, J.J. Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biol.* 2014, 2, 971–977.
11. Sánchez-Quesada, C.; López-Biedma, A.; Warleta, F.; Campos, M.; Beltrán, G.; Gaforio, J.J. Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea europaea*. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 12173–12182.
12. Rodríguez-Rodríguez, R. Oleonic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* 2015, 22, 1414–1425.
13. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). General guidance for stakeholders on the evaluation of Article 13.1, 13.5 and 14 health claims. *EFSA J.* 2011, 9, 1–24.
14. Biel, S.; Mesa, M.-D.; de la Torre, R.; Espejo, J.-A.; Fernández-Navarro, J.-R.; Fitó, M.; Sánchez-Rodríguez, E.; Rosa, C.; Marchal, R.; Alche, J.D.; et al. The NUTRAOLEOUM Study, a randomized controlled trial, for achieving nutritional added value for olive oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 2016, 16, 404. [CrossRef]
15. FDA. U.S. Food and Drug Administration. Available online: <https://www.fda.gov/food/labelingnutrition/ucm073992.htm#cardio> (accessed on 28 March 2018).
16. Covas, M.-I.; Nyyssönen, K.; Poulsen, H.E.; Kaikkonen, J.; Zunft, H.-J.F.; Kiesewetter, H.; Gaddi, A.; de la Torre, R.; Mursu, J.; Bäumler, H.; et al. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors. *Ann. Intern. Med.* 2006, 145, 333–341.

17. Fielding, C.J.; Havel, R.J.; Todd, K.M.; Yeo, K.E.; Schloetter, M.C.; Weinberg, V.; Frost, P.H. Effects of dietary cholesterol and fat saturation on plasma lipoproteins in an ethnically diverse population of healthy Young men. *J. Clin. Investig.* 1995, 95, 611–618.
18. Yang, Y.J.; Kim, M.K.; Hwang, S.H.; Ahn, Y.; Shim, J.E.; Kim, D.H. Relative validities of 3-day food records and the food frequency questionnaire. *Nutr. Res. Pract.* 2010, 4, 142–148.
19. Base de Datos de Composición de Alimentos (BEDCA). Available online: <http://www.bedca.net/> (accessed on 28 March 2018).
20. Huisman, H.W.; Schutte, A.E.; van Rooyen, J.M.; Schutte, R.; Malan, L.; Fourie, C.M.T.; Malan, N.T. The Association of Red Blood Cell Counts with Endothelin-1 in African and Caucasian Women. *Clin. Exp. Hypertens.* 2009, 31, 1–10.
21. Walter, R.; Mark, M.; Gaudenz, R.; Harris, L.G.; Reinhart, W.H. Influence of nitrovasodilators and endothelin-1 on rheology of human blood in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 1999, 128, 744–750.
22. Pozo, O.J.; Pujadas, M.; Gleeson, S.B.; Mesa-García, M.D.; Pastor, A.; Kotronoulas, A.; Fitó, M.; Covas, M.I.; Navarro, J.R.F.; Espejo, J.A.; et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of triterpenes in human fluids: Evaluation of markers of dietary intake of olive oil and metabolic disposition of oleanolic acid and maslinic acid in humans. *Anal. Chim. Acta* 2017, 990, 84–95.
23. Senn, S. *Cross-over Trials in Clinical Research*, 2nd ed.; JohnWiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2002; pp. 35–53.
24. Liu, G.F.; Lu, K.; Mogg, R.; Mallich, M.; Mehrotra, D.V. Should baseline be a covariate or dependent variable in analyses of change from baseline in clinical trials? *Stat. Med.* 2009, 28, 2509–2530.
25. Estruch, R.; Salas-Salvadó, J. Towards an even healthier mediterranean diet. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013, 23, 1163–1166.
26. Babio, N.; Toledo, E.; Estruch, R.; Ros, E.; Martínez-González, M.A.; Castañer, O.; Bulló, M.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; et al. Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the PREDIMED randomized trial. *CMAJ* 2014, 186, E649–E657.
27. Salas-Salvadó, J.; Bulló, M.; Estruch, R.; Ros, E.; Covas, M.-I.; Ibarrola-Jurado, N.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; et al. Prevention of Diabetes with Mediterranean Diets. *Ann. Intern. Med.* 2014, 160, 1–10.
28. Peyrol, J.; Riva, C.; Amiot, M. Hydroxytyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Nutrients* 2017, 9, 306.

29. Hohmann, C.D.; Cramer, H.; Michalsen, A.; Kessler, C.; Steckhan, N.; Choi, K.; Dobos, G. Effects of high phenolic olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine* 2015, 22, 631–640.
30. Rondanelli, M.; Giacosa, A.; Morazzoni, P.; Guido, D.; Grassi, M.; Morandi, G.; Bologna, C.; Riva, A.; Allegrini, P.; Perna, S. MediterrAsian Diet Products that Could Raise HDL-Cholesterol: A Systematic Review. *BioMed. Res. Int.* 2016, 2016, 1–15.
31. Farràs, M.; Castañer, O.; Martín-Peláez, S.; Hernáez, Á.; Schröder, H.; Subirana, I.; Muñoz-Aguayo, D.; Gaixas, S.; de la Torre, R.; Farré, M.; et al. Complementary phenol-enriched olive oil improves HDL characteristics in hypercholesterolemic subjects. A randomized, double-blind, crossover, controlled trial. The VOHF study. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, 59, 1758–1770.
32. Hernaez, A.; Fernandez-Castillejo, S.; Farras, M.; Catalan, U.; Subirana, I.; Montes, R.; Sola, R.; Munoz-Aguayo, D.; Gelabert-Gorgues, A.; Diaz-Gil, O.; et al. Olive Oil Polyphenols Enhance High-Density Lipoprotein Function in Humans: A Randomized Controlled Trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014, 34, 2115–2119.
33. Fernández-Castillejo, S.; Valls, R.-M.; Castañer, O.; Rubió, L.; Catalán, Ú.; Pedret, A.; Macià, A.; Sampson, M.L.; Covas, M.-I.; Fitó, M.; et al. Polyphenol rich olive oils improve lipoprotein particle atherogenic ratios and subclasses profile: A randomized, crossover, controlled trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, 60, 1544–1554.
34. Hernáez, Á.; Castañer, O.; Goday, A.; Ros, E.; Pintó, X.; Estruch, R.; Salas-Salvadó, J.; Corella, D.; Arós, F.; Serra-Majem, L.; et al. The Mediterranean Diet decreases LDL atherogenicity in high cardiovascular risk individuals: A randomized controlled trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017, 61, 1601015.
35. Nordestgaard, B.G.; Langsted, A.; Mora, S.; Kolovou, G.; Baum, H.; Bruckert, E.; Watts, G.F.; Sypniewska, G.; Wiklund, O.; Borén, J.; et al. Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: Clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points. A joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Eur. Heart J.* 2016, 37, 1944–1958.
36. Saibandith, B.; Spencer, J.; Rowland, I.; Commane, D. Olive Polyphenols and the Metabolic Syndrome. *Molecules* 2017, 22, 1082.
37. Luo, H.; Liu, J.; Ouyang, Q.; Xuan, C.; Wang, L.; Li, T.; Liu, J. The effects of oleanolic acid on atherosclerosis in different animal models. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2017, 49, 349–354.
38. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993, 362, 801–809.

39. Gkaliagkousi, E.; Gavriilaki, E.; Triantafyllou, A.; Douma, S. Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 2015, 17, 85.
40. Cambiaggi, C.; Mencarelli, M.; Muscettola, M.; Grasso, G. Gene expression of endothelin-1 (ET-1) and release of mature peptide by activated human neutrophils. *Cytokine* 2001, 14, 230–233.
41. Shinagawa, S.; Okazaki, T.; Ikeda, M.; Yudoh, K.; Kisanuki, Y.Y.; Yanagisawa, M.; Kawahata, K.; Ozaki, S. T cells upon activation promote endothelin 1 production in monocytes via IFN- γ and TNF- α . *Sci. Rep.* 2017, 7, 14500.
42. Massai, L.; Carbotti, P.; Cambiaggi, C.; Mencarelli, M.; Migliaccio, P.; Muscettola, M.; Grasso, G. Prepro-endothelin-1 mRNA and its mature peptide in human appendix. *Gastrointest. Liver Physiol.* 2003, 284, G340–G348.
43. Mencarelli, M.; Pecorelli, A.; Carbotti, P.; Valacchi, G.; Grasso, G.; Muscettola, M. Endothelin receptor A expression in human inflammatory cells. *Regul. Pept.* 2009, 158, 1–5.
44. Achmad, T.H.; Rao, G.S. Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin-1 and the influence of calcium channel blockers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 189, 994–1000. [CrossRef]
45. Ruetten, H.; Thiemermann, C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J. Physiol. Pharmacol.* 1997, 48, 675–688.
46. Zouki, C.; Baron, C.; Fournie, A.; Filep, J.G. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: Role of ETA receptors and platelet activating factor. *Br. J. Pharmacol.* 1999, 127, 969–979.
47. Zern, T.L.; Fernandez, M.L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.* 2005, 135, 2291–2294.
48. Musini, V.M.; Wright, J.M. Factors affecting blood pressure variability: Lessons learned from two systematic reviews of randomized controlled trials. *PLoS ONE* 2009, 4, e5673.
49. Handler, J. The Importance of Accurate Blood Pressure Measurement. *Perm. J.* 2009, 13, 51–54.
50. Rodriguez-Rodriguez, R.; Herrera, M.D.; de Sotomayor, M.A.; Ruiz-Gutierrez, V. Pomace Olive Oil Improves Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats by Increasing Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression. *Am. J. Hypertens.* 2007, 20, 728–734.
51. Valero-Muñoz, M.; Martín-Fernández, B.; Ballesteros, S.; de la Fuente, E.; Quintela, J.C.; Lahera, V.; de las Heras, N. Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids

in alterations related to hypertension in rats: Mechanisms involved. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, 58, 376–383.

52. Dell’Agli, M.; Fagnani, R.; Mitro, N.; Scurati, S.; Masciadri, M.; Mussoni, L.; Galli, G.V.; Bosisio, E.; Crestani, M.; De Fabiani, E.; et al. Minor Components of Olive Oil Modulate Proatherogenic Adhesion Molecules Involved in Endothelial Activation. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 3259–3264.

53. Fitó, M.; Cladellas, M.; de la Torre, R.; Martí, J.; Muñoz, D.; Schröder, H.; Alcántara, M.; Pujadas-Bastardes, M.; Marrugat, J.; López-Sabater, M.C.; et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: A randomized, crossover, controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007, 62, 570–574.

54. Papageorgiou, N.; Tousoulis, D.; Psaltopoulou, T.; Giolis, A.; Antoniadis, C.; Tsiamis, E.; Miliou, A.; Toutouzas, K.; Siasos, G.; Stefanadis, C. Divergent anti-inflammatory effects of different oil acute consumption on healthy individuals. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2011, 65, 514–519.

55. Martín-Peláez, S.; Castañer, O.; Konstantinidou, V.; Subirana, I.; Muñoz-Aguayo, D.; Blanchart, G.; Gaixas, S.; de la Torre, R.; Farré, M.; Sáez, G.T.; et al. Effect of olive oil phenolic compounds on the expression of blood pressure-related genes in healthy individuals. *Eur. J. Nutr.* 2017, 56, 663–670.

Bibliografía

- Abe R, Beckett J, Abe R, Nixon A, Rochier A, Yamashita N et al. Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* W.B. Saunders; 2011 Jun 1;41(6):814–20. doi:10.1016/J.EJVS.2010.12.021
- Achmad TH, Rao GS. Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin-1 and the influence of calcium channel blockers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992 Dec 15;189(2):994–1000. ISSN: 0006-291X
- Ahmad-Farooqi A, Fayyaz S, Silva A, Sureda A, Nabavi S, Mocan A et al. Oleuropein and Cancer Chemoprevention: The Link is Hot. *Molecules.* 2017 Apr 29;22(5):705. doi:10.3390/molecules22050705
- Alarcón de la Lastra C, Barranco MD, Motilva V, Herrerías JM. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr. Pharm. Des.* 2001 Jul;7(10):933–50. ISSN: 1381-6128
- Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet.* 2005 Sep;366(9491):1059–62. doi:10.1016/S0140-6736(05)67402-8
- Allouche Y, Beltrán G, Gaforio JJ, Uceda M, Mesa MD. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chem. Toxicol.* 2010 Oct;48(10):2885–90. doi:10.1016/j.fct.2010.07.022
- Allouche Y, Uceda M, Jiménez A, Aguilera MP, Gaforio JJ, Beltrán G. Fruit Quality and Olive Leaf and Stone Addition Affect Picual Virgin Olive Oil Triterpenic Content. *J. Agric. Food Chem.* 2009 Oct 14;57(19):8998–9001. doi:10.1021/jf902105h
- Allouche Y, Warleta F, Campos M, Sánchez-Quesada C, Uceda M, Beltrán G et al. Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *J. Agric. Food Chem.* 2011 Jan 12;59(1):121–30. doi:10.1021/jf102319y
- Angeloni C, Malaguti M, Barbalace M, Hrelia S. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 2017 Oct 25;18(11):2230. doi:10.3390/ijms18112230
- Aparicio R, Luna G. Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002;104((2002)):614–627. doi:10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L

- Aronson D, Bartha P, Zinder O, Kerner A, Markiewicz W, Avizohar O et al. Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *Int. J. Obes.* 2004 May 2;28(5):674–9. doi:10.1038/sj.ijo.0802609
- Awad JA, Morrow JD, Takahashi K, Roberts LJ. Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F2-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J. Biol. Chem.* 1993 Feb 25;268(6):4161–9. ISSN: 0021-9258
- Babio N, Toledo E, Estruch R, Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Castaner O et al. Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the PREDIMED randomized trial. *Can. Med. Assoc. J.* 2014 Nov 18;186(17):E649–57. doi:10.1503/cmaj.140764
- Balanehru S, Nagarajan B. Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. *Biochem. Int.* 1991 Jul;24(5):981–90. ISSN: 0158-5231
- Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 2004 Feb;38(2):105–22. ISSN: 1071-5762
- Basu S, Helmersson J. Factors Regulating Isoprostane Formation In Vivo. *Antioxid. Redox Signal.* 2005 Jan;7(1–2):221–35. doi:10.1089/ars.2005.7.221
- Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit. Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S498-501. ISSN: 0090-3493
- Bessaoud F, Daurès J-P, Gerber M. Dietary Factors and Breast Cancer Risk: A Case Control Study Among a Population in Southern France. *Nutr. Cancer.* 2008 Mar;60(2):177–87. doi:10.1080/01635580701649651
- Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3–8. ISSN: 0026-0495
- Biel S, Mesa M-D, de la Torre R, Espejo J-A, Fernández-Navarro J-R, Fitó M et al. The NUTRAOLEOUM Study, a randomized controlled trial, for achieving nutritional added value for olive oils. *BMC Complement. Altern. Med. BioMed Central*; 2016 Oct 22;16(1):404. doi:10.1186/s12906-016-1376-6
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 2012 Jan;5(1):9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
- de Bock M, Derraik JGB, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC et al. Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *Nerurkar P V., editor. PLoS One.* 2013 Mar 13;8(3):e57622. doi:10.1371/journal.pone.0057622

- BOE. Convenio Internacional del aceite de oliva y las aceitunas de mesa, 2005, hecho en Ginebra el 29 de abril de 2005. [Internet: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2007-19323>]. BOE núm. 268. Ginebra; 2005. p. 45932 a 45944.
- Bretón Lesmes I, Suárez Llanos P, Pérez de la Cruz A. Nutrición y obesidad en el adulto. En: Gil A, editor. Tratado Nutr. Tomo V. 3a. 2017. p. 458–64. ISBN:978-84-9110-194-9
- Bulotta S, Corradino R, Celano M, Maiuolo J, D'Agostino M, Oliverio M et al. Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *J. Mol. Endocrinol.* 2013 Jun 29;51(1):181–9. doi:10.1530/JME-12-0241
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet (London, England)*. 1982 Aug 7;2(8293):327. ISSN: 0140-6736
- Cambiaggi C, Mencarelli M, Muscettola M, Grasso G. Gene expression of endothelin-1 (ET-1) and release of mature peptide by activated human neutrophils. *Cytokine*. 2001 May 1;14(4):230–3. doi:10.1006/CYTO.2001.0865
- Cao K, Xu J, Zou X, Li Y, Chen C, Zheng A et al. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2014 Feb;67:396–407. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.029
- Casas R, Sacanella E, Urpí-Sardà M, Corella D, Castañer O, Lamuela-Raventos R-M et al. Long-Term Immunomodulatory Effects of a Mediterranean Diet in Adults at High Risk of Cardiovascular Disease in the PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) Randomized Controlled Trial. *J. Nutr.* 2016 Sep;146(9):1684–93. doi:10.3945/jn.115.229476
- Casas R, Uрпи-Sardà M, Sacanella E, Arranz S, Corella D, Castañer O et al. Anti-Inflammatory Effects of the Mediterranean Diet in the Early and Late Stages of Atheroma Plaque Development. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1–12. doi:10.1155/2017/3674390
- COI. Método de valoración organoléptica del aceite de oliva virgen extra que opta a una denominación de origen COI/T.20/Doc. no 22 [Internet: <http://www.internationaloliveoil.org/>]. 2005.
- COI. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC no3/Rev.3 Noviembre de 2008 [Internet: <http://www.internationaloliveoil.org/>]. Cons. Oleícola Int. 2008.
- COI. Newsletter Mercado Oleícola 2018. International Olive Council (COI) [Internet: <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/698-year-2018-news/1166-newsletter-mercado-oleicola-2018>]. Newsl. Merc. OLEÍCOLA 2018 - Newsl. Merc. OLEÍCOLA 2018 - Int. Olive Counc. 2018.

- Commission Regulation (EU).N° 432/2012 of 16 May 2012. Oficial Journal of the European Union, L136/1. 25, 5, 2012
- Commission Regulation (EU).N° 1348/2013 of 16 Dec 2013. Oficial Journal of the European Union, L331/31 2013
- Conde C, Delrot S, Gerós H. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J. Plant Physiol.* 2008 Oct 9;165(15):1545–62. doi:10.1016/j.jplph.2008.04.018
- Covas M-I, de la Torre K, Farré-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitó M, López-Sabater C et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 2006a Feb;40(4):608–16. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.027
- Covas M-I, Nyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft H-JF, Kiesewetter H et al. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors. *Ann. Intern. Med. American College of Physicians*; 2006b Sep 5;145(5):333. doi:10.7326/0003-4819-145-5-200609050-00006
- Covas M-I, Ruiz-Gutierrez V, de la Torre R, Kafatos A, Lamuela-Raventos RM, Osada J et al. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans. *Nutr. Rev.* 2006c;64(10):s20–30. doi:10.1301/nr.2006.oct.S20
- Covas MI, de la Torre R, Fitó M. Virgin olive oil: A key food for cardiovascular risk protection. *Br. J. Nutr.* 2015 Apr 7;113(S2):S19–28. doi:10.1017/S0007114515000136
- Cresti M, Ciampolini F, Tattini M, Cimato A. Effect of salinity on productivity and oil quality of olive (*Olea europaea* L.) plants. *Adv. Hortic. Sci.* 1994;8(4):211–4.
- Crisante F, Taresco V, Donelli G, Vuotto C, Martinelli A, D'Ilario L et al. Antioxidant Hydroxytyrosol-Based Polyacrylate with Antimicrobial and Antiadhesive Activity Versus *Staphylococcus Epidermidis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015. p. 25–36. doi:10.1007/5584_2015_5013
- De la Torre R, Carbó M, Pujadas M, Biel S, Mesa M, Covas M et al. Compartmental and non-compartmental modeling of maslinic and oleanolic acids absorption and their effect on endothelial function in healthy adults. A randomized, controlled, dose-response study. *Under Consid.* 2018
- Dell'Agli M, Fagnani R, Mitro N, Scurati S, Masciadri M, Mussoni L et al. Minor Components of Olive Oil Modulate Proatherogenic Adhesion Molecules Involved in Endothelial Activation. *J. Agric. Food Chem. American Chemical Society*; 2006 May;54(9):3259–64. doi:10.1021/jf0529161
- Després J-P, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121):881–7. doi:10.1038/nature05488

- Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* 2006 Jun;23(3):394. doi:10.1039/b515312n
- EFSA Journal. General guidance for stakeholders on the evaluation of Article 13.1, 13.5 and 14 health claims. *EFSA J.* 2011 Apr;9(4):2135. doi:10.2903/j.efsa.2011.2135
- EFSA Panel on Dietetic Products. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance [Internet: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2011.2033>]. *EFSA J.* 2011 Apr. doi:10.2903/j.efsa.2011.2033
- EFSA Panel on Dietetic Products. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to polyphenols in olive and maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 [Internet: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2012.2848>]. *EFSA J.* 2012 Aug. doi:10.2903/j.efsa.2012.2848
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(14):1279–90. doi:10.1056/NEJMoa1200303
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N. Engl. J. Med.* 2018 Jun 21;378(25):e34. doi:10.1056/NEJMoa1800389
- Estruch R, Salas-Salvadó J. “Towards an even healthier mediterranean diet.” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. Elsevier*; 2013 Dec 1;23(12):1163–6. doi:10.1016/j.numecd.2013.09.003
- Fabiani R. Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of in vivo studies. *Food Funct.* 2016 Oct 12;7(10):4145–59. doi:10.1039/c6fo00958a
- Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF et al. Oxidative DNA Damage Is Prevented by Extracts of Olive Oil, Hydroxytyrosol, and Other Olive Phenolic Compounds in Human Blood Mononuclear Cells and HL60 Cells. *J. Nutr.* 2008 Aug 1;138(8):1411–6. doi:10.1093/jn/138.8.1411
- Farr SA, Price TO, Dominguez LJ, Motisi A, Saiano F, Niehoff ML et al. Extra Virgin Olive Oil Improves Learning and Memory in SAMP8 Mice. *J. Alzheimer’s Dis.* 2012 Jan 12;28(1):81–92. doi:10.3233/JAD-2011-110662
- Farràs M, Castañer O, Martín-Peláez S, Hernáez Á, Schröder H, Subirana I et al. Complementary phenol-enriched olive oil improves HDL characteristics in hypercholesterolemic subjects. *A*

- randomized, double-blind, crossover, controlled trial. The VOHF study. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015 Sep;59(9):1758–70. doi:10.1002/mnfr.201500030
- Farràs M, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Giralt M, Solà R, Subirana I et al. Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans. A randomized controlled trial. *J. Nutr. Biochem.* 2013 Jul;24(7):1334–9. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.10.008
- FDA. Labeling & Nutrition - Letter Responding to Health Claim Petition dated August 28, 2003: Monounsaturated Fatty Acids from Olive Oil and Coronary Heart Disease (Docket No 2003Q-0559) [Internet: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171114183732/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/LabelingNutrition/ucm072963.htm>]. Center for Food Safety and Applied Nutrition; 2003.
- Fernández-Castillejo S, Valls R-M, Castañer O, Rubió L, Catalán Ú, Pedret A et al. Polyphenol rich olive oils improve lipoprotein particle atherogenic ratios and subclasses profile: A randomized, crossover, controlled trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016 Jul;60(7):1544–54. doi:10.1002/mnfr.201501068
- Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* Nature Publishing Group; 2008 Apr 21;62(4):570–4. doi:10.1038/sj.ejcn.1602724
- Fitó M, Guxens M, Corella D, Sáez G, Estruch R, de la Torre R et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch. Intern. Med.* 2007;167(11):1195–203. doi:10.1001/archinte.167.11.1195
- Freitas Lima LC, Braga VDA, do Socorro de França Silva M, Cruz J de C, Sousa Santos SH, de Oliveira Monteiro MM et al. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Front. Physiol.* 2015 Nov 3;6(November):1–15. doi:10.3389/fphys.2015.00304
- Gardener H, Wright CB, Gu Y, Demmer RT, Boden-Albala B, Elkind MS V et al. Mediterranean-style diet and risk of ischemic stroke, myocardial infarction, and vascular death: the Northern Manhattan Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011;94(6):1458–64. doi:10.3945/ajcn.111.012799
- Giordano E, Dávalos a., Visioli F. Chronic hydroxytyrosol feeding modulates glutathione-mediated oxido-reduction pathways in adipose tissue: A nutrigenomic study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* Elsevier B.V; 2014 Oct;24(10):1144–50. doi:10.1016/j.numecd.2014.05.003
- Di Giovacchino L, Sestili S, Di Vincenzo D. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002;104:587–601. doi:10.1002/1438-9312

- Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Triantafyllou A, Douma S. Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* Springer US; 2015 Nov 14;17(11):85. doi:10.1007/s11906-015-0596-3
- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N et al. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* 2018 Feb 28;19(3):686. doi:10.3390/ijms19030686
- Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur. J. Pharmacol.* 2011 Jul 15;662(1–3):78–84. doi:10.1016/j.ejphar.2011.04.023
- Handler J. The Importance of Accurate Blood Pressure Measurement. *Perm. J.* 2009 Jul 1;13(3):51–4. doi:10.7812/TPP/09-054
- Hannon B, Khan NA, Teran-Garcia M. Nutrigenetic Contributions to Dyslipidemia: A Focus on Physiologically Relevant Pathways of Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Nutrients.* 2018;In Press. doi:10.3390/nu10101404
- Hernández Á, Castañer O, Goday A, Ros E, Pintó X, Estruch R et al. The Mediterranean Diet decreases LDL atherogenicity in high cardiovascular risk individuals: a randomized controlled trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017 Sep;61(9):1601015. doi:10.1002/mnfr.201601015
- Hernaez A, Fernandez-Castillejo S, Farras M, Catalan U, Subirana I, Montes R et al. Olive Oil Polyphenols Enhance High-Density Lipoprotein Function in Humans: A Randomized Controlled Trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014a Sep 1;34(9):2115–9. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303374
- Herrera M, Rodriguez-Rodriguez R, Ruiz-Gutierrez V. Functional Properties of Pentacyclic Triterpenes Contained in “Orujo” Olive Oil. *Curr. Nutr. Food Sci.* Elsevier; 2006 Feb 1;2(1):45–9. doi:10.2174/157340106775471976
- Hill RA, Connolly JD. This review covers the isolation and structure determination of triterpenoids including squalene. *Triterpenoids. Nat. Prod. Reports.* 2013;29(7):780–818. doi:10.1039/c3np70032a
- Hohmann CD, Cramer H, Michalsen A, Kessler C, Steckhan N, Choi K et al. Effects of high phenolic olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine.* 2015 Jun 1;22(6):631–40. doi:10.1016/j.phymed.2015.03.019
- Hsu Y-H, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z et al. Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006 Jan 1;83(1):146–54. doi:10.1093/ajcn/83.1.146

- Huisman HW, Schutte AE, van Rooyen JM, Schutte R, Malan L, Fourie CMT et al. The Association of Red Blood Cell Counts with Endothelin-1 in African and Caucasian Women. *Clin. Exp. Hypertens.* 2009 Jan 3;31(1):1–10. doi:10.1080/10641960802409838
- INE. INE. Defunciones según la causa de muerte. Nota de prensa 2017 [Internet: https://www.ine.es/prensa/edcm_2016.pdf]. 2016. p. 1–8.
- Jacomelli M, Pitozzi V, Zaid M, Larrosa M, Tonini G, Martini A et al. Dietary extra-virgin olive oil rich in phenolic antioxidants and the aging process: long-term effects in the rat. *J. Nutr. Biochem.* 2010 Apr;21(4):290–6. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.12.014
- Junta de Andalucía. Aceite de Oliva Virgen Extra [Internet: <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturapescaydesarrollorural/areas/industrias-agroalimentaria/calidad-promocion/paginas/denominaciones-calidad-aceite-oliva.html>]. Junta de Andalucía.
- Junta de Andalucía - Consejería de Agricultura y Pesca. El Olivar Andaluz [Internet: http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/prospectiva/Oliver4_doc_sinAnexo.pdf]. 2002.
- Katsiki M, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ, Gonos ES. The Olive Constituent Oleuropein Exhibits Proteasome Stimulatory Properties In Vitro and Confers Life Span Extension of Human Embryonic Fibroblasts. *Rejuvenation Res.* 2007 Jun;10(2):157–72. doi:10.1089/rej.2006.0513
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am. J. Epidemiol.* 1986 Dec;124(6):903–15. ISSN: 0002-9262
- Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K et al. Adiponectin Specifically Increased Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Through Interleukin-10 Expression in Human Macrophages. *Circulation.* 2004 May 4;109(17):2046–9. doi:10.1161/01.CIR.0000127953.98131.ED
- Lasa A, Miranda J, Bulló M, Casas R, Salas-Salvadó J, Larretxi I et al. Comparative effect of two Mediterranean diets versus a low-fat diet on glycaemic control in individuals with type 2 diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014a Jul 12;68(7):767–72. doi:10.1038/ejcn.2014.1
- Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* 1986 Jan;27(1):114–20. ISSN: 0022-2275
- Lin T-K, Zhong L, Santiago J. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *Int. J. Mol. Sci.* 2017 Dec 27;19(1):70. doi:10.3390/ijms19010070

- Liu GF, Lu K, Mogg R, Mallick M, Mehrotra D V. Should baseline be a covariate or dependent variable in analyses of change from baseline in clinical trials? *Stat. Med.* 2009 Sep 10;28(20):2509–30. doi:10.1002/sim.3639
- Lockyer S, Rowland I, Jeremy ., Spencer PE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *Eur. J. Nutr.* 2017;56:1421–32. doi:10.1007/s00394-016-1188-y
- López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, Covas MI et al. Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2010;20(4):284–94. doi:10.1016/j.numecd.2009.12.007
- de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet (London, England)*. 1994 Jun 11;343(8911):1454–9. ISSN: 0140-6736
- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999 Feb 16;99(6):779–85. ISSN: 0009-7322
- Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012 Jul;56(7):1043–57. doi:10.1002/mnfr.201100668
- Lucas L, Russell A, Keast R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr. Pharm. Des.* 2011;17(8):754–68. ISSN: 1873-4286
- De Luis Román D, Olivares Alcolea J, López Gómez J. Nutrición y dislipidemia. En: Gil A, editor. *Tratado Nutr. Tomo V. 3a.* 2017. p. 553–4. ISBN:978-84-9110-194-9
- Luo H, Liu J, Ouyang Q, Xuan C, Wang L, Li T et al. The effects of oleanolic acid on atherosclerosis in different animal models. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. Oxford University Press; 2017 Apr;49(4):349–54. doi:10.1093/abbs/gmx013
- Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, Weimann A, Fitó M, Marrugat J et al. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *FASEB J.* 2007 Jan;21(1):45–52. doi:10.1096/fj.06-6328com
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Blood Press.* 2013 Aug 18;22(4):193–278. doi:10.3109/08037051.2013.812549

- Márquez Martín A, De La Puerta Vázquez R, Fernández-Arche A, Ruiz-Gutiérrez V. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radic. Res.* 2006 Jan 7;40(3):295–302. doi:10.1080/10715760500467935
- Martín-Peláez S, Castañer O, Konstantinidou V, Subirana I, Muñoz-Aguayo D, Blanchart G et al. Effect of olive oil phenolic compounds on the expression of blood pressure-related genes in healthy individuals. *Eur. J. Nutr.* 2017 Mar 12;56(2):663–70. doi:10.1007/s00394-015-1110-z
- Martínez-González M, Hershey M, Zazpe I, Trichopoulou A. Transferability of the Mediterranean Diet to Non-Mediterranean Countries. What Is and What Is Not the Mediterranean Diet. *Nutrients.* 2017 Nov 8;9(11):1226. doi:10.3390/nu9111226
- Martínez-González MA. The SUN cohort study (Seguimiento University of Navarra). *Public Health Nutr.* 2006 Feb;9(1A):127–31. ISSN: 1368-9800
- Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E et al. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2015 Jul;58(1):50–60. doi:10.1016/j.pcad.2015.04.003
- Martínez-González MÁ, Toledo E, Arós F, Fiol M, Corella D, Salas-Salvadó J et al. Extravirgin Olive Oil Consumption Reduces Risk of Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2014 Jul;130(1):18–26. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006921
- Martínez-Ramírez MJ, Palma S, Martínez-González MA, Delgado-Martínez AD, de la Fuente C, Delgado-Rodríguez M. Dietary fat intake and the risk of osteoporotic fractures in the elderly. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007 Sep 7;61(9):1114–20. doi:10.1038/sj.ejcn.1602624
- Massai L, Carbotti P, Cambiaggi C, Mencarelli M, Migliaccio P, Muscettola M et al. Prepro-endothelin-1 mRNA and its mature peptide in human appendix. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(2):G340-8. doi:10.1152/ajpgi.00262.2002
- Mataix-Verdú FJ, Delgado Pérez A, Molina Díaz A, Carpio Dueñas A, Palomeque Messía F, Castillo Acuyo F et al. El aceite de oliva: su obtención y propiedades. Olivar F del, editor. Fundación del Olivar; 2009. ISBN:9788493450342
- Mataix-Verdú FJ, Solá-Alberich R. Hipertensión arterial Vol. 2. En: Mataix Verdú FJ, editor. *Nutr. y Aliment. humana.* 2a. 2009. p. 1521–5. ISBN:9788484736646
- Mayneris-Perxachs J, Sala-Vila A, Chisaguano M, Castellote AI, Estruch R, Covas MI et al. Effects of 1-Year Intervention with a Mediterranean Diet on Plasma Fatty Acid Composition and Metabolic Syndrome in a Population at High Cardiovascular Risk. *Atkin SL, editor. PLoS One.* 2014 Mar 20;9(3):e85202. doi:10.1371/journal.pone.0085202

- Medina E, de Castro A, Romero C, Brenes M. Comparison of the Concentrations of Phenolic Compounds in Olive Oils and Other Plant Oils: Correlation with Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2006 Jul 12;54(14):4954–61. doi:10.1021/jf0602267
- Mencarelli M, Pecorelli A, Carbotti P, Valacchi G, Grasso G, Muscettola M. Endothelin receptor A expression in human inflammatory cells. *Regul. Pept.* 2009 Nov 27;158(1–3):1–5. doi:10.1016/j.regpep.2009.06.004
- Mente A, de Koning L, Shannon HS, Anand SS. A Systematic Review of the Evidence Supporting a Causal Link Between Dietary Factors and Coronary Heart Disease. *Arch. Intern. Med.* 2009 Apr 13;169(7):659. doi:10.1001/archinternmed.2009.38
- Mesa M, Sanchez-Rodriguez E, de Luis D. Nutrición en las enfermedades cardiovasculares. En: Gil A, editor. *Tratado Nutr. Tomo V. 3a. Médica Panamericana*; 2017. p. 587–615. ISBN:9788491101949
- Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN et al. Triglycerides and Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2011 May 24;123(20):2292–333. doi:10.1161/CIR.0b013e3182160726
- Monti MC, Margarucci L, Riccio R, Casapullo A. Modulation of Tau Protein Fibrillization by Oleocanthal. *J. Nat. Prod.* 2012 Sep 28;75(9):1584–8. doi:10.1021/np300384h
- Musini VM, Wright JM. Factors Affecting Blood Pressure Variability: Lessons Learned from Two Systematic Reviews of Randomized Controlled Trials. Reitsma PH, editor. *PLoS One.* 2009 May 22;4(5):e5673. doi:10.1371/journal.pone.0005673
- Nathan DM. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Overview. *Diabetes Care.* American Diabetes Association; 2014 Jan 19;37(1):9–16. doi:10.2337/dc13-2112
- Neuenschwander P, Michelakis S. The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Zeitschrift für Angew. Entomol.* Wiley/Blackwell (10.1111); 2009 Aug 26;86(1–4):420–33. doi:10.1111/j.1439-0418.1978.tb01948.x
- Nordestgaard BG, Langsted A, Mora S, Kolovou G, Baum H, Bruckert E et al. Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points—a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federa. *Eur. Heart J.* Elsevier Saunders, Philadelphia; 2016 Jul 1;37(25):1944–58. doi:10.1093/eurheartj/ehw152
- Di Nunzio M, Picone G, Pasini F, Caboni MF, Gianotti A, Bordoni A et al. Olive oil industry by-products. Effects of a polyphenol-rich extract on the metabolome and response to inflammation

- in cultured intestinal cell. *Food Res. Int.* Elsevier; 2018;113(May):392–400. doi:10.1016/j.foodres.2018.07.025
- O'Donnell CJ, Elosua R. [Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study]. *Rev. Esp. Cardiol.* 2008 Mar;61(3):299–310. ISSN: 1579-2242
- Oliviero F, Scanu A, Zamudio-Cuevas Y, Punzi L, Spinella P. Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. *J. Sci. Food Agric.* 2018 Mar;98(5):1653–9. doi:10.1002/jsfa.8664
- OMS. Enfermedades cardiovasculares [Internet: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/]. WHO. World Health Organization; 2016a.
- OMS. Obesity and overweight [Internet: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>]. 2016b.
- OMS. Sobrepeso y obesidad infantiles [Internet: <https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/es/>]. 2016c.
- Osman M, Metzidakis I, Gerasopoulos D, Kiritsakis A. Qualitative changes in olive oil of fruits collected from trees grown at two altitudes. *Riv. Ital. delle Sostanze Grasse. Stazione sperimentale per l'industria degli olii e dei grassi*; 1994;
- Osman WA, Labib DA, Abdelhalim MO, Elrokh EM. Synergistic analgesic, anti-pyretic and anti-inflammatory effects of extra virgin olive oil and ibuprofen in different experimental models of albino mice. *Int. J. Rheum. Dis.* 2017 Oct;20(10):1326–36. doi:10.1111/1756-185X.13105
- Panth N, Raj Paudel K, Parajuli K, Castro A. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. 2016; doi:10.1155/2016/9152732
- Papageorgiou N, Tousoulis D, Psaltopoulou T, Giolis A, Antoniadis C, Tsiamis E et al. Divergent anti-inflammatory effects of different oil acute consumption on healthy individuals. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2011 Apr 16;65(4):514–9. doi:10.1038/ejcn.2011.8
- Pei T, Meng Q, Han J, Sun H, Li L, Song R et al. (-)-Oleocanthal inhibits growth and metastasis by blocking activation of STAT3 in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016 Jul 12;7(28):43475–91. doi:10.18632/oncotarget.9782
- Pérez-Camino MC, Cert A. Quantitative Determination of Hydroxy Pentacyclic Triterpene Acids in Vegetable Oils. *J. Agric. Food Chem.* 1999 Apr;47(4):1558–62. doi:10.1021/jf980881h
- Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J. Nutr. Biochem.* 2006;17(7):429–45. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.11.007

- Peyrol J, Riva C, Amiot M. Hydroxytyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017 Mar 20;9(3):306. doi:10.3390/nu9030306
- Pozo OJ, Pujadas M, Gleeson SB, Mesa-García MD, Pastor A, Kotronoulas A et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of triterpenes in human fluids: Evaluation of markers of dietary intake of olive oil and metabolic disposition of oleanolic acid and maslinic acid in humans. *Anal. Chim. Acta*. 2017 Oct 16;990:84–95. doi:10.1016/j.aca.2017.07.041
- Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, Wahle KWJ. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br. J. Nutr.* 2002 Sep 9;88(03):225. doi:10.1079/BJN2002620
- Raatz SK, Bibus D, Thomas W, Kris-Etherton P. Total Fat Intake Modifies Plasma Fatty Acid Composition in Humans. *J. Nutr.* 2001 Feb 1;131(2):231–4. doi:10.1093/jn/131.2.231
- Ramírez-Tortosa MC, Granados S, Quiles JL. Chemical composition, types and characteristics of olive oil. *Olive oil Heal*. Wallingford: CABI; 2006. p. 45–62. doi:10.1079/9781845930684.0045
- Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Martín MV, Soto MJ, Rico MC, Vallejo F et al. Normal or High Polyphenol Concentration in Orange Juice Affects Antioxidant Activity, Blood Pressure, and Body Weight in Obese or Overweight Adults. *J. Nutr.* 2015 Aug 1;145(8):1808–16. doi:10.3945/jn.115.213660
- Rangel-Zuñiga OA, Haro C, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Marin C, Quintana-Navarro GM et al. Effect of frying oils on the postprandial endoplasmic reticulum stress in obese people. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014 Nov;58(11):2239–42. doi:10.1002/mnfr.201400401
- Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol Is the Major Anti-Inflammatory Compound in Aqueous Olive Extracts and Impairs Cytokine and Chemokine Production in Macrophages. *Planta Med.* 2011 Nov 9;77(17):1890–7. doi:10.1055/s-0031-1280022
- Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *Int. J. Mol. Sci.* 2016 May 31;17(6):843. doi:10.3390/ijms17060843
- Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 2000 Feb 15;28(4):505–13. ISSN: 0891-5849
- Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL et al. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res. Int.* 2018 Mar;105:654–67. doi:10.1016/j.foodres.2017.11.053

- Rodriguez-Rodriguez R. Oleanolic Acid and Related Triterpenoids from Olives on Vascular Function: Molecular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Curr. Med. Chem.* 2015 Mar 17;22(11):1414–25. doi:10.2174/0929867322666141212122921
- Rodriguez-Rodriguez R, Herrerra MD, Alvarez de Sotomayor M, Ruiz Gutierrez V. Pomace Olive Oil Improves Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats by Increasing Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression. *Am. J. Hypertens.* 2007 Jul;20(7):728–34. doi:10.1016/j.amjhyper.2007.01.012
- Romeu M, Rubió L, Sánchez-Martos V, Castañer O, de la Torre R, Valls RM et al. Virgin Olive Oil Enriched with Its Own Phenols or Complemented with Thyme Phenols Improves DNA Protection against Oxidation and Antioxidant Enzyme Activity in Hyperlipidemic Subjects. *J. Agric. Food Chem.* 2016 Mar 9;64(9):1879–88. doi:10.1021/acs.jafc.5b04915
- Rondanelli M, Giacosa A, Morazzoni P, Guido D, Grassi M, Morandi G et al. MediterrAsian Diet Products That Could Raise HDL-Cholesterol: A Systematic Review. *Biomed Res. Int. Hindawi*; 2016 Nov;2016:1–15. doi:10.1155/2016/2025687
- Rong Z-T, Gong X-J, Sun H-B, Li Y-M, Ji H. Protective effects of oleanolic acid on cerebral ischemic damage in vivo and H₂O₂-induced injury in vitro. *Pharm. Biol. Taylor & Francis*; 2011 Jan 5;49(1):78–85. doi:10.3109/13880209.2010.499130
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993 Apr 29;362(6423):801–9. doi:10.1038/362801a0
- Ross R. Inflammation or Atherogenesis. *N. Engl. J. Med.* 1999;340(2):115–26. doi:10.1056/NEJM199901143400207
- Rotondi A, Bendini A, Cerretani L, Mari M, Lercker G, Toschi TG. Effect of Olive Ripening Degree on the Oxidative Stability and Organoleptic Properties of Cv. Nostrana di Brisighella Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2004 Jun 2;52(11):3649–54. doi:10.1021/jf049845a
- Ruetten H, Thiemeermann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J. Physiol. Pharmacol.* 1997 Dec;48(4):675–88. ISSN: 0867-5910
- Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J et al. Erratum. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes With the Mediterranean Diet: Results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care* 2011;34:14–19. *Diabetes Care.* 2018 Oct;41(10):2259–60. doi:10.2337/dc18-er10
- Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, Ros E, Covas M-I, Ibarrola-Jurado N et al. Prevention of Diabetes With Mediterranean Diets. *Ann. Intern. Med. American College of Physicians*; 2014 Jan 7;160(1):1–10. doi:10.7326/M13-1725

- Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C et al. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br. J. Nutr.* 2006 Apr;95(4):742–51. ISSN: 0007-1145
- Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Warleta F, Campos M, Beltrán G, Gaforio JJ. Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea europaea*. *J. Agric. Food Chem.* 2013 Dec 18;61(50):12173–82. doi:10.1021/jf403154e
- Sanchez-Rodriguez E, Lima-Cabello E, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Calleja MA, Roca M et al. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on metabolic syndrome and endothelial functional risk biomarkers in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients.* 2018;10(5). doi:10.3390/nu10050626
- Sanchez-Rodriguez E, Mesa M. Compuestos bioactivos del aceite de oliva. *Nutr Clin Med.* 2018;12:80–94. doi:10.7400/NCM.2018.12.2.5064
- Santangelo C, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Filardi T, Fogliano V et al. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *J. Endocrinol. Invest.* Springer International Publishing; 2016 Nov;39(11):1295–301. doi:10.1007/s40618-016-0506-9
- Sarafidis PA, Nilsson PM. The metabolic syndrome: a glance at its history. *J. Hypertens.* 2006 Apr;24(4):621–6. doi:10.1097/01.hjh.0000217840.26971.b6
- Schulze MB, Hoffmann K, Manson JE, C WW, Meigs JB, Weikert C et al. Dietary pattern, inflammation, and incidence of type 2 diabetes in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005a;82(3):675–716 15p. ISSN: 0002-9165
- Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N, Hu FB. Adiponectin and Future Coronary Heart Disease Events Among Men With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2005b;54(2).
- Schwingshackl L, Christoph M, Hoffmann G. Effects of Olive Oil on Markers of Inflammation and Endothelial Function—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2015 Sep 11;7(9):7651–75. doi:10.3390/nu7095356
- Senn S. *Cross-over Trials in Clinical Research*, 2nd ed.; JohnWiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2002; pp. 35–53. 2002;35–53.
- Shinagawa S, Okazaki T, Ikeda M, Yudoh K, Kisanuki YY, Yanagisawa M et al. T cells upon activation promote endothelin 1 production in monocytes via IFN- γ and TNF- α . *Sci. Rep.* 2017 Dec 3;7(1):14500. doi:10.1038/s41598-017-14202-5
- Silva S, Sepodes B, Rocha J, Direito R, Fernandes A, Brites D et al. Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and

- rheumatoid arthritis. *J. Nutr. Biochem.* 2015 Apr;26(4):360–8. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.11.011
- Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010 Nov 1;92(5):1189–96. doi:10.3945/ajcn.2010.29673
- Somova LO, Nadar A, Rammanan P, Shode FO. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine.* 2003;10(2–3):115–21. doi:10.1078/094471103321659807
- Soni M, Prakash C, Sehwal S, Kumar V. Protective effect of hydroxytyrosol in arsenic-induced mitochondrial dysfunction in rat brain. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2017 Jul;31(7):e21906. doi:10.1002/jbt.21906
- Souza P, Marcadenti A, Portal V. Effects of Olive Oil Phenolic Compounds on Inflammation in the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease. *Nutrients.* 2017 Sep 30;9(10):1087. doi:10.3390/nu9101087
- Stefanoudaki E, Williams M, Chartzoulakis K, Harwood J. Effect of Irrigation on Quality Attributes of Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2009 Aug 12;57(15):7048–55. doi:10.1021/jf900862w
- Stephen SL, Freestone K, Dunn S, Twigg MW, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH et al. Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *Int. J. Hypertens. Hindawi;* 2010 Aug 17;2010:646929. doi:10.4061/2010/646929
- Stiti N, Triki S, Hartmann M-A. Formation of Triterpenoids throughout *Olea europaea* Fruit Ontogeny. *Lipids.* 2007 Feb 21;42(1):55–67. doi:10.1007/s11745-006-3002-8
- Storniolo CE, Roselló-Catafau J, Pintó X, Mitjavila MT, Moreno JJ. Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biol. Elsevier;* 2014;2(1):971–7. doi:10.1016/j.redox.2014.07.001
- Tabas I, Kevin ;, Williams J, Borén J. Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis Update and Therapeutic Implications. 2007; doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890
- Tangney CC, Rasmussen HE. Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2013 May 20;15(5):324. doi:10.1007/s11883-013-0324-x
- Torres M, Pierantozzi P, Searles P, Rousseaux MC, García-Inza G, Miserere A et al. Olive Cultivation in the Southern Hemisphere: Flowering, Water Requirements and Oil Quality Responses to New Crop Environments. *Front. Plant Sci.* 2017 Oct 27;8:1830. doi:10.3389/fpls.2017.01830

- Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D. Mediterranean Diet and Survival Among Patients With Coronary Heart Disease in Greece. *Arch. Intern. Med.* 2005 Apr 25;165(8):929. doi:10.1001/archinte.165.8.929
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population. *N. Engl. J. Med.* 2003 Jun 26;348(26):2599–608. doi:10.1056/NEJMoa025039
- Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GDO, Fowkes FGR. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Soluble Adhesion Molecules as Predictors of Progressive Peripheral Atherosclerosis in the General Population. *Circulation.* 2005 Aug 16;112(7):976–83. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.513085
- Valero-Muñoz M, Martín-Fernández B, Ballesteros S, de la Fuente E, Quintela JC, Lahera V et al. Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: Mechanisms involved. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014 Feb;58(2):376–83. doi:10.1002/mnfr.201300256
- Valero Zanuy M, León Sanz M. Nutrición en la diabetes mellitus. En: Gil A, editor. *Tratado Nutr.* Tomo V. 3a. 2017. p. 533–44. ISBN:978-84-9110-194-9
- Valls R-M, Farràs M, Suárez M, Fernández-Castillejo S, Fitó M, Konstantinidou V et al. Effects of functional olive oil enriched with its own phenolic compounds on endothelial function in hypertensive patients. A randomised controlled trial. *Food Chem. Elsevier Ltd;* 2015;167:30–5. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.107
- Vijayanathan A, Nawawi O. The importance of Good Clinical Practice guidelines and its role in clinical trials. *Biomed. Imaging Interv. J.* 2008 Jan;4(1):e5. doi:10.2349/bijj.4.1.e5
- Villa Estébanez R, Tranche Iparraguirre S, Marín Iranzo R, Prieto Díaz MA, Hevia Rodríguez E. La presión de pulso como marcador de riesgo cardiovascular en población anciana. *Atención Primaria.* 2002;30(6):374–80. doi:10.1016/S0212-6567(02)79050-1
- Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G et al. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur. J. Nutr.* 2005 Mar 5;44(2):121–7. doi:10.1007/s00394-004-0504-0
- Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G et al. Hydroxytyrosol Excretion Differs between Rats and Humans and Depends on the Vehicle of Administration. *J. Nutr.* 2003 Aug 1;133(8):2612–5. doi:10.1093/jn/133.8.2612
- Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J. Cardiol.* 2009;50(5):402–9. ISSN: 2241-5955

- Van de Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism*. 2013 Nov;62(11):1513–21. doi:10.1016/j.metabol.2013.06.004
- Wahrburg U, Kratz M, Cullen P. Mediterranean diet, olive oil and health. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* Wiley-Blackwell; 2002 Oct 1;104(9–10):698–705. doi:10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<698::AID-EJLT698>3.0.CO;2-A
- Wainstein J, Ganz T, Boaz M, Bar Dayan Y, Dolev E, Kerem Z et al. Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats. *J. Med. Food*. 2012 Jul;15(7):605–10. doi:10.1089/jmf.2011.0243
- Wajchenberg BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocr. Rev.* 2000 Dec;21(6):697–738. doi:10.1210/edrv.21.6.0415
- Walter R, Mark M, Gaudenz R, Harris LG, Reinhart WH. Influence of nitrovasodilators and endothelin-1 on rheology of human blood in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 1999 Oct;128(3):744–50. doi:10.1038/sj.bjp.0702817
- Wang X, Ye X, Liu R, Chen H-L, Bai H, Liang X et al. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases. *Chem. Biol. Interact.* 2010 Mar 30;184(3):328–37. doi:10.1016/j.cbi.2010.01.034
- Weinbrenner T, Fitó M, Torre R de la, Saez GT, Rijken P, Tormos C et al. Olive Oils High in Phenolic Compounds Modulate Oxidative/Antioxidative Status in Men. *J. Nutr.* 2004 Sep 1;134(9):2314–21. doi:10.1093/jn/134.9.2314
- de Winther MPJ, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear Factor κ B Signaling in Atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005 Feb 24;25(5):904–14. doi:10.1161/01.ATV.0000160340.72641.87
- Wolf SH, Battista RN, Anderson GM, Logan AG, Wang E. Assessing the clinical effectiveness of preventive maneuvers: analytic principles and systematic methods in reviewing evidence and developing clinical practice recommendations. A report by the Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. *J. Clin. Epidemiol.* 1990;43(9):891–905. ISSN: 0895-4356
- Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules*. 2015 Jul 21;5(3):1563–79. doi:10.3390/biom5031563
- Yang YJ, Kim MK, Hwang SH, Ahn Y, Shim JE, Kim DH. Relative validities of 3-day food records and the food frequency questionnaire. *Nutr. Res. Pract.* 2010;4(2):142. doi:10.4162/nrp.2010.4.2.142

- Yarla NS, Polito A, Peluso I. Effects of Olive Oil on TNF- α and IL-6 in Humans: Implication in Obesity and Frailty. *Endocrine, Metab. Immune Disord. - Drug Targets*. 2017 Dec 12;18(1):63–74. doi:10.2174/1871530317666171120150329
- Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr. American Society for Nutrition*; 2005 Oct;135(10):2291–4. ISSN: 0022-3166
- Zhu L, Liu Z, Feng Z, Hao J, Shen W, Li X et al. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J. Nutr. Biochem*. 2010 Nov;21(11):1089–98. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.09.006
- Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET A receptors and platelet-activating factor. *Br. J. Pharmacol*. 1999;127:969–79.