

# **TESIS DOCTORAL**

**Estudio de los efectos cardiovasculares y la absorción oral del hidroxitirosol en modelos animales y humanos.**

**Maria Pilar González Santiago**

**Granada, 2005**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Pilar González Santiago  
D.L.: Gr. 916 - 2005  
ISBN: 84-338-3409-6

# **Estudio de los efectos cardiovasculares y la absorción oral del hidroxitirosol en modelos animales y humanos.**

Memoria que presenta la Lda. María Pilar González Santiago para aspirar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Granada

Los trabajos de investigación que se exponen en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido realizados en el Departamento de Nutrición y Salud de Puleva Biotech S.A. bajo la dirección de los doctores D. Eduardo López-Huertas León y D. Juristo Fonollá Joya, bajo la tutela del Dr. C.U. Antonio Zarzuelo Zurita, del departamento de Farmacología de la Universidad de Granada.

Dr. Eduardo López-Huertas  
León

Dr. Juristo Fonollá  
Joya

Dr. C.U. Antonio Zarzuelo  
Zurita



**Universidad de Granada**  
Dto. de Farmacología



**Puleva Biotech S.A.**  
Dto. de Nutrición y Salud



La presente Memoria de Tesis ha sido realizada en las instalaciones de Puleva Biotech S.A., gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Fundación Universidad-Empresa (2001-2005) de la Universidad de Granada.



# INDICE

INDICE .....	I
ABREVIATURAS.....	IV
1. JUSTIFICACIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	5
3. INTRODUCCIÓN .....	9
3.1. La enfermedad cardiovascular y sus factores de riesgo .....	11
3.2. Fisiopatología de la aterosclerosis .....	14
3.3. Lipoproteínas plasmáticas y aterosclerosis.....	20
3.4. Teoría de la oxidación de la LDL.....	22
3.5. Antioxidantes y enfermedad cardiovascular.....	26
3.6. Dieta mediterránea .....	32
3.7. Aceite de oliva.....	33
3.8. Hidroxitirosol .....	36
3.8.1. Propiedades del hidroxitirosol descritas en modelos in vitro .....	38
3.8.2. Estudios en animales de experimentación.....	41
3.8.3. Estudios en humanos.....	43
3.8.4. Estudios de toxicidad con hidroxitirosol en animales.....	47
3.8.5. Estudios de absorción y metabolismo del hidroxitirosol .....	47
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
4.1. Material y aparatos .....	53
4.1.1. Aparatos de uso general .....	53
4.1.2. Animales de experimentación .....	54
4.1.2.1. Conejos .....	54
4.1.2.2. Ratas .....	54
4.1.2.3. Ratones .....	55
4.1.3. Dietas .....	55
4.1.3.1. Dietas de conejos .....	55
4.1.3.2. Dietas de ratones .....	57
4.1.4. Obtención de hidroxitirosol.....	57
4.1.4.1. Síntesis química .....	57
4.1.4.2. Purificación a partir de alpeorajo.....	57
4.2. Métodos .....	58
4.2.1. Diseños experimentales .....	58
4.2.1.1. Efectos del hidroxitirosol en un modelo experimental de aterosclerosis inducida por dieta.....	58
4.2.1.2. Estudio de absorción del hidroxitirosol en ratas.....	60
4.2.1.3. Estudio de biodisponibilidad del hidroxitirosol en humanos y su afinidad in vivo a la LDL .....	60

4.2.1.4. Estudio del efecto del hidroxitirosol sobre la expresión génica de ratones.....	62
4.2.2. Obtención de muestras .....	63
4.2.2.1 Obtención de plasma.....	63
4.2.2.2. Aislamiento de lipoproteínas LDL.....	63
4.2.3. Métodos analíticos .....	65
4.2.3.1. Grasa total de las dietas.....	65
4.2.3.2. Análisis de los ácidos grasos de la dieta.....	65
4.2.3.3. Análisis de la pureza y concentración de hidroxitirosol en los extractos y soluciones acuosas.....	66
4.2.3.4. Determinación de ácidos grasos en plasma .....	68
4.2.3.5. Determinación de colesterol total .....	69
4.2.3.6. Determinación de triglicéridos .....	70
4.2.3.7. Determinación de colesterol HDL.....	70
4.2.3.8. Determinación de capacidad antioxidante del plasma.....	71
4.2.3.9. Determinación de malondialdehído en plasma .....	72
4.2.3.10. Análisis histológico de aortas .....	73
A) Tinciones histológicas de las secciones de arteria .....	73
B) Estudio del análisis morfométrico.....	74
4.2.3.11. Determinación de hidroxitirosol y metabolitos derivados.....	75
A) Preparación de la muestra y derivatización .....	75
B) Análisis cromatográfico .....	76
C) Preparación de las curvas de calibración y muestras control. Validación del método .....	80
D) Expresión de los resultados .....	83
4.2.3.12. Determinación de las constantes farmacocinéticas .....	83
4.2.3.13. Determinación de la resistencia a la oxidación de lipoproteínas LDL o “lag time” .....	84
4.2.3.14. Determinación de proteínas .....	85
4.2.3.15. Determinación de apolipoproteínas B y A1 .....	86
4.2.3.16. Electroforesis de lipoproteínas en gel de agarosa .....	86
4.2.3.17. Obtención del ARN.....	86
A) Extracción.....	86
B) Limpieza .....	87
C) Cuantificación.....	87
D) Electroforesis de ARN en gel de agarosa.....	88
4.2.3.18. Análisis de la expresión génica de los ARN de ratón con el sistema microarray .....	88
A) Obtención de ARN marcado con biotina.....	88
B) Hibridación del test de prueba.....	90
C) Hibridación del ARN marcado con biotina con los microchips y lectura de los datos obtenidos .....	90
4.2.3.19. Análisis estadístico de los resultados.....	91
4.3. Consideraciones éticas.....	92
5. RESULTADOS .....	95
5.1. Efectos del hidroxitirosol en un modelo experimental de aterosclerosis inducida por dieta .....	97
5.1.1. Adaptación de los animales a la dieta.....	97
5.1.2. Examen macroscópico.....	98
5.1.3. Perfil de ácidos grasos en plasma .....	99
5.1.4. Composición lipídica del plasma.....	101
5.1.5. Concentración de peróxidos del plasma .....	103
5.1.6. Capacidad antioxidante del plasma .....	104
5.1.7. Análisis histológico y morfométrico de la aorta.....	105
5.2. Estudio de la absorción del hidroxitirosol en ratas. ....	110



5.3. Estudio de la absorción de hidroxitirosol en humanos .....	115
5.3.1. Concentración plasmática de hidroxitirosol y sus metabolitos derivados en plasma .....	115
5.3.2. Excreción de HT y sus metabolitos por orina.....	120
5.3.3. Parámetros de oxidabilidad del plasma y LDL.....	122
5.3.4. Capacidad antioxidante de los metabolitos del HT .....	123
5.4. Estudio de la afinidad del hidroxitirosol por las lipoproteínas LDL .....	125
5.4.1. Caracterización del gradiente de lipoproteínas.....	125
5.4.2. Concentración de hidroxitirosol en plasma y las distintas fracciones de lipoproteínas .....	128
5.5. Estudio del efecto del hidroxitirosol sobre la expresión génica en ratones.....	132
5.5.1. Evolución del peso corporal y examen macroscópico .....	132
5.5.2. Efecto del hidroxitirosol en la expresión génica en hígado de ratón .....	132
6. DISCUSIÓN.....	137
6.1. Efectos del hidroxitirosol sobre el desarrollo de la aterosclerosis.....	139
6.2. Absorción del hidroxitirosol en animales y humanos.....	144
6.3. Asociación del hidroxitirosol a la LDL in vivo.....	150
6.4. Efectos del hidroxitirosol sobre la expresión génica en hígado de ratón .....	153
7. CONCLUSIONES.....	157
8. BIBLIOGRAFIA .....	163

## ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-Azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)
ABTS <sup>•+</sup>	Radical del ácido 2,2'-Azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGMI	Ácidos grasos mono-insaturados
AGPI	Ácidos grasos poli-insaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Área bajo la curva
BSTFA	N,O-Bis(trimetil-silil)-trifluoroacetamida
CAO	Capacidad antioxidante
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
C <sub>max</sub>	Concentración plasmática máxima
CML	Células de músculo liso
COMT	Catecol orto metil transferasa
CT	Colesterol total
DHPA	Ácido dihidroxifenilacético
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Etilendiaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
HDL	Lipoproteínas de densidad alta
HDL-C	Colesterol HDL
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HT	Hidroxitirosol
HvAc	Ácido homovanílico
HvOH	Alcohol homovanílico
Ke	Constante de eliminación
LDL	Lipoproteínas de densidad baja

LDLmo	LDL mínimamente oxidada
LDLox	LDL oxidada
MDA	Malondialdehido
NF- $\kappa$ $\beta$	Factor nuclear $\kappa$ $\beta$
P/V	Peso / Volumen
PBS	Tampón fosfato salino
QM	Quilomicrones
RL	Radicales libres
rpm	Revoluciones por minuto
$t_{1/2}$	Tiempo de semivida plasmática
TBA	Ácido tiobarbiturico
TG	Trigliceridos
Tmax	Tiempo en alcanzar la máxima concentración plasmática
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2 carboxilico
V/V	Volumen / Volumen
VLDL	Lipoproteínas de densidad muy baja
vs.	<i>versus</i>





*Justificación*



En las últimas dos décadas ha aumentado enormemente el interés por la relación existente entre la alimentación y la salud. El concepto clásico de “nutrición adecuada”, o aporte adecuado de nutrientes para satisfacer las necesidades básicas del organismo, esta siendo sustituido por conceptos como “nutrición óptima”, “promoción de la salud” o “prevención de enfermedades”, reconociendo a la nutrición como potencial promotora de la salud. (FAO/OMS Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Roma-Ginebra)

Para la consecución de este fin surge el concepto de alimentación funcional. Los alimentos funcionales se definen como alimentos que además de la función de nutrir (dada la composición en nutrientes) y de proporcionar placer (con su sabor, aroma, etc) poseen una tercera función, la de influir positivamente sobre la salud o sobre una determinada función fisiológica que beneficia el estado de salud. Un alimento convencional puede convertirse en funcional fundamentalmente a través de 3 procesos: mediante la eliminación de un componente conocido que puede causar un efecto no beneficioso, aumentando la concentración de un componente presente de forma natural en un alimento o bien mediante la adición de un componente al que se le ha descrito un efecto beneficioso. Pero para que un ingrediente sea considerado funcional tiene que haber demostrado de forma satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas del organismo y que puede ejercer sus actividades biológicas *in vivo* sin producir efectos adversos, toxicológicos o nutricionales.

Numerosos estudios epidemiológicos muestran una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer en el área mediterránea que ha sido atribuida a sus hábitos alimentarios que incluyen gran cantidad de frutas, verduras, cereales, legumbres, vino y aceite de oliva (Keys et al., 1995). Los efectos beneficiosos atribuidos a la dieta mediterránea a nivel cardiovascular también han sido relacionados con un consumo reducido de grasas saturadas en favor del consumo de aceite de oliva, rico en ácidos grasos monoinsaturados. Además, el aceite de oliva virgen contiene una serie de compuestos minoritarios que, aunque se encuentran a concentraciones reducidas, se ha descrito que podrían contribuir al efecto protector del aceite de oliva sobre la ECV. Entre ellos se encuentra el hidroxitirosol (HT), un compuesto fenólico con una elevada actividad antioxidante (Visioli et al., 1998). Los estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que el HT podría poseer propiedades beneficiosas y protectoras de la enfermedad cardiovascular. Así, se ha demostrado que puede prevenir la oxidación de la lipoproteína LDL *in vitro* (Salami et al., 1995), reducir la inflamación (Carluccio et al., 2003) e inhibir la agregación plaquetaria (Petroni et al., 1995). Además, también se ha descrito que el HT puede poseer propiedades antibacterianas (Bisignano et al., 1999) y anticancerígenas (Fabián et al., 2002). Sin embargo la mayoría de los estudios realizados *in vivo*, tanto en animales de experimentación como en humanos, utilizan aceites de oliva o extractos ricos en compuestos fenólicos siendo difícil separar los efectos producidos por el HT de los del resto de los componentes del aceite.

El HT es por tanto un compuesto natural presente en el aceite de oliva, con importantes propiedades biológicas que podrían sugerir su uso como ingrediente funcional. La presente Memoria Doctoral pretende evaluar el efecto del HT aislado en la prevención de la aterosclerosis y sus posibles mecanismos de acción implicados, así como investigar la absorción y farmacocinética de este compuesto, estableciendo de este modo bases científicas para futuras aplicaciones nutricionales y/o terapéuticas del HT.



# **2**

## *Objetivos*



**OBJETIVO GENERAL.**

El objetivo global de esta Memoria Doctoral consiste en la caracterización y el estudio de la absorción y disponibilidad del hidroxitirosol cuando es administrado de forma aislada al aceite de oliva, así como sus efectos cardiovasculares y los posibles mecanismos de acción en modelos animales y sujetos humanos.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1.** Estudiar los efectos del hidroxitirosol purificado sobre los principales factores de riesgo cardiovascular y en el desarrollo de la lesión aterosclerótica en un modelo animal de aterosclerosis inducida por una dieta rica en grasa saturada y colesterol.
- 2.** Establecer el perfil de absorción plasmática del hidroxitirosol en modelos animales.
- 3.** Estudiar la absorción, el metabolismo, la eliminación urinaria y las propiedades antioxidantes *in vivo* del hidroxitirosol purificado en humanos.
- 4.** Estudiar la afinidad de este compuesto por las distintas fracciones de lipoproteínas del plasma.
- 5.** Estudiar la toxicidad y los posibles mecanismos de acción del hidroxitirosol mediante el análisis de la expresión génica en hígado de ratón usando un sistema de microarray.



**3**

*Introducción*



### 3.1. LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y SUS FACTORES DE RIESGO

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la primera causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. Son las responsables de 16,7 millones de defunciones en todo el mundo lo que supone el 29,3% del total. En España, las enfermedades cardiovasculares también son la primera causa de mortalidad ocasionando el 36% de todas las defunciones. Entre ellas destacan la enfermedad isquémica del corazón y la enfermedad cerebrovascular, que en conjunto suponen algo más del 60% de la mortalidad cardiovascular total. Por otra parte, las ECV ocasionan 5 millones de estancias hospitalarias al año en España lo que supone un elevado impacto sanitario y social (Villar et al., 2003).

ECV tales como la angina de pecho, el infarto de miocardio, y la enfermedad vascular periférica tienen su origen en la aterosclerosis. La aterosclerosis se caracteriza por la presencia de placas fibroadiposas que comienzan a desarrollarse en la íntima arterial (placas de ateromas) especialmente en aorta, arterias coronarias y arterias cerebrales que pueden llegar a invadir la luz arterial, comprometiendo la funcionalidad circulatoria. El estrechamiento de la luz del vaso (estenosis) dificulta la llegada de sangre a los tejidos irrigados (isquemia) disminuyendo el aporte de oxígeno. La isquemia puede acompañarse de un dolor muy intenso provocado al parecer por el exceso de lactato producido durante la anaerobiosis. En las lesiones más avanzadas se puede producir trombosis, lo que con frecuencia provoca la oclusión del vaso, cesando la irrigación al tejido, que se necrosa (infarto). Las placas de ateroma pueden producir también un debilitamiento progresivo de la pared arterial, que puede dilatarse hasta romperse y producir una hemorragia (aneurisma) (Mataix, 2001).

#### Factores de riesgo cardiovascular

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial y compleja a la que se han asociado multitud de factores de riesgo. Los estudios epidemiológicos de los últimos 50 años, que comenzaron con el estudio de Framingham (Dawber y Kannel, 1966), identificaron a la hipercolesterolemia, la hipertensión, la hiperglucemia y el consumo de tabaco como los mayores y principales factores de riesgo “causales” de la ECV. Otros trabajos de investigación posteriores han dado a conocer otros factores de riesgo como las hipertrigliceridemia, hiperhomocisteinemia, concentraciones elevadas en sangre de ciertos factores de coagulación y lipoproteína(a). Aunque la mayoría de estos factores presentan una asociación con el proceso aterosclerótico, el mecanismo por el cual conducen al desarrollo de la enfermedad aterosclerótica no está claramente establecido por lo que se conocen como factores de riesgo “condicionales”. Otros factores como obesidad, sedentarismo, sexo masculino, antecedentes familiares de ECV y factores psicosociales se

consideran “factores predisponentes” ya que pueden empeorar o agravar las consecuencias de los factores de riesgo mayores. (Grundy et al., 1999).

El avance en el conocimiento acerca de nuestra predisposición genética han permitido una clasificación más completa de los factores de riesgo de ECV en dos categorías: factores con un alto componente genético y factores ambientales (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1. Factores de riesgo genéticos y ambientales asociados con la Aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares. (Lusis, 2000).**

Factores de riesgo	Bibliografía
<b>Factores con componente genético:</b>	
• Niveles elevados de LDL/VLDL	Assmann et al., 1999
• Baja concentración de HDL	Gordon y Rifkind, 1989
• Niveles elevados de lipoproteína(a)	Kronenberg et al., 1999
• Presión arterial elevada	Assmann et al., 1999; Luft, 1998
• Niveles elevados de homocisteína	Gerhard y Duel, 1999
• Antecedentes familiares	Goldbourt y Neufeld, 1988
• Diabetes y Obesidad	Assmann et al., 1999
• Factores hemostáticos	Assmann et al., 1999
• Depresión y otros trastornos del comportamiento	Glassman y Shapiro, 1998
• Sexo masculino	Nathan y Chaudhuri, 1997
• Inflamación	Kugiyama et al., 1999
• Síndrome metabólico	Lusis et al., 1998
<b>Factores medioambientales:</b>	
• Dieta rica en grasa y colesterol	Assmann et al., 1999
• Tabaquismo	Assmann et al., 1999
• Niveles bajos de antioxidantes	Steinberg y Witztum, 1999
• Sedentarismo	Assmann et al., 1999
• Agentes infecciosos	Hu et al., 1999

La tabla 3.2. muestra los límites establecidos de los principales factores de riesgo cardiovascular según el último informe consenso emitido por el Instituto Nacional de Salud Americano. (National Cholesterol Education Program, 2002-Adult Treatment Panel III, ATP III).



**Tabla 3.2. Clasificación de la ATPIII de los factores de riesgo cardiovascular.**

<b>Factor de riesgo</b>	<b>Normales</b>	<b>Límite superior</b>	<b>Elevado</b>
Colesterol total (mg/dL)	< 200	200-239	> 240
LDL-colesterol (mg/dL)	< 129 < 100 (óptimo)	130-159	> 160 ≥ 190 (muy alto)
Triglicéridos (mg/dL)	< 150	150-199	200-499 ≥ 500 (muy alto)
<b>Valores límites:</b>			
HDL colesterol (mg/dL)	< 40		
Hipertensión (mmHg)	≥ 140/90		
Edad	Hombres: ≥ 45 Mujeres: ≥ 55		

El último informe de la Sociedad Española de Aterosclerosis (Informe SEA, 2003) alerta de el impacto que las ECV están teniendo en la salud y la economía de la población española, no solo por su elevadas tasas de mortalidad y morbilidad, sino que también por la alta prevalencia de los factores de riesgo asociados a la ECV entre la población española:

- La prevalencia de hipercolesterolemia en la población española es elevada: el 18% de individuos entre 35-56 años posee valores de colesterol total elevados, superiores a 250 mg/dL y el 57,8% lo tiene mayor de 200 mg/dL. Sin embargo la mayoría de las personas con hipercolesterolemia desconocen parecerla y la mayoría no reciben tratamiento dietético ni hipolipemiente (Banegas et al., 1993).
- El 40 % de la población española padece hipertensión arterial. Este porcentaje aumenta con la edad y alcanza el 68% entre las personas mayores de 60 años. Además solo el 16% de la población hipertensa tiene controlada regularmente su presión arterial de forma óptima (Banegas et al, 1998, Banegas y Rodríguez Artalejo, 2002b).
- En España el porcentaje de población diabética entre los 30-65 años se estima en un 6% y en un 10% si aumentamos la edad límite hasta los 89 años. Además la frecuencia de diabetes esta aumentando en los últimos años, y una parte muy importante de las personas diabéticas desconoce que lo son (Goday, 2002).
- El 36% de los españoles son fumadores habituales y los jóvenes españoles tienen una de las prevalencias de tabaquismo más altas de Europa. El tabaco produce aproximadamente 52.000 muertes al año en España (16% de todas las defunciones) siendo la primera causa de enfermedad, discapacidad y muerte prematuras y evitables dentro de la población española (Informe SEA, 2003)

- La dieta española ha experimentado en los últimos años una serie de cambios, quizás asociados al desarrollo económico, que hacen que tienda a separarse en algunos aspectos del patrón dietético mediterráneo recomendable, evolucionando hacia un modelo anglosajón. Así encuestas nutricionales recientes han puesto de manifiesto como la dieta española tiene una ingesta excesiva de grasas saturadas (procedentes principalmente de la carne y los derivados lácteos) y una ingesta deficiente de hidratos de carbono (Aranceta y Serra-Majem, 2001). Estos mismos cambios dietéticos están presentes en la población infantil (Rodríguez Artalejo et al., 2002a).
- Según las encuestas realizadas por el ministerio de Sanidad y Consumo entre 1989 y 1999, el 46% de la población mayor de 16 años declara no realizar actividad física durante su tiempo libre, el 32% manifiesta no realizarla tampoco durante su actividad laboral y solo el 16% declara ser lo suficientemente activo como para obtener un beneficio para su salud.
- Los últimos datos de prevalencia de obesidad indican también una tendencia al aumento de la misma tanto en población adulta como infantil: El 12.9% de los ciudadanos españoles mayores de 20 años son obesos (índice de masa corporal > 30) (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1989-1999; Gutiérrez-Fisac et al, 2000). Mayor atención recibe la obesidad infantil, que al igual que en otros países desarrollados tiende a aumentar en España. Los últimos estudios epidemiológicos indican que el 29-35% de los niños de 6-7 años presentan sobrepeso y el 8-16% son obesos (Rodríguez Artalejo et al., 2002a).

Como consecuencia de todo ello, las autoridades sanitarias y sociedades nutricionales trabajan activamente en la búsqueda de estrategias eficaces que permitan controlar y reducir los factores de riesgo y disminuir el impacto de la ECV en la salud de la población y el enorme gasto sanitario que ocasiona. (Informe SEA, 2003)

### **3.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS:**

La aterosclerosis se definió inicialmente como una lesión arterial caracterizada por un engrosamiento de la intima, formado tras la acumulación de grasa y capas de fibra de colágeno, ambos en distintas proporciones, denominada “placa de ateroma” (Crawford, 1960).

Actualmente, se ha descrito que la formación de la placa de ateroma es el resultado de una compleja interacción entre el flujo, los componentes de la sangre y la pared vascular, donde pueden intervenir procesos (Ross y Fuster, 1996) como:

- Inflamación, con un aumento de la permeabilidad endotelial, activación endotelial y atracción de monocitos.

- Crecimiento, con proliferación y migración de células de músculo liso y síntesis de matriz.
- Degeneración, con acumulación de lípidos.
- Necrosis, probablemente debida a efectos citotóxicos de los lípidos oxidados.
- Calcificación y/u osificación, que pueden ser consideradas como un proceso activo.
- Trombosis, con acumulación de plaquetas y formación de fibrina.

Numerosos autores han sugerido que el proceso de aterosclerosis ocurre principalmente en tres etapas: la iniciación de la lesión o formación de la estría grasa, la formación de la placa fibrosa y por último las lesiones avanzadas y trombosis. (Berliner et al., 1995; Lusis, 2000; Glass y Witztum 2001, Berliner, 2002). Los principales eventos que tienen lugar en cada una de estas etapas se detallan en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3. Etapas de la aterosclerosis (Berliner, 2002)**

---

***Iniciación de la lesión formación de la estría grasa:***

- A) Aumento en la entrada de monocitos a la pared arterial
  - Aumento en la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales: P-Selectina, VCAM, Cs-1, fibronectina
  - Aumento en la producción de factores quimiotácticos para monocitos y linfocitos: MCP-1
  - Aumento de factores de diferenciación de monocitos: M-CSF, IL-8, GM-CSF
- B) Formación de células espumosas
  - Alteración de lipoproteínas
  - Captación de estas lipoproteínas por receptores scavenger de macrófagos
  - Disminución de la excreción de colesterol por los macrófagos: acumulación

***Formación de la placa fibrosa:***

1. Aumenta la proliferación de las células de músculo liso
2. Aumenta la quimiotaxis de las células de músculo liso
3. Rotura de la membrana basal por metaloproteinasas
4. Aumento de la síntesis de proteínas de la matriz por las células del músculo liso
5. Muerte de las células espumosas por necrosis y apoptosis y formación del núcleo necrótico

***Lesiones avanzadas y trombosis:***

- A) Aumentan las propiedades pro-trombóticas de las células endoteliales
  - B) Aumenta la expresión de moléculas pro-trombóticas por parte de macrófagos y células del músculo liso: Factor tisular
  - C) Ruptura del vaso sanguíneo.
-

**a) Iniciación de la lesión: formación de la estría grasa**

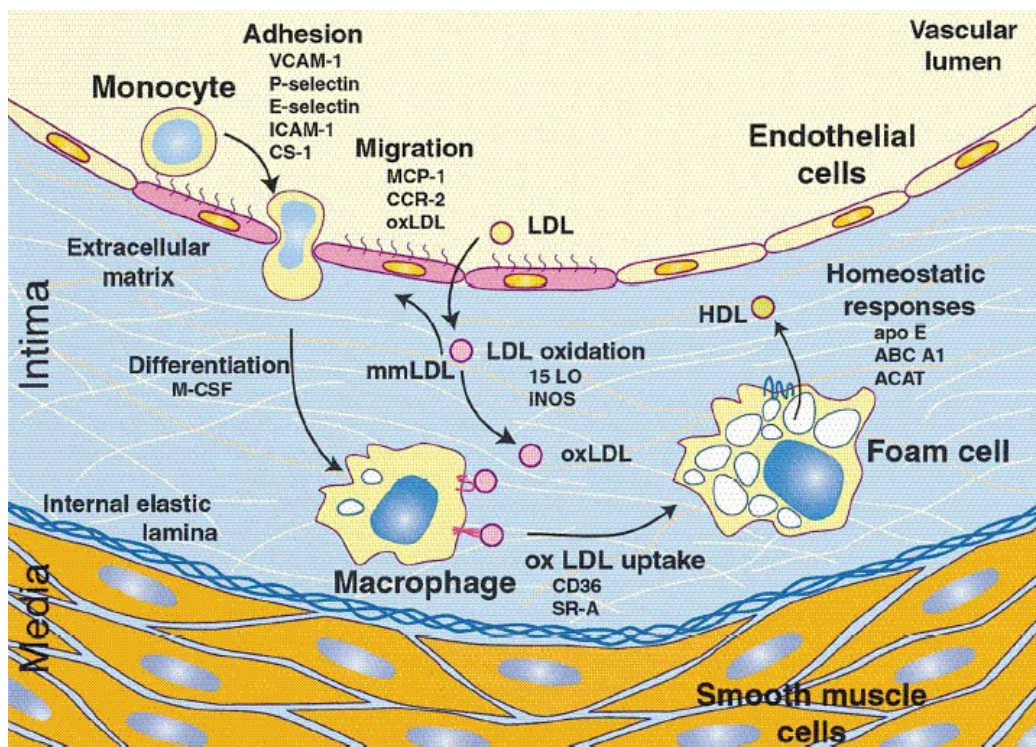
El endotelio vascular actúa como una barrera semipermeable entre la sangre y los tejidos y ejerce numerosas funciones ya que regula procesos tan importantes como la trombosis, la inflamación y el tono y la remodelación vascular. Las fuerzas hemodinámicas determinan la morfología de las células endoteliales. Así, en las regiones lineales de las arterias, donde el flujo es laminar, las células son elipsoidales y están alineadas en dirección al flujo. Sin embargo en las zonas curvas de las arterias, como el cayado aórtico, el flujo sanguíneo es turbulento ejerciendo una mayor presión sobre la pared vascular por lo que las células adquieren formas poligonales y se disponen en una orientación irregular. Estas zonas tienen una mayor permeabilidad a macromoléculas como la LDL siendo los sitios preferentes para el inicio de la lesión aterosclerótica (Gimbrone, 1999).

Las lipoproteínas LDL y otros componentes del plasma pueden entrar y salir de la matriz subendotelial. Sin embargo, cuando existe un exceso de LDL circulante, como consecuencia por ejemplo de un exceso de colesterol sanguíneo, se aumenta el transporte y la retención de las mismas. Este proceso ocurre preferentemente en los lugares donde la permeabilidad es mayor, como el cayado aórtico. La LDL difunde a través del endotelio y puede quedar retenida en la íntima arterial, posiblemente debido a una interacción entre la molécula de Apo-B100 de la LDL y los proteoglicanos de la matriz (Boren et al., 1998). Otras partículas lipídicas del plasma que contienen Apo-B100, como la lipoproteína(a) y los remanentes de la VLDL, también son susceptibles de quedar atrapadas en la matriz subendotelial y por ello también se consideran aterogénicas. Las lipoproteínas atrapadas quedan expuestas a los radicales libres (RL) generados por la actividad metabólica las células endoteliales y son susceptibles de sufrir modificaciones como oxidación, lipólisis, proteólisis y agregación. Una de las modificaciones de la LDL más significativas es la oxidación lipídica que da como resultado la aparición de unas partículas de LDL “mínimamente oxidadas” (LDL<sub>mo</sub>). En principio ni las LDL nativa, ni las LDL<sub>mo</sub> son reconocidas por los receptores scavenger de los macrófagos, pero estas LDL<sub>mo</sub> tienen un efecto pro-inflamatorio (Lusis, 2000).

Así, la acumulación de estas partículas de LDL<sub>mo</sub> puede estimular al endotelio para la producción de moléculas pro-inflamatorias, incluyendo moléculas de adhesión (VCAM-1, PCAM-1, ICAM-1, P-selectina, E-selectina), proteínas quimiotácticas (MCP-1) y factores de crecimiento (M-CSF). Este proceso se conoce con el nombre de “activación endotelial” y consiste en una respuesta global mediada al parecer por el factor nuclear NF- $\kappa$ B (Collins y Cybulsky, 2001). La activación endotelial ocasiona a la llegada de monocitos y linfocitos a la pared arterial, que entran en la matriz subendotelial donde por efecto de M-CSF proliferan y se diferencian a macrófagos. Además de la LDL<sub>mo</sub>, existen otros factores capaces de modular la inflamación como las fuerzas hemodinámicas, los niveles de homocisteína, las hormonas sexuales y las infecciones. La diabetes también puede promover la inflamación, en

parte a través de la glicación de moléculas como proteínas y lípidos que modifican la interacción con los receptores del endotelio (Ross, 2004).

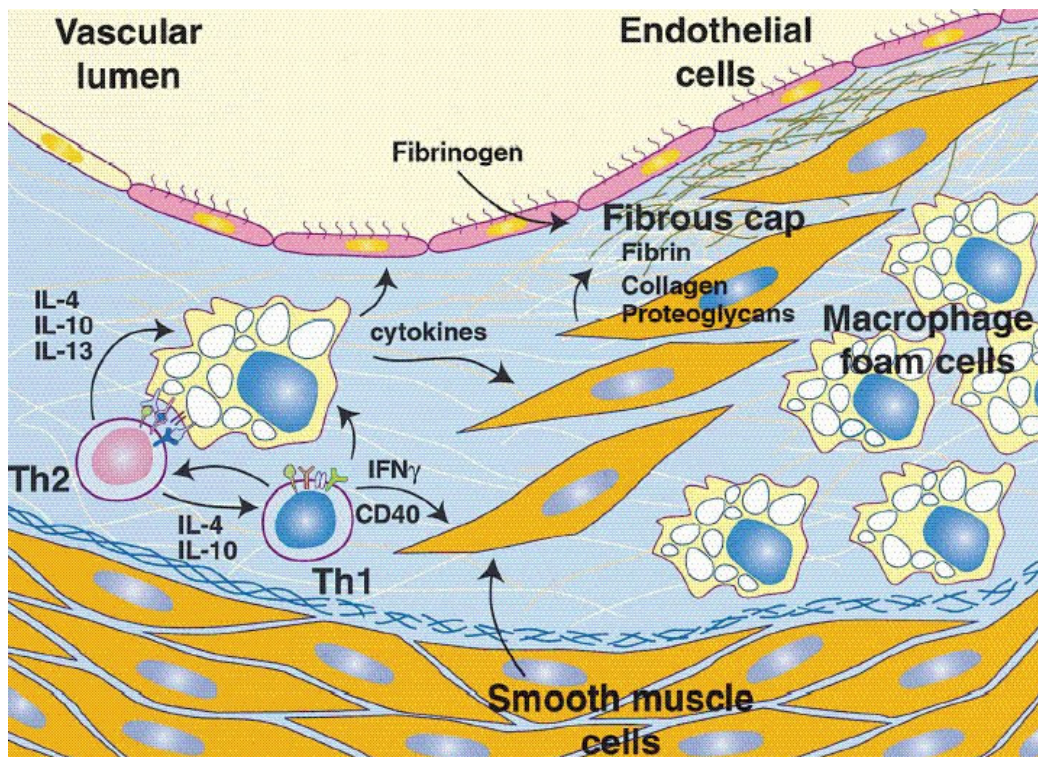
Los macrófagos presentan en su superficie unos receptores llamados “scavenger” o “basureros”, como el SR-A y el CD36. Estos receptores reconocen y captan a las lipoproteínas modificadas y otras partículas. A diferencia de los receptores de la LDL, la expresión de los receptores scavenger no esta regulada por la concentración intracelular de colesterol sino que su síntesis parece estar regulada un factor de transcripción (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) entre cuyos ligandos se incluyen: ácidos grasos oxidados y citoquinas, como el TNF $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  (Tontonoz et al., 1998). La captación de lípidos por parte de los macrófagos produce la acumulación de los mismos en el interior de la célula transformándose en lo que se conoce como “celulas espumosas” (foam cells). Pero para que las LDL sean susceptibles de ser reconocidas por los receptores scavenger de los macrófagos es necesario que se modifiquen extensamente. En esta modificación los RL de oxígeno producidos por células endoteliales y macrófagos desempeñan un papel importante, aunque también podrían estar involucradas varias encimas como la mieloperoxidasa, la esfingomielinasa o las fosfolipasas (Lusis, 2000). Las LDL oxidadas parecen estar implicadas tanto en el inicio, como en la progresión de la aterosclerosis y su papel será tratado con profundidad más adelante en esta Memoria Doctoral.



**Figura 3.1. Acontecimientos iniciales en el desarrollo de la estria grasa.** (Glass y Witztum, 2001)

### b) Formación de la placa fibrosa.

La siguiente fase del desarrollo de la lesión parece estar mediada por las interacciones entre monocitos/macrófagos y células T que resulta en una serie de respuestas celulares y humorales características de un estado inflamatorio crónico (Dzau et al., 2002). La formación de la placa fibrosa se inicia con la migración de las células de músculo liso (CML) desde la capa media hacia la matriz subendotelial. Allí las células proliferan y también son capaces de captar las lipoproteínas modificadas contribuyendo así junto con las células espumosas al engrosamiento del núcleo lipídico. Además las CML secretan proteínas fibrosas de la matriz extracelular, como colágeno y proteoglicanos conduciendo de este modo al desarrollo de la placa fibrosa. En la placa fibrosa suele observarse un núcleo central de lípidos extracelulares, con cristales de colesterol y abundantes células espumosas, rodeado de CML y una cubierta de fibras más o menos colagenizada e hialinizada que le da el nombre a esta lesión. Esta disposición de la placa fibrosa se ha interpretado como una reacción a la agresión ocasionada por los lípidos en la íntima arterial y una respuesta del tejido conectivo que trata de limitar la progresión del reciente depósito de lípidos. La formación de la placa fibrosa supone un importante avance en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que supone un aumento en el tamaño de la lesión y una disminución en el grosor de la capa media (Glass y Witztum, 2001).



**Figura 3.2 : Progresión de lesión aterosclerótica: formación de la placa fibrosa.** (Glass y Witztum, 2001).

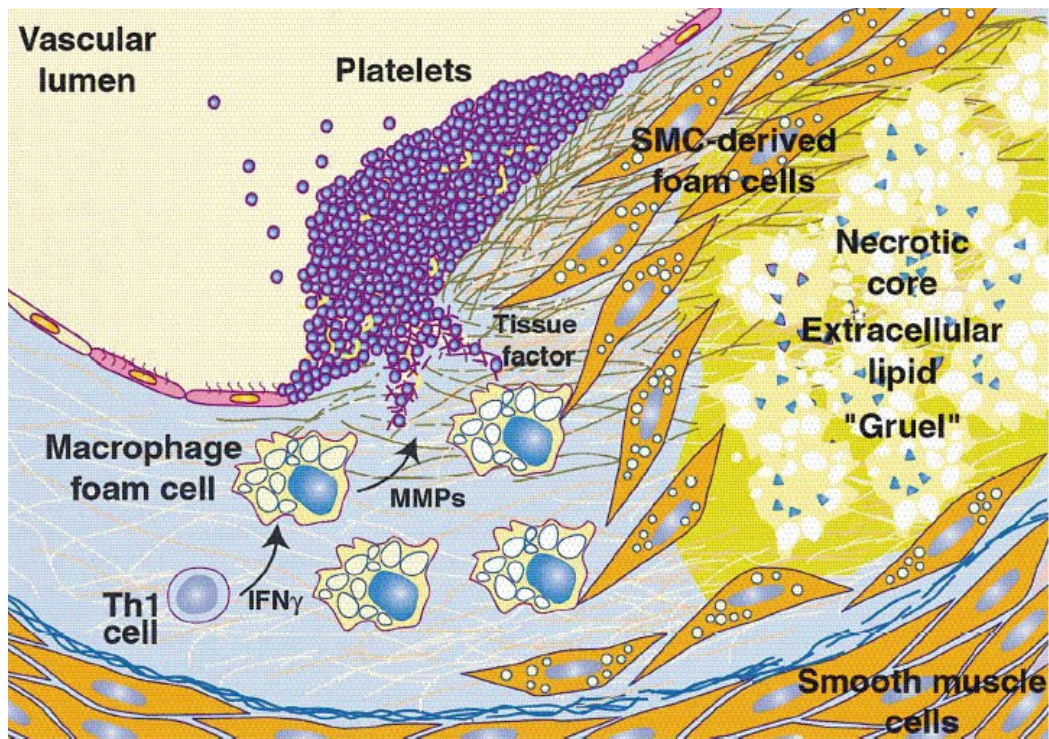
**c) Lesiones avanzadas y trombosis.**

La respuesta proliferativa de las CML y células inflamatorias hace que la estría grasa evolucione a una placa aterosclerótica más compleja. Los estadios más avanzados de la lesión implican muerte celular, rotura de las placas, calcificación y procesos trombóticos.

Las placas ateromatosas más avanzadas presentan un “núcleo necrótico” que consiste en un gran núcleo lipídico rodeado por una delgada cubierta fibrosa. Las células espumosas mueren liberando una gran cantidad de lípidos a la matriz extracelular, formándose así el núcleo necrótico al que contribuyen además los lípidos intracelulares, CML que también han captado LDL modificadas y el resto del material lipídico extracelular (Bennett, 1999). No se conoce muy bien los mecanismos que inducen a la apoptosis de macrófagos y células del músculo liso aunque se ha sugerido que las partículas de LDLox podrían participar en este proceso ya son capaces de inducir la muerte celular en muchos tipos de células. (Berliner, 1996). Las placas más vulnerables a la rotura generalmente son delgadas y contienen un elevado número de células inflamatorias. La estabilidad de las placas depende del mantenimiento de la placa fibrosa, que a su vez depende del equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz. Las CML sintetizan las fibras de colágeno y los proteoglicanos de la matriz extracelular, mientras que los macrófagos secretan varias proteinasas, como colagenasas, gelatinasas o catepsinas, que la degradan. Por otra parte, las células T también pueden producir una serie de moléculas capaces de inhibir la síntesis de la matriz, como el interferon- $\gamma$  (Lusis, 2000).

Las placas más complejas también pueden presentar calcificación lo que ocasiona un cambio en las características mecánicas del tejido arterial, lo que contribuye a la inestabilidad de la placa (Beadenkopf et al., 1964). Esta calcificación limita la flexibilidad de los vasos sanguíneos por lo que el corazón necesitará ejercer más presión para la circulación de la sangre. Se ha descrito que la calcificación de la íntima ocurre de forma similar a la formación del hueso por los osteoblastos (Bostrom et al., 1993) y que este proceso podría estar favorecido por la presencia de oxiesteroles y citoquinas en la lesión aterosclerótica (Watson et al., 1994).

Cuando las placas se rompen, los componentes internos de la misma y el factor tisular quedan expuestos a los componentes de la sangre y se inicia cascada de la coagulación, las plaquetas se adhieren y se origina la trombosis (Glass y Witztum, 2001). De esta forma las lesiones ateroscleróticas avanzadas pueden acarrear síntomas isquémicos como resultado de un estrechamiento progresivo de la luz arterial. Las consecuencias agudas de la ECV, tales como el infarto de miocardio o la enfermedad cerebrovascular, son el resultado generalmente de la ruptura de la placa y la trombosis (Lee y Lobby, 1997).



**Figura 3.3. Lesiones avanzadas: ruptura de la placa fibrosa y trombosis.** (Glass y Witztum).

### 3.3. LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS Y ATROSCLEROSIS.

La relación existente entre el colesterol y el riesgo de ECV ha sido descrita extensamente en la literatura científica (Steinberg, 2002). Las primeras evidencias a este respecto fueron obtenidas en 1913 por el fisiólogo ruso Anitschkow, quien encontró que la adición de una cantidad importante de colesterol y de grasa saturada a la dieta de conejos les inducía una notable hipercolesterolemia, que transcurridos unos meses producía una grave aterosclerosis. Numerosos trabajos posteriores con otras especies animales han confirmado estos estudios y la alimentación con una dieta rica en grasa saturada y colesterol es un modelo ya clásico en los laboratorios para conseguir reproducir hipercolesterolemia en animales de experimentación. (Moghadasian et al., 2002)

Sin embargo el colesterol es un componente esencial de todos los tejidos ya que forma parte de las estructuras de las membranas y es precursor de una serie de moléculas como vitaminas, hormonas, sales biliares. El colesterol es transportado por la sangre por las lipoproteínas entre las que se encuentran los quilomicrones (QM), las lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL), las lipoproteínas de densidad baja, (LDL) y las lipoproteínas de



alta densidad (HDL). La tabla 3.4 muestra la composición y características de las principales lipoproteínas plasmáticas.

**Tabla 3.4. Composición y características de las lipoproteínas plasmáticas humanas.**

	QM	VLDL	LDL	HDL
Proteínas (% masa total)	2	7	20	50
TG (% masa total)	83	50	10	8
CT (% masa total)	8	22	48	20
PL (% masa total)	7	20	22	22
Peso molecular (KDa)	400-3000	10000-100000	2000-3500	175-360
Densidad (g/mL)	<0.95	0.95-1.006	1.019-1.063	1.063-1.210
Diámetro (nm)	>70	30-90	22-28	5-12
Apolipoproteínas	A-I, B-48, C-I, C-II, C-III	B-100, E	B-100	A-I, A-II

*QM, quilomicrones; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; TG, triglicéridos; CT, colesterol total (libre + esterificado); PL, fosfolípidos. Fuente: Gurr & Harwood 1991. Lipid Biochemistry: an introduction, 4th edn. Chapman and Hall, London.*

Los quilomicrones (QM) son las lipoproteínas mayores del plasma y su función es transportar los triglicéridos el colesterol y otras componentes liposolubles de la dieta desde el intestino hasta el tejido adiposo y el hígado. Su densidad es muy baja (<0.94 g/mL) y su contenido proteico no alcanza el 2%. Se ha propuesto que estas lipoproteínas postprandiales ricas en triglicéridos y sus remanentes (originados en el plasma tras la hidrólisis de sus TG por la lipoprotein-lipasa) podrían ser potencialmente aterogénicas ya que estudios *in vitro* han sugerido que pueden provocar disfunción endotelial (Doi et al, 1998).

Las VLDL son las principales lipoproteínas secretadas por el hígado, contienen colesterol, fosfolípidos, triglicéridos, Apo B100 y pequeñas cantidades de Apo E y Apo C. De la misma manera que los QM, los triglicéridos de las VLDL son hidrolizados por la lipoprotein-lipasa. Los remanentes de VLDL resultantes, ricos en esteres de colesterol se conocen como lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), una parte de estas son recaptadas por el hígado. El papel de estas lipoproteínas ricas en TG en la aterosclerosis todavía no está bien establecido. Si bien, se ha observado un desarrollo prematuro de aterosclerosis en individuos que padecen betadislipoproteinemia familiar, una enfermedad genética provocada por una mutación de la ApoE que se caracteriza por un aumento en los triglicéridos sanguíneos producido por la acumulación de QM y VLDL remanentes (Schaefer, 2002).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se generan en el plasma procedentes de las IDL y contienen solo una molécula de Apo B100. El papel de las LDL es transportar el colesterol a los tejidos periféricos y regular la síntesis de novo del colesterol en estos lugares. Está ampliamente aceptado que altas concentraciones de LDL en plasma constituyen un importante factor de riesgo de ECV (Olson, 1998). Sin embargo los estudios *in vitro* han demostrado que las LDL nativas están desprovistas de actividad aterogénica y solo después de su modificación pueden dar lugar a la formación de células espumosas. La oxidación de las lipoproteínas LDL parece ser un proceso clave en la iniciación de la aterosclerosis y por ello se tratará en profundidad en el siguiente apartado.

Otras lipoproteínas como la lipoproteína(a) también se consideran aterogénicas. Estas lipoproteínas son similares a la LDL pero contienen otra subunidad proteica, la Apo(a), unida a la ApoB100 mediante un puente disulfuro. Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que las concentraciones elevadas de Lipoproteína (a) constituyen un factor de riesgo de ECV (Genest et al., 1991; Schaefer et al., 1994; Boston et al., 1996; Seman et al., 1999). Estudios en animales de experimentación han descrito que estas lipoproteínas también son susceptibles de oxidación y pueden contribuir a la formación de células espumosas (Nielsen et al 1998) y a la activación endotelial (Beaudeau et al., 1997).

Las HDL pueden ser producidas por el hígado o generadas en el plasma como consecuencia de interacción entre las distintas lipoproteínas plasmáticas y los tejidos. El papel de las HDL es el transporte de colesterol desde los tejidos extrahepáticos hacia el hígado (Olson, 1998). Las lipoproteínas HDL también son ricas en colesterol pero a diferencia de las anteriores se consideran antiaterogénicas ya que pueden ejercer un doble mecanismo protector frente a la aterosclerosis: por una parte las HDL son capaces de retirar el exceso de colesterol acumulado en la matriz subendotelial y en el interior de las células espumosas (Tall et al., 2000) y por la otra protege de la oxidación lipídica, debido en parte a la presencia en esta lipoproteína de una enzima, la paroxonasa sérica, que degrada ciertos fosfolípidos biológicamente activos (Barter et al., 2004).

Por ello, hoy en día se tienden más a considerar los valores de colesterol-LDL como factor de riesgo cardiovascular en vez de las concentraciones totales de colesterol (ATP III, 2002).

### **3.4. TEORIA DE LA OXIDACIÓN DE LA LDL.**

Entre los muchos factores implicados en la aterosclerosis, la teoría de la modificación oxidativa de las lipoproteínas LDL es la hipótesis más aceptada como causa de inicio del proceso aterosclerótico. Esta teoría afirma que la modificación oxidativa de las LDL u otras lipoproteínas es un proceso inicial primordial, aunque no exclusivo, del proceso aterogénico (Chisolm y Steinberg, 2000).

El concepto de que las LDL circulantes debían sufrir modificaciones para poder tener un efecto pro-aterogénico fue propuesto originalmente por Brown y Goldstein (1979). Estos investigadores descubrieron que los macrófagos no eran capaces de captar las LDL nativas con una eficacia suficiente como para saturar las células con colesterol y que las partículas de LDL debían de sufrir alguna modificación para que fueran reconocidas por sus “receptores scavenger”. La teoría de la oxidación de las LDL se basa principalmente en dos observaciones experimentales (Steinberg y Witztum, 2002):

- Las LDL nativas son captadas por macrófagos con una velocidad lo suficientemente lenta como para prevenir la formación de células espumosas, mientras que la captación de las LDLox parece no estar regulada, acumulándose en el macrófago y dando lugar a la formación de células espumosas (Heinecke et al., 1984).
- Las LDLox poseen actividad citotóxica pudiendo causar un daño directo sobre las células endoteliales y otras células constituyentes de las arterias. (Hessler et al., 1983).

Se ha sugerido que uno de los mecanismos por el que las LDLox ocasionan tales efectos es la reacción de los productos de peroxidación lipídica con la apolipoproteína B100 de la LDL. Esta reacción puede modificar la estructura de la misma ocasionando una alteración del lugar de reconocimiento de los receptores. De esta forma, las partículas de LDL atrapadas en la matriz subendotelial no podrían ser retiradas mediante los mecanismos habituales de captación, lo que origina la activación de mecanismos compensatorios a través de los receptores “scavenger” que, al no estar regulados por la concentración de colesterol intracelular, ocasiona una acumulación de colesterol en las células y una alteración de su función biológica (Berliner, 1996).

No obstante, actualmente se ha descrito que la LDLox, así como sus productos de degradación, pueden contribuir a la fisiopatología de la aterosclerosis tanto en la iniciación como en la progresión de la lesión. Así otros procesos implicados en el desarrollo de la aterosclerosis como la inflamación, la proliferación celular y la trombosis pueden tener también su origen en la oxidación o estar inducidos por lipoproteínas oxidadas (Tabla 3.5) (Berliner, 1996). Entre los efectos descritos ocasionados por las LDL oxidadas se encuentran: alteración de la función del endotelio vascular (Boissonneault et al., 1995); alteración en los mecanismos de captación de lipoproteínas, su utilización y su reemplazamiento (Maor y Aviram, 1994); el aumento de la expresión de moléculas proinflamatorias por parte del endotelio (Hajjar y Pomerantz, 1992); una inhibición de la liberación de NO por las células endoteliales (Liao et al., 1995) o una disminución de su disponibilidad (Watson et al., 1997); y por último efectos citotóxicos e inducción de la apoptosis de células vasculares (Harada-Shiba et al., 1998).

**Tabla 3.5. Mecanismos aterogénicos de las LDL oxidadas** (Witztum y Steinberg, 2001)

- 
- Captación por macrófagos de forma no controlada, conduciendo a la formación de células espumosas.
  - Efecto quimiotáctico para monocitos y células-T e inhibición la movilidad de la los macrófagos tisulares.
  - Efecto citotóxico, en parte debido a los esteroides oxidados que pueden inducir la apoptosis.
  - Actividad mitogénica para SMC y macrófagos.
  - Alteración de la expresión génica de células vasculares Ej. Inducción de MCP-1, factores estimuladores de colonias, IL-1, y expresión de moléculas de adhesión.
  - Aumento de la expresión de receptores “scavenger” de los macrófagos, aumentando de este modo su propia captación por los mismos.
  - Inducción de determinados genes proinflamatorios como la hemoxigenasa, y la celuloplasmina.
  - Actividad inmunogénica. Conduce a la formación de anticuerpos específicos y a la activación de células T.
  - Mayor susceptibilidad a la agregación, lo que ocasiona un aumento de su captación por los macrófagos.
  - Puede aumentar los mecanismos pro-coagulantes mediante la inducción del factor tisular y la agregación plaquetaria.
  - Impacto negativo sobre las propiedades vasomotoras de las arterias.
- 

Estudios científicos indican que dietas ricas en lípidos y/o colesterol pueden promover la producción de RL de oxígeno, la elevación los peróxidos plasmáticos y un incremento la susceptibilidad de las lipoproteínas a la oxidación (Prasad y Kalra, 1993; Yumaguchi et al, 1993; Erdinçler et al. 1997), y que la administración de antioxidantes a dietas ricas en colesterol redujeron los niveles plasmáticos de productos de peroxidación e inhibieron el desarrollo de la aterosclerosis. (Hodis et al., 1992; Fruebis et al., 1994; Crawford et al., 1998; Fukao et al., 2004; Kamada et al., 2005). La relación entre la actividad antioxidante de determinados compuestos y la protección que ejercen los mismos sobre la aterosclerosis refuerza la teoría de que la oxidación de la LDL es un paso principal en el desarrollo de la aterosclerosis (Steinberg et al., 1989; Berliner, 1996).

Se han descrito dos factores que pueden influenciar en la susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas LDL. Por un lado el contenido de antioxidantes, sobre todo de vitamina E, el

antioxidante mayoritario de la LDL (Esterbauer et al., 1992b; Reaven et al., 1993) y por el otro el tamaño y la densidad de la partícula. Se ha observado que las partículas más densas y pequeñas, aumentadas en varias condiciones de riesgo de ECV como diabetes, dislipidemia mixta o hipercolesterolemia familiar, son más susceptibles a la oxidación que las partículas más grandes y menos densas (Campos et al., 1992; Lada y Rudel, 2004).

Parece que la oxidación de lipoproteínas es poco probable que tenga lugar en el plasma, debido a la presencia de un número elevado de moléculas antioxidantes y de proteínas capaces de unirse a los iones metálicos, neutralizando así su efecto. Es más probable que esta oxidación ocurra en un ambiente donde la concentración de antioxidantes sea reducida y donde estas partículas estén expuestas al estrés oxidativo. La pared arterial presenta estas características y estudios *in vitro* han demostrado que la presencia de células vasculares puede acelerar la oxidación de la LDL (Berliner, 1996)

Se han descrito varios sistemas responsables de la oxidación de las LDL *in vitro* y la mayoría de ellos comparten un mecanismo radicalario común. Los iones metálicos son uno de los mecanismos más utilizados para promover la oxidación de las LDL *in vitro*. Las CML en cultivo necesitan hierro o cobre para producir la modificación de las LDL, y esta oxidación es inhibida por agentes quelantes (Heinecke et al., 1984). Además, en ausencia de células, una alta concentración de estos iones metálicos también oxida las LDL, como también lo hacen proteínas que contienen metales como la celuloplasmina (Ehrenwald et al., 1994). Si bien, el papel de los iones metálicos en la oxidación de la LDL y en desarrollo de la ECV *in vivo* no está tan claro (Sempos, 2002). La formación de tioles a partir de moléculas de L-cisteína en sistemas celulares *in vitro* también genera RL y pueden oxidar las LDL (Heinecke et al., 1987). Las especies reactivas de oxígeno pueden promover la peroxidación lipídica mediante reacciones que dependen de la presencia de iones metálicos y posiblemente también interfieran en la oxidación de la LDL por parte de las células. Se ha demostrado que la generación de iones superóxido por sistemas celulares o enzimáticos puede promover la oxidación de LDL *in vitro* y que esta oxidación es inhibida en presencia de superóxido dismutasa (Berliner, 1996). Las células endoteliales liberan óxido nítrico (NO) un compuesto con actividad vasodilatadora que juega un importante papel en la fisiología del sistema vasomotor. Se ha sugerido que el NO podría tener propiedades anti-aterogénicas ya que posee importantes funciones como son la vasorelajación y la inhibición de la agregación plaquetaria (Cooke y Tsao, 1994). El NO es un radical libre relativamente estable al pH fisiológico, incapaz de oxidar por sí mismo la LDL, sino que por el contrario, inhibe la peroxidación lipídica al actuar como aceptor final de la cadena de propagación radicalaria (Rubbo et al., 1995). Sin embargo en presencia de iones superóxido, el NO origina peroxinitrito, un radical libre muy reactivo, capaz de producir la oxidación lipídica de las partículas de LDL así como nitrosación de proteínas. (Beckman et al., 1990; Graham et al., 1993). Algunos sistemas enzimáticos originan RL que pueden producir la oxidación de la

LDL. Algunos ejemplos son las lipoxigenasas, presentes en macrófagos, células endoteliales y CML, que oxidan los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de fosfolípidos (Yamamoto, 1992) o las mieloperoxidasas, sintetizadas por los fagocitos como mecanismo de defensa frente a agentes microbianos (Klebanoff et al., 1980). Se ha demostrado la presencia de ambas enzimas en las lesiones ateroscleróticas humanas lo que sugiere que podrían ser responsables de la oxidación de lipoproteínas *in vivo*. (Heinecke, 1998). Otros mecanismos no radicalarios también pueden producir la modificación de las partículas LDL, aumentando su susceptibilidad a la oxidación y haciéndolas más aterogénicas. Por ejemplo se ha descrito que las reacciones de glicosilación juegan un papel en la aceleración de la enfermedad cardiovascular en individuos que sufren diabetes (Baynes, 1991; Chisolm, 1992).

### 3.5. ANTIOXIDANTES Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

El capítulo anterior muestra el importante papel que podrían jugar los RL y el estrés oxidativo en el desarrollo de la aterosclerosis. Muchos de los ciclos bioquímicos que tienen lugar en el organismo implican reacciones de oxidación y reducción. Los RL pueden generarse continuamente en el organismo en multitud de reacciones biológicas, como durante la respiración, la respuesta inmunitaria, el metabolismo de xenobióticos o la señalización celular (Halliwell y Gutteridge, 1999). Sin embargo la producción de RL puede verse incrementada en determinadas situaciones como consecuencia de enfermedades, el consumo de tabaco, contaminantes medioambientales, fármacos o la exposición a radiaciones ionizantes. Estos compuestos pueden reaccionar con otras moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, lo que ocasiona una alteración de la estructura y función de componentes celulares y produciendo un daño celular (McCord, 2000). Por lo tanto, la capacidad del organismo de evitar estos daños producidos por los RL depende en gran medida de la eficacia de su sistema de defensa antioxidante.

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando esta presente a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo (Halliwell y Gutteridge, 1999). Entre los mecanismos de defensa antioxidante del organismo se encuentran enzimas que actúan inactivando o descomponiendo los RL hacia moléculas menos reactivas, como la superóxido dismutasa, paroxonasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Otras moléculas del organismo o procedentes de la dieta pueden actuar captando los RL o secuestrando iones metálicos. Este es el caso de las vitaminas E y C, coenzima Q, glutatión,  $\beta$ -carotenos, algunas proteínas plasmáticas, el ácido úrico o los polifenoles. El último frente de defensa son las enzimas de reparación como nucleasas, proteasas o transferasas que destruyen las moléculas dañadas o reparan los daños originados por los RL (Halliwell y Gutteridge, 1999). En los organismos aerobios, la producción de RL esta balanceada con la defensa antioxidante. Sin embargo la ruptura de este balance da lugar a una situación conocida como "estrés oxidativo" (Sies, 1991). El estrés oxidativo no se ha relacionado

solamente con el desarrollo de la aterosclerosis, sino que también con otras enfermedades crónicas degenerativas entre las que se incluyen la enfermedad de alzheimer o el cáncer (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Un gran número de estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de una dieta rica en frutas y verduras reduce el riesgo de desarrollar ECV y cáncer (Kris-Etherton, 2002; WHO/FAO, 2003) y que los niveles plasmáticos de antioxidantes, como la vitamina E,  $\beta$ -carotenos, vitamina-C o selenio están inversamente relacionados con la incidencia de ECV (Stanner et al., 2004). Sin embargo, el mecanismo por el cual los antioxidantes pueden ejercer este efecto protector no ha sido todavía establecido. Una de las teorías propuestas es que los antioxidantes podrían actuar reduciendo el estrés oxidativo subyacente en multitud de procesos patológicos. No obstante, a pesar de que los antioxidantes han mostrado efectos beneficiosos en modelos experimentales y estudios epidemiológicos, los resultados de los estudios de intervención no han resultado concluyentes (Griendling y FitzGerald, 2003; Scanner et al., 2004; Hasnain y Mooradian, 2004; Blomhoff, 2005).

Entre los estudios observacionales destacan, por ejemplo, el "Nurses' Health Study", en el que participaron 87000 participantes. Los resultados de este estudio indicaron que el riesgo de ECV estaban inversamente relacionadas con la ingesta de vitamina E. En otro estudio llevado a cabo con 40000 participantes ("Health Professionals' Follow-up Study"), la mayor ingesta de  $\beta$ -caroteno también se asoció con un menor riesgo coronario, pero en este caso el mayor consumo de la vitamina E en la dieta solo se asoció con un menor riesgo cardiovascular entre el subgrupo de fumadores (Stampfer et al., 1993; Rimm et al., 1993). La ingesta de vitamina C también fue inversamente relacionada con la ECV en otro estudio epidemiológico que contó con 12000 participantes (Enstrom et al., 1992). Por otra parte la baja ingesta de estos compuestos antioxidantes también se ha relacionado con mayor riesgo cardiovascular (Klipstein-Grobusch et al., 1999).

Se han llevado a cabo un gran número de estudios de intervención para demostrar una posible relación entre el consumo de nutrientes antioxidantes, en la dieta o a través de suplementos, y la ECV (tabla 3.6). Sin embargo estudios de intervención realizados en humanos con cohortes muy numerosas no han mostrado efectos beneficiosos en la ECV producido por el consumo de antioxidantes. Este es el caso del "Large Finnish Alpha-Tocopherol-Beta-Carotene cancer prevention study" (ATBC) diseñado para estudiar los efectos de la vitamina E y el beta caroteno en cáncer de pulmón en más de 29000 varones fumadores de entre 50-69 años (Virtamo et al., 1998; Leppala et al., 2000). Tampoco se encontraron efectos de la administración de  $\beta$ -caroteno en el "Physicians' Health Study" llevado a cabo con 22000 voluntarios (Hennekens et al., 1996). Sin embargo otros estudios si que reportan resultados positivos. El "Cambridge Heart AntiOxidant Study" (CHAOS), llevado a cabo con 2002 hombres y mujeres con evidencias de enfermedad coronaria, encontró un efecto beneficioso del

tratamiento con antioxidantes. Así tras un periodo de 17 meses se observó un 47% de reducción en muerte por ECV y un 77% de reducción de infartos de miocardio no mortales, entre los pacientes tratados con antioxidantes con respecto al placebo (Stephens et al., 1996). En un estudio con 196 pacientes en hemodiálisis con un riesgo alto de ECV, la administración de  $\alpha$ -tocoferol disminuyó el riesgo relativo de infarto de miocardio primario, enfermedad vascular periférica, y angina (Boaz et al., 2000). En un estudio prospectivo a doble ciego llevado a cabo con 40 pacientes de trasplante cardiaco, donde existe un alto riesgo de aterogénesis acelerada, el tratamiento con un conjunto de vitaminas antioxidantes (vitaminas C y E) condujo a una menor progresión de la lesión comparada con el placebo. (Fang et al., 2002). Estos resultados ponen de manifiesto la controversia existente sobre el papel del consumo de antioxidantes en la protección o la reducción del riesgo de padecer ECV.

El conjunto de todos estos resultados han llevado a las autoridades sanitarias y a los organismos internacionales a recomendar el consumo habitual de frutas y verduras en la dieta, sin embargo la suplementación con vitaminas antioxidantes en la prevención de ECV requiere aún de investigaciones adicionales y el desarrollo de técnicas que permitan evaluar el efecto de estos suplementos en la prevención de la ECV.



**Tabla 3.6. Grandes estudios de intervención (mas de 1000 participantes) con antioxidantes en ECV**

Estudio	Pais	Población de estudio	Duración del tratamiento (años)	Dosis diaria	Resultados
<b>ESTUDIOS DE PREVENCIÓN PRIMARIA</b>					
Linxian Cancer Preventio Study (Blot et al., 1993)	China	29584 hombres y mujeres con deficiencias nutricionales, 40-69 años	5.2	15 mg $\beta$ -caroteno, 30 mg $\alpha$ -tocoferol y 50 $\mu$ g selenio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descenso no significativo de la mortalidad cerebrovascular.</li> </ul>
ATBC (Leppala et al., 2000)	Finlandia	29133 varones fumadores, 50-69 años	6.1	50 mg $\alpha$ -tocoferol y/o 20 mg $\beta$ -caroteno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento 11% en mortalidad por ECV entre el grupo <math>\beta</math>-caroteno.</li> <li>• Aumento 50% mortalidad por infarto hemorrágico entre el grupo <math>\alpha</math>-tocoferol</li> <li>• Aumento 62% en hemorragia intracerebral entre el grupo <math>\beta</math>-caroteno.</li> <li>• Disminución 14% infarto cerebral entre el grupo <math>\alpha</math>-tocoferol</li> </ul>
CARET (Omenn et al., 1996)	EEUU	14254 fumadores y 4060 trabajadores con amianto, 45-69 años	4	30 mg $\beta$ -caroteno y 25000 UI retinol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento 26% en ECV (no significativo)</li> <li>• Aumento 17% en mortalidad total</li> </ul>
PHS (Hennekens et al, 1996)	EEUU	22071 médicos varones, 40-94 años	12	50 mg $\beta$ -caroteno y/o aspirina (días alternados)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No efecto en la incidencia o mortalidad por infarto de miocardio o derrame cerebral</li> </ul>
Women's Health Study (Lee et al., 1999)	EEUU	39876 mujeres sanas, >45 años	2.1	50 mg $\beta$ -caroteno (días alternados)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No efecto en mortalidad por ECV</li> </ul>

Estudio	País	Población de estudio	Duración del tratamiento (años)	Dosis diaria	Resultados
Vitamin A and Cancer prevention Trial (De Klerk et al., 1998)	Australia	1204 antiguos trabajadores con amianto, hombres y mujeres, 40-83 años	5	30 mg β-caroteno o 25000 UI retinol (sin grupo placebo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>No efectos del β-caroteno en mortalidad por ECV</li> </ul>
Skin Cancer Prevention Trial (Greenberg et al., 1996)	Australia	1720 hombres y mujeres con cáncer de piel (no melanoma) reciente, 27-84 años	4.3	50 mg β-caroteno	<ul style="list-style-type: none"> <li>No efectos en mortalidad por ECV</li> </ul>
PHS II (Christen et al., 2000)	EEUU	15000 médicos sanos, ≥ 55 años	12	50 mg β-caroteno, 400 UI α-tocoferol, 500 mg vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> <li>A la espera de resultados.</li> </ul>
SU. VI.MAX (Hercberg et al, 2004)	Francia	13017 hombres (45-69 años) y mujeres (35-60 años)	7.5	6 mg β-caroteno, 30 mg α-tocoferol, 120 mg vitamina C, 100 μg selenio, 20 mg zinc	<ul style="list-style-type: none"> <li>No efectos en mortalidad por ECV</li> </ul>
<b>ESTUDIOS DE PREVENCIÓN SECUNDARIA</b>					
ATBC (Rapola et al., 1997)	Finlandia	1862 varones fumadores con antecedentes de infarto de miocardio y 1795 con antecedentes de angina de pecho 50-69 años	5.3	50 mg α-tocoferol y/o 20 mg β-caroteno	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduce la isquemia aguda (vit E y β-caroteno)</li> <li>No efecto en riesgo de infarto de miocardio (Vit E)</li> <li>Aumento riesgo infarto de miocardio (β-caroteno)</li> <li>No efectos en síntomas o progresión de angina de pecho (vitamina E)</li> </ul>

Estudio	País	Población de estudio	Duración del tratamiento (años)	Dosis diaria	Resultados
CHAOS (Stephens et al., 1996)	Inglaterra	2002 pacientes con aterosclerosis coronaria, media de edad 62 años	1.4	400 o 800 UI $\alpha$ -tocoferol	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminución 77% en infarto de miocardio</li> <li>No 47% reducción en muerte por ECV</li> </ul>
GISSI (GISSI, 1999)	Italia	11324 pacientes con antecedentes recientes de infarto de miocardio, edad no definida	3.5	300 mg $\alpha$ -tocoferol y/o 1 g de AGPI omega-3	<ul style="list-style-type: none"> <li>No beneficios de la vitamina E</li> <li>Disminución 15% en riesgo de muerte, infarto de miocardio y derrame cerebral en grupo omega-3</li> </ul>
HOPE (Yusuf et al., 2000)	Canada	9541 hombres y mujeres con alto riesgo ECV, > 55 años	4-6	400 UI $\alpha$ -tocoferol y/o tratamiento antihipertensivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>No efecto de la vitamina E en infarto de miocardio, derrame cerebral o muerte por ECV</li> </ul>
PPP (de Gaetano, 2001)	Italia	4495 hombres y mujeres con riesgo ECV, media edad 64 años	3.6	Dosis baja de aspirina y/o 300 mg $\alpha$ -tocoferol	<ul style="list-style-type: none"> <li>No efecto de la vitamina E en infarto de miocardio, derrame cerebral o muerte por ECV (Estudio interrumpido prematuramente)</li> </ul>
WACS (Manson et al., 1995)	EEUU	8000 mujeres con antecedentes ECV o alto riesgo, $\geq$ 40 años	4	50 mg $\beta$ -caroteno o 600 UI $\alpha$ -tocoferol	<ul style="list-style-type: none"> <li>Resultados no publicados</li> </ul>
Heart Protection Study, 2002	Inglaterra	20536 hombres y mujeres con alto riesgo ECVm, 40-80 años	$\geq$ 5	20 mg $\beta$ -caroteno, 600 mg $\alpha$ -tocoferol y 250 mg vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> <li>No efecto en infartos de miocardio o derrame cerebral</li> </ul>

ATBC, "Alpha Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study"; CARET, " $\beta$ -Carotene and Retinol Efficacy Trial"; PHS, "Physicians' Health Study"; CHAOS, "Cambridge Heart Antioxidant Study"; GISSI, "Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio"; HOPE, "Heart Outcomes Prevention Evaluation Study"; PPP, "Primary Prevention Project"; WACS, "Women's Antioxidant Cardiovascular Study";

### 3.6. DIETA MEDITERRANEA

Comparando las tasas de mortalidad por ECV (ajustadas por edades) de España y otros países del norte de Europa se ha observado que, al igual que otros países del mediterráneo, España posee unas tasas de mortalidad inferiores. Esta menor incidencia ha sido atribuida a los hábitos dietéticos de la región mediterránea, cuyas principales características son el empleo del aceite de oliva como principal aporte de grasa de la dieta y el elevado consumo de frutas y verduras frescas.

El primer estudio que estableció los efectos beneficiosos producidos por el patrón dietético mediterráneo fue el estudio de los 7 países, llevado a cabo en la década de los 50 por Keys et al. (1980). Este estudio analizó una serie de factores de riesgo cardiovascular en 13.000 hombres de 40-59 años distribuidos en 16 cohortes pertenecientes a 7 países: Finlandia, Estados Unidos, Japón, Holanda y 3 países mediterráneos: Grecia, Italia y Yugoslavia. Las 5 cohortes mediterráneas estudiadas (Creta, Corfú, Crevalcore, Montegiorgio y Dalmacia) mostraron una dieta basada en el consumo de aceite de oliva, cereales, frutas, verduras frescas y vino. La dieta de las cuatro poblaciones no mediterráneas se caracterizaba, sin embargo, por un elevado consumo de grasa animal acompañado de lácteos y bebidas alcohólicas, fundamentalmente cerveza y licores. Estos distintos modelos dietéticos se asociaron con claras diferencias en las tasas de mortalidad por enfermedad cardiovascular, lo que puso de manifiesto el posible efecto protector la dieta mediterránea frente a esta enfermedad.

Un estudio posterior, el “Lyon Diet Heart Study”, investigó el efecto de la dieta mediterránea en 605 pacientes que habían sufrido algún episodio de infarto de miocardio. Tras 27 meses de seguimiento los resultados mostraron que la mortalidad por evento cardiovascular fue 70% menor en el grupo que siguió la dieta mediterránea que los que no la siguieron (De Lorgeril et al., 1994). Más adelante se examinó la ingesta diaria de nutrientes en ambos grupos con el fin de encontrar que componentes de la dieta podrían ser los responsables de dicho efecto protector llegando a la conclusión de que el tipo de grasa de la dieta, más que la cantidad de la misma, estaba relacionada con el riesgo cardiovascular y que particularmente, la sustitución en la dieta de los ácidos grasos saturados por los ácidos grasos monoinsaturados del aceite de oliva podría resultar beneficiosa en la enfermedad cardiovascular.(De Lorgeril t al., 1997)

El elevado consumo de compuestos antioxidantes es otro de los argumentos empleados para explicar el efecto beneficioso de la dieta mediterránea en la ECV (Trichopolou et al., 1999). La elevada exposición a las radiaciones solares y las temperaturas cálidas existentes en las regiones de la cuenca mediterránea, lleva a las especies vegetales a desarrollar mecanismos

de defensa frente a las radiaciones ultravioletas y la producción excesiva de RL, mediante la acumulación de sustancias antioxidantes, como flavonoides, antocianinas y polifenoles (Cardell M, 1981). La dieta mediterránea rica en frutas, verduras y aceite de oliva conduce por tanto a una elevada ingesta de antioxidantes que podrían trasladar sus propiedades biológicas al organismo (Visioli F. et al., 1998). Así varios autores han sugerido que los compuestos antioxidantes podrían ser, al menos en parte, responsables de las bajas incidencias de enfermedad cardiovascular observadas en los países de la cuenca mediterránea (Ghiselli et al., 1997; Giugliano, 2000; Vita, 2005; Bazzano et al., 2003).

En la actualidad, el término “dieta mediterránea” se refiere a los hábitos alimenticios de algunas regiones mediterráneas asociadas al cultivo del olivo. Aunque el patrón dietético mediterráneo varía según las regiones geográficas, se pueden identificar algunas características comunes al mismo (Trichopoulou y Lagiou, 1997):

- Elevado consumo de alimentos de origen vegetal como frutas, verduras, legumbres, cereales, etc que se consumen frescos o mínimamente procesados lo que hace que conserven las propiedades nutricionales de los mismos.
- El hábito de tomar fruta fresca como postre diario y reducir el consumo de productos de pastelería.
- El consumo de aceite de oliva como principal fuente de grasa de la dieta.
- Consumo diario de lácteos (especialmente el yogur y el queso) en cantidades pequeñas o moderadas.
- El consumo moderado de vino, especialmente durante las comidas.
- Ingesta moderada de pescado y de aves y una ingesta reducida de carnes rojas y huevos (entre 0 y 4 por semana)

Los beneficios cardiovasculares observados en las poblaciones con patrón dietético mediterráneo también han influenciado en las recomendaciones nutricionales para la prevención de ECV de sociedades y organismos internacionales. Así, la OMS en su último informe recomienda sustituir el consumo de grasa saturada por grasa monoinsaturada (subrayando así el consumo de el aceite de oliva) y aumentar el consumo de frutas y verduras frescas (OMS, 2003).

### **3.7. ACEITE DE OLIVA**

El aceite de oliva ha estado ligado a la región mediterránea desde tiempos inmemorables. El cultivo del olivo pareció iniciarse en Asia Menor, en una región que se extiende desde Siria a Grecia, hace 6.000 años, pero el uso del mismo para la obtención de su fruto y del aceite data de mucho antes. (Mataix, 2001)

Podríamos definir al aceite de oliva como el zumo oleoso procedente de las aceitunas, aunque existen diferentes denominaciones en función del método de obtención y de su calidad, pudiéndose distinguir:

- **Aceite de oliva virgen:** Es el obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos, en condiciones, especialmente térmicas, que no impliquen la alteración del aceite y que no hayan tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado, con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de esterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Esta definición sólo establece una forma de obtención y limita su aplicación a otros aceites obtenidos por medios diferentes a los expresados. Dentro de los aceites de oliva vírgenes, se distinguen según su calidad sensorial y fisicoquímica: El aceite de oliva virgen extra, el aceite de oliva virgen, el aceite de oliva virgen corriente y el aceite de oliva virgen lampante.
- **Aceite de oliva:** Compuesto por aceite de oliva refinado que se enriquece con aceite de oliva virgen apto para el consumo en proporción variable en función del aceite que se quiera obtener.

La composición del aceite de oliva varía en función de múltiples factores tales como la variedad de aceituna, la exposición solar, la localización geográfica, las características del olivar, la forma de extracción y la conservación del aceite, etc. (Brenes et al., 1999). En general, pueden distinguirse dos fracciones en la composición del aceite de oliva:

- **Fracción saponificable:** Constituye el 97-99% del total y esta formada en su mayor parte por triglicéridos. El ácido oleico es el ácido graso mayoritario de los aceites de oliva y representa por término medio el 79% del total de ácidos grasos aunque puede variar entre 57-82%. Le siguen en cantidad los ácidos grasos saturados (AGS) (13-20%) fundamentalmente palmítico (11-17%) y esteárico. Por último, el aceite de oliva contiene además ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) entre los que se encuentran los ácidos grasos esenciales linoleico (4-20%) y  $\alpha$ -linolénico (0.9%).
- **Fracción insaponificable:** Constituye tan solo el 1-3% del aceite y esta compuesta por un gran número de compuestos que se encuentran en concentraciones del orden miligramos por kilo de aceite (ppm) (Tabla 3.1) por lo que también se le denominan como componentes minoritarios. Esta fracción es, en parte, la responsable de la estabilidad y las características organolépticas excepcionales de estos aceites. Los componentes minoritarios de los aceites vegetales se eliminan mayoritariamente durante los procesos de refinación (Tabla 3.7). Es por ello que el aceite de oliva virgen, al ser obtenido únicamente mediante los procesos de lavado, prensado, centrifugación y filtración, conserva todos sus componentes minoritarios, muchos de ellos con actividad antioxidante.

**Tabla 3.7. Concentración (ppm) de los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen y el aceite de oliva refinado. (Ryan et al., 1998)**

<b>Componentes</b>	<b>Aceite de oliva virgen</b>	<b>Aceite de oliva refinado</b>
Alcoholes terpénicos	3500	2500
Esteroles	2500	1500
Hidrocarburos	2000	120
Escualeno	1500	100
Compuestos fenólicos	350	80
β- caroteno	300	120
Alcoholes alifáticos	200	100
Tocoferoles	150	100
Ésteres	100	30
Aldehídos y cetonas	40	10

Esta bien establecido que el aceite de oliva tiene un papel beneficioso en la prevención de la ECV. En efecto, distintos estudios han puesto de manifiesto que el consumo de aceite de oliva y de una dieta rica en AGMI en sustitución de los AGS conduce a una reducción de factores de riesgo cardiovascular (Stara y Madar, 2002). En la mayoría de los estudios llevados a cabo en sujetos humanos, la sustitución de las grasas saturadas en la dieta por el aceite de oliva dio lugar a un descenso de los niveles de colesterol total y de colesterol LDL (Grundy, 1997; Kris-Etherton et al., 1999; Truswell y Choudhury, 1998) que fue acompañado de un aumento de colesterol-HDL (Thomsen et al., 1999). Por otra parte otros estudios han encontrado que dietas con aceite de oliva reducen la presión arterial sistólica en individuos hipertensos (Ruiz Gutiérrez et al., 1999; Ferrara et al., 2000; Herrera et al., 2001; Perona et al., 2004a). Tales efectos han sido atribuidos mayoritariamente a los ácidos grasos monoinsaturados, sin embargo, un elevado número de trabajos científicos en años recientes han puesto de manifiesto el posible papel de las sustancias antioxidantes presentes en la fracción insaponificable en relación con la enfermedad cardiovascular y el desarrollo de la aterosclerosis (Visioli y Galli, 1998).

La oxidación de la LDL juega un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis (Berliner y Heinecke, 1996). Diversos estudios de intervención en humanos han mostrado un efecto protector del aceite de oliva virgen frente a la oxidación de la LDL (Ramírez Tortosa et al., 1999; Masella et al., 2001; Fito et al., 2002; Gimeno et al., 2002; Visioli et al., 2004;

Weinbrenner et al., 2004a; Marrugat et al., 2004). Dos mecanismos se han sugerido para explicar este efecto beneficioso del aceite de oliva. En primer lugar el consumo de dietas ricas en aceite de oliva y AGMI conduce a la producción de partículas de LDL enriquecidas en AGMI, con menor contenido de AGPI, que son más resistentes a la oxidación (Reaven et al., 1991; Berry et al., 1992; Bonanome et al., 1992; Aviran y Eias, 1993; Mata et al., 1997). Además estas LDL enriquecidas en AGMI son captadas por macrófagos en menor medida que las ricas en AGPI (Aviran y Eias, 1993). En segundo lugar, los componentes minoritarios del aceite podrían contribuir a este efecto protector ya que muchos de ellos, como el hidroxitirosol y la oleuropeina, poseen actividad antioxidante y han mostrado efectos inhibidores de la oxidación de las LDL *in vitro* (Visioli y Galli, 1994; Visioli et al., 1995, Salami et al., 1995).

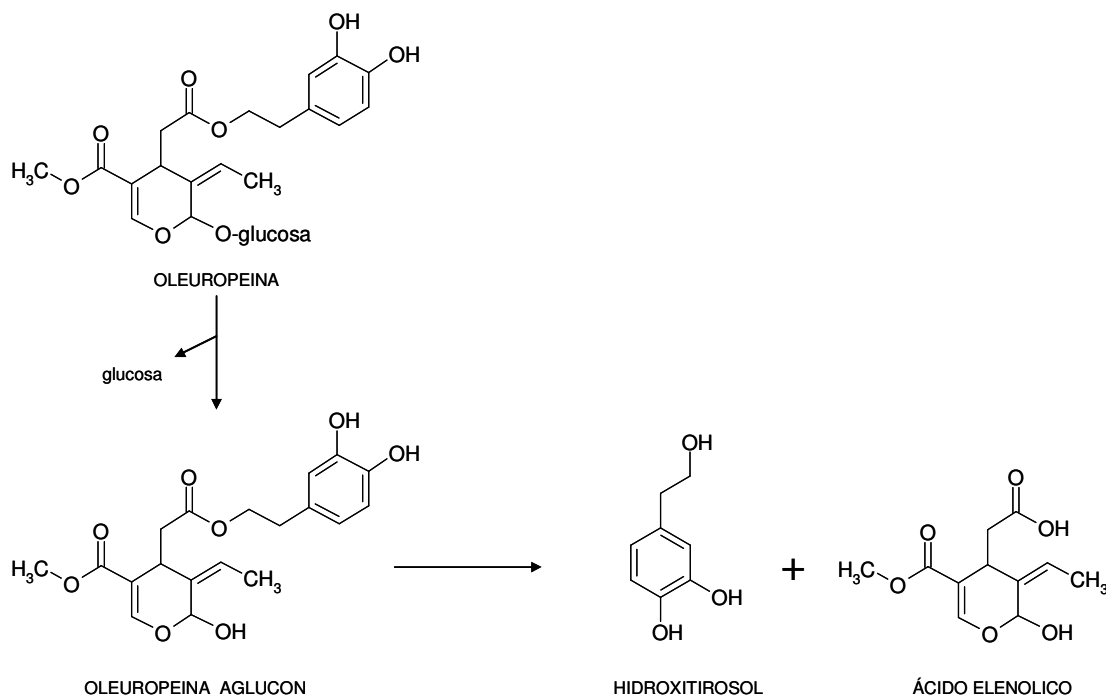
El aceite de oliva también parece tener un efecto sobre los procesos de inflamación que se desencadenan en las etapas tempranas de la aterosclerosis. Un estudio a doble ciego llevado a cabo en hombres adultos mostró que el consumo de aceite de oliva virgen por un periodo de dos meses originó un descenso en la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) por las células mononucleares periféricas (Yaqoob et al., 1998). En otro estudio llevado a cabo en un modelo *in vitro* de aterosclerosis, usando células endoteliales estimuladas con citoquinas, el ácido oleico disminuyó la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y del factor nuclear NF- $\kappa$ B (Massaro et al., 1999). Por otra parte los compuestos minoritarios del aceite de oliva también ocasionaron una disminución de VCAM-1 y una reducción de la adhesión de monocitos al endotelio en otro modelo de inflamación *in vitro* que empleaba células endoteliales (Carluccio et al., 2003).

Por último, Larsen et al. (1999) encontraron que el aceite de oliva virgen produjo una disminución de los factores de coagulación en relación con otros tipos de aceites por lo que también podría disminuir el riesgo de trombogénesis.

### 3.8. HIDROXITIROSOLO

Entre los compuestos fenólicos del aceite de oliva, se encuentra el (3,4-dihidroxifenil)etanol, más conocido como hidroxitirosol (HT). Este compuesto procede de la hidrólisis de la oleuropeina, un glicósido amargo que puede llegar a constituir más del 14% del peso seco del fruto del olivo (Ryan y Robards, 1998). En el transcurso de la maduración del fruto y durante el proceso de elaboración de las aceitunas de mesa, la oleuropeina se hidroliza dando lugar a sus componentes: oleuropeina aglicona, HT y ácido elenólico (figura 3.4.).





**Figura 3.4. Estructura química del hidroxitirosol y procedencia.**

Las aceitunas de mesa son por tanto una fuente substancial de HT en la dieta, donde se han encontrado concentraciones de hasta 761 mg/Kg en algunas variedades (Blekas G. et al., 2002).

Debido a su carácter polar, durante el proceso de elaboración del aceite, la mayor parte de los compuestos fenólicos quedan en los residuos acuosos formando parte del orujo, el alpechin o las aguas de lavado. Por tanto, estos residuos procedentes de la industria del aceite de oliva también son muy ricos en compuestos fenólicos y podrían constituir una fuente natural muy importante de HT (Fernandez-Bolanos et al., 2002).

Por otra parte, debido a su carácter anfipático, una parte del HT permanece en el aceite de oliva. La concentración de HT en el aceite de oliva depende de muchos factores tales como de la variedad de aceituna de procedencia, su grado de maduración, el proceso de extracción, etc. Entre los aceites de oliva vírgenes españoles el contenido de HT oscila entre 113.7 y 381.2 mg/kg (Brenes M. et al., 2000).

Otra fuente natural importante de HT y oleuropeina, es la hoja del olivo (Briante et al., 2002) cuyo extracto se comercializa actualmente como suplemento nutricional.

España es un país con una gran tradición de consumo de aceite de oliva virgen y aceitunas, por lo tanto el hidroxitirosol es consumido diariamente en nuestra dieta habitual. En función de los datos de consumo medio anual de aceite de oliva y aceitunas en los hogares españoles, publicados para el ejercicio 2002 por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, se ha calculado que la ingesta media de hidroxitirosol aportado por la dieta en España es de 8,42 mg/día (Tabla 3.8.).

**Tabla 3.8. Cálculo de la ingesta diaria de hidroxitirosol aportada por la dieta**

	Kg per capita anual	Ingesta diaria por persona	Media mg/Kg Hidroxitirosol *	Hidroxitirosol (mg/día)
Aceite de oliva (Cualquier calidad)	10,31	<u>28 mL</u>	234,5	<u>5,99 mg</u>
Aceitunas	2,79	<u>7,6 g</u>	320,6	<u>2,43 mg</u>
			TOTAL:	<u>8,42 mg</u>

\* Valores promedio de contenido de HT en aceitunas y aceites de oliva españoles extraídos de Blekas G. et al. (2002), Brenes M. et al. (2000), respectivamente

### 3.8.1. PROPIEDADES DEL HIDROXITIRO SOL DESCRITAS EN MODELOS *IN VITRO*.

El hidroxitirosol presenta una elevada actividad antioxidante y los estudios *in vitro* han demostrado que posee propiedades biológicas que hacen pensar que podría tener efectos beneficiosos en enfermedades tales como el cáncer, la enfermedad cardiovascular o las enfermedades neurodegenerativas.

#### a) Antioxidante

Una de las propiedades más descritas para el HT es su elevada actividad antioxidante demostrada en multitud de ensayos, tanto en sistemas fisicoquímicos, como en sistemas biológicos *in vitro* y modelos celulares:

Así, la estabilidad de los aceites a la oxidación muestra una clara correlación con el contenido de HT y oleuropeína de los mismos (Baldioli et al., 1996). Ambos compuestos presentaron una elevada actividad captadora de RL en el ensayo del radical DPPH, mayores que las de otros antioxidantes utilizados en alimentación tales como las vitaminas C y E o el BHT (Visioli et al., 1998). El HT también mostró actividad captadora del radical superóxido

generado por el sistema hipoxantina-xantina oxidasa y del peróxido de hidrógeno generado por la reacción de guayacol (De la Puerta et al., 1999). Además el HT inhibió la oxidación del ácido salicílico por el radical  $\text{OH}^\bullet$  (Owen et al., 2000), redujo la inactivación de la catalasa mediada por el ácido hipocloroso (Visioli et al., 1998) y podría actuar sobre especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito (Deiana et al., 1999; de la Puerta et al., 2001). Su actividad antioxidante también se puso de manifiesto en ambientes lipofílicos actuando frente a la autooxidación del ácido linoleico (Chimi et al., 1991).

AL parecer, la estructura orto-difenólica del HT es fundamental para que pueda ejercer su actividad antioxidante, ya que otros compuestos similares presentes en el aceite de oliva, como el tirosol (p-hidroxifeniletanol), mostraron actividades antioxidantes mucho menores o nulas. Además, se ha descrito que gracias también a la estructura del anillo de catecol, el HT también puede actuar como quelante de metales (Ryan y Robards, 1998, Aeschbach et al., 1994). Los iones metálicos como el hierro y el cobre son esenciales para el organismo, pero pueden ser potencialmente peligrosos ya que son capaces de actuar como transferidores de electrones y actuar como catalizadores de reacciones de autooxidación (Halliwell y Gutteridge, 1999). Sin embargo otros modelos *in vitro* sugirieron que concentraciones elevadas del HT podrían tener cierto carácter prooxidante, si bien este efecto fue menor que el que produce el ácido ascórbico (vitamina C) que se administra en formas farmacéuticas a dosis de hasta 1g (Aeschbach et al., 1994).

Estas propiedades antioxidantes sugieren que el HT podría tener cierto papel protector frente a la oxidación de las lipoproteínas LDL y contribuir de esta forma a la prevención de la enfermedad cardiovascular. Visioli et al. (1995) estudiaron el efecto que cantidades micromolares de HT tenían sobre la oxidación de la LDL cuando esta era incubada *in vitro* con  $\text{CuSO}_4$ . Sus resultados mostraron que el HT previno la pérdida de vitamina E, inhibió la formación de peróxidos lipídicos, impidió la oxidación de los AGPI, redujo la modificación proteica y prolongó la fase de iniciación de oxidación de la lipoproteína LDL (medida como "lagtime" o tiempo necesario para alcanzar la fase exponencial de oxidación). Resultados similares fueron encontrados por Salami et al. (1995) en donde la preincubación de la LDL con cantidades micromolares de HT inhibieron la formación de F2-isoprostanos y protegieron a la vitamina E cuando esta lipoproteína fue oxidada por  $\text{CuSO}_4$ . Otro estudio demostró que la preincubación del plasma con un extracto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva originaba un aumento en el contenido de compuestos fenólicos en la LDL aislada y una mayor resistencia de la misma a la oxidación por cobre (aumento dosis-dependiente del "lagtime"). (Covas et al., 2000).

Esta actividad captadora de los RL y de protección frente a la oxidación también se ha descrito para otras macromoléculas como el DNA (Deiana et al., 1999). Incluso a concentraciones que pueden considerarse fisiológicas (10  $\mu\text{M}$ ) el hidroxitirosol fue capaz de

inhibir en un 23% los daños ocasionados por el radical  $H_2O_2$  en el DNA de células prostáticas. (Quiles et al., 2002).

En modelos celulares se ha demostrado que concentraciones reducidas de HT podían proteger a los eritrocitos de los daños ocasionados por el estrés oxidativo, disminuyendo de forma significativa la hemólisis y protegiendo de la lipoperoxidación las membranas celulares eritrocitarias (Manna et al., 1999): Así mismo, redujo de la oxidación de fosfolípidos en microsomas hepáticos (Gutierrez et al., 2001), previno los daños ocasionados por  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$  en células Caco-2 intestinales (Mana et al., 1997) y protegió contra el daño ocasionado por el  $H_2O_2$  en células neuronales a través de un aumento en la actividad catalasa (Hashimoto et al., 2003). Además fue capaz de reducir la generación de RL por leucocitos (De la Puerta et al., 1999), neutrófilos (O'Dowd et al., 2004) y macrófagos activados (Leger et al., 2000).

#### **b) Anticancerígena.**

El estrés oxidativo y la generación de RL también parecen estar implicados en la patología del cáncer (Halliwell y Gutteridge, 1999) y se ha sugerido que el HT y los compuestos fenólicos del aceite de oliva también podrían tener relación con la baja incidencia de diversos tipos de cáncer en la región mediterránea (Owen et al., 2004). Estudios llevados a cabo en células cancerosas apoyan esta hipótesis. Así, el HT fue capaz de proteger al DNA celular de células prostáticas de los daños ocasionados por los RL por lo que podría prevenir la actividad mutagénica ocasionada por el estrés oxidativo (Deiana et al., 1999; Quiles et al., 2002). También fue capaz de inhibir los daños ocasionados por la luz ultravioleta en una línea celular de melanoma (D'Angelo et al., 2005). Los compuestos fenólicos del aceite de oliva mostraron ser potentes inhibidores de la generación de RL en la matriz fecal, sugiriendo que estos compuestos podrían actuar directamente en el colon al reducir el daño oxidativo (Owen et al., 2000). Por otra parte, podrían existir otros efectos beneficiosos del HT no producidos por su actividad antioxidante. Así, estudios con cultivos celulares mostraron que el HT fue capaz de detener el ciclo celular, reduciendo el crecimiento y la proliferación de células cancerosas, e inducir la apoptosis de células HL60 (leucemia promielocítica) (DellaRagione et al., 2000) y células HT29 (adenocarcinoma de colon) sin afectar a otro tipo de células no cancerosas como linfocitos aislados y células polimorfonucleares (Fabiani et al., 2002).

#### **c) Antiinflamatorio y antiagregante plaquetario**

También se han descrito efectos del HT en la inflamación y la agregación plaquetaria. La preincubación de células del endotelio vascular con varios compuestos antioxidantes como el hidroxitirosol, el resveratrol y la oleuropeina condujo a una disminución de la adhesión de

monocitos al endotelio activado y a una menor producción de VCAM-1 (Carluccio et al., 2003). Las lipoproteínas ricas en TG aisladas de individuos tras la ingesta de aceite de oliva enriquecido con compuestos fenólicos también redujeron la producción de eicosanoides inflamatorios y vasoconstrictores (PGE2 y TxB2) por parte de células endoteliales comparada con aquellas que fueron aisladas tras la ingesta de aceites de oliva no enriquecidos (Perona et al., 2004a). Otro estudio puso de manifiesto que el HT podría influenciar en la respuesta linfocitaria al inhibir su proliferación (Della Ragione et al., 2000). Por otra parte, el HT inhibió la agregación plaquetaria inducida por colágeno y ADP *in vitro*, mostrando una actividad comparable a la del ácido acetilsalicílico, un potente inhibidor de la agregación plaquetaria (Petroni et al., 1995). Se ha sugerido que el mecanismo por el cual produce tales efectos podría ser a través de una inhibición selectiva en la síntesis de eicosanoides por parte de las enzimas 5-lipoxigenasa y 12-lipoxigenasa, ya que se encontró una disminución en la producción de TxB2 y 12-hidroxi-eicosatetranoico por parte de las plaquetas activadas durante la coagulación (Petroni et al., 1995) y una reducción de la producción de LTB4 por leucocitos activados (De la Puerta et al., 1999). Sin embargo, el HT no afectó a la actividad de la ciclooxigenasa (Kohyama et al., 1997).

#### **d) Antimicrobiana**

Por último, el HT presentó propiedades antimicrobianas *in vitro* frente a varios agentes infecciosos del tracto gastrointestinal y respiratorio, tales como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* o *Staphylococcus aureus*, a concentraciones mínimas inhibitorias que, en algunos casos, fueron inferiores a la que presentaron antibióticos como la ampicilina (Bisignano et al., 1999). Recientemente se ha descrito que el HT también posee actividad frente al agente causal de la neumonía, el *Mycoplasma pneumoniae* y otras especies de la familia de los micoplasmas (Furneri et al., 2004)

### **3.8.2. ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:**

A pesar de las muchas propiedades descritas *in vitro* para el HT, son pocos los estudios que analizan los efectos *in vivo* de este compuesto y la mayoría de ellos han sido realizados con extractos ricos en compuestos fenólicos donde el HT también estaba presente.

El efecto de protector de los componentes minoritarios del aceite de oliva sobre la oxidación de la LDL fue estudiado por Wiseman et al. (1996). Para ello tres grupos de conejos fueron alimentados con unas dietas enriquecidas en 3 aceites distintos (40% energía): aceite de oliva virgen, aceite de oliva refinado y aceite de girasol alto oleico. Todas las dietas contenían un perfil de ácidos grasos y un contenido de vitamina E similar, por lo que la diferencia

fundamental entre los distintos grupos fue la presencia de los compuestos fenólicos en la dieta de aceite de oliva virgen. La resistencia a la oxidación de la LDL medida como “lagtime” o tiempo de retardo, fue mayor en el grupo alimentado con la dieta rica en polifenoles que en los otros dos grupos, a pesar de que el contenido en vitamina E en esta lipoproteína fue significativamente menor. En otro estudio realizado con conejos también se utilizaron dietas enriquecidas con diversos aceites de oliva que se diferenciaban solamente en el contenido de compuestos fenólicos. Igualmente se encontró una mayor resistencia a la oxidación de las lipoproteínas LDL que fue proporcional al contenido de polifenoles de la dieta. En este caso se observó de un aumento en el contenido de antioxidantes, vitamina E y coenzima Q, de estas lipoproteínas (Ochoa et al., 2002).

Coni et al. (2000) estudiaron específicamente los efectos la oleuropeina en conejos. El estudio consistió en tres grupos de conejos alimentados con 3 dietas distintas durante 6 semanas: una dieta estándar, la dieta estándar con un 10% de aceite de oliva virgen, y esta última dieta pero adicionada de 7 mg de oleuropeina, equivalente a una cantidad extra de oleuropeina de 0.4 mg/Kg peso corporal. A pesar de que el contenido de vitamina E de la dieta estándar fue igualado al de las otras dos dietas por adición de vitamina E sintética, la concentración plasmática de esta vitamina fue mayor en los animales alimentados con las dietas enriquecidas con aceite de oliva. Las diferencias más notables encontradas entre los animales que consumieron el suplemento de oleuropeína o no fue una disminución de la concentración de colesterol total en plasma del 15%. La composición lipídica de la LDL también se vio afectada por el antioxidante, encontrando que las partículas de LDL de los animales que consumieron la oleuropeína tenían un mayor contenido en fosfolípidos y colesterol, principalmente colesterol esterificado, dando lugar a partículas de LDL de mayor tamaño, menos aterogénicas y más resistentes a la oxidación. En ratas, una dieta rica en compuestos fenólicos del aceite de oliva también produjo un cambio en la composición lipídica del plasma observándose en este caso un aumento en la concentración de lipoproteínas HDL que fue proporcional al contenido de compuestos fenólicos de la dieta (Mangas-Cruz et al., 2001).

Los efectos antioxidantes *in vivo* de los compuestos fenólicos del aceite de oliva y del HT no se limitan a la protección de la LDL. Se han descrito efectos protectores frente a otros daños ocasionados por el estrés oxidativo y los RL. Visioli et al. (Circulation 2000c) estudiaron el efecto del HT en ratas expuestas al humo del tabaco. Para ello se midió la excreción urinaria de 8-isoPGF<sub>2α</sub>, un biomarcador establecido de estrés oxidativo *in vivo*. La exposición al humo de tabaco durante cuatro días produjo un aumento de la excreción de este compuesto, que se redujo con el pretratamiento de las ratas con un extracto de agua de lavado de aceitunas conteniendo 414 µg de HT. En otro modelo de estrés oxidativo se administro una inyección con cloruro de cadmio a ratas junto con una dosis doble de 9 mg/Kg de HT. Se ha descrito que el cadmio puede producir un efecto tóxico debido a su acumulación en diversos tejidos y

la oxidación de las membranas lipídicas. La intoxicación por cadmio produjo un aumento de peróxidos lipídicos en el hígado de las ratas que fue inhibido con la administración del HT (Casalino et al., 2002).

La actividad antiinflamatoria del HT también ha sido estudiada *in vivo*. La aplicación tópica de HT, al igual que la de otros componentes de la fracción minoritaria del aceite de oliva, inhibió la inflamación, la reacción edematosa y la producción del enzima mieloperoxidasa (indicadora de la infiltración de neutrófilos al tejido inflamado) en varios modelos de inflamación en ratas (De la Puerta et al., 2000). Por otra parte, una dieta enriquecida en compuestos fenólicos del aceite de oliva produjo un menor índice de inflamación en ratas tanto en la fase aguda, como en la fase crónica (Martínez-Domínguez et al., 2001). Dietas enriquecidas en aceite de oliva virgen y oleuropeina también mostraron cierto efecto protector frente a la inflamación provocada en un modelo animal de ratas ovariectomizadas (Puel et al., 2004).

No se ha encontrado ningún trabajo publicado que estudie específicamente los efectos del HT o de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en modelos animales de aterosclerosis, pero sí del aceite de oliva virgen en comparación con otras fuentes lipídicas. En un modelo de aterosclerosis inducida por dieta en conejos se observó que la dieta con aceite de oliva virgen condujo a una mejora en el estado oxidativo provocado por la dieta rica en colesterol (Aguilera et al., 2003), una disminución de los lípidos del plasma (Ramirez-Tortosa et al., 1998) y a un menor avance de la lesión aterosclerótica (Aguilera et al., 2002). En ratas hipertensas la adición de aceite de oliva virgen a la dieta atenuó la respuesta vascular (Herrera et al., 2001). Por otra parte en ratas alimentadas con aceite de oliva virgen se han observado efectos beneficiosos al reducir las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos (Quiles et al., 2003) y además efectos antitrombóticos (Brzosko et al., 2002). En otro estudio con conejos hipercolesterolemicos la adición de aceite de oliva comercial ( $10^{-4}$  mg/Kg compuestos fenólicos) a una dieta aterogénica produjo una disminución en el colesterol total y los triglicéridos, un aumento en la HDL, una reducción en la agregación plaquetaria, un menor desarrollo de la lesión aterogénica (De la Cruz et al., 2000a) y una reducción de la peroxidación lipídica a nivel tisular con respecto al grupo alimentado con la dieta aterogénica (De la Cruz et al., 2000b).

### 3.8.3. ESTUDIOS EN HUMANOS:

La mayoría de los estudios en humanos que investigan los efectos de los compuestos fenólicos del aceite de oliva han sido realizados con aceites de oliva virgen o enriquecidos con compuestos fenólicos, sin embargo hasta la fecha no hay ningún estudio publicado que haya analizado los efectos biológicos del HT como tal. La tabla 3.9. resume los principales

resultados obtenidos en estudios llevados a cabo en humanos que investigan los efectos de los compuestos fenólicos del aceite de oliva.

En general, los resultados de estas investigaciones indicaron que comparado con el aceite de oliva refinado, el consumo de un aceite de oliva virgen, rico en compuestos fenólicos, redujo la susceptibilidad a la oxidación de la LDL, disminuyó los parámetros de oxidación lipídica y aumentó las defensas antioxidantes. Estos efectos aunque moderados, se observaron en periodos de tiempo breves y con cantidades ingeridas similares o menores a las habitualmente consumidas en la dieta mediterránea (Ramírez Tortosa et al., 1999; Masella et al., 2001; Fito et al., 2002; Gimeno et al., 2002; Visioli et al., 2004; Weinbrenner et al., 2004a; Marrugat et al., 2004). Una sola ingesta de aceite de oliva virgen enriquecido con compuestos fenólicos produjo una reducción en la excreción urinaria de 8-isoprostano, y esta disminución fue proporcional al contenido de compuestos fenólicos incorporados en el aceite (Visioli et al., 2000a). Por el contrario Vissers et al. (2001a) y Moschandreas et al. (2002) no observaron diferencias significativas en los parámetros de peroxidación lipídica entre dos aceites de oliva vírgenes con distinto contenido en compuestos fenólicos tras 3 semanas de ingesta. A nivel postprandial, los compuestos fenólicos del aceite no produjeron ningún efecto sobre la oxidación de la LDL comparado con el control (Vissers et al., 2001b) mientras que en otra ocasión el consumo de 50 mL de aceite de oliva virgen (12.7 mg de compuestos fenólicos) produjo un aumento en la peroxidación lipídica y una reducción de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa durante las primeras horas tras la ingesta, aunque los valores volvieron a la normalidad transcurridas varias horas (Fito et al., 2002)

Respecto a los lípidos sanguíneos los resultados son contradictorios: Ramirez-Tortosa et al. (1999) encontró que los TG plasmáticos fueron mayores entre los voluntarios que tomaron aceite de oliva virgen comparado con los que tomaron aceite de oliva refinado durante 3 meses. En otro estudio de una semana de duración, donde los voluntarios consumieron diariamente 25 mL de aceite de oliva virgen, se produjo una pequeña elevación de TG del plasma (Gimeno et al., 2002). Sin embargo en un estudio cruzado controlado de 7 semanas de duración se encontró una leve tendencia a disminuir los TG plasmáticos comparando con un aceite de oliva virgen con un refinado (Visioli et al., 2004). Sin embargo no se encontraron diferencias en los lípidos plasmáticos entre voluntarios que consumieron dietas con aceite de oliva con distinto contenido en compuestos fenólicos durante 3 semanas (Vissers et al., 2001a). La concentración total de colesterol no se modificó significativamente en ninguna de las intervenciones nutricionales descritas publicadas. Sin embargo, una disminución en la concentración de LDL-colesterol fue observada en dos estudios (Fito et al., 2001; Gimeno et al., 2002). Estudios recientes mostraron además un aumento significativo de los niveles plasmáticos de HDL tras la ingesta de aceite de oliva virgen durante periodos relativamente cortos de tiempo (Weinbrenner et al., 2004a; Marrugat et al., 2004).



**Tabla 3.9: Estudios realizados en humanos**

<b>mg de compuestos fenólicos</b>	<b>Forma de administración</b>	<b>Duración del tratamiento</b>	<b>Frecuencia de tomas</b>	<b>Efectos</b>	<b>Referencia</b>
32-35 mg	Aceite de oliva virgen	3 meses	diario	Reducción de la oxidación de la LDL, Reducción de la captación de LDL oxidada por macrófagos Aumento de los triglicéridos en plasma y en LDL; aumento del colesterol libre en LDL, VLDL y HDL .	Ramírez-Tortosa et al. (1999)
24,48,73 y 97 mg	Aceite de oliva enriquecido	4 meses	mensual	Disminución de la excreción de F <sub>2</sub> -Isoprotano.	Visioli et al. (2000a)
21.2 mg	Aceite de oliva virgen	3 semanas	diario	Ausencia de efectos en los marcadores de oxidación de LDL y en el perfil lipídico del plasma	Visiers et al. (2001a)
31-100 mg	Aceite de oliva enriquecido y suplementos	3 semanas	semanal	Ausencia de efectos en los marcadores de oxidación a nivel postprandial.	Visiers et al. (2001b)
4.8 mg	Aceite de oliva virgen	4 semanas	diario	Disminución la susceptibilidad a la oxidación por Cu de la LDL Reducción de productos de peroxidación lipídica (MDA e hidroperóxidos) Aumento en el contenido en compuestos fenólicos en plasma	Masella et al.(2001)
6.3 mg	Aceite de oliva virgen	1 semana	diario	Disminución de LDL-colesterol Aumento de la resistencia a la oxidación de la LDL Aumento de glutatión reductasa	Fito et al. (2002)

<b>mg de compuestos fenólicos</b>	<b>Vehículo de administración</b>	<b>Duración del tratamiento</b>	<b>Frecuencia de tomas</b>	<b>Efectos</b>	<b>Referencia</b>
12.7 mg	Aceite de oliva virgen	1 día	postprandial	Aumento de la peroxidación lipídica entre 4-6 horas Aumento actividad Glutation reductasa y glutation peroxidasa	Fito et al. (2002)
21.6 mg	Aceite de oliva	3 semanas	diario	Ausencia de efectos en los parámetros de oxidación	Moschandreas et al. (2002)
5.6 mg	Aceite de oliva	1 semana	diario	Reducción de colesterol-LDL y aumento de TG Mayor contenido de ácido oleico, vit E y compuestos fenólicos en LDL. Disminución de la susceptibilidad a la oxidación de la LDL	Gimeno et al. (2002)
6.64 mg	Aceite de oliva	7 semanas	diario	Disminución de la producción de Tromboxano B2 Aumento de la capacidad antioxidante Ausencia de efectos sobre los lípidos sanguíneos	Visioli et al. (2004)
12.15 mg	Aceite de oliva	4 días	diario	Disminución de la LDL oxidada en plasma, 8-desoxiguandina en DNA mitocondrial y MDA en orina Aumento de HDL-colesterol y Glutation peroxidasa	Weinbrenner et al., 2004a
3.75	Aceite de oliva	3 semanas	diario	Disminución de LDL oxidada en plasma, aumento de la resistencia oxidación LDL, aumento de HDL-colesterol	Marrugat et al. 2004
25-12.5 mg	Extracto rico en HT	4 días	diario	Disminución del 46% TxB2 en suero. Tendencia al aumento de vitamina C	Leger et al. 2005

En un estudio cruzado de intervención llevado a cabo en ancianos hipertensos, una dieta con aceite de oliva virgen redujo la presión arterial sistólica comparado con un aceite de girasol alto oleico. Ambos aceites contenían cantidades similares de ácido oleico, lo que sugirió que compuestos fenólicos podrían ser los responsables de este efecto hipotensor. (Perona et al., 2004a). En este mismo estudio se observó además una disminución del colesterol total y de colesterol LDL plasmático en los voluntarios normotensos.

Por otra parte, un estudio cruzado con voluntarios dislipémicos puso de manifiesto la actividad antiagregante antiplaquetaria de los compuestos fenólicos del aceite de oliva *in vivo*. En ambos periodos de estudio se observó una disminución en la producción de TXB<sub>2</sub> (21% de media) en el grupo que consumió aceite de oliva virgen pero no con el refinado (Visioli et al., 2004). En un trabajo recientemente publicado por Leger et al. (2005) se encontró que la administración de un extracto rico en HT (25 mg el día 1, y 12.5 mg/día durante 3 días) producía una disminución del 46% en las concentraciones séricas de TxB<sub>2</sub>.

#### **3.8.4. ESTUDIOS DE TOXICIDAD CON HT EN ANIMALES.**

D'Angelo et al. (2001) llevó a cabo el primer ensayo de toxicidad aguda con HT en animales de experimentación. Sus resultados mostraron que una dosis única de 2 g/kg de peso corporal no produjo ningún efecto tóxico y solamente originó piloerección, que comenzó 2 horas después de la administración de este compuesto y desapareció antes de las 48 horas. Ningún efecto adverso o alteración macroscópica de órganos internos fue encontrado en este estudio.

Un estudio de toxicidad más completo se publicó recientemente para un producto consistente en un hidrolizado del extracto acuoso de la pulpa de la aceituna (HIDROX<sup>®</sup>) comercializado por la empresa estadounidense Creagri, conteniendo 24 mg/g de HT y 60 mg/g de compuestos fenólicos. Este producto ha sido reconocido oficialmente por la FDA americana (Food and Drug Administration) como seguro para su uso alimentario en humanos, adquiriendo el estatus GRAS (generally regarded as safe). Tanto los ensayos de toxicidad aguda como los ensayos de toxicidad crónica a 90 días confirmaron la ausencia de efectos tóxicos a dosis de 2000 mg/Kg/día, así como la ausencia de efectos teratogénicos y mutagénicos (Christian et al., 2004).

#### **3.8.5. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN Y METABOLISMO DEL HIDROXITIROSOL.**

Como ya hemos mencionado, muchas de las propiedades beneficiosas del HT descritas en modelos *in vitro* también se han observado en animales y humanos cuando se administra un

aceite de oliva virgen lo que hizo suponer que estos compuestos pudieron absorberse y ejercer su efecto *in vivo*.

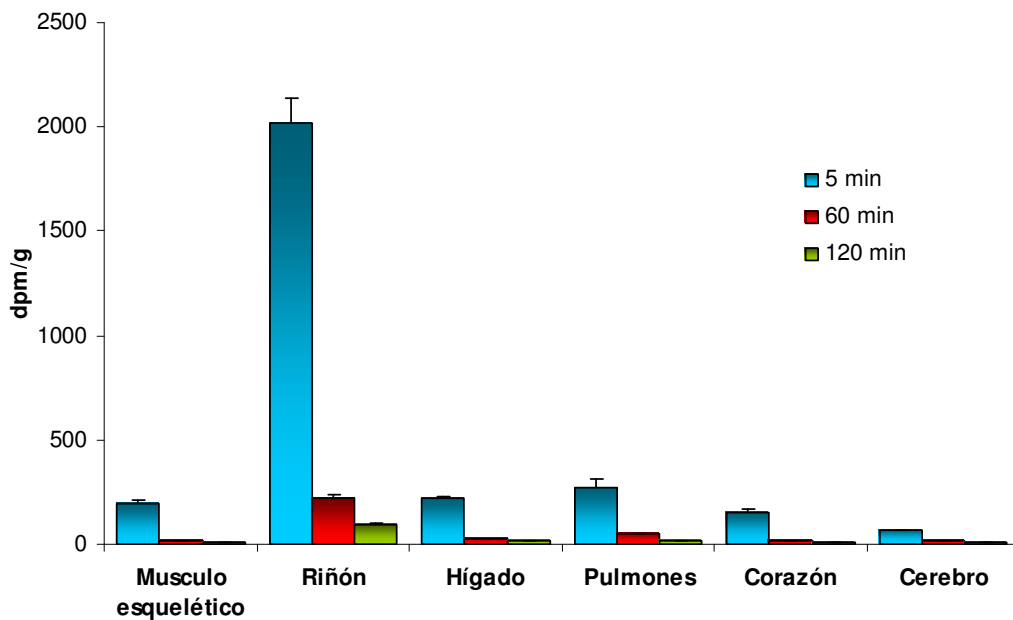
En 1998, Chen Bai et al. estudió por primera vez la concentración plasmática de HT tras la ingesta oral de este compuesto en ratas. La máxima concentración plasmática se alcanzó en tan solo 5-10 minutos de la ingesta seguido de una rápida disminución de los niveles plasmáticos, de forma que a las tres horas de su administración apenas se detectó en plasma (Fig. 2). Tuck et al. (2001) calculó la biodisponibilidad oral en ratas a partir de la excreción urinaria de hidroxitirosol marcado con tritio, obteniendo una absorción del 75 y del 90% cuando se administró en disolución acuosa u oleosa, respectivamente.

Las primeras evidencias de la absorción del HT en humanos se publicaron en el año 2000 (Visioli et al 2000b). En este estudio se administraron diferentes aceites de oliva con distinto contenido en compuestos fenólicos, encontrando de HT y tirosol en orina cuya cantidad fue proporcional al contenido de los mismos en el aceite. También se ha descrito que la cantidad absorbida de este compuesto depende del vehículo de administración. Así, la excreción de HT por orina fue mayor cuando se ingirió aceite de oliva virgen que cuando el aceite estaba enriquecido en compuestos fenólicos, o cuando este compuesto fue incorporado a otro alimento como el yogurt (Visioli et al., 2003). En un trabajo publicado por Bonanome et al., (2000) se detectó tirosol y en algunos casos también HT en las lipoproteínas plasmáticas después del consumo de 100 mL de aceite. El único estudio publicado hasta el momento que analizó la cantidad de HT presente en el plasma fue Miro Casas et al. (2003) que detectaron en plasma no solo HT sino también su metabolito, el alcohol homovanílico, de nuevo tras el consumo de un aceite de oliva virgen.

Todos los estudios en los que se ha investigado la absorción de HT y los compuestos fenólicos del aceite de oliva en humanos se han realizado con aceites de oliva vírgenes o enriquecidos en compuestos fenólicos, donde la absorción del compuesto puede estar afectada por el proceso de digestión. Además en esta situación puede existir dificultad al estimar la cantidad administrada debido a que el HT también puede proceder de la hidrólisis de sus precursores como la oleuropeína.

Como se ha mencionado anteriormente, el HT en el aceite de oliva puede encontrarse en forma libre o formando parte de la oleuropeína o su aglicona. Durante la digestión y después de su absorción, en los enterocitos o en el hígado, tiene lugar la hidrólisis de la oleuropeína dando lugar a la forma libre. Los lugares de absorción descritos para el HT son el intestino delgado y del colon (Vissers et al., 2002) y se ha sugerido que el transporte a través del epitelio intestinal puede tener lugar por difusión pasiva y de forma bi-direccional (Manna et al., 2000).

D'Angelo et al. (2001) estudiaron la distribución tisular del HT marcado con  $^{14}\text{C}$  administrado por vía intravenosa en ratas. A los 5 minutos de la inyección, menos del 8% de la radiactividad estaba todavía presente en la sangre (6% en el plasma y 1.9% en la fracción celular de la sangre) por lo que se estimó que el tiempo de vida media del compuesto en sangre fue muy reducido, del orden de 1 o 2 minutos. Niveles de radiactividad similares procedentes del  $^{14}\text{C}$  fueron encontrados en el músculo esquelético, hígado, pulmones y corazón, mientras que el riñón acumuló 10 veces más radiactividad que los otros órganos (Figura 3.5.). También se detectó  $^{14}\text{C}$  en el cerebro lo que indicó que el HT fue capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque se ha descrito que el HT puede ser generado además endogenamente en el cerebro a partir de la dopamina (Edwards y Rizk, 1981) y del ácido DHPA a través de la dihidroxifenilacetato reductasa presente en el cerebro. (Xu y Sim, 1995). 5 horas después de la inyección intravenosa de HT, solo el 0.1% de la radiactividad administrada estaba presente en el organismo de los animales.

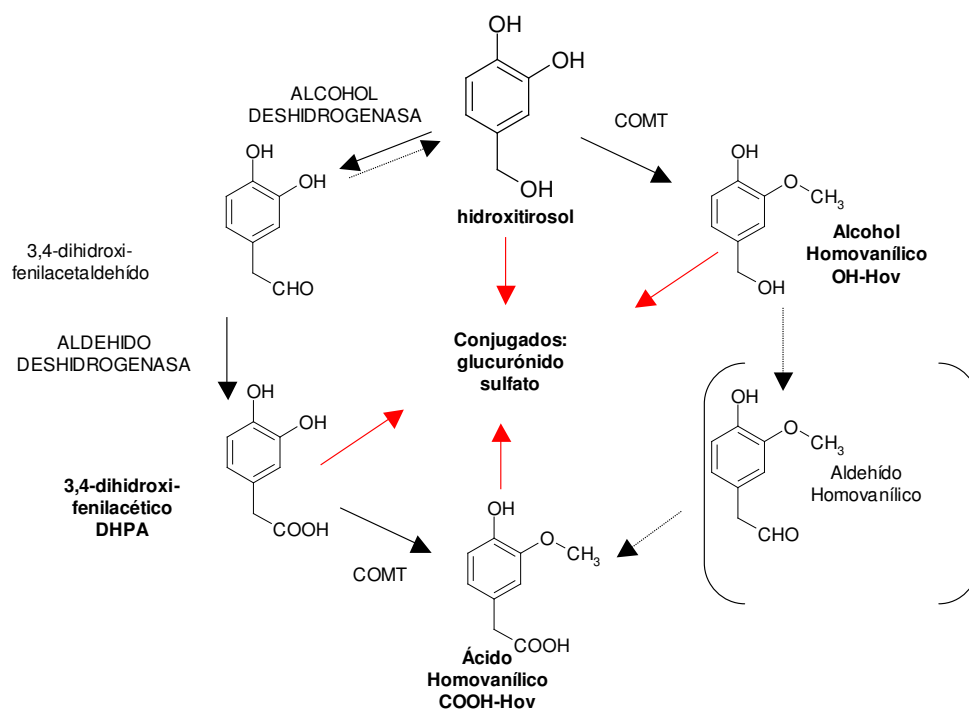


**Figura 3.5. Distribución de la radiactividad en tejidos de ratas después de la inyección intravenosa de  $^{14}\text{C}$ -HT a distintos tiempos (D'Angelo et al., 2001). Resultados expresado como desintegraciones por minuto (dpm) por gramo de tejido.**

Los metabolitos del HT se encontraron en sangre 5 minutos después de la inyección intravenosa de  $^{14}\text{C}$ -HT, indicando que el compuesto se metabolizaba rápidamente en los tejidos, especialmente en el hígado y el enterocito. En este trabajo se propusieron tres vías metabólicas para el HT (Fig. 3.6):

- Oxidación: a través de los enzimas alcohol-deshidrogenasa y aldehído-deshidrogenasa dando lugar al ácido dihidroxi-fenilacético (DHPA)
- Metilación: a través el enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) dando lugar a el alcohol homovanílico (HvOH)
- Metilación + Oxidación, para formar el ácido homovanílico (HvAc)

Tanto el HT como cualquiera de sus metabolitos, se conjugaron con sulfato (D'Angelo et al., 2001) o con ácido glucurónico (Tuck et al., 2002) originando un elevado número de metabolitos que pudieron detectarse en plasma o en orina.



**Figura 3.6.: Metabolismo del hidroxitiroso (D'Angelo et al, 2001)**

Respecto a la excreción se encontró que el 90% de la radiactividad era detectada en orina 5 horas después de la inyección intravenosa de  $^{14}\text{C}$ -HT y una pequeña proporción se excretaba por heces. (D'Angelo, 2001), Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en humanos por Miro Casas et al., (2001) donde se encontró la mayor parte del HT y el tiroso en la orina recogida durante las primeras 4 horas después de la ingestión de 50 mL de aceite de oliva virgen.

# 4

## *Materiales y Métodos*





## 4.1. MATERIALES

### 4.1.1. APARATOS DE USO GENERAL

- **Centrífuga** refrigerada modelo 3K15 provista de un rotor vascular nº11133 de SIGMA (Osterode am Harz, Alemania)
- **Ultracentrífuga** Beckman Optima™ L-90K provista de un rotor vertical VTi 50 de Beckman Coulter (Fullerton, California, EEUU)
- **Centrífuga** refrigerada modelo 5415 R para tubos de 1.5 mL de Eppendorf (Hamburg, Alemania)
- **HPLC**, equipo de cromatografía líquida de alta resolución modelo 2695 provisto con un detector de fluorescencia modelo 474 de Waters (Milford Massachusetts, EEUU)
- **Cromatografo de gases con detercor FID** modelo CP3800 de Varian (Palo Alto, California, EEUU)
- **CG-EM** cromatógrafo de gases modelo 3400, provisto de un inyector automático modelo 8200 y acoplado a un espectrofotómetro de masas modelo Varian Saturn MS/MS 2000 de Varian (Palo Alto, California, EEUU)
- **Espectrofotometro** modelo Cary 100 BIO UV-Visible de Varian (Palo Alto, California, EEUU)
- **Fraccionador de gradiente** modelo 185 de ISCO (Lincoln, Nevada, EEUU)
- **Evaporador "SpeedVac"** modelo SPD 2010 de Thermo Savant (EEUU).
- **Rotavapor** modelo R2000 de Büchi (Suiza)
- **Balanza de precisión** modelo BP61S de Sartorius AG, (Göttingen, Alemania)
- **Balanza analítica** modelo BL 3100 de Sartorius AG (Göttingen, Alemania)
- **pH-metro** modelo GLP22 de Crisol (Barcelona, España)
- **Congelador -80°C** modelo MDF-U71V de SANYO (Bensenville, Illinois, EEUU).
- **Micropipetas de precisión** modelo Pipetman de Gilson (Francia)
- **Bloques calefactores** de Stuart-Scientific (UK).
- **Agitadores magnéticos con calefactor** modelo MR 3001 K de Heidolph (Schwabach, Alemania).
- **Agitador vasculante** modelo Gyro-Rocket de Stuart-Scientific (UK).
- **Agitador vibrador (Vortex)** modelo Reax Top de Heidolph (Schwabach, Alemania).
- **Homogenizador eléctrico** modelo DIAX 900 de Heidolph (Schwabach, Alemania).
- **Fotomicroscopio** LEICA DMRB (Wetzlar, Alemania) conectado a una cámara de video Sony CCD.
- **Analizador de imágenes** de análisis de imagen LEICA Q 500MC (Wetzlar, Alemania).
- **Thermomixer** modelo Confort de Eppendorf (Hamburg, Alemania).

- **Sistemas de electroforesis de ARN.** Cubeta de electroforésis modelo Bio-Rad Mini-Sub Cell<sup>®</sup> GT (Hercules, California, EEUU) conectado a una fuente de alimentación BIORAD modelo Powerpac 300 (Hercules, California, EEUU).
- **Horno de hibridación** modelo Genechip Hybridizaton Oven 640 de Affymetrix (Santa Clara, California, EEUU).
- **Estación fluidica de array** modelo GeneChip Fluidics Station 400 de Affymetrix (Santa Clara, California, EEUU).
- **Escáner de array** modelo GeneChip Scanner<sup>®</sup> de Affymetrix (Santa Clara, California, EEUU).
- **Software** Microarray Suite versión 5.0 de Affymetrix (Santa Clara, California, EEUU).
- **SPSS** (versión 10.1, Chicago, EEUU).

#### 4.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

##### 4.1.2.1. Conejos

Se emplearon 64 conejos machos de la raza New Zealand White, de 2.5 a 3 Kg de peso al comienzo del estudio, para estudiar los efectos del HT en un modelo de aterosclerosis experimental inducida por dieta. Los animales fueron proporcionados por Harlam Interfauna Iberica S.A. (Barcelona, España) y se ubicaron en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.



Los animales se dispusieron en jaulas individuales situadas en una habitación termorregulada a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con una humedad del 60% y unas condiciones de luminosidad de 12 horas de luz (8:00 - 20:00 h) y 12 horas de oscuridad (20:00 - 8:00 h). Se suministraron 150 g diarios de dieta y agua “*ad libitum*”. La ingesta de la dieta se controló por pesada diaria de los sobrantes no consumidos, que fueron desechados. El peso de los animales se controló semanalmente.

◀ **Figura 4.1: Conejo New Zealand White.**

##### 4.1.2.2. Ratas

Se estudió la absorción de HT empleando 21 ratas de la cepa Wistar-Kyoto. El peso de los animales osciló entre 220 y 250 g. Los animales fueron proporcionados por el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y alojados en el Centro de Experimentación Animal de esta misma Universidad.

### 4.1.2.3. Ratones

Se emplearon 15 ratones hembras de la cepa Balb/C de tres meses de edad para el estudio de los efectos del HT sobre la expresión génica. El peso inicial de los ratones osciló entre los 20 y 25 g. Los animales fueron proporcionados por el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y alojados en el Centro de Experimentación Animal de esta misma Universidad. Los animales se distribuyeron en tres grupos de cinco ratones que fueron ubicados en jaulas situadas en una habitación termorregulada a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con una humedad del 60% y en unas condiciones de luminosidad de 12 horas de luz (8:00 - 20:00 h) y 12 horas de oscuridad (20:00 - 8:00 h). Se suministraron comida y agua "*ad libitum*". El peso de los animales se controló diariamente.

### 4.1.3. DIETAS

#### 4.1.3.1. Dietas de conejos

Las dietas empleadas en este estudio fueron las siguientes:

- Dieta control (**Dieta C**): 97% dieta chow estándar + 3% aceite de girasol refinado (Coosur, España)
- Dieta aterogénica (**Dieta A**): 95.66% dieta chow estándar + 3% manteca de cerdo (Campofrío, España) + 1.33% colesterol (Sigma Aldrich).
- Dieta aceite de oliva virgen (**Dieta V**): 97% dieta chow estándar + 3% aceite de oliva virgen (Cordoliva, España)

La composición nutricional de la dieta chow estándar (Conejo 112, Panlab, Barcelona) fue: 13.5% de proteínas, 3% de grasa, 50% de hidratos de carbono, 15.5% de fibra, 7% de minerales y 11% de humedad. La elaboración de las distintas dietas fue realizada por Panlab (Barcelona) mezclando la dieta base pulverizada con la grasa atomizada, calentando levemente para que la incorporación de la grasa fuera homogénea. La dieta se peletizó y se envasó al vacío en bolsas de 20 Kg que fueron almacenadas en oscuridad y a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El contenido de grasa de las distintas dietas utilizadas en el estudio, medido por gravimetría (apartado 4.2.3.1.) se muestra en la tabla 4.1. La adición del 3% de los distintos aceites y grasas utilizadas para la elaboración de las dietas aumentó el contenido de grasa de la dieta estándar de conejos proporcionada por la casa comercial hasta un 6% del peso total (excluyendo el colesterol). El peso del extracto graso de la dieta A fue mayor debido a que el método extrajo también el colesterol añadido.

**Tabla 4.1. Contenido de grasa de las dietas.**

	<b>Dieta C</b>	<b>Dieta A</b>	<b>Dieta V</b>
Muestra (g)	35.19	34.69	35.37
Extracto graso (g)	2.09	2.52	2.11
<b>% grasa</b>	<b>5.93</b>	<b>7.26</b>	<b>5.96</b>

Las dietas se elaboraron a partir de la dieta estándar para conejos adicionadas de: 3% de aceite de girasol (dieta C); 3% de manteca de cerdo y 1,33% de colesterol (dieta A); 3% de aceite de oliva virgen extra (dieta V).

Tras comprobar el contenido de grasa de las distintas dietas se procedió al análisis de ácidos grasos de los extractos lipídicos (apartado 4.2.3.2.). Los porcentajes de los principales ácidos grasos de las dietas están recogidos en la tabla 4.2. La dieta C contenía el mayor porcentaje de ácido linoleico (18:2n6) y AGPI. La dieta A, contenía la mayor proporción de AGS. La dieta V, contenía mayoritariamente ácido oleico (18:1n9) y AGMI.

**Tabla 4.2. Porcentaje de ácidos grasos de las diferentes dietas.**

	<b>Dieta C</b>	<b>Dieta A</b>	<b>Dieta V</b>
C16:0	10.16	24.54	13.5
C16:1	0.32	1.33	0.69
C18:0	3.63	11.25	2.46
C18:1n9	26.3	29.34	55.24
C18:2n6	54.82	24.08	21.33
C18:3n3	2.16	3.35	3.43
<b>AGS</b>	<b>15.15</b>	<b>38.33</b>	<b>16.97</b>
<b>AGMI</b>	<b>27.56</b>	<b>33.64</b>	<b>58.08</b>
<b>AGPI</b>	<b>57.28</b>	<b>28.03</b>	<b>24.95</b>
<b>n6/n3</b>	<b>23.29</b>	<b>6.73</b>	<b>5.95</b>

AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; n6/n3, indica la relación de ácidos grasos n6/n3.

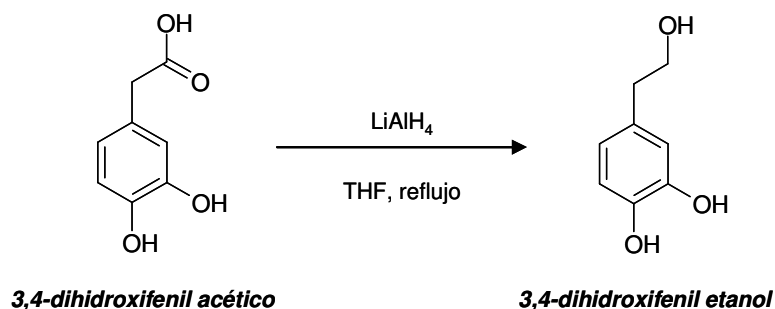
#### 4.1.3.2. Dietas de ratones

La dieta suministrada a los ratones durante el tratamiento con HT en el estudio de expresión génica fue una dieta chow estándar suministrada por Panlab (Mantenimiento AO4). La composición nutricional de esta dieta fue: 15.4% de proteínas, 2.9% de grasa, 60.5% de hidratos de carbono, 3.9% de fibra, 5.3% de minerales y 12% de humedad.

#### 4.1.4. OBTENCIÓN DEL HIDROXITIROSOLO EMPLEADO PARA LOS ESTUDIOS

##### 4.1.4.1. Síntesis química

El HT utilizado para los estudios en modelos animales fue sintetizado químicamente por el Departamento de Síntesis Química de Puleva Biotech S.A. de acuerdo con el procedimiento descrito por Capasso et al. (1999). El método consiste en una reducción directa del ácido 3,4-dihidroxifenil acético con hidruro de aluminio y litio en tetrahidrofurano anhidro (THF) a reflujo durante 2 horas. El procesado incluye la destrucción del exceso de reductor y posterior extracción con acetato de etilo y purificación cromatográfica. El grado de pureza del producto resultante se estimó por HPLC (apartado 4.2.3.3) y fue del 98%.



**Figura 4.2. Síntesis química del HT**

Para su administración a los animales de experimentación, el compuesto se disolvió en agua destilada y se conservó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

##### 4.1.4.2. Purificación a partir de alpeorujó

El HT utilizado en los estudios con voluntarios humanos se purificó a partir del alpeorujó por el Departamento de Ingeniería de Procesos de Puleva Biotech S.A. El proceso de obtención se realizó en varias etapas: solubilización de la materia prima, extracción con disolventes y finalmente purificación por cromatografía preparativa. Los disolventes orgánicos utilizados en la extracción fueron los autorizados para uso alimentario según RD 226/1994 de 11 de

febrero y se eliminaron posteriormente por secado a vacío. El grado de pureza del producto resultante se estimó por HPLC (apartado 4.2.3.3) y fue del 98%. Una vez purificado, el HT se disolvió en agua de mineralización débil y se conservó a -20°C hasta su uso.

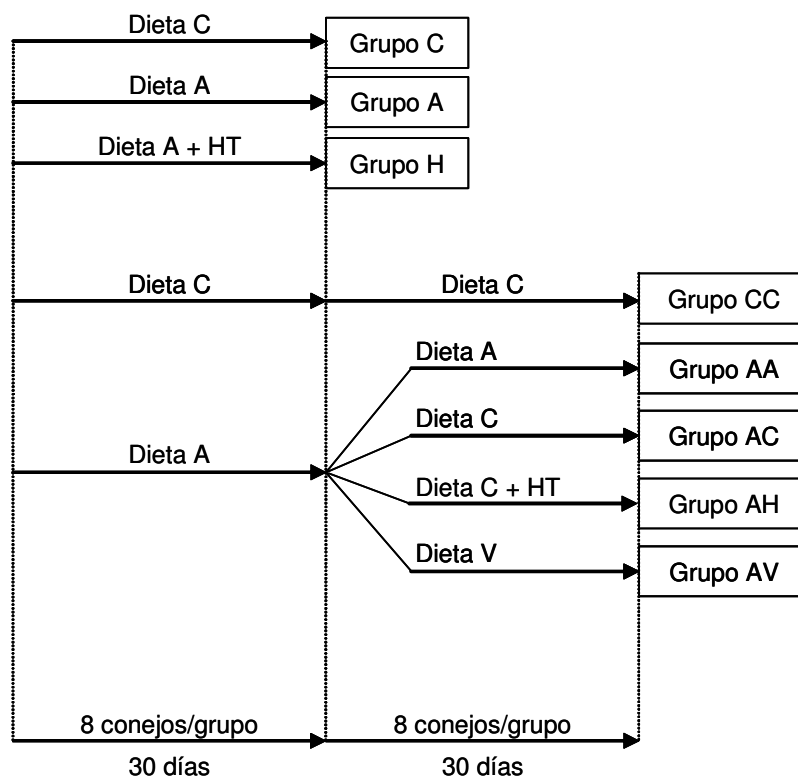
## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES**

#### **4.2.1.1. Estudio de los efectos del hidroxitirosol en un modelo experimental de aterosclerosis inducida por dieta**

En este estudio se utilizaron 64 conejos (apartado 4.1.2.1) que fueron distribuidos al azar en 8 grupos de 8 animales cada uno de acuerdo con el esquema mostrado en la figura 4.3. Tres de los grupos fueron sacrificados a los 30 días (grupos C, A y H) y el resto a los 60 días del comienzo del estudio (grupos CC, AA, AC, AH y AV).

Los grupos C, A y H fueron alimentados durante un mes con la dieta C, la dieta A y la dieta A con HT respectivamente. Otros dos grupos fueron alimentados durante dos meses con la dieta C y la dieta A (grupos CC y AA respectivamente). El resto de los grupos (grupos AC, AV y AH) fueron alimentados durante el primer mes con la dieta A y durante el segundo mes con la dieta C, la dieta V o la dieta C con HT respectivamente. El HT utilizado en este estudio fue obtenido por síntesis química (apartado 4.1.4.1). Una dosis diaria de 4 mg de HT por kilogramo de peso fue administrada a los conejos mediante una sonda oral (Pennine Inglaterra UK).



**Figura 4.3. Diseño experimental del estudio de los efectos del HT en modelo experimental de aterosclerosis inducida por dieta.**

Los conejos fueron sacrificados en el quirófano del Centro de Experimentación Animal, acondicionado para tal efecto, trascurridas 12 horas de ayuno, mediante anestesia con 1 mL de una disolución pentotal sódico al 1% (P/V) administrada por la vena marginal de la oreja. Una vez anestesiados, se canuló la arteria carótida para la obtención de la sangre.

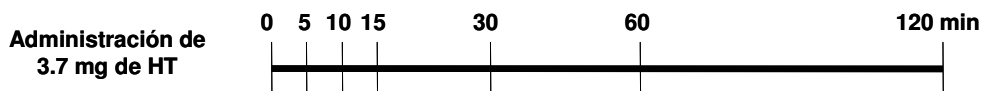
El procedimiento fue llevado a cabo por técnicos especialistas en experimentación animal. La sangre de los conejos se recogió en tubos tipo falcon estériles de 50 mL conteniendo 3 mL de una solución acuosa de heparina sódica al 0.2% (P/V) (Rovi, Madrid). Se aisló el plasma por centrifugación de la sangre (apartado 4.2.2.1.) para el análisis de ácidos grasos, CT, TG, HDL, CAO y MDA (apartados 4.2.3.4 a 4.2.3.9). Se tomaron muestras del cayado aórtico de aproximadamente 5 cm de longitud. Los fragmentos de aorta se transfirieron a placas “petri” estériles conteniendo una disolución de Krebs-Henseleit sin calcio cuya composición es 118 mmol NaCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.7 mM KCl, 11 mM glucosa y 25 mM NaHCO<sub>3</sub>.

Los fragmentos de aorta se incubaron en esta solución durante 15 minutos y se eliminó la grasa periférica con ayuda de unas pinzas estériles. A continuación los fragmentos limpios de la aorta fueron depositados en una solución fijadora de tampón fosfato sódico 0.1 M (pH=7.4)

conteniendo formol al 10% (V/V). La solución fijadora se renovó cada 15 días por solución fresca, un total de 5 veces. Este tratamiento permitió conservar los diferentes tipos celulares de la capa endotelial, muscular y adventicia de las muestras para su análisis histológico (apartado 4.2.3.10).

#### 4.2.1.2. Estudio de absorción del hidroxitirosol en ratas

En este estudio se utilizaron 21 ratas (apartado 4.1.2.2.) las cuales permanecieron en ayunas durante las 12 horas previas a la realización del ensayo. A los animales se les administró una dosis de 3.7 mg (25  $\mu$ moles) de HT disuelto en 1 mL de agua mediante una sonda oral (Vygon, Francia). Las ratas fueron divididas en 7 grupos de 3 ratas cada uno que fueron sacrificados transcurridos 0 (basal), 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración del compuesto. El HT utilizado en este estudio fue obtenido por síntesis química (apartado 4.1.4.1). Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, llevada a cabo por técnicos especialistas en experimentación animal. La sangre fue recogida de forma inmediata sobre tubos adicionados de EDTA (sal potásica 1.6 mg/mL sangre). El plasma se aisló por centrifugación de la sangre (apartado 4.2.2.1.) para el análisis de HT y sus metabolitos (apartado 4.2.3.11).



**Figura 4.4. Diseño experimental del estudio de absorción de HT en ratas**

#### 4.2.1.3. Estudio de biodisponibilidad del hidroxitirosol en humanos y su afinidad *in vivo* a las lipoproteínas LDL

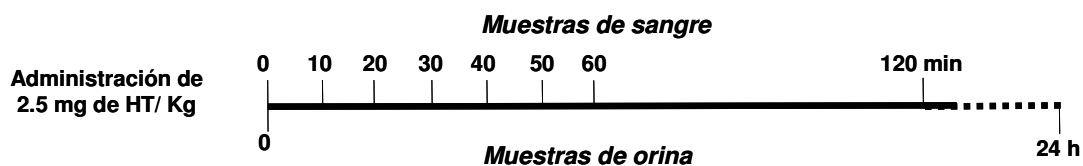
El estudio de biodisponibilidad del HT y su afinidad *in vivo* a las lipoproteínas LDL en humanos se llevó a cabo en dos fases separadas por un periodo de descanso de 15 días o "wash out". En el estudio participaron 10 voluntarios sanos (8 hombres y 2 mujeres) con edades comprendidas entre los 21 y los 31 años (media:  $25 \pm 1$ ) e índice de masa corporal de  $23.6 \pm 0.9$  Kg/m<sup>2</sup>. Ninguno de los voluntarios tenía antecedentes de enfermedades gastrointestinales, de hígado o de riñón que pudieran afectar a la absorción y/o eliminación de nutrientes y tras un examen físico fueron considerados sanos. Los voluntarios no consumieron aceitunas o aceite de oliva durante los dos días previos a la realización de los ensayos. Los participantes llegaron a los servicios médicos de Puleva Food S.L. en ayunas y permanecieron sentados y en reposo durante todo el ensayo.



La toma de muestras de sangre se realizó utilizando un dispositivo de extracción con cánula tipo “mariposa” acabado en una conexión tipo “Luer” o adaptador múltiple (Set cánula Multifyl<sup>®</sup>, Sarstedt, Alemania) y un sistema de extracción a vacío con tubos de tipo “vacutainer” aicionados de EDTA (sal potásica 1.6 mg/mL sangre) (S-Monovette<sup>®</sup>, Sarstedt, Alemania). La extracción fue realizada por un ATS especialista y bajo supervisión médica.

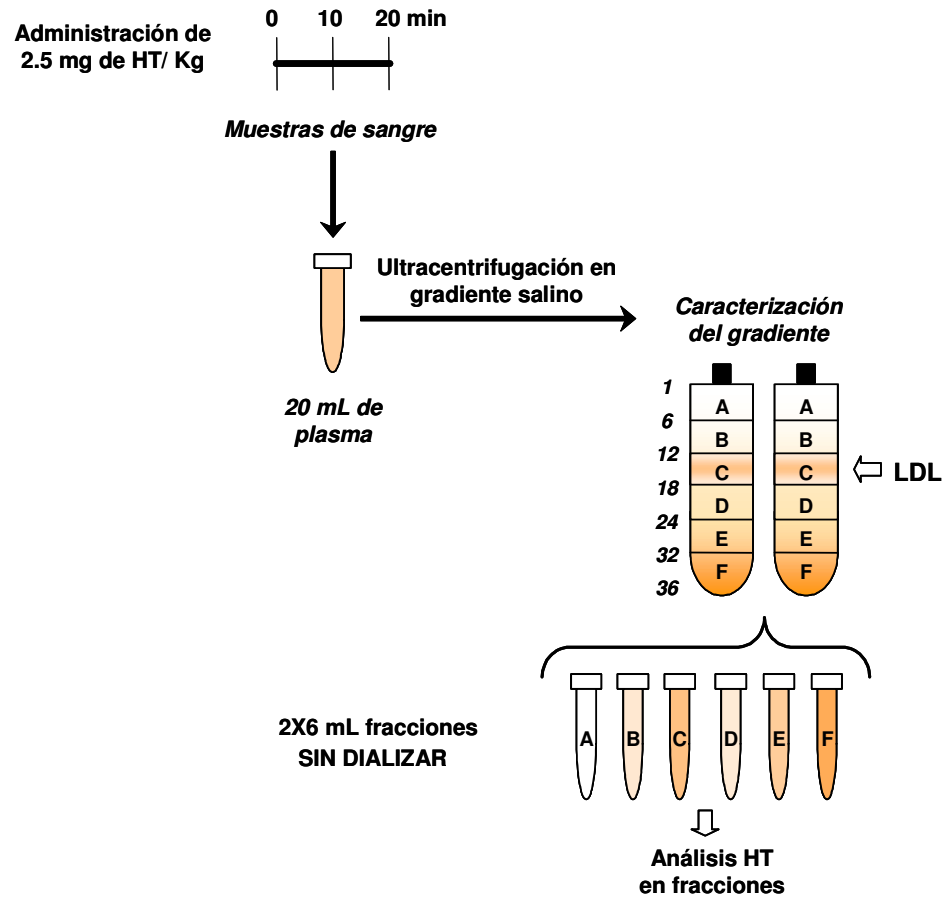
Los voluntarios ingirieron en una sola dosis 2.5 mg por kilogramo de peso de HT obtenido a partir de alpeorujó (apartado 4.1.4.2.) que se administró disuelto en agua.

Para el estudio de la biodisponibilidad, se extrajeron muestras de sangre antes de la toma del preparado (tiempo 0) y transcurridos 10, 20, 30, 40, 50, 60, y 120 minutos de la ingesta. Se aisló el plasma (apartado 4.2.2.1.) y las lipoproteínas LDL (apartado 4.2.2.2). Se recogió una muestra de orina antes de la ingesta del HT (orina basal) y se recopiló la orina durante las 24 horas posteriores a la administración del compuesto y se midió su volumen. Se determinaron la concentración de HT y sus metabolitos en plasma y en orina, así como la CAO del plasma y la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas LDL.



**Figura 4.5. Diseño experimental del estudio de biodisponibilidad del HT en humanos.**

Para el estudio de afinidad del HT a las lipoproteínas LDL se llevaron a cabo extracciones de sangre antes de la toma del preparado (tiempo 0) y transcurridos 10 y 20 minutos de la ingesta. El plasma se obtuvo por centrifugación de la sangre (apartado 4.2.2.1) y las lipoproteínas del plasma se aislaron por ultracentrifugación en gradiente salino (apartado 4.2.2.2.). El gradiente de densidad resultante se dividió en fracciones de 1 mL de densidad creciente mediante la inyección de una solución de sacarosa al 66% (P/V) desde la parte inferior del tubo de ultracentrífuga usando un fraccionador de gradientes. Se realizó una caracterización previa del gradiente de lipoproteínas mediante la determinación de la densidad, la concentración de proteínas totales, ApoB, ApoA1 (apartados 4.2.3.14 y 4.2.3.15), CT y TG (apartados 4.2.3.5. y 4.2.3.6.). Las fracciones obtenidas se reunieron en 6 grupos, conteniendo cada uno 6 fracciones consecutivas de 1 mL, que se denominaron de menor a mayor densidad: A, B, C, D, E y F (Figura 4.6.) que fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.2.3.16) de cada uno de estos grupos y se determinó la concentración de HT y metabolitos derivados en el plasma y en los distintos grupos del gradiente de lipoproteínas (apartado 4.2.3.11).



**Figura 4.6. Diseño experimental del estudio de afinidad del HT por LDL en humanos.**

Se utilizaron dos soluciones control diferentes al plasma consistentes en a) una disolución acuosa de HT (250 µg/L) y b) una disolución de 40 g/L de albúmina sérica bovina en PBS (pH=7.4) conteniendo 250 µg/L de HT. Estos controles siguieron el mismo proceso de ultracentrifugación y tratamientos que las muestras de plasma.

#### 4.2.1.4. Estudio del efecto del hidroxitirosol sobre la expresión génica de ratones

En este estudio se utilizaron 15 ratones (apartado 4.1.2.3.) que fueron divididos en 3 grupos de 5 animales cada uno que recibieron durante 14 días consecutivos el siguiente tratamiento:

- Grupo control: 0.5 mL de agua al día
- Grupo 1 mg: 1 mg de HT al día (0.5 mL de una disolución 2 mg/mL en agua)
- Grupo 10 mg: 10 mg de HT al día (0.5 mL de una disolución 20 mg/mL en agua)

El HT utilizado en este estudio fue obtenido por síntesis química (apartado 4.1.4.1). La administración de los distintos tratamientos se realizó mediante una sonda oral (Vygon, Francia). El peso de los animales se comprobó diariamente. 24 horas después de haber recibido la última dosis de HT, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y sus hígados fueron aislados y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Se obtuvieron muestras de ARN de los tejidos (apartado 4.2.3.17) y para cada grupo se preparó un pool con 10 µg de ARN total de cada muestra. El efecto del HT en la expresión génica se analizó utilizando un sistema de microarrays (Murine Genome U74Av2) de Affymetrix (MedPlant Genetics, Bilbao) (apartado 4.2.3.18).

#### 4.2.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

##### 4.2.2.1. Obtención de plasma

El plasma se obtuvo por centrifugación de la sangre a 1750 g durante 10 minutos y a 4°C. Las alícuotas de plasma se gasearon con nitrógeno para prevenir la oxidación y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

##### 4.2.2.2. Aislamiento de lipoproteínas LDL

Las lipoproteínas se aislaron por ultracentrifugación en gradiente de densidad según el método descrito por Chung et al. (1980). Se utilizaron 10 mL de plasma que fueron introducidos en un tubo de ultracentrífuga (Optiseal™ Beckman, EEUU). La densidad del plasma se ajustó a 1.30 g/mL mediante la adición de bromuro potásico (KBr) cuya cantidad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$M_{\text{KBr}} = \frac{(13 - M_p + M_v)}{1 - (0.01335 \times (13 + M_p - M_v))}$$

En donde:

$M_{\text{KBr}}$  = g de KBr a añadir para ajustar la densidad a 1.3

$M_p$  = Peso del tubo con 10 mL de plasma (g)

$M_v$  = Peso del tubo vacío (g)

El KBr se disolvió mediante agitación suave y el tubo se completó con 26 mL de una solución de NaCl 0.15 M que se añadieron lentamente dejándolos resbalar gota a gota por las

paredes del tubo en el que se formaron claramente dos fases de distinta densidad. Los tubos se centrifugaron a 242000 g durante 2.5 horas y a 4°C en una ultracentrífuga. Finalizado el tiempo de centrifugación aparecieron 3 bandas claramente definidas correspondientes a las lipoproteínas VLDL, LDL y HDL como se muestra en la figura 4.7



**Figura 4.7. Bandas de las lipoproteínas aisladas por ultracentrifugación.**

La banda que contenía a las partículas LDL se dializó para sus posteriores análisis utilizando membranas de celulosa (Sigma): en primer lugar las membranas de diálisis se activaron calentándolas a 80°C en una disolución acuosa saturada de EDTA y a continuación se enjuagaron con abundante agua destilada. La banda de LDL, correspondiente al intervalo de densidad entre 1.019 y 1.063, se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur y se introdujo en la membrana de diálisis cerrada por sus extremos con unas pinzas de plástico. Todas las membranas se sumergieron en dos litros de una solución PBS en agitación continua y se mantuvieron durante 24 horas a 4°C y en oscuridad. La solución de diálisis se renovó cada 8 horas. Tras la diálisis, las alícuotas de LDL se gasearon con nitrógeno y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### 4.2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 4.2.3.1. GRASA TOTAL DE LAS DIETAS.

La extracción de grasa de las dietas se realizó empleando un dispositivo Soxhlet según el protocolo oficial descrito en el Reglamento CE num. 2472/97 del Comité Oleícola Internacional (COI).

En un cartucho de extracción de 33x100 mm, se introdujeron 35 g de dieta y se colocó en un extractor tipo Soxhlet (Afora) conectado en su parte superior a una columna refrigeradora. Como disolvente extractor se utilizaron 200 mL de n-hexano que se colocaron en un matraz redondo, previamente tarado, situado en la parte inferior del dispositivo que a su vez que se encontraba en contacto con una manta calefactora. La extracción de la grasa se llevo a cabo a reflujo durante un periodo de 6 horas. A continuación, el n-hexano se evaporó en un rotavapor hasta la completa eliminación del disolvente y el matraz se enfrió a temperatura ambiente en un desecador. La grasa de la dieta se determinó por diferencia de pesadas entre el matraz con grasa y el matraz vacío y se expresó como porcentaje en función de la cantidad exacta de dieta introducida en el cartucho de extracción.

#### 4.2.3.2. ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA

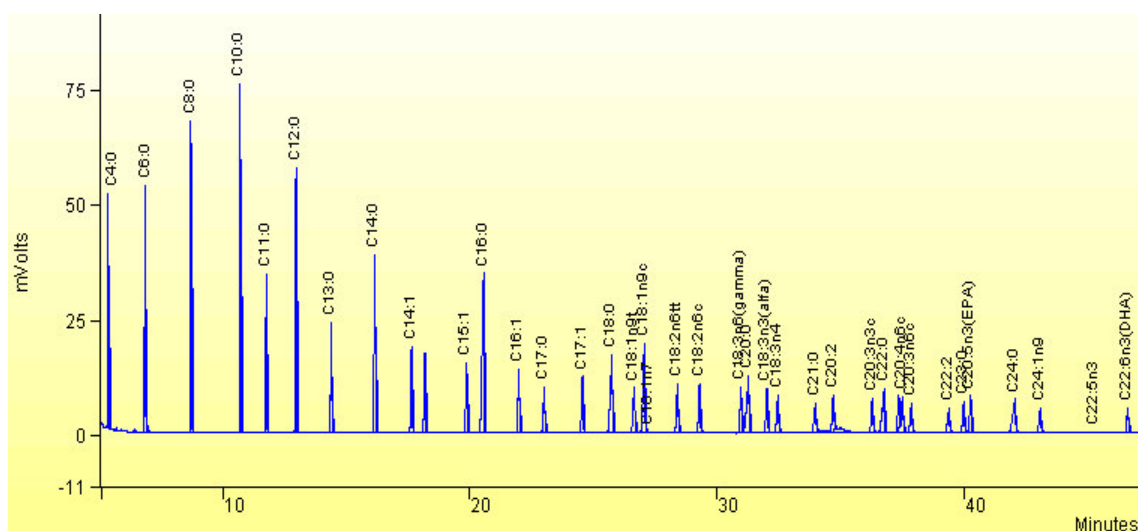
El método empleado para la determinación de los ácidos grasos de la dieta se describe en el Reglamento CE num. 2472/97 del Comité Oleícola Internacional (COI) y se basa en la cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que componen los triglicéridos de los aceites.

Se emplearon 0.5 g del extracto graso de la dieta que se pesaron en un tubo de cristal de 15 mL y se disolvieron en 5 mL de n-hexano de calidad HPLC. A continuación se llevó a cabo una trans-esterificación añadiendo 0.5 mL de una solución 2 N de KOH en metanol y se agitó con la ayuda de un vórtex durante unos segundos. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un vial y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Varian CP3800) con las siguientes condiciones experimentales:

- Fase estacionaria: columna SPB 2380 (60 m, 0.2 mm).
- Fase móvil: helio purísimo.
- Volumen de inyección: 2 µL.
- Flujo: 1.2 mL/min.

- Temperaturas del horno:  $T_0 = 60^{\circ}\text{C}$  (0.5 min),  $T_1 = 150^{\circ}\text{C}$  (rampa  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 14.5 min),  $T_2 = 220^{\circ}\text{C}$  (rampa  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 50.5 min).
- Temperatura del inyector:  $60^{\circ}\text{C}$  alcanzando los  $250^{\circ}\text{C}$ .
- Temperatura del detector:  $250^{\circ}\text{C}$ .
- Gases combustión: aire e hidrogeno.

Para la identificación de los ácidos grasos se compararon los tiempos de retención de los picos con los obtenidos a partir de una solución patrón de 37 ácidos grasos (Sulpeco 37 Component FAME mix, Sigma). La cuantificación se realizó mediante integración de los picos y los resultados se expresaron como tanto por ciento del total de los ácidos grasos correspondientes.



**Figura 4.8. Cromatograma del patrón de ácidos grasos empleados para el análisis de las dietas.**

#### 4.2.3.3. ANÁLISIS DE LA PUREZA Y CONCENTRACIÓN DE HT EN LOS EXTRACTOS Y SOLUCIONES ACUOSAS.

El análisis de la pureza del HT obtenido por síntesis o por extracción a partir del alpeorujó y el análisis de la concentración de HT en las disoluciones acuosas empleadas para los diferentes estudios se realizó por el método descrito por Brenes et al. (1999) utilizando un sistema de HPLC conectado a un detector de ultravioleta (PDA).

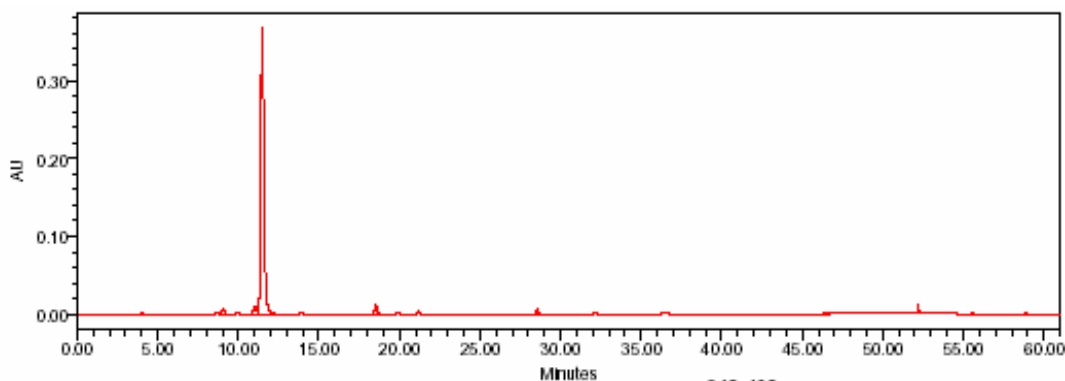
Las muestras se diluyeron en agua milliQ y se filtraron con un filtro de nylon de  $0.2\ \mu\text{m}$ . Las muestras diluidas se transvasaron a un vial y se inyectaron en HPLC conectado a un detector ultravioleta con las siguientes condiciones experimentales:

- Fase estacionaria: Columna LiChroCart RP-18, 250 x 4.1 mm
- Fase Móvil (gradiente): Fase A: disolución de ácido acético al 2%. Fase B: metanol.
- Flujo: 0.8 mL/min. Las condiciones del gradiente se indican en la siguiente tabla:

t(min)	% Fase A	% Fase B
0 min	85	15
8 min	85	15
15 min	60	40
20 min	45	55
21 min	0	100
25 min	0	100
26 min	85	15
30 min	85	15
5 minutos de acondicionamiento		

- Volumen de inyección: 10  $\mu$ L.
- Profundidad de la aguja: 2 mm.
- Temperatura del carrusel de muestras:  $25.0 \pm 5.0^{\circ}\text{C}$ .
- Temperatura columna:  $40.0 \pm 5.0^{\circ}\text{C}$ .
- Duración del cromatograma (tiempos de retención): 30 min. (HT = 6.90 min. Tirosol = 11.40 min).
- Modo de medida: áreas.

Para la cuantificación se preparó una recta patrón de HT con las siguientes concentraciones: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg/L. La concentración en la muestra se determinó mediante interpolación del área correspondiente al pico de HT en la función de calibración obtenida con los patrones.



**Figura 4.9** Análisis cromatográfico por HPLC del extracto natural rico en hidroxitirosol

#### 4.2.3.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASMA

El método empleado fue el descrito por Lepage y Roy (1986) que presenta la ventaja de realizar la extracción lipídica y la transesterificación de los ácidos grasos en una sola etapa.

Los análisis de los ácidos grasos del plasma se realizaron en tubos de ensayo de vidrio Pirex con 200  $\mu$ L de plasma a los que se adicionaron 2 mL de una mezcla metanol:tolueno 4:1 (V:V) y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos. A continuación se añadieron, lentamente 200  $\mu$ L de cloruro de acetilo en agitación continua y campana de extracción de gases. Los tubos se cerraron herméticamente y se incubaron durante 1h a 100°C en una placa calefactora. Seguidamente se enfriaron en un baño de hielo y se le adicionaron 5 mL de una disolución de carbonato potásico al 6% (P/V). Para finalizar, los tubos se centrifugaron a 1700 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron con ayuda de pipetas "Pasteur" de vidrio y se introdujeron en viales antes de su análisis por cromatografía gaseosa.

La determinación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en plasma se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases con inyector automático, acoplado a un detector de llama (detector FID) en las siguientes condiciones experimentales:

- Fase estacionaria: columna Supelco SPTM 2380 Fused Silica Capillary Column 60m x 0.25 mm x 0.2  $\mu$ m.
- Fase móvil: helio purísimo.
- Volumen de inyección: 2  $\mu$ L.
- Temperaturas del horno:  $T_0 = 60^\circ\text{C}$  (0.5 min),  $T_1 = 150^\circ\text{C}$  (rampa  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , 5 min),  $T_2 = 220^\circ\text{C}$  (rampa  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ , 1 min), duración 50.5 min.
- Temperatura del inyector:  $250^\circ\text{C}$ .
- Liner: Split/splitless 2 mm ID, Split: 50%.
- Flujo: 1 mL/min.
- Temperatura del detector:  $280^\circ\text{C}$ .
- Gases combustión: aire e hidrogeno.

La identificación cromatográfica de los ácidos grasos se realizó también por comparación de los tiempos de retención de los picos con los obtenidos a partir de una solución patrón de 37 ácidos grasos (Sulpeco 37 Component FAME mix, Sigma). La cuantificación se realizó mediante integración de los picos y los resultados se expresaron como tanto por ciento del total de los ácidos grasos correspondientes.



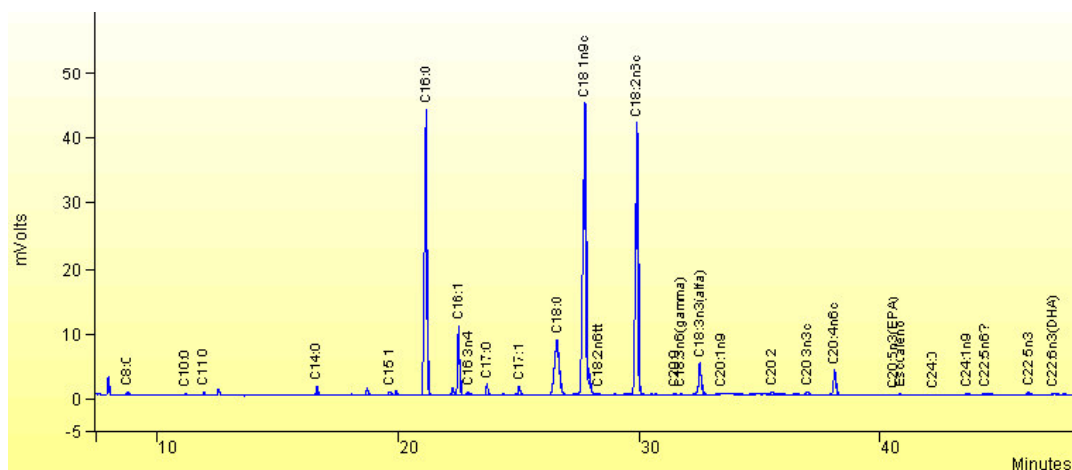
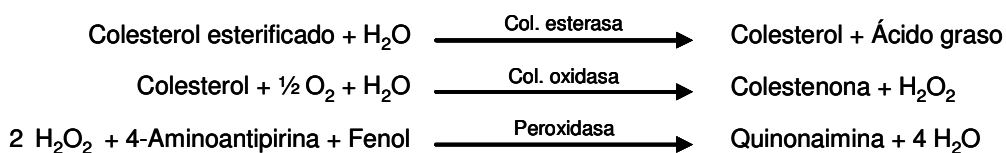


Figura 4.10. Ejemplo de cromatograma de ácidos grasos del plasma.

#### 4.2.3.5. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

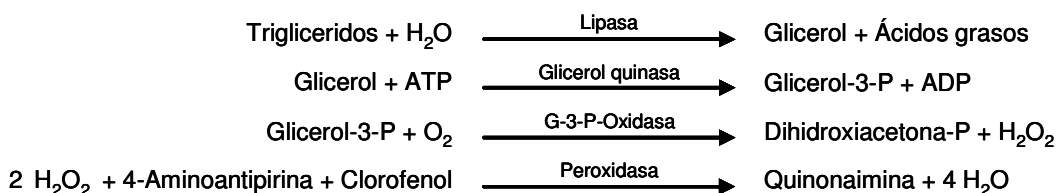
La cuantificación de colesterol total (CT) se llevó a cabo empleando un kit enzimático comercial proporcionado por BioSystems (Barcelona, España). El método de la determinación de CT esta basado en la liberación del colesterol esterificado mediante la colesterol esterasa y la posterior oxidación de este y el colesterol libre por la colesterol oxidasa. Esta reacción libera agua oxigenada que al reaccionar con 4-aminoantipirina y fenol produce quinonaimina, un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 500 nm (Allain et al, 1974; Meiattini et al, 1978)



Las determinaciones de CT se llevaron a cabo mezclando 10  $\mu\text{L}$  de plasma con 1 mL del reactivo cuya composición era: piper 35 mM, colato sódico 0.5 mM, fenol 28 mM, colesterol esterasa 0.2 U/mL, colesterol oxidasa 0.1 U/mL, peroxidasa 0.8 U/mL, 4-aminoantipirina 0.5 mM (pH=7). La mezcla resultante se agitó en vortex y se incubó durante 5 minutos en un bloque calefactor a 37°C. La absorbancia de la mezcla resultante se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm. Los valores de CT se obtuvieron por comparación de absorbancias con un patrón acuoso de colesterol de 200 mg/dL. Para las muestras con una concentración de CT superior al límite de linealidad (1000 mg/dL) se realizó una dilución en agua.

#### 4.2.3.6. DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

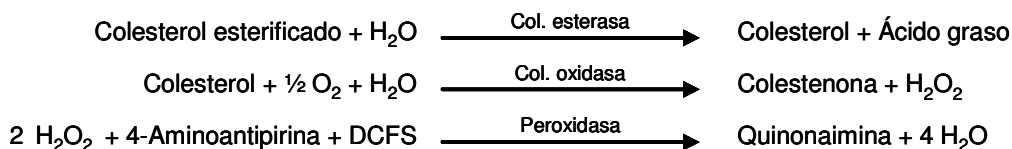
La cuantificación de triglicéridos (TG) se llevó a cabo empleando un kit enzimático comercial proporcionado por BioSystems (Barcelona, España). El método de determinación de TG esta basado en la hidrólisis de los TG presentes en la muestra por la acción de la lipasa liberando una molécula de glicerol que en presencia de ATP y de la enzima glicerol quinasa produce glicerol-3-fostato. Este se oxida por la glicerol-3-fostato oxidasa liberando agua oxigenada, que al reaccionar con 4-aminoantipirina y fenol produce quinonaimina, un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 500 nm (Bucolo y Davis, 1973; Fossati y Prencipe, 1982):



Las determinaciones de TG se llevaron a cabo mezclando 10  $\mu\text{L}$  de plasma con 1 mL del reactivo cuya composición era: piper 45 mM, 4-clorofenol 6 mM, cloruro magnésico 5 mM, lipasa 100 U/mL, glicerol quinasa 1.5 U/mL, glicerol-3-fostato oxidasa 4 U/mL, peroxidasa >0.8 U/mL, 4-aminoantipirina 0.75 mM, ATP 0.9 mM (pH=7). La mezcla resultante se agitó en vortex y se incubó durante 5 minutos en un bloque calefactor a 37°C. La absorbancia de la mezcla resultante se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm. Los valores de TG se obtuvieron por comparación de absorbancias con un patrón acuoso de glicerol equivalente a 200 mg/dL de trioleina.

#### 4.2.3.7. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL HDL

La cuantificación de colesterol de alta densidad (HDL) se llevó a cabo empleando un kit enzimático comercial proporcionado por BioSystems (Barcelona, España). El método esta basado en la precipitación de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra en presencia de fosfotungstato e iones magnesio. El colesterol es cuantificado en el sobrenadante, que contiene las HDL, mediante hidrólisis del colesterol esterificado por la colesterol esterasa y la posterior oxidación de este y el colesterol libre por la colesterol oxidasa. Esta reacción libera agua oxigenada que, al reaccionar con 4-aminoantipirina y clorodifenol sulfonato (DCFS), produce quinonaimina, un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 500 nm (Grove, 1979; Burstein et al., 1980):



Las determinaciones de HDL se llevaron a cabo mezclando 200  $\mu\text{L}$  de plasma con 0.5 mL de reactivo precipitante (solución acuosa de Fosfotungstato 0.4 mM y cloruro de magnesio 20 mM). La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se mezclaron con 1 mL de reactivo cuya composición era: fosfatos 35 mM, colesterol esterasa 0.2 U/mL, colesterol oxidasa 0.1 U/mL, peroxidasa 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0.5 mM, colato sódico 0.5 mM, DCFS 4 mM, (pH=7). La mezcla resultante se agitó en vortex y se incubó durante 10 minutos en un bloque calefactor a 37°C. La absorbancia de la mezcla resultante se leyó en el espectrofotómetro a 500 nm. Los valores de HDL se obtuvieron por comparación de absorbancias con un patrón acuoso de colesterol de 15 mg/dL.

#### 4.2.3.8. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA

Para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma (CAO) se utilizó el método descrito en Re R. *et al.* (1999). El método está basado en la decoloración del catión radicalario ABTS<sup>•+</sup> llevado a cabo por los compuestos antioxidantes presentes en el plasma.



La solución madre del radical ABTS<sup>•+</sup> se preparó mezclando 5 mL de una disolución acuosa 7 mM de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt 98% de pureza, de Sigma) con 88  $\mu\text{L}$  de una disolución 140 mM de persulfato potásico que se incubó durante 16 horas en oscuridad y a 4°C. El radical ABTS<sup>•+</sup> generado es un cromóforo de color verde azulado que presenta un máximo de absorción a la longitud de onda de 734 nm. Antes de la realización del ensayo la disolución madre del radical ABTS<sup>•+</sup> se disolvió en PBS (pH 7.4) hasta ajustar su densidad óptica a  $0.70 \pm 0.02$ , esta disolución constituyó la solución de trabajo. Las determinaciones de CAO se llevaron a cabo diluyendo la muestra de plasma en PBS en proporción 1/10. A continuación, 20  $\mu\text{L}$  de las muestras diluidas se mezclaron con 980  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo. La mezcla se incubó durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la absorbancia fue leída a 734 nm. Para la cuantificación de la CAO se utilizaron estándares de TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-carboxílico, de Sigma) en solución etanólica cuyas concentraciones fueron 0, 0.125, 0.250, 0.500, 0.750 y 1 mM. La CAO de las muestras se

determinaron mediante interpolación de la absorbancia de la muestra en la función de calibración obtenida con los patrones y multiplicando por el factor de dilución. Los valores de CAO se expresaron en  $\mu\text{M}$  como equivalentes de TROLOX.

#### 4.2.3.9. DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHIDO EN PLASMA

El malondialdehido (MDA) es un marcador aceptado de peroxidación lipídica en plasma y su determinación se ha llevado a cabo según el método descrito por Fukunaga et al. (1998). Este método está basado en la reacción del MDA, que se produce durante la oxidación lipídica en el plasma, con ácido tiobarbitúrico (TBA) a pH ácido y a alta temperatura, que da lugar a la formación de un compuesto fluorescente que se cuantifica por HPLC.

La determinación de MDA en plasma se llevó a cabo utilizando 20  $\mu\text{L}$  de muestra, que se dispusieron en tubos eppendorf de rosca, a las que se adicionaron 0.5 mL de una disolución al 0.2% de TBA en tampón 2 M de acetato sódico a pH=3.5 y se agitó vigorosamente. La mezcla resultante se incubó durante una hora en un bloque calefactor a 95°C. Tras la incubación los tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 2 minutos y a 4°C. A continuación se adicionaron 0.5 mL de un tampón 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 6.8 y se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Para finalizar se tomaron 600  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se mezclaron en un vial para HPLC con 600  $\mu\text{L}$  de un tampón 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 3.5 agitando vigorosamente.

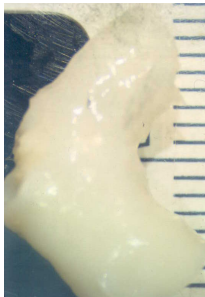
La mezcla se inyectó en un cromatógrafo HPLC con un detector de fluorescencia en las siguientes condiciones experimentales:

- Fase estacionaria: columna LiChroCart 250-4 (Superspher 100 RP-18) 250 x 4.6 mm.
- Fase móvil: 96 % fase A (tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 6.8 con 20% de acetonitrilo) + 4 % fase B: (acetonitrilo/agua, 70/30); flujo 0.5 ml/min.
- Volumen de inyección: 50  $\mu\text{L}$ .
- Temperatura columna: 40.0  $\pm$  5.0°C.
- Detector: longitud de onda de medida de fluorescencia: excitación 515 nm/emisión 543 nm; ganancia 10.
- Duración del cromatograma: 12 minutos.
- Modo de medida: áreas.

Para la cuantificación del MDA presente en el plasma se preparó una recta patrón de MDA con las siguientes concentraciones: 0, 0.1, 0.25, 0.50, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10  $\mu\text{mol/L}$ . La concentración en la muestra se determinó mediante interpolación del área correspondiente al

pico de MDA en cada una de las muestras en la función de calibración obtenida con los patrones.

#### 4.2.3.10. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE AORTAS



Los fragmentos de aorta fueron analizados en colaboración con el Departamento de Cirugía II de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras correspondían a la región próxima al cayado aórtico de los conejos. Las muestras fueron fotografiadas bajo lupa y con una regla de calibrado.

◀ **Figura 4.10. Fragmento de callado aórtico.**

##### **A) Tinciones histológicas de las secciones de arteria:**

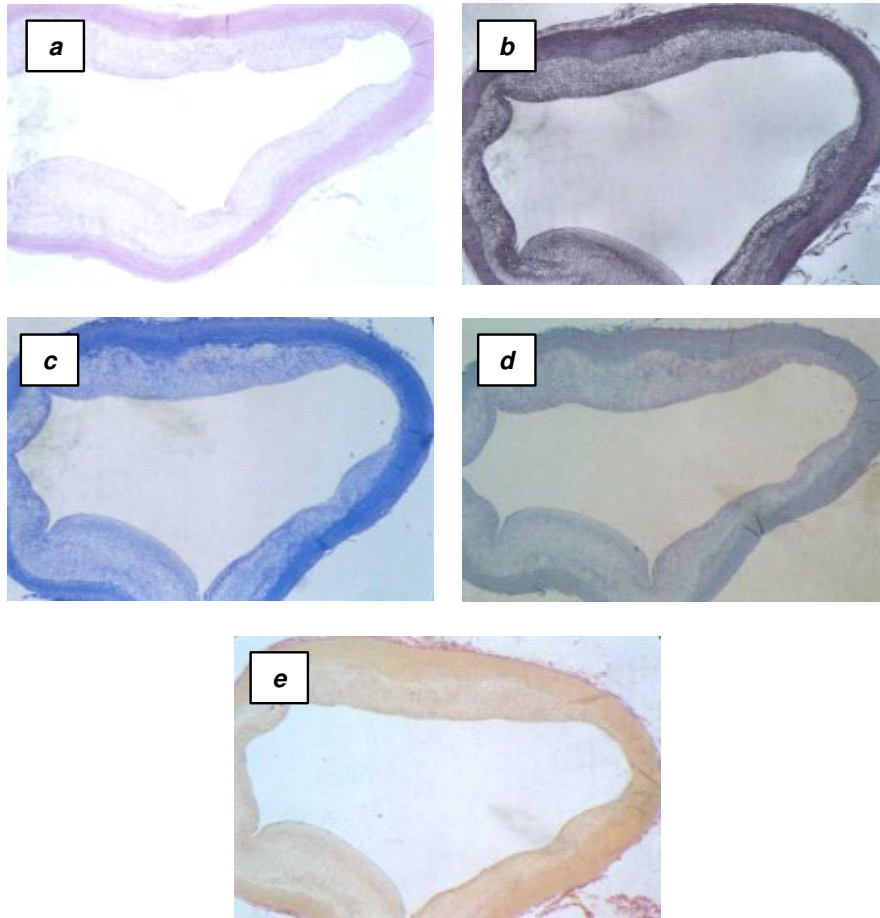
Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol: 35%, 50%, 70%, 96%, 100%, alcohol/tolueno y tolueno y se incluyeron en parafina. A continuación se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. El número de secciones por arteria fue aproximadamente de 40 cortes por muestra.

Las secciones se desparafinaron en xileno y fueron rehidratadas posteriormente en etanol a concentraciones decrecientes: 100%, 96%, 70%, 50%, 35% y agua bidestilada. Después de teñirlas y ser observadas a microscopio, las secciones se deshidrataron de nuevo en concentraciones crecientes de alcohol (35%, 50%, 70%, 96%, 100% y xileno).

Para las tinciones se utilizaron los siguientes colorantes de anilinas:

- a) Hematoxilina-Eosina: que tiñe de color violáceo los núcleos celulares debido a la hematoxilina de Weigert y el citoplasma celular de color naranja corresponde a la eosina.
- b) Orceína: Tiñe las fibras elásticas de púrpura oscuro a pardo negruzco, el colágeno casi incoloro, y el color azul corresponde a núcleos celulares y la monocapa endotelial.
- c) Azan: es un colorante tricrómico, en el que se diferencian los núcleos de color rojo brillante y el colágeno, la membrana basal y las mucinas de color azul. En algunos casos la lámina elástica interna se observa teñida de azul como una membrana basal.

- d) Masson: es un colorante tricrómico, que permite diferenciar las estructuras de colágeno en verde, el núcleo de las células en azul negrozco y el citoplasma de color rosa rojizo.
- e) Van Giesson: es un colorante tricrómico que permite distinguir el colágeno en rojo intenso, los núcleos en azul oscuro y el citoplasma en amarillo



**Figura 4.11. Tinciones histológicas realizadas en secciones consecutivas de una muestra de cayado aórtico. a) Hematoxilina-eosina; b) Orceína; c) Azán; d) Masson; e) Van Gielsson.**

#### **B) Estudio de análisis morfométrico:**

De cada fragmento de arteria se analizaron 4 secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor cada una. Entre cada sección analizada había una diferencia de 50  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron tomadas mediante un fotomicroscopio conectado a una cámara de video. Las imágenes fueron digitalizadas utilizando un programa de análisis de imagen LEICA Q 500MC (Alemania). En el análisis morfométrico se consideraron los siguientes parámetros:

- Área total: los valores obtenidos corresponden con el área total de la arteria sin diferenciar entre las diferentes capas. La unidad de medida fue el mm<sup>2</sup>.
- Área de la media: corresponde al área de la capa media exclusivamente. La unidad de medida fue el mm<sup>2</sup>.
- Área de la capa íntima: corresponde al área de la capa íntima y endotelio, ya que no es posible separar esta monocapa celular de la capa íntima con las técnicas empleadas. La unidad de medida fue el mm<sup>2</sup>.

#### **4.2.3.11. DETERMINACIÓN DE HIDROXITIROSOLO Y METABOLITOS DERIVADOS.**

Se cuantificaron el HT, el alcohol homovanílico (HvOH), el ácido homovanílico (HvAc) y el ácido dihidroxifenilacético (DHPA) en sus formas libres y conjugadas con glucurónico y sulfato en las muestras de plasma y orina obtenidas en los estudios de absorción. Las formas conjugadas se hidrolizaron enzimáticamente según las condiciones descritas por D'Angelo et al. (2001) y la determinación de las formas libres de HT y los metabolitos derivados se realizó por cromatografía de gases con detector de espectroscopia de masas (CG-EM) según el método descrito por Bai C et al. (1998).

##### **A) Preparación de la muestra y derivatización.**

La extracción de las formas libres de HT, HvOH, HvAc y DHPA de las diferentes muestras y patrones, así como de los compuestos liberados por hidrólisis enzimática, se realizó empleando acetato de etilo como disolvente extractor. Con objeto de corregir las diferencias producidas en el grado de extracción de las diferentes muestras, una cantidad fija de un estándar interno fue añadida tanto a muestras como patrones. Se seleccionó  $\alpha$ -Naftol como estándar interno por presentar un peso molecular y grado de extracción similar al de los compuestos estudiados.

Los volúmenes de muestras, así como las cantidades empleadas de estándar interno y disolvente extractor dependieron del tipo de muestra de partida y se indican en la tabla 4.3

**Tabla 4.3. Muestras y condiciones de extracción empleadas para el análisis de HT y sus metabolitos derivados por CG-EM.**

	Hidrólisis enzimática previa	Volumen muestra (mL)	Estándar interno ( $\mu\text{L}$ )	Volumen acetato de etilo (mL)
Plasma de rata	NO	0.9	2	3
Plasma humano	SI	2	2	3
Orina Humana	SI	5	2	3
Grupos del gradiente de lipoproteínas	NO	9	3	8

*Estándar interno: disolución etanólica de  $\alpha$ -Naftol de 1g/L.*

Para la cuantificación de las formas conjugadas, las muestras de plasma y orina humanas, así como sus respectivos patrones de calibración se incubaron antes de la extracción con 800 U/mL de  $\beta$ -glucuronidasa (Tipo L-II, Sigma) o con 100 U/mL de sulfatasa (Tipo H-I, Sigma) durante 20 minutos a 37°C.

La extracción se llevó a cabo en tubos de ensayo de vidrio donde se depositó el volumen adecuado de muestra o patrón, se añadió una cantidad exacta (Tabla 4.3.) de una disolución etanólica de  $\alpha$ -naftol (1g/L) con una jeringa Hamilton® y se agitó durante un minuto. A continuación se añadió el acetato de etilo (Tabla 4.3.), se agitó en vórtex durante un minuto y se centrifugó a 2200 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido (fase orgánica) se separó con una pipeta Pasteur a un tubo limpio y seco. La fase inferior acuosa se volvió a extraer empleando el mismo volumen de acetato de etilo, agitando un minuto y centrifugando a 2200 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se reunieron en el mismo tubo y se llevaron a sequedad en condiciones de vacío durante 1 hora y a 45°C usando un sistema de evaporación a vacío tipo SpeedVac®. El residuo seco fue resuspendido en 200  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo y transferido a un inserto, el cual volvió a ser evaporado usando el mismo sistema. El residuo contenido en el inserto fue silanizado con 30  $\mu\text{L}$  de una mezcla de N,O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA), piridina y acetato de etilo en proporción 2:1:2, respectivamente. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente previamente a su inyección en el cromatógrafo de gases.

## **B) Análisis cromatográfico.**

La determinación de HT y sus metabolitos se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases con inyector automático acoplado a un detector de espectroscopia de masas. El



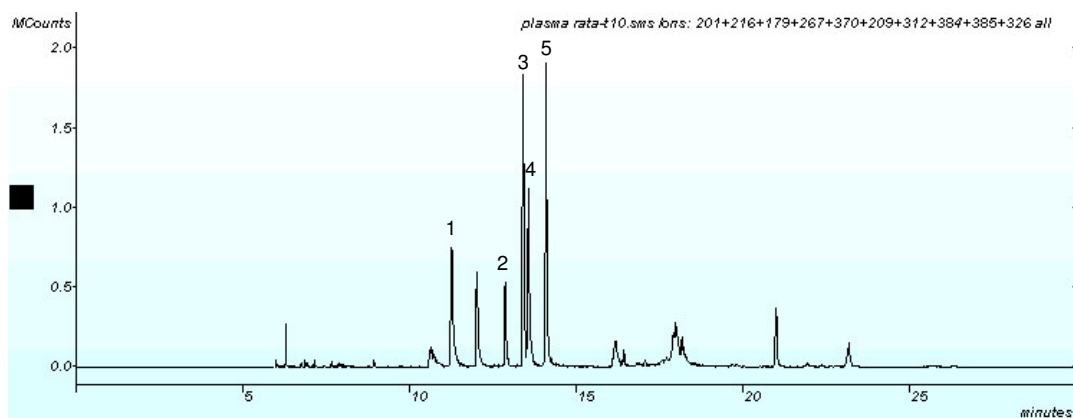
volumen de la mezcla silanizada inyectado en el cromatógrafo fue de 2  $\mu$ L. Las muestras fueron inyectadas en un inserto de vidrio silanizado de 2 mm de diámetro interno (ID) estableciendo una relación de split 10. La separación de los compuestos se realizó empleando una columna CP-Sil 8CB de 30 m x 0.25 mm ID y 0.25  $\mu$  de tamaño de partícula. La fase móvil empleada fue helio purísimo con un flujo de 1 mL/min. Las condiciones optimizadas para el análisis de los compuestos en las muestras problema fueron las siguientes:

- Cromatógrafo de gases (CG):
  - Inyector: 150 °C (30 min).
  - Horno:  $T_o = 45$  °C (2 min).  
 $T_1 = 150$  °C (20°C/min, 8.25 min).  
 $T_2 = 270$  °C (10°C/min, 9.75 min).  
Duración del cromatograma 30 min.
- Espectrómetro de Masas (MS):
  - Temperatura trampa: 200°C.
  - Temperatura “manifold”: 50°C.
  - Temperatura “transfer line”: 260°C.
  - intervalo de masas: Delay 4.50 min.  
Hasta 6 minutos → Cerrado.  
De 6 a 30 minutos → 45 a 400 m/z.

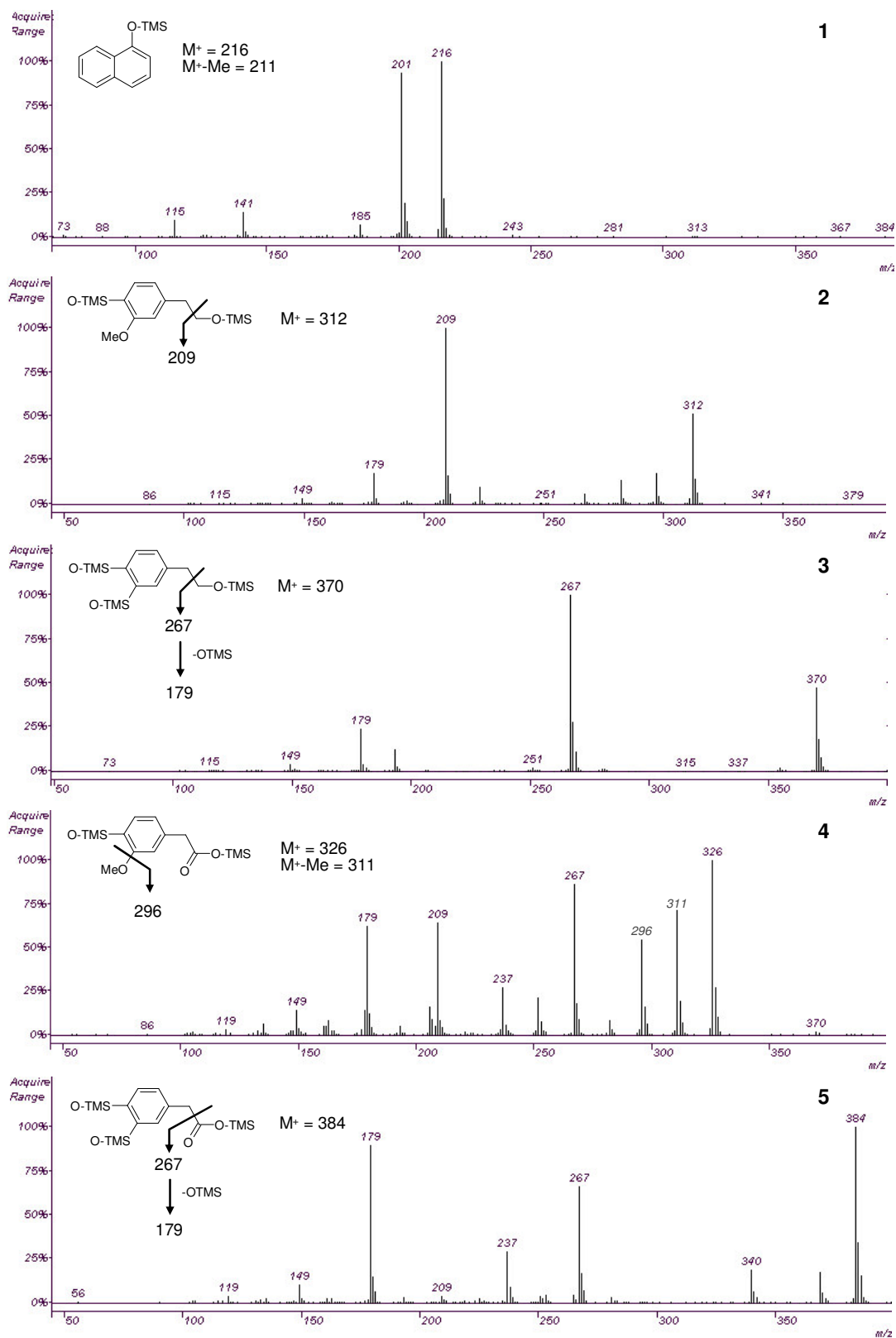
En el detector, los compuestos se ionizaron por impacto electrónico dando lugar a una serie de fragmentos característicos de cada especie molecular. La identificación de los distintos compuestos analizados se realizó en función de los tiempos de retención y los espectros de masas obtenidos a partir de disoluciones patrón de los compuestos puros (Cromatograma tipo y espectro de masas característicos de los compuestos en figuras 4.12 y 4.13). La cuantificación se realizó mediante integración de las áreas de los picos en modo de trabajo SIM (Selected ion monitoring). En este modo se establece una relación masa/carga característica de la fragmentación de cada compuesto por lo que solamente se integran los picos donde se detecten estos fragmentos, evitando los problemas de solapamiento con otros picos. En la tabla 4.4. se muestran los iones seleccionados en modo SIM así como los tiempos de retención de los distintos compuestos estudiados.

**Tabla 4.4. Tiempo de retención en minutos e iones selectivos (relación masa/carga) establecidos para la identificación e cuantificación de los picos de HT y sus metabolitos.**

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones (m/z)
$\alpha$ -Naftol	11.3	201+216
HT	13.5	179+267+370
HvOH	12.9	209+312
DHPA	14.1	384+385
HvAc	13.6	296+311+326



**Figura 4.12. Cromatogramas resultante del análisis de HT y sus metabolitos en plasma de rata por CG-EM. 1:  $\alpha$ -Naftol, 2: HvOH, 3: HT, 4: HvAc, 5: DHPA.**



**Figura 4.13. Estructura de los compuestos silanizados y espectro de masas característico de los compuestos puros. (1),  $\alpha$ -Naftol; (2), HvOH; (3), HT; (4), HvAc y (5), DHPA.**

**C) Preparación de las curvas de calibración y muestras control. Validación del método.**

Para la preparación de las curvas de calibración y los controles se emplearon como materiales de referencia los plasmas, grupos del gradiente de lipoproteínas y orinas basales, obtenidos de los mismos voluntarios después de dos días de consumo de una dieta sin aceite de oliva ni aceitunas y antes de la administración del HT (Tiempo 0). Estas muestras basales fueron previamente analizadas para asegurar la ausencia de estos compuestos. Los patrones fueron preparados añadiendo los volúmenes adecuados de soluciones de trabajo, consistentes en disoluciones etanólicas de los compuestos de referencia puros (HT, HvOH, HvAc, DHPA), preparadas a concentraciones de 10, 100 o 1000 mg/L. Las concentraciones finales de las curvas de calibración están indicadas en la tabla 4.5. Los patrones fueron procesados siguiendo el mismo procedimiento que las muestras analizadas.

**Tabla 4.5. Concentración de los patrones de HT y sus metabolitos derivados (HvOH, HvAc y DHPA) usados en los distintos tipos de muestra.**

Tipo de muestra	Compuesto	Concentraciones (µg/L)
Plasma rata	HT	0, 1, 5, 10, 50, 100
	HvOH	0, 10, 50, 100, 500, 1000
	HvAc y DHPA	0, 25, 125, 250, 1250, 2500
Plasma humano	Todos	0, 10, 25, 50, 100, 500, 1000
Orina humana	HT, HvOH, DHPA	0, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 1000, 5000, 10000
	HvAc	0, 10, 20, 50, 100, 400, 1000, 5000, 10000, 20000

Para cada uno de estos calibrados se calculó la linealidad, los límites de detención y cuantificación y la sensibilidad analítica del método mediante regresión simple utilizando el programa informático Statgraphics Plus 5.0 para Windows. Los resultados por CG-EM de los patrones adicionados al plasma de ratas, plasma humano, orina humana y grupos del gradiente de lipoproteínas indicaron que existía un efecto de la matriz que interfería en la cuantificación de HT y sus metabolitos en los diferentes tipos de muestras. Como consecuencia, la detección de los distintos compuestos así como las características del calibrado, tales como el límite de detención, la linealidad o la sensibilidad, dependieron tanto del tipo de muestra utilizado y como del procesado de las mismas:

- Plasma de rata: El método permitió la determinación simultánea de HT, HvOH, HvAc y DHPA en el plasma de ratas mediante una única inyección en el cromatógrafo.
- Plasma humano: No se detectaron los picos correspondientes al HvAc ni al DHPA en ninguno de los patrones, incluso a concentraciones elevadas (100 mg/L), lo que indicó

que el método de extracción empleado no permitió la recuperación de estos compuestos ácidos del plasma humano. Por lo tanto en este tipo de muestras solo fue posible el análisis del HT y HvOH. El tratamiento enzimático previo de los plasmas para la cuantificación de las formas conjugadas precisó de funciones de calibrado adicionales para ambos metabolitos.

- Orina humana: En orina humana fue posible la determinación simultánea de HT, HvOH, HvAc y DHPA mediante una única inyección en el CG-MS. Teniendo en cuenta la amplia variabilidad encontrada entre los voluntarios se realizaron rectas patrón que comprendieran un intervalo de concentraciones bajo y alto. Al igual que en el caso anterior, fueron necesarias funciones de calibración adicionales para la cuantificación de las formas conjugadas.

Por lo tanto se emplearon en total 22 rectas de calibrado diferentes para la cuantificación de estos compuestos en los distintos tipos de muestra. La tabla 4.6. indica las distintas rectas obtenidas y los principales parámetros de validación obtenidos a partir de las mismas.

El análisis de HT en los distintos grupos del gradiente de lipoproteínas necesitó un volumen de muestra muy elevado (9 mL) por lo que, en lugar de realizar curvas de calibración, se incluyeron muestras control de concentración conocida con el objeto de comprobar si existía diferencia en la recuperación de este compuesto entre los distintos grupos del gradiente de lipoproteínas. Estos controles se prepararon a partir de los grupos de fracciones obtenidos de un gradiente de plasma basal al que se añadió una cantidad final de 250 µg/L de HT en etanol. Como muestra la tabla 4.7., las relaciones de área (HT/α-naftol) fueron similares en todos los grupos del gradiente, no encontrando diferencia significativa en la cantidad detectada en cada grupo.

**Tabla 4.6. Funciones de calibración y parámetros de validación del HT y sus metabolitos derivados en los distintos tipos de muestras.**

Tipo muestra			Función de calibración			Parámetros de validación			
O	P	compuesto	a	b	r <sup>2</sup>	Lin	CC <sub>α</sub>	CC <sub>β</sub>	S
Plasma ratas	L	HT	0.0047	2.847	99.8	97.1	0.0034	0.0055	0.0024
	L	HvOH	-0.0103	1.679	99.8	97.7	0.0270	0.0443	0.0194
	L	HvAc	-0.0130	0.146	98.1	91.9	0.2383	0.3908	0.1717
	L	DHPA	-0.0078	0.086	98.7	93.3	0.1952	0.3202	0.1406
Plasma humano	L	HT	0.0006	0.117	99.2	96.4	0.0170	0.0279	0.0157
	L	HvOH	0.0001	0.169	98.9	95.7	0.0206	0.0337	0.0190
	G	HT	-0.0083	2.016	99.9	98.6	0.0078	0.0127	0.0060
	G	HvOH	-0.0159	0.419	99.8	97.5	0.0134	0.0220	0.0103
	S	HT	0.0006	1.815	100.0	99.5	0.0025	0.0041	0.0011
	S	HvOH	0.0021	0.386	99.9	98.5	0.0081	0.0133	0.0055
Orina humana	L	HT	0.2453	8.339	99.7	97.8	0.0921	0.1510	0.0988
	L	HvOH	0.2161	2.674	99.7	98.1	0.1677	0.2751	0.1873
	L	HvAc	-0.0420	0.630	99.1	96.2	0.7192	1.1795	0.7246
	L	DHPA	0.0637	0.486	99.7	97.6	0.1955	0.3205	0.2160
	G	HT	0.1113	6.380	99.6	97.7	0.1973	0.3236	0.2204
	G	HvOH	-0.0424	3.318	98.8	98.1	0.0183	0.0300	0.0165
	G	HvAc	0.8629	0.860	99.9	98.1	0.4471	0.7333	0.3335
	G	DHPA	0.0652	0.908	99.9	98.9	0.1019	0.1670	0.1038
	S	HT	-0.0289	9.414	99.6	97.3	0.0262	0.0430	0.0235
	S	HvOH	0.0023	3.216	99.9	98.2	0.0025	0.0040	0.0013
	S	HvAc	0.1364	0.316	99.6	97.3	0.4904	0.8043	0.5160
	S	DHPA	0.0212	0.260	99.5	97.3	0.2316	0.3799	0.2586

Tipo de muestras: O, origen; P, procesado; L, compuestos libres sin tratamiento enzimático; G, incubada con glucuronidasa; S, incubada con sulfatasa. Función de calibración: concentración (muestra) =  $a + b \cdot (\text{área compuesto} / \text{área naftol})$ ; a, ordenada en el origen; b, pendiente; r<sup>2</sup>, coeficiente r<sup>2</sup> o de determinación. Parámetros de validación: Lin, linealidad en el intervalo de concentraciones empleado (%); CC<sub>α</sub>, límite de decisión o límite de detección (mg/L); CC<sub>β</sub>, Capacidad de detección o límite de cuantificación (mg/L); S, sensibilidad analítica (L/mg).

**Tabla 4.7. Relación de áreas HT/ $\alpha$ -Naftol obtenidas en las muestras control de 0.25 mg/L del gradiente de lipoproteínas.**

<b>Grupo</b>	<b>Área (HT/ <math>\alpha</math>-naftol)</b>
<b>A</b>	1.30 $\pm$ 0.05
<b>B</b>	1.36 $\pm$ 0.26
<b>C</b>	1.51 $\pm$ 0.02
<b>D</b>	1.32 $\pm$ 1.01
<b>E</b>	1.41 $\pm$ 0.80
<b>F</b>	1.86 $\pm$ 1.19

*Resultados expresados como media  $\pm$  SEM*

#### **D) Expresión de los resultados**

La cuantificación de cada uno de los compuestos presentes en la muestra se calculó a partir de la razón entre el área del pico correspondiente a cada uno de los compuestos y el área del pico correspondiente al  $\alpha$ -Naftol. El valor resultante se interpoló en la función de calibración obtenida con los patrones de concentración conocida. La concentración de los compuestos conjugados con ácido glucurónico y sulfato se calculó por diferencia entre los valores de concentración obtenida en las muestras previamente hidrolizadas con las enzimas glucuronidasa y sulfatasa, respectivamente, y las concentraciones de los compuestos libres resultantes de las muestras que no fueron sometidas a la hidrólisis enzimática.

#### **4.6.12. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FARMACOCINÉTICAS**

Las constantes farmacocinéticas se determinaron a partir de la curva de concentración plasmática obtenida tras la ingesta de HT a los distintos tiempos estudiados. Para el cálculo de estas constantes se emplearon las funciones farmacocinéticas de Microsoft Excel (PK Functions for Microsoft Excel) suponiendo un modelo de distribución monocompartimental.

Para cada voluntario se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos:

- La concentración máxima alcanzada en plasma ( $C_{max}$ )
- El tiempo en el cual se alcanzó la máxima concentración plasmática ( $T_{max}$ ).

- La constante de eliminación ( $K_e$ ) que se define como la velocidad a la que se elimina el compuesto y que viene dada por la pendiente de la zona de descenso de la curva de concentración plasmática que se calculó por regresión lineal.
- Tiempo de vida media plasmática ( $t_{1/2}$ ): tiempo necesario para que la concentración del compuesto en el plasma se reduzca a la mitad y se calculó a partir de la constante de eliminación empleando la siguiente fórmula:
$$t_{1/2} = \ln(2) / K_e$$
- El área bajo la curva (AUC). Indica la cantidad del compuesto presente en el organismo. El área bajo la curva se calculó por el método de los trapecios a partir de la curva de concentración plasmática en función del tiempo.

#### 4.2.3.13. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA OXIDACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS LDL O “LAGTIME”

La resistencia a la oxidación de las lipoproteínas LDL se determinó empleando un método indirecto descrito por Esterbauer et al. (1989) basado en el tiempo que tarda una cantidad determinada de lipoproteínas LDL en alcanzar la fase exponencial de propagación cuando es oxidada con iones de cobre.

En una cubeta de cuarzo, se tomaron 50 mg de LDL purificada y se llevaron a un volumen final de 1 mL con PBS. La cubeta se introdujo en un espectrofotómetro y la absorbancia se ajustó a cero. A continuación se añadió sulfato de cobre a una concentración final de 10 mM. La formación de dienos conjugados se midió mediante monitorización continua de la absorbancia a 234 nm cada 10 minutos y durante 4 horas a 37°C.

Según este método, en la curva originada durante la oxidación de la LDL por cobre se distinguen tres fases (Figura 4.14): una fase de iniciación en el que los antioxidantes lipofílicos de la LDL protegen a los lípidos de la oxidación, una fase exponencial de propagación en donde los producen rápidamente hidroperóxidos lipídicos ocasionando un aumento en la absorbancia a 234 nm, y por último una fase de terminación en donde la pendiente de la curva desciende hasta que la absorbancia alcanza un valor máximo.

El tiempo de retardo o “lagtime” se calculó como el punto de intersección entre las dos líneas tangentes trazadas en la fase de iniciación y de propagación (figura 4.14). Este tiempo indica de forma indirecta el contenido en antioxidantes de la LDL y por tanto su resistencia a la oxidación.



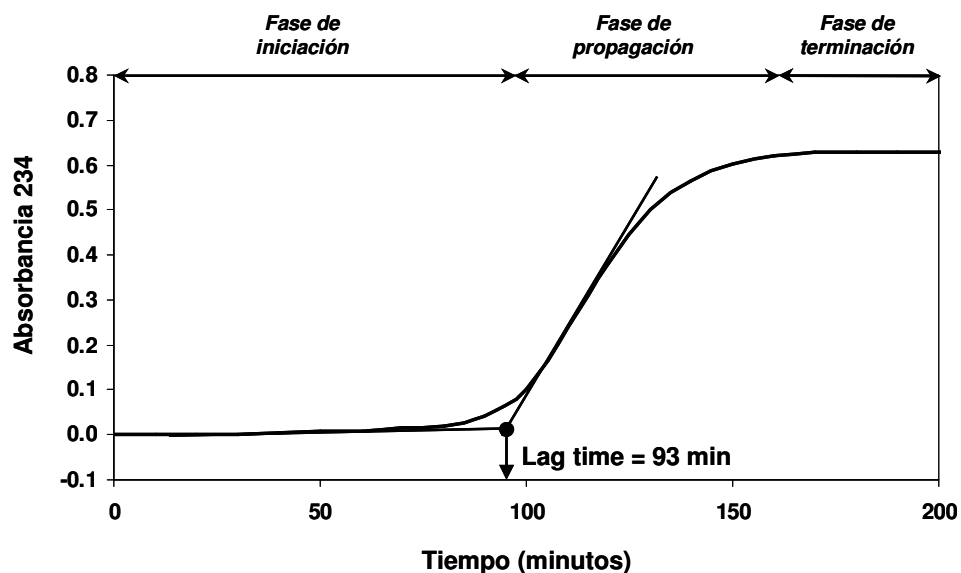


Figura 4.14. Determinación del “lagtime” de lipoproteínas.

#### 4.2.3.14. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas de la LDL purificada y de las fracciones del gradiente se realizó usando un kit comercial BCA™ Protein Assay Kit de Pierce (EEUU). Este método está basado en la reducción de los iones  $\text{Cu}^{++}$  a  $\text{Cu}^+$  por parte de los enlaces peptídicos de las proteínas en un medio alcalino. El  $\text{Cu}^+$  así producido se une a dos moléculas de ácido bicinónico originando un color púrpura que absorbe a 562 nm. En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra. (Smith et al. 1985)

El reactivo de trabajo se preparó en el momento mezclando una parte de una disolución de sulfato de cobre al 4% con 50 partes de otra disolución que contenía ácido bicinónico, carbonato sódico, bicarbonato sódico y tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1M. La determinación se realizó con 50  $\mu\text{L}$  de muestra a los que se les añadió 1 mL de reactivo de trabajo. La mezcla se incubó durante 30 minutos en un bloque calefactor a 37°C. La absorbancia resultante se leyó en el espectrofotómetro a 562 nm. Para la cuantificación de proteínas se utilizaron soluciones estándares de albúmina sérica bovina en agua cuyas concentraciones fueron 0, 0.1, 0.2, 0.4, 1 y 2 mg/mL. La concentración de proteínas de la muestra se determinó mediante interpolación de la absorbancia en la función de calibración obtenida con los patrones.

#### 4.2.3.15. DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS B Y A1

La determinación de las apolipoproteínas B y A1 se realizó mediante un método inmuno-turbidimétrico de punto final descrito por Tietz (1987) adaptado para ser usado con auto-analizadores de química-clínica (Olimpus, Irlanda). El método se basa en que las apolipoproteínas B o A1 presentes en la muestra reaccionan específicamente con los anticuerpos anti-ApoB o Anti-ApoA1 humanas respectivamente para producir complejos insolubles que se miden por turbidimetría. La absorbancia de estos complejos es proporcional a la concentración de estas apolipoproteínas en la muestra.

#### 4.2.3.16. ELECTROFORESIS DE LIPOPROTEÍNAS EN GEL DE AGAROSA

Se utilizó un kit de electroforesis de lipoproteínas (LIPO) Paragon<sup>®</sup> diseñado para la separación de lipoproteínas en el suero humano. Esta técnica usa la electroforesis en geles de agarosa tamponado para separar las lipoproteínas humanas en cuatro zonas o fracciones: Quilomicrones, lipoproteínas beta (correspondiente a las LDL), lipoproteínas pre-beta (correspondientes a las VLDL) y lipoproteínas alfa (correspondientes a las HDL).

Los grupos de fracciones obtenidas en el gradiente se depositaron en los pocillos de un gel de agarosa al 0.5 % en tampón barbital 1.0% y se dejaron reposar durante 5 minutos. El gel se colocó, en una cubeta de electroforesis conteniendo tampón Barbital (10 mM de ácido dietilbarbitúrico, 50 mM de sal sodica del ácido dietilbarbitúrico). La cubeta se conectó a una fuente de alimentación y el gel se sometió a una corriente eléctrica de 100V durante 30 minutos. Una vez finalizada la electroforesis las lipoproteínas del gel se inmovilizaron sumergiendo el gel en una solución fijadora compuesta por alcohol, agua y ácido acético glacial (60:30:10) durante 5 minutos. El gel se secó sobre papel y la distribución de lipoproteínas se visualizó tiñendo el gel con un colorante Sudan Black 0.07% (P/P), durante 5 minutos sucedido de 3 lavados en alcohol al 45%.

#### 4.2.3.17. OBTENCIÓN DE ARN

##### A) Extracción:

Para la extracción de ARN se empleó el método de extracción con TRIzol (Gibco BRL Life technologies, EEUU) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). El ARN se aisló a partir de 100 mg de tejido hepático que se homogeneizaron en 1 mL de TRIzol con ayuda de un homogeneizador eléctrico. Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos de

nucleoproteínas. A continuación se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, los tubos se agitaron a mano vigorosamente durante 15 segundos y se mantuvieron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. El ARN se recuperó con una pipeta a partir de la fase acuosa situada en la parte superior del tubo cuyo volumen fue de aproximadamente el 60% del volumen del TRIzol utilizado en la homogenización. Esta fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y el ARN se precipitó añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol y posterior incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró con cuidado y al precipitado de ARN se le añadió con 1 mL de etanol al 75%, se agitó y se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró de nuevo y el precipitado de ARN se secó durante unos 10 minutos. El ARN obtenido se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  agua libre de ARNasas incubando a 55°C durante 10 minutos.

### **B) Limpieza:**

La limpieza del ARN se llevó a cabo con el Kit Rneasy<sup>®</sup> Mini (Quiagen). Este método de limpieza se basa en la adsorción selectiva del ARN a una membrana de silicagel mediante la utilización de tampones salinos y etanol, que son eliminados por centrifugación. A 100  $\mu\text{L}$  de muestra de ARN se añadieron 350  $\mu\text{L}$  de tampón RTL (Qiagen, EEUU. fórmula privada), al que previamente se le habían añadido un 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol. La mezcla se agitó suavemente y se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de etanol al 96%, se mezcló suavemente con la pipeta y se traspasó todo a una columna Rneasy que se centrifugó 15 segundos a 8000 g. El filtrado se desechó, se añadieron sobre la columna 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE (Qiagen, EEUU. fórmula privada) y se centrifugó a 8000 g durante 15 segundos. Se desechó de nuevo el filtrado, se añadieron otros 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos. Se desechó otra vez el filtrado y se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto para secar completamente la columna. La columna se colocó sobre un tubo nuevo de 1.5 mL libre de ARNasas, se añadieron cuidadosamente 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas sobre la membrana, se incubó durante un minuto y se centrifugó a 8000 g durante 1 minuto recuperándose el ARN en el filtrado.

### **C) Cuantificación:**

El ARN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando la convención de que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40  $\mu\text{g}$  de ARN por mL:

$$\text{Concentración de ARN en la muestra} = 40 \times A_{260} \times \text{Factor de dilución}$$

La relación de absorbancias 260/280 fue siempre cercana a 2.0 lo que indicó que el ARN obtenido tenía la pureza adecuada para la realización del estudio genómico.

**D) Electroforesis en gel de agarosa:**

Para comprobar la correcta extracción y la integridad del ARN obtenido en la purificación a partir de los hígados de ratón se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

Se preparó un gel de agarosa al 2% en TAE (40 mM de tris-acetato, 1mM EDTA) y se introdujo en una cubeta de electroforesis conteniendo tampón TAE hasta cubrir completamente el gel. En cada pocillo se cargaron 5 µl de muestra (mínimo 1 µg de ARN) previamente mezcladas en proporción 1:5 con tampón de carga (Blue/orange Loading Dye 6x de Promega, EEUU) y se conectó a una fuente de alimentación a 80V durante aproximadamente 30 minutos. A continuación el gel se introdujo en una solución acuosa de bromuro de etidio durante 15 minutos y se observó bajo luz ultravioleta utilizando un analizador de imágenes.

**4.2.3.18. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN GENICA DE LOS ARN DE RATON CON SISTEMA MICROARRAY**

Se estudiaron los efectos del HT en la expresión génica de ratones empleando un sistema microarray y microchips "Genechip Murine Genome U74Av2 Array" de Affymetrix. Este sistema permite el análisis simultaneo de la expresión de 12422 genes. Las distintas fases del procedimiento vienen reflejadas en el esquema de la figura 4.15.

**A) Obtención de ARN marcado con biotina**

En primer lugar, a partir de 10 µg de ARN total de cada una de las muestras se sintetizó la primera cadena de ADN utilizando un kit enzimático de retrotranscriptasa y oligonucleotido T7-oligo dT, de Invitrogen Life Technologies (EEUU). A partir de esta se sintetizó la segunda hebra de ADN con una ADN polimerasa y una ADN ligasa. El ADN obtenido se purificó utilizando un kit específico de Genechip (Sample cleanup Module, de Affymetrix, EEUU). A continuación, utilizando como molde esta cadena de ADN, se sintetizó de nuevo ARN mensajero empleando una ARN polimerasa y un ribonucleótido marcado con biotina de manera que el ARN resultante quedará marcado con la misma. El ARN mensajero obtenido se purificó y se cuantificó según se ha descrito en el apartado 4.2.3.17. Finalmente 15 mg de cada preparación se fragmentaron mediante calentamiento a 94°C quedando listo para su hibridación del Genechip Murine Genome U74Av2 Array de Affymetrix.

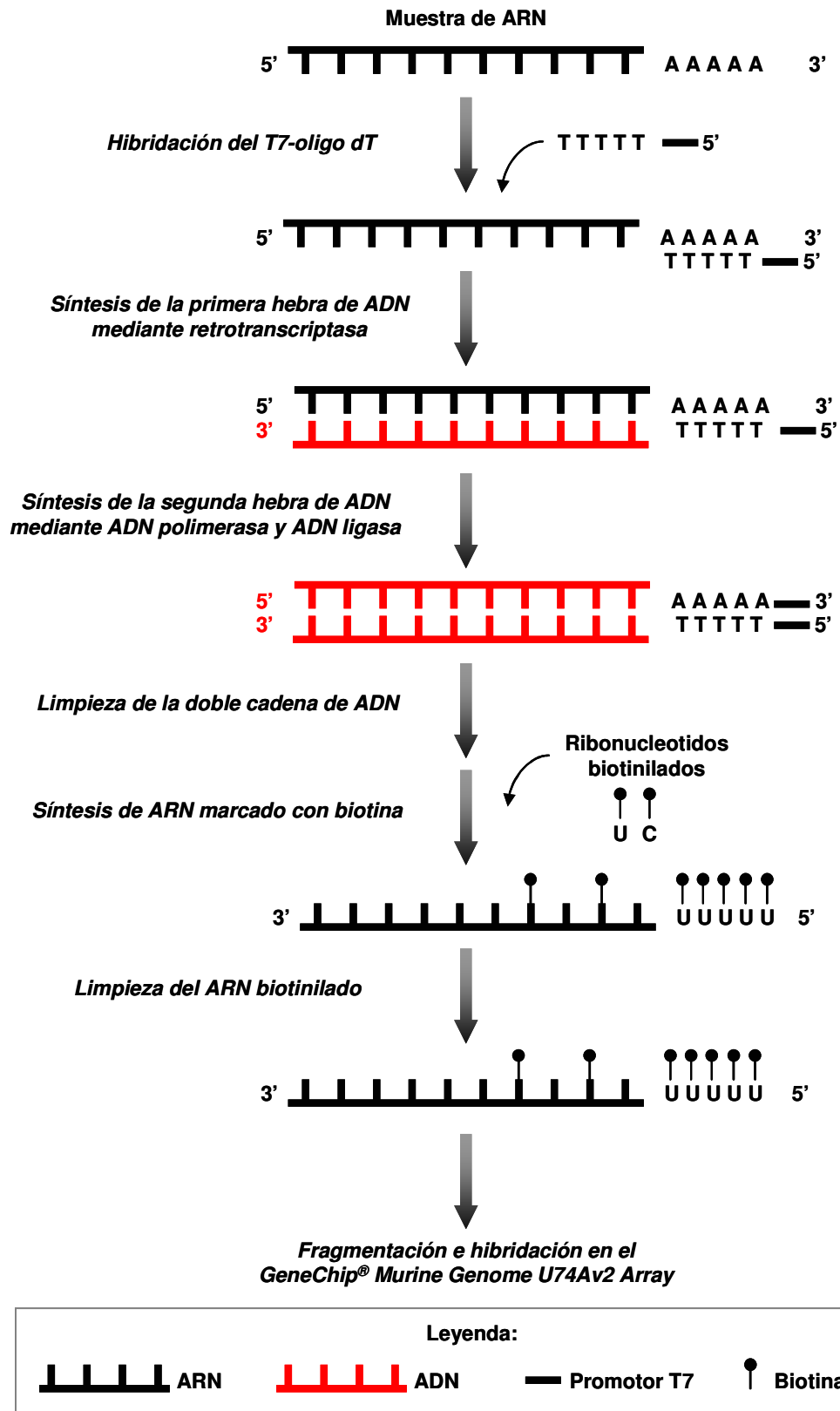


Figura 4.15. Esquema general del procesamiento de muestras de ARN para su hibridación con el GeneChip® de Affymetrix

## B) Hibridación con el test de prueba

Previo al análisis en el Murine Genome U74Av2 Array se comprobó la calidad de las mezclas de hibridación preparadas mediante su hibridación con un array de prueba (Test3 Array). La calidad de las mezclas de hibridación se evaluó usando los datos de lectura obtenidos a partir de genes constitutivos (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y beta-actina) y de sondas control adicionadas a las muestras previamente ("Spike controls"). Los resultados de los Test3 Array para las muestras analizadas en este estudio indicaron que las mezclas de hibridación proporcionaban la sensibilidad requerida y que la calidad de los ARNs era la óptima para el abordaje del experimento de análisis de la expresión.

## C) Hibridación del ARN marcado con biotina con los microchips y lectura de los datos obtenidos.

La hibridación se llevó a cabo incubando los ARN marcados con biotina obtenidos en las etapas anteriores con los fragmentos de oligonucleótidos complementarios incluidos sobre el soporte sólido del microchip.

Se preparó la siguiente mezcla de hibridación conteniendo el ARN marcado con biotina de acuerdo con la siguiente tabla:

<i>Componente</i>	<i>Volumen</i>	<i>Concentración Final</i>
ARN marcado con biotina y fragmentado	15 µg	0.05 µg/µl
Control Oligonucleotido B2(3 nM)	5 µl	50 pM
20X controles de hibridación de eucariotas (bioB,bioC,bioD,cre)	15 µl	1.5,5,25 and 100 pM
Herring Sperm ADN (10 mg/ml)	3 µl	0.1 mg/ml
Albumina serica bovina acetilada (50 mg/ml)	3 µl	0.5 mg/ml
2X tampón de hibridación	150 µl	1X
Agua	Csp. 300 µl	
Volumen final	<b>300 µl</b>	

La mezcla se calentó a 99°C durante 5 minutos e inmediatamente después se llevó a cabo la hibridación con el microchip en un horno de hibridación ajustado a 60 rpm. durante 16 horas a 45°C. Una vez transcurrida la hibridación el chip se colocó en la estación fluidica, previamente preparada según los protocolos del fabricante, donde se llevó a cabo la limpieza del chip y una tinción con soluciones de estreptavidina y ficoeritrina. La fluorescencia emitida

por el ARN de las muestras unidos a la sonda de los microchips se determinaron usando un escáner de array.

El software utilizado para el procesamiento de los chips y de los resultados fue el Microarray Suite versión 5.0 (Affymetrix®, EEUU)

El procesado de las muestras de ARN y su posterior análisis con el GeneChip de Affymetrix fue llevado a cabo en MedPlant Genetics (Bilbao).

#### 4.2.3.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los resultados se han expresado como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Todos los datos obtenidos en esta Memoria Doctoral, a excepción de los resultados de expresión génica, fueron analizados usando el programa SPSS (versión 10.1, Chicago, EEUU).

a) Para el análisis estadístico de los datos del estudio con modelo animal de aterosclerosis se comprobó si los valores seguían o no una distribución normal mediante el test Kolmoronow-Smirnoff. La mayoría de los datos no mostraron una distribución normal por lo que usaron test no paramétricos para el análisis de los mismos:

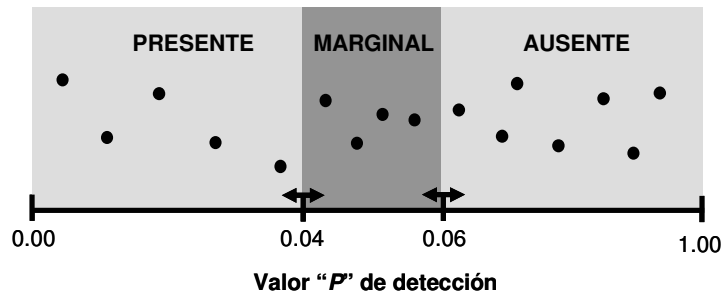
- Se compararon los grupos A, C y H entre si mediante la prueba de Krustal-Wallis seguido del test de U de Mann-Whitney.
- Se compararon los grupos CC, AA, AC, AV y AH entre si mediante la prueba de Krustal-Wallis seguido del test de U de Mann-Whitney.

En todos los casos el nivel de significación estadística se estableció en  $P < 0.05$

b) El análisis estadístico de los datos obtenidos en los estudios de absorción del HT en animales y humanos y los datos del estudio de afinidad del HT por las lipoproteínas plasmáticas humanas, se realizó mediante un ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni. En todos los casos el nivel de significación estadística se estableció en  $P < 0.05$

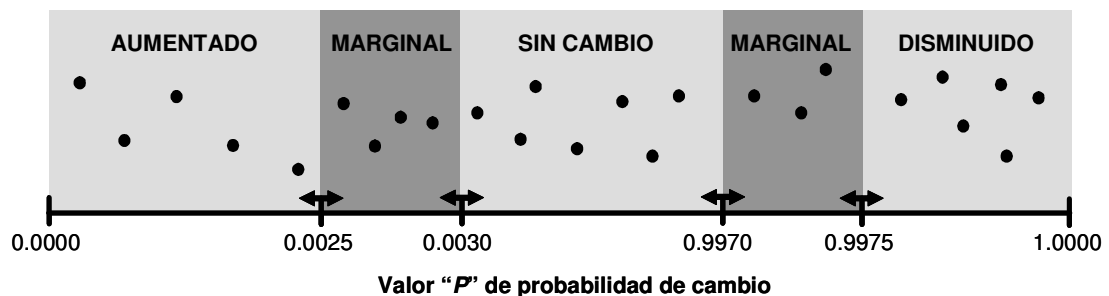
d) El análisis de los cambios en la expresión génica producidos por el HT fueron analizados con el software Microarray Suite versión 5.0 (Affymetrix®, EEUU) mediante una serie de algoritmos estadísticos:

- Análisis simple de los array: Indica el perfil de expresión génica de las muestras analizadas y clasifica los genes expresados en presentes, marginales o ausentes en función de la señal obtenida y según el valor de significación estadística obtenido del test de Wilconxon (Figura 4.16.)



**Figura 4.16.** Valores de significación para la detección en el análisis simple de los array.

- Análisis comparativo de los array: Indica los cambios en la expresión génica entre las muestras experimentales (1 mg o 10 mg) y la muestra control, que se considera expresión basal. El análisis genera un valor cuantitativo para cada cambio en el nivel de expresión en la muestra A respecto a la muestra B y cada cambio en la expresión del transcrito es clasificado cualitativamente como: aumentado, poco aumentado, sin cambio, poco disminuido o disminuido en función de un valor de probabilidad de cambio dado por el test de Wilcoxon.



**Figura 4.17.** Valores de significación para la probabilidad de cambio de los array.

### 4.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los animales de experimentación empleados en los diferentes estudios fueron supervisados por personal veterinario especialista. La experimentación y las condiciones de la misma se llevaron a cabo de acuerdo con RD 223/1988 de 14 de Marzo, sobre "protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos".

Los estudios con voluntarios humanos contaron antes de ser realizados con un informe favorable del Comité Ético de Investigación Clínica de Puleva Biotech S.A. y en todo



momento se realizaron bajo condiciones de respeto a los derechos fundamentales de la persona y a los postulados éticos que afectan a la investigación biomédica con seres humanos, siguiéndose a estos efectos los contenidos en la declaración de Helsinki y sucesivas actualizaciones. Los voluntarios firmaron antes de su inclusión en el estudio un consentimiento informado, libremente expresado, en los términos del artículo 12 del Real Decreto 561/1993 de 16 de Abril.



# **5**

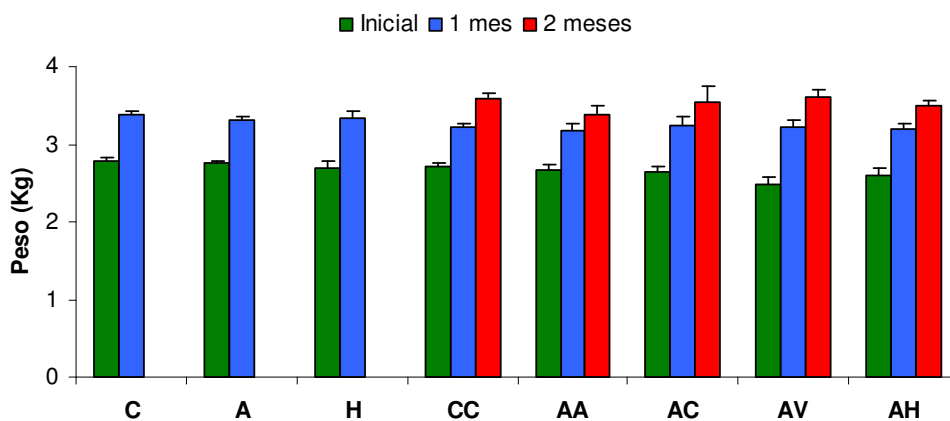
## *Resultados*



## 5.1. EFECTOS DEL HIDROXITIRO SOL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROSCLEROSIS INDUCIDA POR DIETA.

### 5.1.1 ADAPTACIÓN DE LOS ANIMALES A LA DIETA.

Todos los animales de experimentación finalizaron el estudio en los tiempos establecidos. La figura 5.1.1. muestra la evolución en el peso de los conejos de los distintos grupos experimentales. Al inicio del estudio, la media de peso de los animales de experimentación fue de  $2.673 \pm 0.025$  Kg. No se encontraron diferencias significativas en el peso inicial entre los distintos grupos. Una vez iniciado el estudio, los animales fueron incrementando su peso gradualmente y no se observaron variaciones significativas en la evolución del mismo. Transcurrido el primer mes del estudio, los animales incrementaron su peso hasta  $3.342 \pm 0.034$  Kg, mientras que aquellos que continuaron hasta el final del segundo mes (grupos CC, AA, AC, AV y AH) lo incrementaron hasta  $3.522 \pm 0.050$  Kg.



**Figura 5.1.1. Evolución del peso de los conejos de los distintos grupos experimentales.**

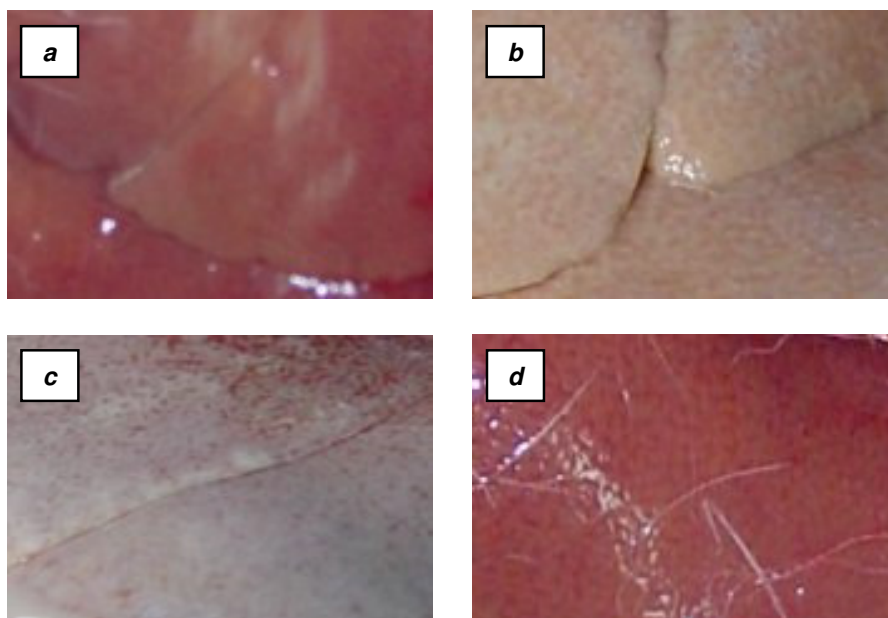
### 5.1.2. EXAMEN MACROSCÓPICO.

Los plasmas de los conejos con aterosclerosis inducida por la dieta (grupos A, H, AA, AC, AV y AH) presentaban un color lechoso y una gran turbidez debido a la elevada concentración de lípidos, muy diferente de los plasmas de los conejos de los grupos control (grupos C y CC) con un color anaranjado y transparente característico (Figura 5.1.2).



**Figura 5.1.2. Plasma representativo de los conejos ateroscleróticos (izquierda) y control (derecha).**

El examen interno de los animales sacrificados mostró una gran acumulación de lípidos en los órganos de aquellos animales alimentados con la dieta rica en colesterol y grasa saturada. Los hígados mostraron un color blanquecino y en algún caso aislado un color amarillo indicativo de una posible lesión hepática. Cabe destacar de este examen macroscópico, que los animales del grupo AH, a los que se administró hidroxitirosol durante el segundo mes de estudio, mostraron un hígado de aspecto similar al de los conejos controles (figura 5.1.3., representativa de los hígados de los distintos grupos animales).



**Figura 5.1.3. Aspecto macroscópico de los hígados de los conejos alimentados con las distintas dietas.** a) grupo CC; b) grupo AA; c) grupo AC y d) grupo AH.

### 5.1.3. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL PLASMA.

Las tablas 5.1.1. y 5.1.2. muestran los porcentajes de ácidos grasos mayoritarios del plasma transcurridos un mes (grupos C, A, H) o dos meses (grupos CC, AA, AC, AV y AH) de consumo de las distintas dietas del presente estudio.

Al final del primer mes de estudio, la composición en ácidos grasos del plasma se modificó en función de las diferentes dietas administradas a los conejos. Los animales del grupo C, alimentados con una dieta rica en aceite de girasol, presentaron el mayor porcentaje de ácido linoleico (C18:2n6) y AGPI, sin embargo también este grupo fue el que mostró el mayor porcentaje de AGS a pesar de que el contenido de estos ácidos grasos en la dieta era reducido (15.2%). Por otra parte los conejos del grupo A, alimentados con la dieta enriquecida en colesterol y manteca de cerdo (conteniendo un 38.3% de grasa saturada), mostraron un mayor porcentaje de ácido oleico (C18:1n9) y AGMI. La composición en ácidos grasos del plasma de los grupos A y H fue muy similar lo que indicó que la administración de HT junto a la dieta A no produjo ningún cambio significativo en el perfil de ácidos grasos en plasma.

**Tabla 5.1.1. Composición de ácidos grasos en plasma de conejos (expresados como porcentaje del total) transcurridos un mes de consumo de las distintas dietas experimentales.**

	GRUPO / DIETA		
	C	A	H
C16:0	24.12 ± 0.57	25.29 ± 0.45	24.37 ± 0.48
C16:1	1.84 ± 0.22 <sup>a</sup>	4.45 ± 0.57 <sup>b</sup>	3.41 ± 0.35 <sup>b</sup>
C18:0	9.38 ± 0.40	8.92 ± 0.39	9.15 ± 0.19
C18:1n9	20.75 ± 1.19 <sup>a</sup>	29.75 ± 1.25 <sup>b</sup>	30.51 ± 0.69 <sup>b</sup>
C18:2n6	31.30 ± 0.77 <sup>a</sup>	21.02 ± 1.01 <sup>b</sup>	22.26 ± 0.77 <sup>b</sup>
C18:3n3	1.82 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.62 ± 0.12 <sup>b</sup>	2.68 ± 0.13 <sup>b</sup>
<b>AGS</b>	41.00 ± 0.76 <sup>a</sup>	37.12 ± 0.71 <sup>b</sup>	36.88 ± 0.50 <sup>b</sup>
<b>AGMI</b>	22.81 ± 1.40 <sup>a</sup>	36.22 ± 1.84 <sup>b</sup>	35.83 ± 0.99 <sup>b</sup>
<b>AGPI</b>	36.19 ± 1.02 <sup>a</sup>	26.65 ± 1.28 <sup>b</sup>	27.27 ± 0.87 <sup>b</sup>
<b>n6/n3</b>	15.57 ± 0.51 <sup>a</sup>	7.72 ± 0.49 <sup>b</sup>	8.21 ± 0.42 <sup>b</sup>

Grupos experimentales C, A y H alimentados durante un mes con las dietas C, A y A con 4 mg/Kg de HT administrado por vía oral, respectivamente. AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. Los resultados se expresan como media ± EEM. Valores con distinto superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

En la segunda parte del estudio, los conejos de los grupos CC y AC, alimentados con la dieta de aceite de girasol durante el segundo mes, presentaron el mayor porcentaje de ácido linoleico (C18:2n6) y AGPI. Los animales del grupo AC mostraron un mayor porcentaje de ácido palmitoleico (C16:1;  $P=0.009$ ), ácido oleico (C18:1;  $P=0.003$ ) y AGMI ( $P=0.002$ ) a expensas de un menor porcentaje de AGS ( $P=0.001$ ), en comparación con los conejos que no fueron alimentados con la dieta aterogénica (AC vs. CC). Los conejos del grupo AV, alimentados con la dieta de aceite de oliva virgen, fueron los que presentaron el mayor porcentaje de ácido oleico (C18:1n9) y AGMI. La administración de HT a los conejos ateroescleróticos junto con la dieta C (grupo AH) produjo cambios modestos, aunque significativos, en el perfil de ácidos grasos del plasma (grupo AH vs. AC). Así, en el grupo AH se encontró un mayor porcentaje plasmático de ácido palmitoleico (C16:1;  $P=0.037$ ) y menores porcentajes de ácido esteárico (C18:0), ácido linoleico (C18:2n6) (ambos  $P=0.049$ ), y AGPI ( $P=0.037$ ). También se observó una tendencia al aumento en el porcentaje



de ácido oleico ( $P=0.064$ ) y AGMI ( $P=0.065$ ). Los conejos alimentados durante uno o dos meses con la dieta C (grupos C y CC) mostraron perfiles similares de ácidos grasos en plasma, al igual que lo hicieron los grupos A y AA alimentados respectivamente durante 1 ó 2 meses con la dieta aterogénica.

**Tabla 5.1.2. Composición de ácidos grasos en plasma de conejos (expresados como porcentaje de la grasa total) transcurridos dos meses de consumo de las distintas dietas experimentales.**

	GRUPO				
	CC	AA	AC	AV	AH
C16:0	23.52 ± 0.63 <sup>ab</sup>	24.14 ± 0.52 <sup>a</sup>	22.66 ± 0.80 <sup>abc</sup>	22.12 ± 0.63 <sup>bd</sup>	21.04 ± 0.62 <sup>cd</sup>
C16:1	1.54 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.06 ± 0.41 <sup>bc</sup>	3.50 ± 0.72 <sup>b</sup>	3.78 ± 0.28 <sup>b</sup>	4.94 ± 0.38 <sup>c</sup>
C18:0	10.52 ± 0.59 <sup>a</sup>	8.16 ± 0.17 <sup>b</sup>	7.10 ± 0.36 <sup>c</sup>	7.90 ± 0.42 <sup>bc</sup>	6.41 ± 0.31 <sup>d</sup>
C18:1n9	18.61 ± 1.17 <sup>a</sup>	32.81 ± 0.79 <sup>b</sup>	29.02 ± 1.27 <sup>c</sup>	37.97 ± 1.42 <sup>d</sup>	31.75 ± 0.88 <sup>bc</sup>
C18:2n6	30.39 ± 1.04 <sup>a</sup>	21.73 ± 0.50 <sup>b</sup>	29.03 ± 0.83 <sup>a</sup>	18.35 ± 0.89 <sup>c</sup>	26.61 ± 0.49 <sup>d</sup>
C18:3n3	1.60 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.59 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.82 ± 0.10 <sup>ac</sup>	1.67 ± 0.09 <sup>ac</sup>	1.94 ± 0.13 <sup>c</sup>
<b>AGS</b>	44.17 ± 1.10 <sup>a</sup>	35.04 ± 0.61 <sup>b</sup>	32.97 ± 1.19 <sup>bc</sup>	34.60 ± 1.07 <sup>b</sup>	30.64 ± 1.02 <sup>c</sup>
<b>AGMI</b>	20.25 ± 1.36 <sup>a</sup>	38.43 ± 0.96 <sup>b</sup>	33.18 ± 1.88 <sup>c</sup>	43.41 ± 1.62 <sup>d</sup>	37.86 ± 1.17 <sup>bc</sup>
<b>AGPI</b>	35.57 ± 1.06 <sup>a</sup>	26.52 ± 0.51 <sup>b</sup>	33.85 ± 0.96 <sup>a</sup>	21.99 ± 0.87 <sup>c</sup>	31.50 ± 0.49 <sup>d</sup>
<b>n6/n3</b>	15.28 ± 0.80 <sup>a</sup>	8.38 ± 0.77 <sup>b</sup>	14.55 ± 0.71 <sup>ac</sup>	8.54 ± 0.58 <sup>b</sup>	12.39 ± 0.68 <sup>c</sup>

Grupo CC alimentado durante dos meses con dieta C; Grupos AA, AC, AV y AH alimentados durante el primer mes con la dieta A y durante el segundo mes con la dieta A, C, V y C+HT administrado por vía oral, respectivamente. Los resultados se expresan como media ± EEM. Valores con distinto superíndice son significativamente diferentes ( $P<0.05$ ).

#### 5.1.4. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DEL PLASMA.

Las tablas 5.1.3. y 5.1.4. muestran las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol HDL (C-HDL) y el ratio CT/C-HDL de los conejos de los distintos grupos experimentales transcurridos uno o dos meses de ingesta de las dietas experimentales, respectivamente.

La administración de la dieta A durante un mes produjo una gran elevación de los lípidos plasmáticos: El CT del plasma de los conejos del grupo A se incrementó 25 veces y los valores de TG aumentaron 7 veces respecto a los del grupo control ( $P=0.001$ , A vs. C). No se encontraron cambios significativos en la concentración de C-HDL del plasma entre los grupos del estudio transcurrido el primer mes. Sin embargo, el ratio CT/C-HDL fue 30 veces superior en el grupo ateroesclerótico con respecto al control ( $P=0.001$ , C vs. A). La administración de 4 mg/Kg de HT junto con la dieta A durante un mes no produjo cambios significativos en la composición lipídica del plasma respecto al grupo A.

**Tabla 5.1.3. Composición lipídica del plasma de los conejos transcurrido un mes de consumo de las distintas dietas experimentales.**

	GRUPO / DIETA		
	C	A	H
TG (mg/dL)	54 ± 6 <sup>a</sup>	394 ± 44 <sup>b</sup>	456 ± 33 <sup>b</sup>
CT (mg/dL)	80 ± 9 <sup>a</sup>	2046 ± 330 <sup>b</sup>	2229 ± 103 <sup>b</sup>
C-HDL (mg/dL)	23 ± 1 <sup>a</sup>	20 ± 2 <sup>b</sup>	21 ± 3 <sup>b</sup>
CT/C-HDL	3.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	104.3 ± 18.3 <sup>b</sup>	125.0 ± 16.6 <sup>b</sup>

Los grupos C, A y H consumieron durante un mes las dietas C, A y A+HT, respectivamente. Los resultados se expresan como media ± EEM. Valores con distinto superíndice son significativamente diferentes ( $P<0.05$ )

En la segunda parte del estudio, aquellos animales que continuaron con la dieta aterogénica durante un mes adicional (grupo AA) presentaron las concentraciones plasmáticas más elevadas de CT y TG, así como de el ratio CT/C-HDL. La eliminación del colesterol y la sustitución parcial de la grasa saturada de la dieta por grasas insaturadas (grupos AC, AV y AH) produjo una reducción general de los lípidos del plasma respecto al grupo AA: la concentración de TG disminuyó un 57% ( $P=0.001$ ) en el grupo AC, un 63% ( $P=0.010$ ) en el grupo AV y un 78% ( $P=0.001$ ) en el grupo AH. Asimismo, la concentración de CT se redujo un 45% ( $P=0.001$ ) en el grupo AC, un 54% ( $P=0.003$ ) en el grupo AV y un 68% ( $P=0.001$ ) en el grupo AH. El grupo AH fue por lo tanto el que mostró la mayor reducción en las concentraciones plasmáticas de CT y TG. La administración diaria de HT junto con la dieta C durante un mes a los conejos ateroescleróticos (grupo AH), redujo la concentración de TG del plasma en un 48% con respecto al grupo AC ( $P=0.002$ ) alcanzando valores próximos al intervalo de normalidad medido en conejos sanos (Grupo CC). La administración de HT redujo la concentración de CT en un 42% ( $P=0.015$ ) y duplicó la concentración de C-HDL ( $P=0.001$ ) comparados con el grupo AC. Así mismo, el ratio CT/C-HDL fue el menor de todos los grupos ateroescleróticos.

**Tabla 5.1.4. Composición lipídica del plasma de conejos transcurridos dos meses de consumo de las distintas dietas experimentales.**

	GRUPO				
	CC	AA	AC	AV	AH
<b>TG (mg/dL)</b>	66 ± 10 <sup>a</sup>	278 ± 34 <sup>b</sup>	119 ± 8 <sup>c</sup>	102 ± 38 <sup>ac</sup>	61 ± 9 <sup>a</sup>
<b>CT (mg/dL)</b>	35 ± 4 <sup>a</sup>	2427 ± 243 <sup>b</sup>	1337 ± 132 <sup>c</sup>	1106 ± 265 <sup>cd</sup>	779 ± 90 <sup>d</sup>
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	13 ± 2 <sup>a</sup>	13 ± 1 <sup>a</sup>	14 ± 1 <sup>a</sup>	17 ± 2 <sup>a</sup>	33 ± 1 <sup>b</sup>
<b>CT/C-HDL</b>	2.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	204.9 ± 42.4 <sup>b</sup>	95.7 ± 9.7 <sup>c</sup>	72.2 ± 21.6 <sup>cd</sup>	23.4 ± 2.7 <sup>d</sup>

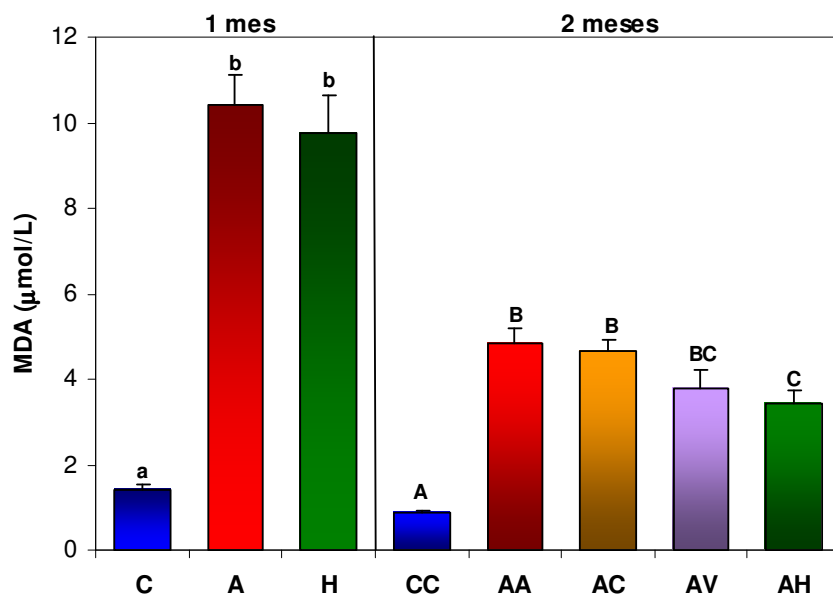
Grupo CC alimentado durante dos meses con la dieta C; grupos AA, AC, AV y AH alimentados durante el primer mes con la dieta A y durante el segundo mes con la dieta A, C, V y C+HT, respectivamente. Los resultados se expresan como media ± EEM. Valores con distinto superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

#### 5.1.5. CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDOS DEL PLASMA.

Los efectos producidos por las dietas experimentales en la oxidación del plasma se determinaron usando malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica y los resultados se muestran en la figura 5.1.4.

El consumo de la dieta aterogénica durante 1 mes incrementó la concentración plasmática de MDA hasta 7 veces respecto al grupo que consumía la dieta control ( $10.42 \pm 0.70 \mu\text{M}$ , grupo A vs.  $1.42 \pm 0.11 \mu\text{M}$ , grupo C;  $P=0.002$ ). La administración adicional de HT no produjo ningún cambio significativo en este parámetro cuando se comparó con los valores obtenidos en el grupo A ( $9.75 \pm 0.89 \mu\text{M}$ ).

Después del segundo mes de consumo de las dietas, la concentración de MDA del plasma de los conejos aterogénicos disminuyó en todos los grupos con respecto al grupo A, aunque fueron superiores a los encontrados en el grupo CC. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos AA, AC y AV. La administración diaria de HT redujo significativamente un 26% los valores plasmáticos de MDA respecto al grupo AC ( $4.65 \pm 0.26 \mu\text{M}$ , grupo AC vs.  $3.41 \pm 0.33 \mu\text{M}$ , grupo AH;  $P=0.021$ ).



**Figura 5.1.4. Concentración de MDA en el plasma de los conejos de los distintos grupos experimentales.** Grupos C, A y H alimentados durante un mes con las dietas C, A y A+HT, respectivamente. Grupo CC: dos meses de consumo de la dieta C. Grupos AA, AC, AV y AH: el primer con la dieta A y el segundo mes con las dietas A, C, V y C+HT, respectivamente. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. Letras distintas en la parte superior de las barras indican valores significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de experimentación a un mes (minúsculas) o dos meses (mayúsculas).

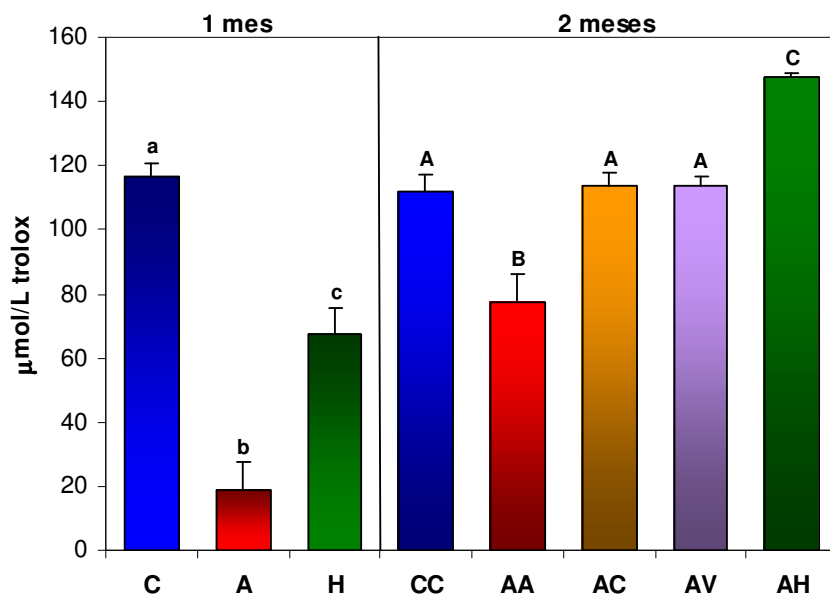
#### 5.1.6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA (CAO).

Los resultados de CAO obtenidos para los distintos grupos experimentales se muestran en la figura 5.1.5.

Los animales alimentados con la dieta aterogénica durante un mes mostraron una CAO del plasma muy inferior a la obtenida en el grupo control ( $116 \pm 4 \mu\text{M}$ , grupo C vs.  $19 \pm 9 \mu\text{M}$ , grupo A;  $P=0.003$ ). Sin embargo, cuando además de la dieta aterogénica se administró HT los valores de CAO alcanzados fueron significativamente mayores ( $67 \pm 8 \mu\text{M}$  grupo H vs  $19 \pm 9 \mu\text{M}$ , grupo A;  $P=0.016$ ) aunque sin llegar a alcanzar los valores obtenidos en los animales sanos.

Durante el segundo mes de estudio los animales que continuaron con la dieta A (grupo AA) presentaron una CAO superior con respecto al primer mes de consumo de esa misma dieta (grupo A) ( $77 \pm 9 \mu\text{M}$ , grupo AA vs.  $19 \pm 9 \mu\text{M}$ , grupo A;  $P=0.003$ ). Los conejos alimentados con las distintas dietas no aterogénicas presentaron valores similares a los obtenidos en

animales sanos:  $112 \pm 5 \mu\text{M}$  del grupo CC,  $114 \pm 4 \mu\text{M}$  del grupo AC y  $114 \pm 3$  del grupo AV. La administración diaria de HT durante este segundo periodo (grupo AH) produjo un incremento en la CAO que alcanzó valores de  $147 \pm 1 \mu\text{M}$  de Trolox, estadísticamente significativos respecto a los obtenidos en animales sanos ( $P=0.001$ , grupos AH vs. CC) y un 30% superiores a los encontrados en el grupo AC ( $P=0.001$ , grupos AH vs. AC).



**Figura 5.1.5. Capacidad antioxidante del plasma de los conejos de los distintos grupos experimentales.** Grupos C, A y H alimentados durante un mes con las dietas C, A y A+HT, respectivamente. Grupo CC: dos meses de consumo de la dieta C. Grupos AA, AC, AV y AH: consumo de dieta A durante el primer mes y de las dietas A, C, V y C+HT durante el segundo mes, respectivamente. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. Letras distintas en la parte superior de las barras indican valores significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de experimentación a un mes (minúsculas) o dos meses (mayúsculas).

### 5.1.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DE LA AORTA.

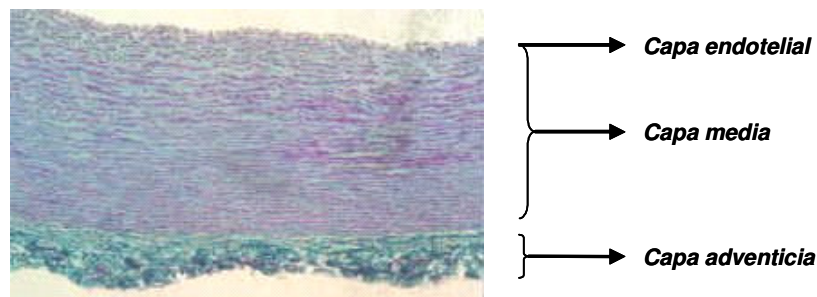
La administración de las diferentes dietas a los animales experimentales afectó de manera diferente a la morfología del cayado aórtico (Tabla 5.1.5).

**Tabla 5.1.5. Área total de la aorta y área de la capa íntima de los conejos de los distintos grupos experimentales:**

GRUPO / DIETA	1 MES				2 MESES			
	C	A	H	CC	AA	AC	AV	AH
Área total (mm <sup>2</sup> )	5.23 ± 0.57 <sup>a</sup>	7.54 ± 0.45 <sup>b</sup>	6.67 ± 0.36 <sup>b</sup>	7.3 ± 0.3 <sup>A</sup>	10.8 ± 0.9 <sup>B</sup>	14.3 ± 1.3 <sup>C</sup>	12.4 ± 0.8 <sup>BC</sup>	6.8 ± 0.4 <sup>A</sup>
Área íntima (mm <sup>2</sup> )	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>A</sup>	3.9 ± 0.8 <sup>BC</sup>	6.5 ± 0.9 <sup>B</sup>	4.5 ± 0.5 <sup>B</sup>	2.1 ± 0.2 <sup>C</sup>

Grupos C, A y H alimentados durante un mes con las dietas C, A y A+HT, respectivamente. Grupo CC: dos meses dieta C. Grupos AA, AC, AV y AH: primer mes con la dieta A y el segundo mes con las dietas A, C, V y C+HT, respectivamente. Los resultados se expresan como media ± EEM. Valores con distinto superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de experimentación a un mes (minúsculas) o dos meses (mayúsculas).

El análisis histológico de las aortas de los grupos C y CC (figura 5.1.6., tinción de Masson) mostró la estructura típica de una arteria sana, caracterizada por tener una capa íntima imperceptible quedando el endotelio en contacto con la capa media, compuesta por fibras musculares que aparecen de color violáceo-rojo, y una capa adventicia formada principalmente por tejido conectivo que aparece de color verde.

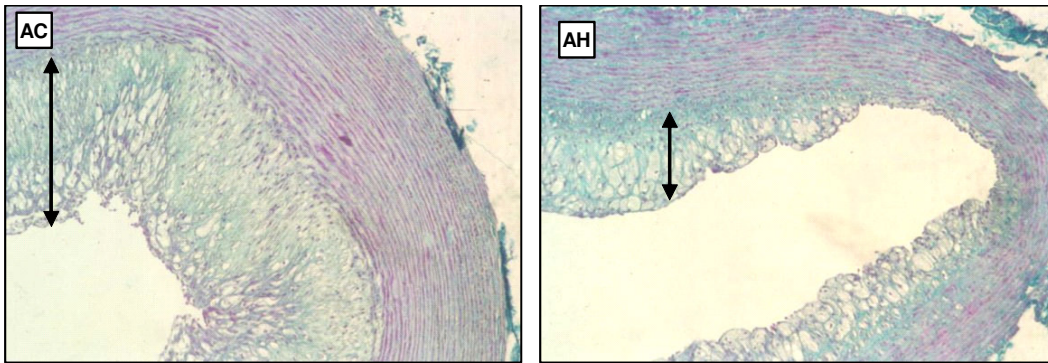


**Figura 5.1.6. Micrografía (20x) típica de sección de cayado aórtico de grupos control.**  
Tinción de Masson.

Después de un mes de consumo de dieta aterogénica, la capa íntima de la aorta apareció ligeramente engrosada y discontinua (figura 5.1.8., A). El grupo alimentado con la dieta A al que también se administró HT (Grupo H) presentó un engrosamiento menor de la capa íntima, que también apareció discontinua por lo que la mayor parte del endotelio quedaba en contacto con la capa media (figura 5.1.8., H). El análisis morfométrico (Tabla 5.1.5) mostró una diferencia significativa en el área de la capa íntima de las arterias de los conejos del grupo H con respecto al grupo A ( $P=0.043$ ).

Los animales alimentados durante dos meses con la dieta A (grupo AA) presentaron una estructura de arteria caracterizada por presentar una capa íntima muy engrosada y uniforme con abundantes vacuolas y donde se observó además la presencia de fibrillas elásticas en las zonas próximas a la luz arterial (Figura 5.1.8., AA. Señaladas con flechas) indicativo de un estado más avanzado de la lesión (placa fibrosa). Los animales ateroscleróticos alimentados durante el segundo mes con las dietas no aterogénicas (grupos AC y AV) mostraron igualmente un engrosamiento de la capa íntima que en algunos casos fue uniforme y en otros discontinuo. En todas las preparaciones microscópicas, la capa íntima, formada principalmente por colágeno, presentaba zonas con células claras, probablemente ricas en lípidos. Al igual que en el grupo AA, en las preparaciones teñidas con orceína de las aortas del grupo AC se pudieron observar pequeños haces de fibras elásticas con una disposición similar a la capa media en el borde de la íntima, próximo a la luz arterial, lo que indicó un mayor avance de la lesión aterosclerótica (figura 5.1.8, AC: señaladas con flechas).

Las secciones de cayado aórtico de los conejos a los que se administró HT (grupo AH) se caracterizaron por presentar una capa íntima discontinua, con unas regiones muy engrosadas y otras zonas con una capa íntima muy reducida quedando el endotelio en contacto directo con la capa media. En ninguna de las arterias del grupo AH se observaron fibras elásticas en las zonas próximas a la luz arterial lo que indicó que se produjo un menor grado de lesión en este grupo con respecto al AC. El análisis morfométrico (Tabla 5.1.5.) reveló que el área total de la aorta, así como del área de la capa íntima fueron significativamente menores en el grupo AH comparado con grupo AC (ambos  $P=0.000$ , AC vs. AH) (Figura 5.1.7).

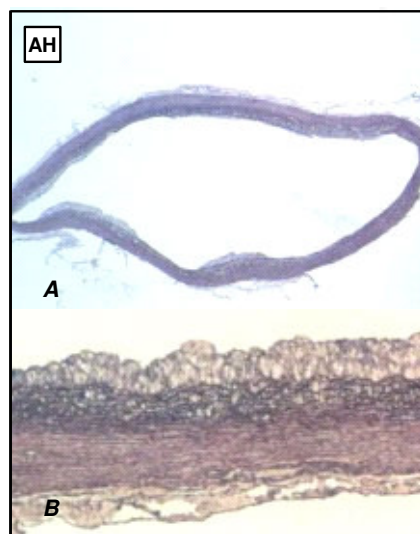
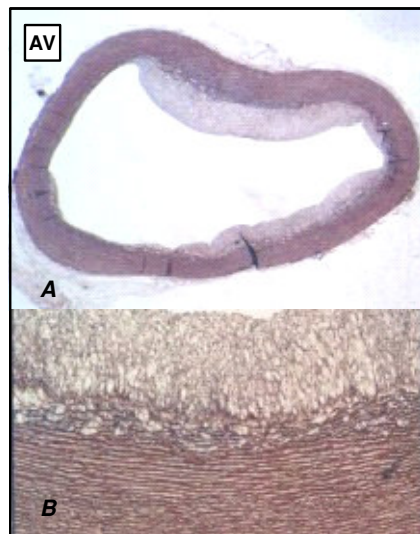
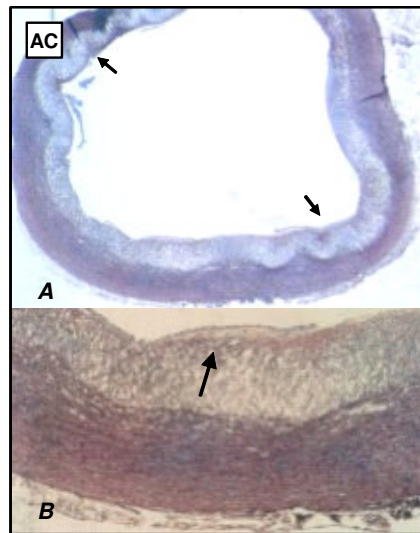
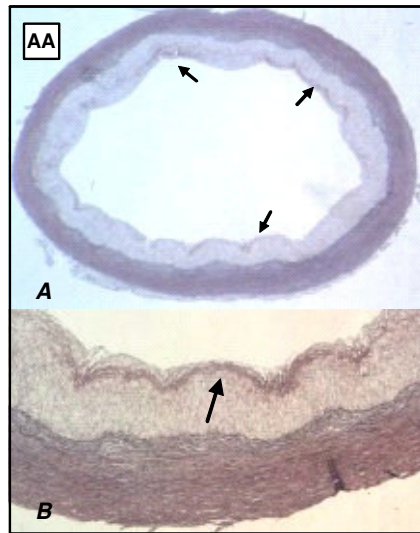
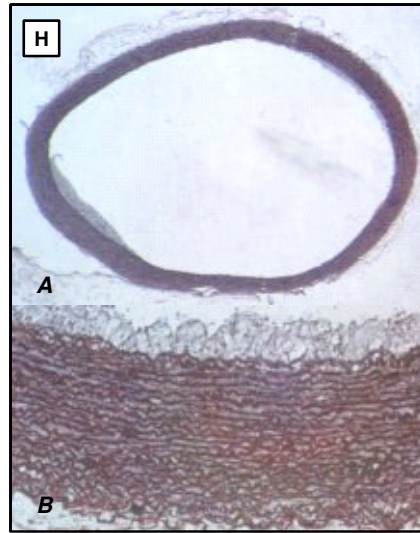
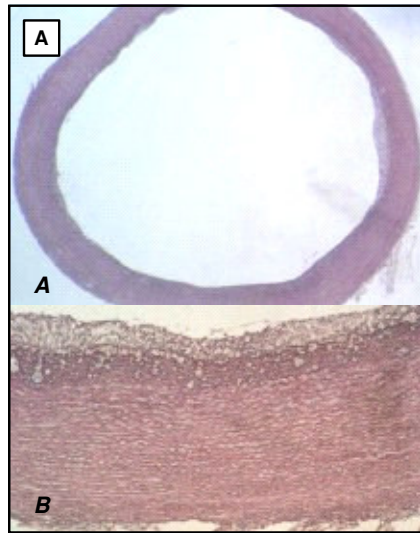


**Figura 5.1.7. Micrografías (20x) de secciones de cayado aórtico de grupos AC y AH.**  
Tinción de Masson

(Página siguiente):

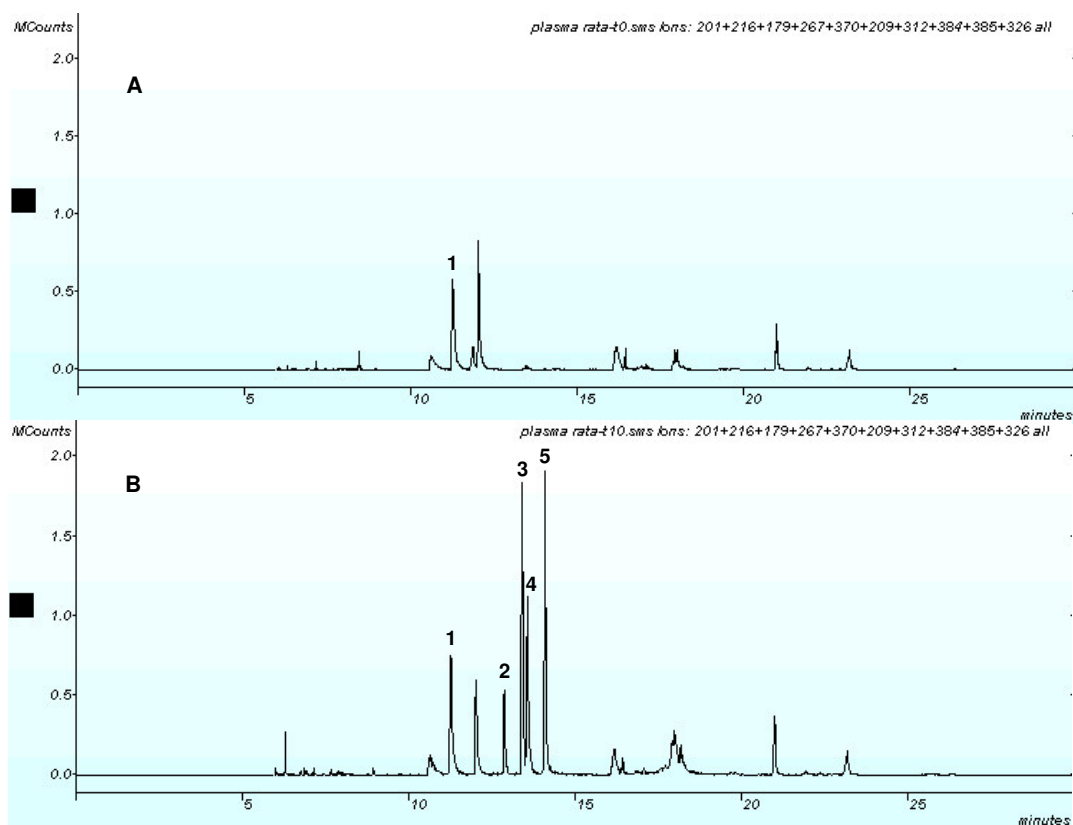
► **Figura 5.1.8. Micrografías de secciones de cayado aórtico de grupos los grupos A, H, AA, AC, AV, AH.** Tinción con Orceína. A, 10x; B, 20x. Las flechas indican la presencia de fibras elásticas en las zonas próximas a la luz arterial.





## 5.2. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DE HIDROXITIRO SOL EN RATAS.

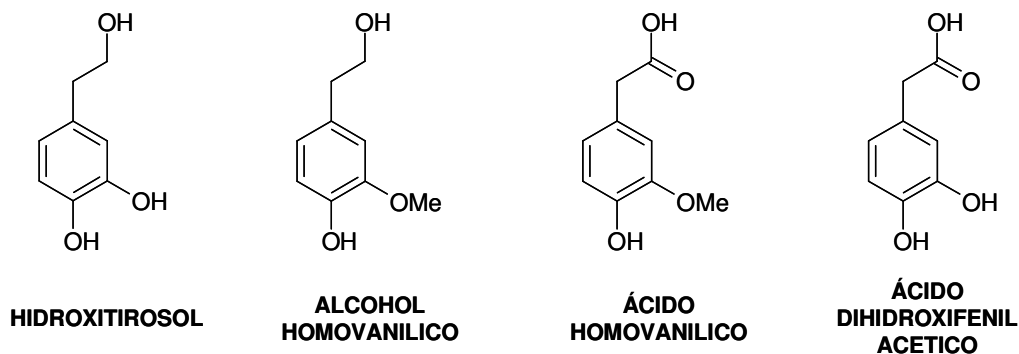
La figura 5.2.1. muestra los cromatogramas representativos resultantes del análisis por CG-EM de los plasmas de ratas antes de la administración de HT (A), y después de 10 minutos de la administración del compuesto (B). No se detectaron los picos correspondientes al HT ni ninguno de sus metabolitos en el plasma de las ratas a los que no se les administró el compuesto (Figura 5.2.1.A). La administración por vía oral de 25  $\mu$ moles de HT en solución acuosa, produjo la aparición de cuatro nuevos picos en el cromatograma (figura 5.2.1.B) correspondientes a HT, alcohol homovanílico (HvOH), ácido homovanílico (HvAc) y ácido dihidroxifenil acético (DHPA) (D'Angelo et al., 2001). Estos picos fueron identificados en función de los tiempos de retención y espectros de masas característicos obtenidos a partir de compuestos puros comerciales.



**Figura 5.2.1. Cromatogramas (CG-EM) de plasma de rata basal (A) y plasma obtenido a los 10 minutos de la administración oral de 25  $\mu$ moles de HT. 1: estándar interno ( $\alpha$ -naftol); 2: HvOH; 3: HT; 4: HvAc; 5: DHPA.**

La figura 5.2.2. muestra a estructura del HT (3,4-dihidroxifenil etanol) y sus metabolitos derivados detectados en el plasma de ratas: el HvOH (4-hidroxi-3-metoxi feniletanol) incorpora un grupo metilo en el hidroxilo situado en posición 3 del HT; El HvAc (4-hidroxi-3-

metoxi fenilacético) y el DHPA (3,4-dihidroxi fenilacético) resultan de la oxidación del grupo etanólico del HvOH y el HT, respectivamente.



**Figura 5.2.2. Estructura de los distintos metabolitos del HT detectados en el plasma de ratas.**

La tabla 5.2.1. indica las concentraciones medias de HT, HvOH, HvAc y DHPA en el plasma de ratas antes y después de la administración de HT. Tanto el HT como sus metabolitos estaban presentes en el plasma de las ratas a los 5 minutos de su administración oral y las concentraciones más elevadas correspondieron a los metabolitos ácidos lo que indicó que el HT se absorbió y se metabolizó rápidamente.

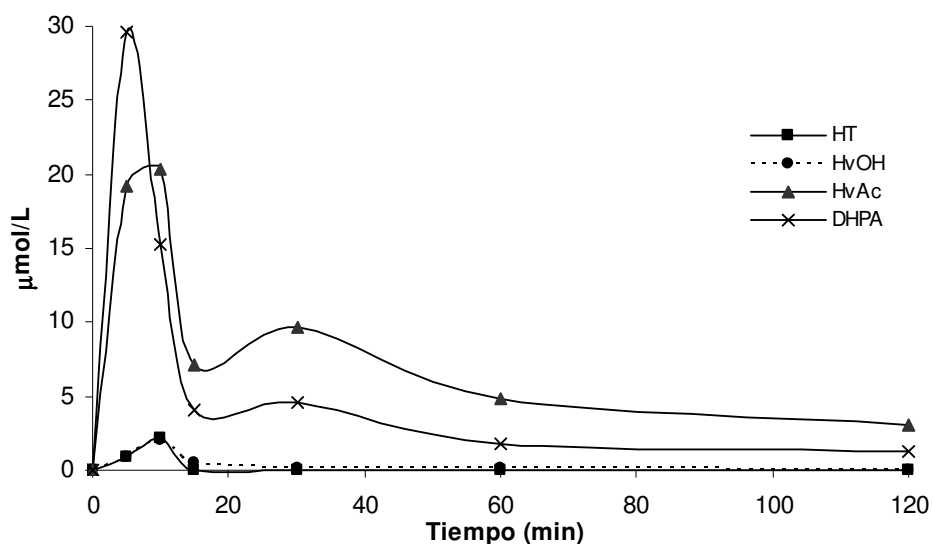
**Tabla 5.2.1. Concentración plasmática del HT y sus metabolitos derivados antes y después de la administración por vía oral de 25  $\mu$ moles de HT.**

Tiempo	HT	HvOH	HvAc	DHPA	SUMA
0	0.00 $\pm$ 0.000	0.00 $\pm$ 0.000.	0.00 $\pm$ 0.000	0.00 $\pm$ 0.000	0.00 $\pm$ 0.000
5	0.90 $\pm$ 0.663	0.83 $\pm$ 0.324	19.25 $\pm$ 5.24	29.64 $\pm$ 10.37	50.62 $\pm$ 16.41
10	2.19 $\pm$ 2.059	2.08 $\pm$ 0.955	20.35 $\pm$ 8.47	15.31 $\pm$ 6.18	39.94 $\pm$ 17.24
15	0.054 $\pm$ 0.022	0.53 $\pm$ 0.117	7.12 $\pm$ 2.74	4.11 $\pm$ 2.13	11.82 $\pm$ 4.80
30	0.052 $\pm$ 0.013	0.16 $\pm$ 0.071	9.68 $\pm$ 4.20	4.55 $\pm$ 1.84	14.45 $\pm$ 6.08
60	0.012 $\pm$ 0.006	0.072 $\pm$ 0.049	4.83 $\pm$ 2.94	1.73 $\pm$ 0.68	6.64 $\pm$ 3.67
120	0.029 $\pm$ 0.026	0.025 $\pm$ 0.025	3.05 $\pm$ 1.50	1.32 $\pm$ 0.50	4.42 $\pm$ 1.97

Concentraciones expresadas en  $\mu$ mol/L. Valores expresados como media  $\pm$  EEM.

Las curvas de concentración plasmática promedio obtenidas para el HT, HvOH, HvAc y DHPA están representadas en la figura 5.2.3. y los principales parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las curvas de concentración plasmática promedio de todos estos

compuestos, se indican en la tabla 5.2.2. Estos valores están calculados suponiendo un modelo monocompartimental de distribución.



**Figura 5.2.3.** Curvas de concentración plasmática promedio del HT y sus metabolitos en ratas después de la administración oral de 25  $\mu$ moles de HT en disolución acuosa.

**Tabla 5.2.2.** Principales parámetros farmacocinéticos del HT y sus metabolitos en plasma de ratas.

	<b>Cmax</b> ( $\mu$ mol/L)	<b>Tmax</b> (min)	<b>t<sub>1/2</sub></b> (min)	<b>AUC<sub>0-2h</sub></b> ( $\mu$ mol*min/L)	<b>AUC<sub>0-inf</sub></b> ( $\mu$ mol*min/L)
<b>HT</b>	2.1	10	8.98	19	19
<b>HvOH</b>	2.2	10	20.26	27	28
<b>HvAc</b>	20.3	10	51.02	796	1020
<b>DHPA</b>	29.6	5	30.73	486	544
<b>SUMA</b>	50.62	5	37.59	1328	<b>1565</b>

*Cmax*: concentración plasmática máxima; *Tmax*: tiempo necesario para alcanzar la concentración plasmática máxima; *t<sub>1/2</sub>*: tiempo de vida media a partir de la *Tmax*; *AUC<sub>0-2h</sub>*: área bajo la curva entre 0 y 2 horas; *AUC<sub>0-inf</sub>*: área bajo la curva entre 0 y infinito. HT: hidroxitirosol; HvOH: alcohol homovanílico; HvAc: ácido homovanílico; DHPA: ácido dihidroxifenilacético.

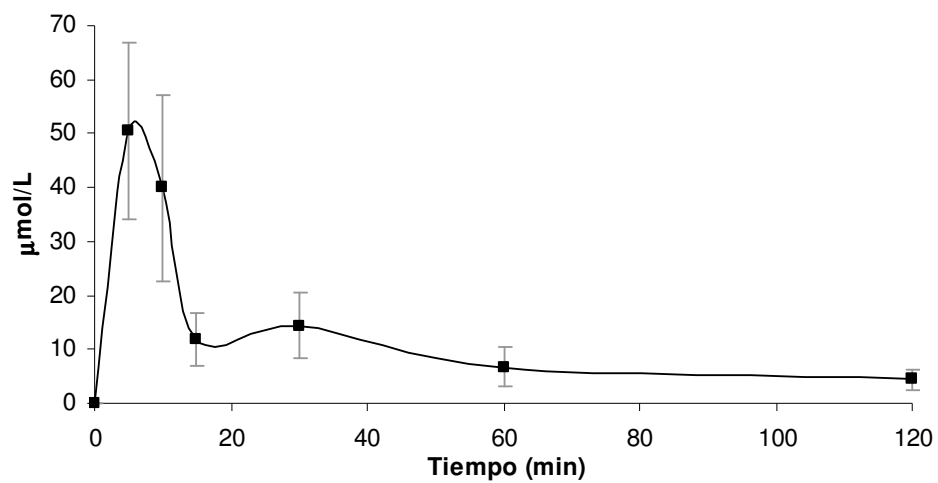
El HT se detectó en el plasma a los 5 minutos de su administración y alcanzó una concentración máxima ( $C_{max}$ ) de  $2.19 \pm 2.06 \mu\text{mol/L}$  a los 10 minutos. A continuación su concentración descendió bruscamente de manera que a los 15 minutos tan solo el 2.5% de la  $C_{max}$  alcanzada estaba presente en el plasma. A partir de este momento el descenso fue más lento y solo se detectó el 1.2% de la  $C_{max}$  dos horas después de la ingesta (Figura 5.2.2). El tiempo de vida media del HT ( $t_{1/2}$ ) una vez alcanzada la  $C_{max}$  fue el menor de todos los compuestos detectados en el plasma de las ratas y se estimó en 9.0 minutos. El área bajo la curva (AUC) medida para HT fue la menor de todas las obtenidas para los metabolitos derivados del mismo y fue de  $19 \mu\text{mol}\cdot\text{min/L}$ . A partir del AUC se realizó estimación de la absorción del compuesto. Para ello se empleó una fórmula propuesta por Ivarsson et al. (1975) que permite el cálculo del volumen plasmático de ratas en función del peso ( $\text{mL plasma} = (0.026 * \text{peso corporal}) + 0.92$ ). Según este cálculo teórico, el porcentaje de HT administrado presente en el compartimento plasmático fue de 0.59%. Este valor asciende hasta un 46% si el cálculo se realiza sobre el AUC total ( $\text{AUC}_T$ ) obtenida a partir de la suma de las concentraciones plasmáticas de todos los compuestos derivados del HT (Figura 5.2.4.). Solo el 1.2% de este  $\text{AUC}_T$  correspondió al HT.

El HvOH se detectó en el plasma a los 5 minutos de la ingesta, aunque su máxima concentración se detectó a los 10 minutos, siendo esta muy similar a la encontrada para el HT ( $2.08 \pm 0.95 \mu\text{mol/L}$ ). A los 15 minutos su concentración se redujo en un 75% pero este valor fue 10 veces superior al obtenido para el HT. Una vez alcanzada su  $C_{max}$  el  $t_{1/2}$  en plasma de este metabolito fue de 20.3 minutos. El AUC de alcohol homovanílico supuso un 1.8% del  $\text{AUC}_T$ .

Para el HvAc se encontró una  $C_{max}$  de  $20.35 \pm 9.69$  a los 10 minutos de la ingesta aunque ya se detectó en plasma a los 5 minutos. Un segundo pico de concentración plasmática apareció a los 30 minutos prolongando el tiempo de vida media de este compuesto en el plasma, que se estimó en 51 minutos. El 15% de la  $C_{max}$  de este compuesto se encontraba en el plasma de las ratas transcurridas dos horas después de la ingesta del HT. El AUC del HvAc fue la mayor de todos los compuestos detectados en el plasma y supuso el 68% de  $\text{AUC}_T$ .

El DHPA fue el metabolito del HT que alcanzó la concentración plasmática más elevada y más rápida, detectando una  $C_{max}$  de  $29.64 \pm 10.38$  a tan solo 5 minutos de la ingesta. Una vez alcanzada su  $C_{max}$  su tiempo de vida media en plasma fue de 31 minutos y el 4.5% de la  $C_{max}$  estaba presente en el plasma de las ratas transcurridas dos horas de la ingesta. El AUC de a este compuesto supuso el 34.8% del  $\text{AUC}_T$ .

En la figura 5.2.4. se muestra la curva de absorción plasmática resultante de la suma de las concentraciones molares de HT y sus metabolitos.

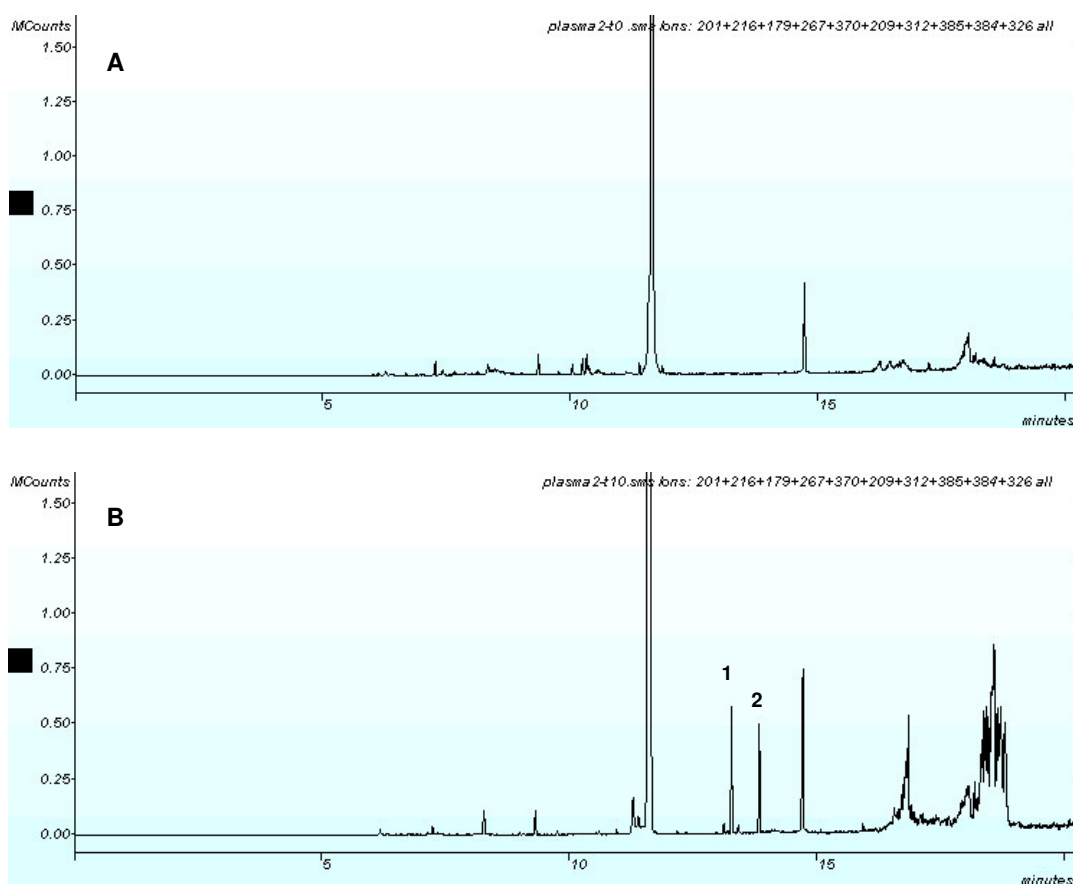


**Figura 5.2.4. Curva de concentración plasmática total del HT y sus metabolitos después de la administración oral de HT. Suma de las concentraciones molares de HT y todos las sus metabolitos en función del tiempo.**

### 5.3. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DEL HIDROXITIRO SOL EN HUMANOS.

#### 5.3.1. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HT Y SUS DERIVADOS EN PLASMA HUMANO.

No se detectaron HT ni sus metabolitos derivados en el plasma basal de ninguno de los voluntarios incluidos en el estudio después de dos días de consumo de una dieta sin aceite de oliva ni aceitunas y un periodo de ayuno mínimo de 12 horas (Figura 5.3.1.A). La administración de una disolución acuosa de 2.5 mg/Kg de peso produjo un aumento de las concentraciones plasmáticas de HT y HvOH inmediatamente después de su consumo en todos los voluntarios (Figura 5.3.1.B). No se detectaron en el plasma humano los metabolitos ácidos: HvAc y DHPA. Tampoco se encontraron variaciones en las concentraciones plasmáticas de HT ni de ninguno de sus metabolitos tras la incubación del plasma con las enzimas glucuronidasa y sulfatasa, lo que sugirió que estos compuestos no se encontraban conjugados en plasma.



**Figura 5.3.1. Cromatogramas de plasma basal (A) y plasma obtenido a los 10 minutos de la administración del compuesto (B). 1: HvOH; 2: HT.**

La figura 5.3.1. muestra las curvas de concentración plasmática y las principales constantes farmacocinéticas obtenidas a partir de las mismas de cada uno de los voluntarios del estudio, así como la cantidad total de los distintos metabolitos y el porcentaje de HT recuperado en orina de 24 horas después de la ingesta oral. El perfil de absorción y parámetros farmacocinéticos obtenidos mostraron una gran variabilidad entre los voluntarios como se muestra a continuación. Las concentraciones máximas (C<sub>max</sub>) de HT detectadas oscilaron entre 0.47 y 2.24 µmol/L que se alcanzaron a los 10 o 20 minutos. Una vez alcanzada la máxima concentración, el HT desapareció rápidamente del plasma con una vida media (t<sub>1/2</sub>) entre 4.8 y 12.5 minutos. El área bajo la curva osciló entre 7.8 y 40 µmol/L. La presencia de HvOH en plasma mostró aún más variabilidad entre los voluntarios: las C<sub>max</sub> de HvOH se obtuvieron entre los 10 y los 30 minutos. En 9 de los 10 voluntarios las C<sub>max</sub> de este metabolito fueron menores que las encontradas para el HT, con valores entre 1.48 y 0 µmol/L. Solo en uno de los participantes no se detectó el HvOH en el plasma. El t<sub>1/2</sub> del HvOH osciló entre 2.9 y 17.8 minutos y el AUC entre 0 y 34.8. En ninguno de los voluntarios se detectó HT o HvOH a las dos horas de su administración.

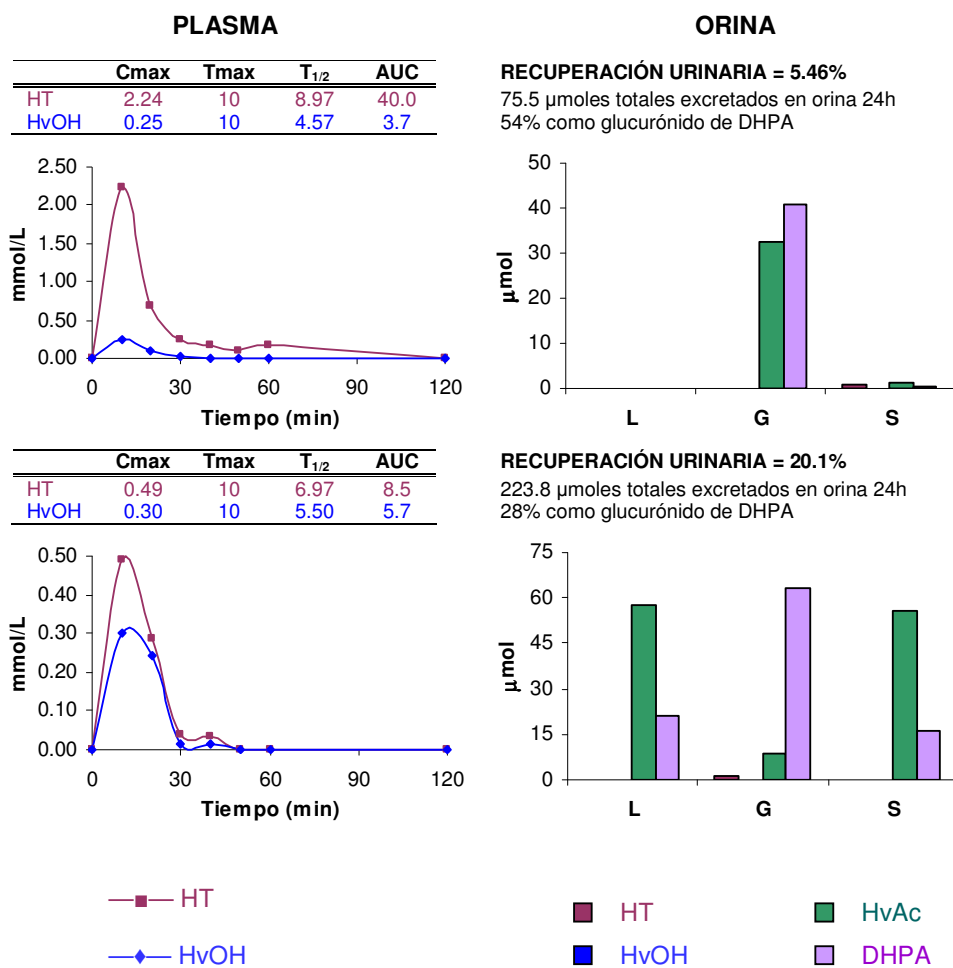


Figura 5.3.1. Absorción de HT en los distintos voluntarios. (continúa pag. siguiente)



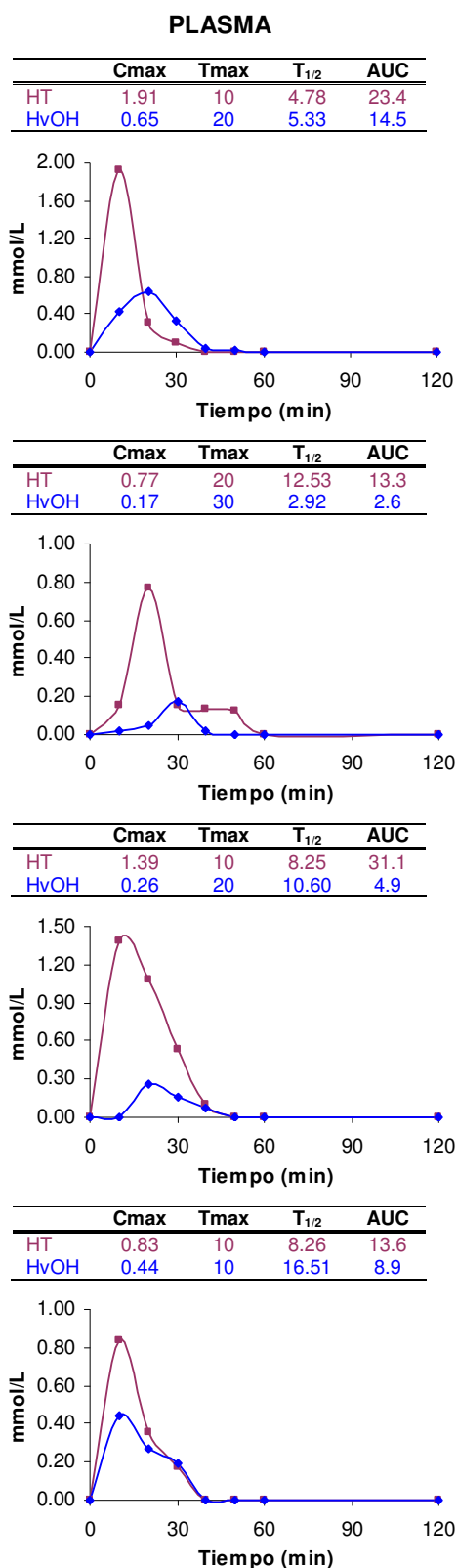
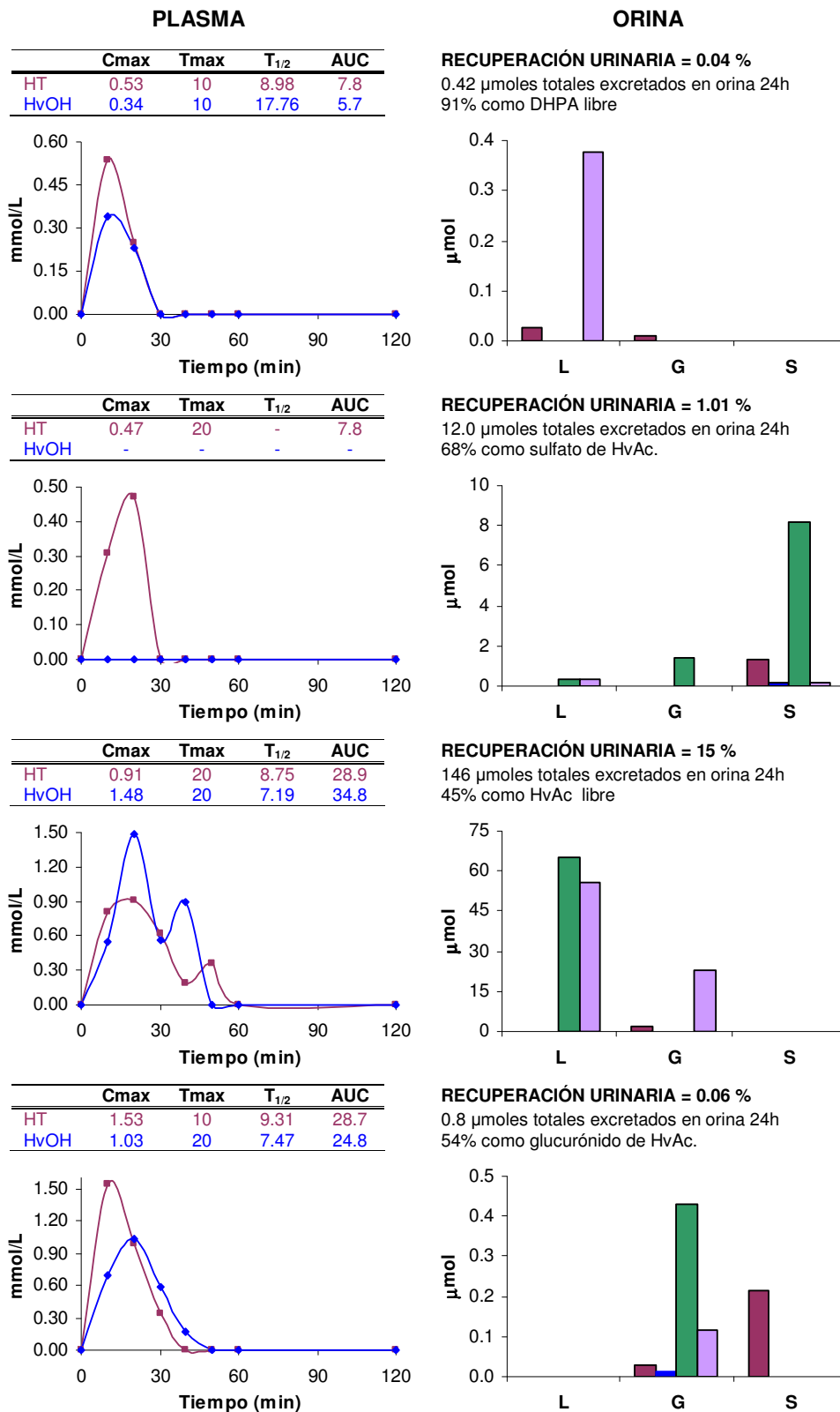


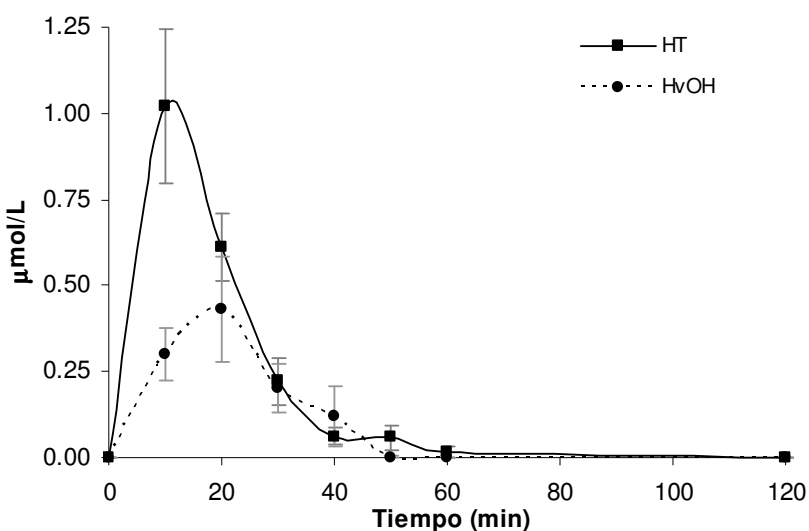
Figura 5.3.1. Absorción de HT en los distintos voluntarios. (continúa pag. siguiente)



**Figura 5.3.1. Absorción de HT en los distintos voluntarios: Curvas de concentración plasmática, principales parámetros farmacocinéticos y formas de excreción urinaria obtenidos después de la administración oral de una disolución acuosa 2.5 mg/Kg de**

**HT.**  $C_{max}$ , máxima concentración plasmática en  $\mu\text{mol/L}$ ;  $T_{max}$ , tiempo necesario para alcanzar la concentración plasmática en minutos;  $T_{1/2}$ , tiempo de vida media en plasma a partir de la  $T_{max}$  en minutos;  $AUC$ , área bajo la curva entre 0 y 2 horas en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min/L}$ . L, compuestos libres; G, compuestos conjugados con ácido glucurónico; S, compuestos conjugados con sulfato.

La curva de concentraciones plasmáticas medias del HT y el HvOH están representadas en la figura 5.3.3. y los valores promedio de los principales parámetros farmacocinéticos se indican en la tabla 5.3.1. En general podemos decir la absorción oral del HT en solución acuosa se llevó a cabo de forma rápida, encontrándose una concentración máxima de  $1.11 \pm 0.20 \mu\text{mol/L}$  a los  $13.0 \pm 1.5$  minutos de su administración. El valor promedio de concentración plasmática máxima de HvOH fue un 55% inferior al del HT y se alcanzó 4 minutos más tarde ( $C_{max}$  del HvOH  $0.49 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$  a los  $16.7 \pm 2.4$  minutos). Una vez alcanzada la máxima concentración plasmática ambos compuestos desaparecieron rápidamente del plasma, mostrando un valor promedio de semivida plasmática similar ( $8.60 \pm 0.68$  minutos para el HT y  $8.65 \pm 1.76$  minutos en el caso del HvOH). El área bajo la curva del HT fue de  $20.3 \pm 3.6$ , prácticamente el doble que la del HvOH que fue de  $10.6 \pm 3.5$ .



**Figura 5.3.3.** Concentración media de HT y HvOH detectada en los plasmas humanos tras la ingesta de 2.5 mg/Kg peso de HT.

**Tabla 5.3.1. Parámetros farmacocinéticos obtenidos en plasma para el HT y el HvOH.**

	<b>Cmax (µmol/L)</b>	<b>Tmax (min)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (min)</b>	<b>AUC<sub>(0-2h)</sub> (µmol*min/L)</b>
<b>HT</b>	1.11 ± 0.20 (0.47-2.23)	13.0 ± 1.5 (10-20)	8.60 ± 0.68 (4.78-12.53)	20.3 ± 3.6 (7.8-40.0)
<b>HvOH</b>	0.49 ± 0.14 (0.00-1.48)	16.7 ± 2.4 (10-30)	8.65 ± 1.76 (2.92-17.76)	10.6 ± 3.5 (0.0-34.78)
<b>Suma (HT+HvOH)</b>	1.50 ± 0.24 (0.47+2.49)	13.0 ± 1.5 (10-20)	9.32 ± 0.78 (5.34-11.90)	30.9 ± 6.0 (7.8-63.7)

*Cmax* concentración plasmática máxima; *Tmax*, tiempo necesario para alcanzar la concentración plasmática máxima; *t<sub>1/2</sub>*, tiempo de vida media a partir del *Tmax*; *AUC<sub>(0-2h)</sub>*, área bajo la curva entre 0 y 2 horas; *HT*, hidroxitirosol; *HvOH*, alcohol homovanílico. Valores expresados como media ± EEM. Los valores mínimos y máximos encontrados se muestran entre paréntesis.

Se realizó una estimación teórica de la cantidad de HT absorbida a partir del AUC y un volumen teórico de plasma calculado en función del peso (48 mL plasma/Kg, Guyton y Hall, 1997). El porcentaje estimado de HT administrado presente en el compartimento plasmático fue de 6.2 ± 1.1% (intervalo: 2.4-11.8%). Este valor ascendió a 9.4 ± 1.8% (intervalo: 2.4-19.6%) cuando se tuvo en cuenta además el HvOH presente en plasma.

### 5.3.2. EXCRECIÓN DE HT Y SUS METABOLITOS POR ORINA.

Se investigó la presencia de HT, HvOH, HvAc y DHPA tanto en sus formas libres como conjugadas con ácido glucurónico y sulfato en las orinas de los distintos voluntarios. No se detectaron cantidades cuantificables de HT ni de ninguno de sus metabolitos en la orina basal de los voluntarios recogida antes de la ingesta del compuesto y después de dos días de consumo de una dieta exenta de aceite de oliva y aceitunas. Sin embargo en la orina total recopilada durante las 24 horas después de su consumo se encontraron hasta 12 metabolitos distintos procedentes del HT: las formas libres y conjugadas con ácido glucurónico o con sulfato de HT, HvOH, HvAc y DHPA.

Al igual que para el plasma, el análisis de los metabolitos del HT en orina mostró una elevada variabilidad entre los distintos voluntarios (Figura 5.3.1.): El HvAc fue el metabolito más abundante en 6 de los 10 voluntarios: en 3 voluntarios apareció como glucurónido de HvAc, en 2 como libre y en 1 como sulfato. Otros dos participantes mostraron como metabolito principal el glucurónido de DHPA y su forma libre lo fue en otro de los voluntarios. El HT solo fue la forma de eliminación principal en uno de los voluntarios. El HvOH, único

metabolito del HT detectado en el plasma, fue el compuesto menos abundante en la orina de todos los participantes.

La tabla 5.3.2. muestra los cantidades medias de los metabolitos del HT encontrados en orina de 24 horas tras la administración oral del compuesto. Las formas más abundantes detectadas en orina fueron el HvAc libre y al DHPA conjugado con glucurónico, mientras que las menos abundantes fueron las formas libres del HvOH y el HT, los únicos compuestos detectados en el plasma.

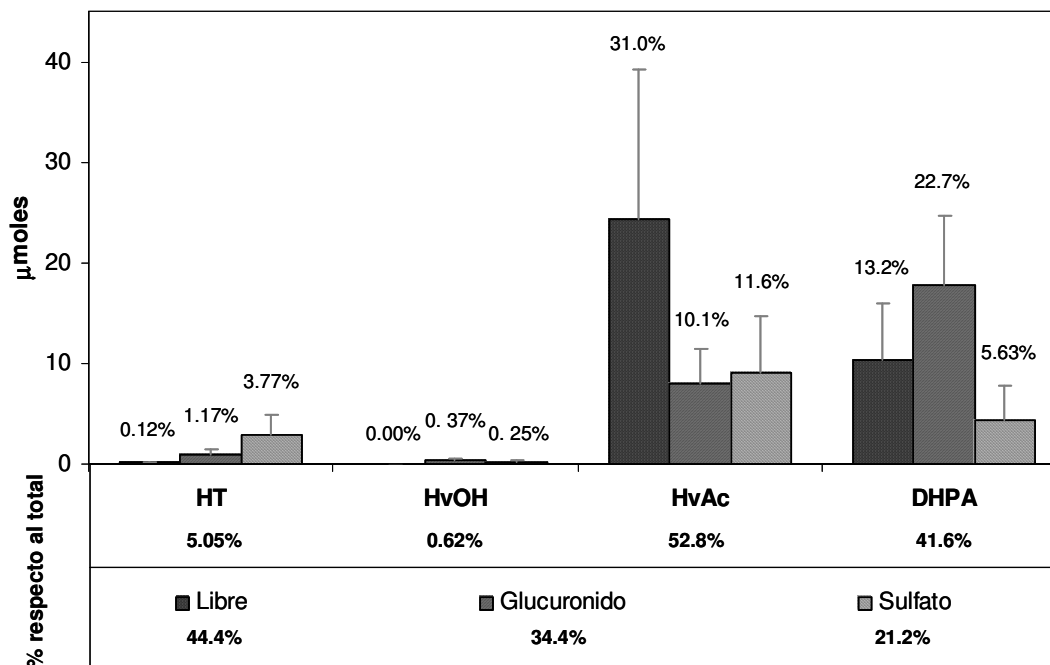
**Tabla 5.3.2. Cantidad de HT y sus metabolitos detectados en orina recogida de 24 horas después de la administración oral de HT.**

	HT	HvOH	HvAc	DHPA
<b>Libre</b>	0.10 ± 0.04 (0.00-0.35)	0.00 ± 0.00 (0.00-0.01)	24.29 ± 14.98 (0.00-163.25)	10.35 ± 5.63 (0.00-55.82)
<b>Glucurónico</b>	0.91 ± 0.45 (0.00-4.92)	0.29 ± 0.19 (0.00-1.97)	7.93 ± 3.48 (0.00-32.43)	17.76 ± 6.87 (0.00-63.00)
<b>Sulfato</b>	2.95 ± 1.93 (0.00-19.89)	0.20 ± 0.17 (0.00-1.98)	9.08 ± 5.54 (0.00-55.90)	4.41 ± 3.33 (0.00-36.41)

HT, hidroxitirosol; HvOH, alcohol homovanílico; HvAc, ácido homovanílico; DHPA, ácido dihidroxifenilacético. Los valores están expresados en  $\mu$ moles detectados en el volumen total de orina de 24 horas como media  $\pm$  EEM. Los valores mínimos y máximos encontrados se muestran entre paréntesis.

La Fig. 5.3.4. muestra los porcentajes de cada metabolito detectado en orina de 24 horas respecto al total. El 44.4% de todos los metabolitos se excretaron como formas libres, el 34.3% conjugados con ácido glucurónico y el 21.2% con sulfato. Solo se encontró el 0.12% como HT en forma libre.

Para el cálculo de la recuperación urinaria se consideró la suma de las cantidades totales acumuladas en orina de 24 horas de HT y sus metabolitos derivados. De nuevo se observó una gran variabilidad entre los distintos voluntarios, obteniendo valores comprendidos en el intervalo entre 0.2 y 344.7  $\mu$ moles. Los porcentajes de recuperación en la orina de 24 horas respecto de la cantidad administrada obtenidos en los diferentes participantes oscilaron entre 0.03% y 35.39%, obteniendo un valor promedio de recuperación urinaria de  $7.45 \pm 3.27\%$ .

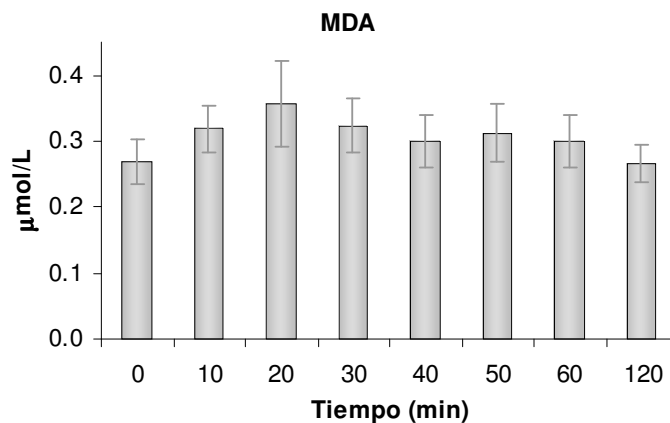


**Figura 5.3.4. Cantidades promedio de las distintas formas metabólicas encontradas en orina de 24 horas.** En la parte superior de las barras se indican los porcentajes respecto al total.

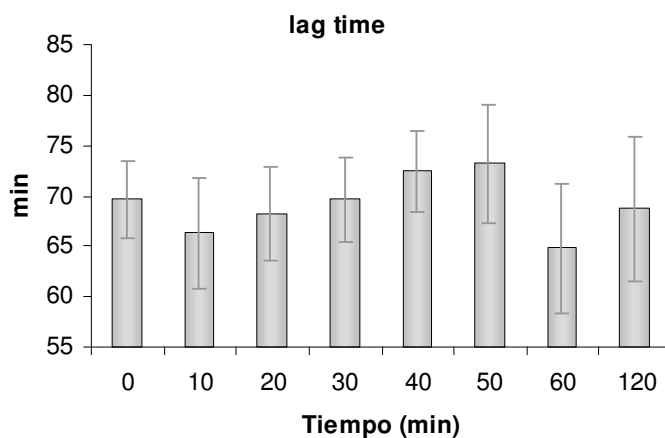
### 5.3.3. PARÁMETROS DE OXIDABILIDAD DEL PLASMA Y LAS LIPOPROTEÍNAS LDL.

La administración de una única dosis de 2.5 mg/Kg de HT en solución acuosa no produjo cambios significativos en la concentración de MDA plasmático en ninguno de los tiempos estudiados durante las dos horas después de la ingesta (Figura 5.3.5). El valor máximo de MDA detectado en plasma fue de  $0.357 \pm 0.066$  que se encontró a los 20 minutos después de la ingesta, mientras que el valor mínimo, que fue de  $0.266 \pm 0.029$ , se halló a los 120 minutos.

Tampoco se produjeron cambios significativos en la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas LDL, medida como "lagtime", en el periodo inmediatamente posterior a la administración de HT (Figura 5.3.6). El valor máximo de "lagtime" de las LDL se encontró 50 minutos después de la ingesta del compuesto y el mínimo a los 60 minutos.



**Figura 5.3.5: Concentración plasmática de MDA tras la administración de una dosis única de 2.5 mg/Kg de HT. Datos expresados como media  $\pm$  EEM.**



**Figura 5.3.6. Susceptibilidad de las lipoproteínas LDL a la oxidación inducida por cobre tras la administración de una dosis única de 2.5 mg/Kg de HT. Medida como "Lagtime" o tiempo necesario para que las lipoproteínas alcancen la fase exponencial de propagación. Datos expresados como media  $\pm$  EEM.**

#### 5.3.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS METABOLITOS DEL HT.

Con objeto de estudiar la posible contribución de los metabolitos del HT a los efectos antioxidantes del HT descritos en literatura se estudió la CAO de los metabolitos procedentes del HT, encontrados tanto en plasma de ratones como en plasma y orina humanos, mediante el ensayo del ABTS. Este método emplea como sustancia antioxidante de referencia el trolox, un análogo de la vitamina E. La tabla 5.3.3. muestra esta CAO, expresada como TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Una unidad de TEAC se

define como la concentración de Trolox con una actividad antioxidante equivalente a una disolución 1 mM de la sustancia investigada. Las capacidades antioxidantes encontradas fueron de mayor a menor: DHPA > HvAc > HvOH > HT, como se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 5.3.3. Capacidad antioxidante del HT y las formas libres de los metabolitos expresada en TEAC.**

Compuesto	TEAC
HT	2.59
HvOH	3.89
HvAc	4.67
DHPA	9.20



## 5.4. ESTUDIO DE LA AFINIDAD DEL HIDROXITIRO SOL POR LAS LIPOPROTEÍNAS LDL.

### 5.4.1. CARACTERIZACIÓN DEL GRADIENTE DE LIPOPROTEÍNAS.

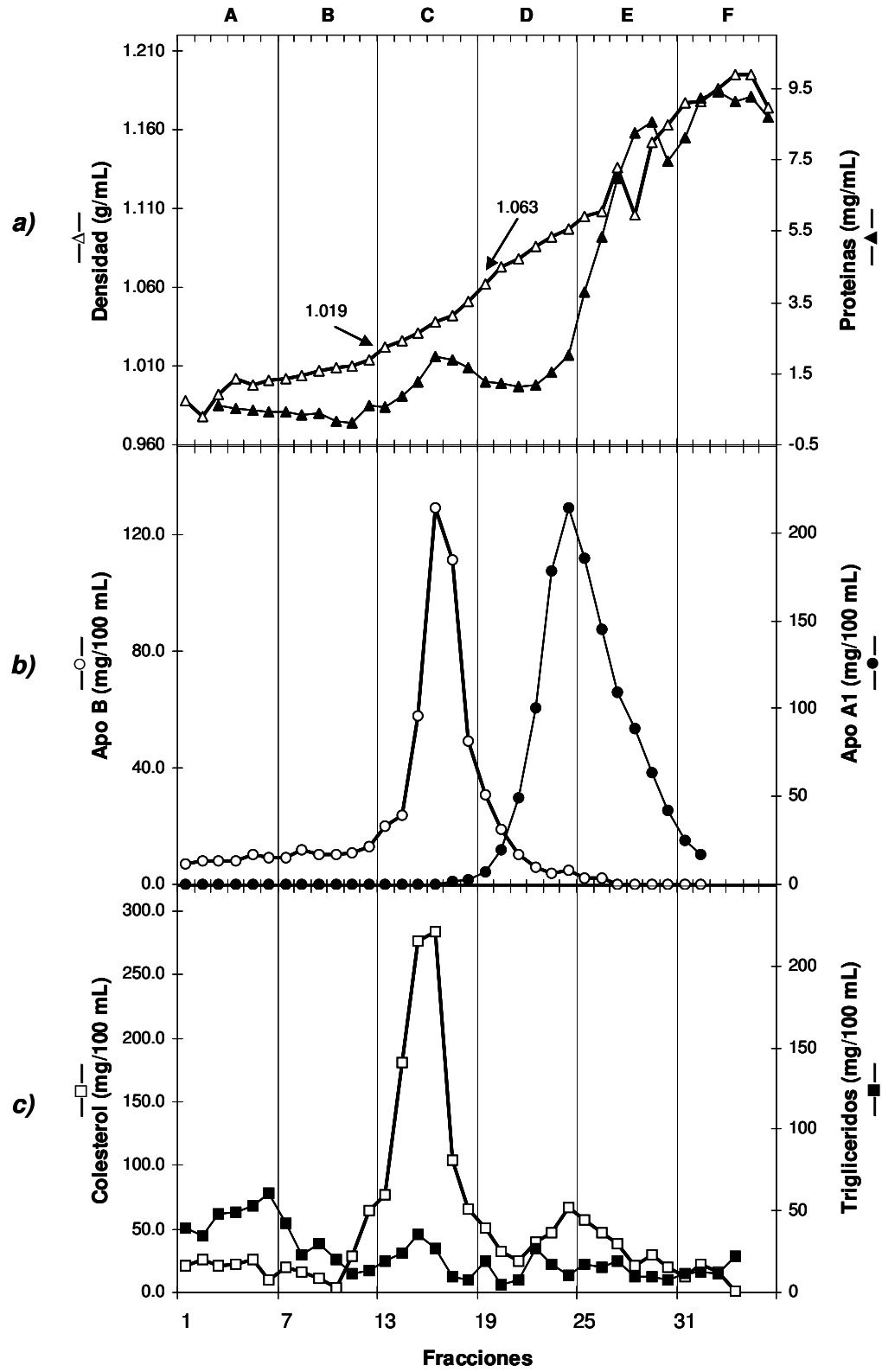
Las lipoproteínas del plasma fueron separadas por ultracentrifugación en gradiente de densidad (apartado 4.6.5). Los gradientes se fraccionaron en alícuotas de 1 mL con ayuda de un fraccionador de gradientes. La densidad, la concentración de proteínas totales, Apo-B, Apo-A1 y las concentraciones de colesterol total y triglicéridos se determinaron en las fracciones (figura 5.4.1).

El gradiente de densidad resultante se muestra en la figura 5.4.1.a. Las lipoproteínas VLDL se detectaron en el intervalo de densidades plasmáticas comprendidas entre 0.95 y 1.006 g/mL (fracciones 3-8), las LDL en el intervalo 1.019-1.063 g/mL (fracciones 13-18) y las HDL en el intervalo 1.063-1.210 g/mL (fracciones 21-29).

La concentración de proteínas en las fracciones obtenidas en el gradiente de densidad del plasma también está representada en la figura 5.4.1.a. En la fracción 14 se observó un pico de proteínas que correspondió a la LDL. A partir de la fracción 20 la concentración de proteínas aumentó coincidiendo con la aparición de la HDL aunque las concentraciones de proteínas máximas se encontraron en las últimas fracciones del gradiente, a partir de la fracción 26.

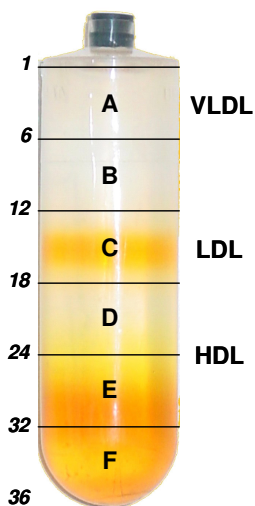
La figura 5.4.1.b. representa la distribución de apolipoproteínas Apo B y Apo A1 en el gradiente de densidades del plasma. La Apo B, se encontró mayoritariamente entre las fracciones 12 y 20 y el pico máximo se situó en la fracción 16. Por otra parte la Apo A1, característica de las lipoproteínas de alta densidad, se detectó a partir de la fracción 19 y alcanzó la máxima concentración en la fracción 24.

La figura 5.4.1.c. muestra la concentración de colesterol y triglicéridos en el gradiente de lipoproteínas plasmáticas. Las concentraciones máximas de colesterol se encontraron en las fracciones 14-19 de gradiente, que coincidían con el pico de Apo B y los datos de densidad típica para estas lipoproteínas, lo que confirmó la presencia de las LDL en estas fracciones. Además, se detectó un pico en la concentración de colesterol más pequeño entre las fracciones 23-26 que también coincidió con el pico de concentración máxima de Apo A1, indicando la presencia de las HDL en el gradiente. Por otra parte se encontraron concentraciones más elevadas de triglicéridos en las primeras fracciones del gradiente posiblemente debido a la presencia de lipoproteínas VLDL.



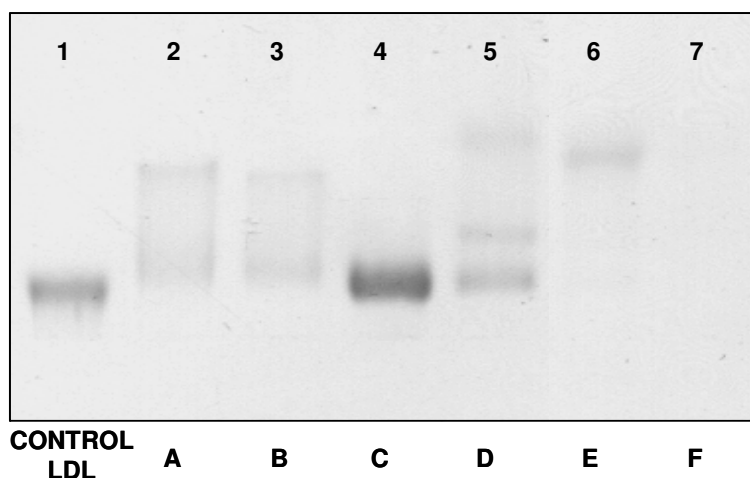
(página anterior) **Figura 5.4.1. Caracterización del gradiente de lipoproteínas.** a) Densidad ( $\text{---}\Delta\text{---}$ ) y concentración de proteínas ( $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ ); b) concentración de Apo B ( $\text{---}\circ\text{---}$ ) y Apo A1 ( $\text{---}\bullet\text{---}$ ) y c) Concentración de colesterol ( $\text{---}\square\text{---}$ ) y triglicéridos ( $\text{---}\blacksquare\text{---}$ ) en las fracciones de 1 mL obtenidas tras la ultracentrifugación del plasma.

Las 36 fracciones de 1 mL del gradiente de densidad se combinaron en 6 grupos de 6 fracciones consecutivas (grupos A, B, C, D, E y F) (Figura 5.4.2.) donde el grupo C contenía las LDL purificadas.



**Figura 5.4.2. Distribución de las fracciones de lipoproteínas en el gradiente de densidad del plasma obtenido por ultracentrifugación en gradiente salino.**

Para comprobar la localización y pureza de las lipoproteínas en las fracciones A-F del gradiente de densidad, las muestras se sometieron a una electroforesis de lipoproteínas en gel de agarosa (figura 5.4.3.). En los geles teñidos resultantes se pudieron observar unas bandas anchas pre-beta en los grupos A y B, correspondientes a la VLDL. El grupo C obtuvo una sola banda beta, correspondiente a las LDL, indicando la pureza de la misma. La fracción D produjo tres bandas, una tipo beta, correspondiente a restos de LDL, y otras dos pre-beta y alfa, correspondientes a subfracciones de HDL. La fracción E solo produjo la banda alfa de HDL. El grupo de fracciones F, que se sitúa al fondo del tubo de ultracentrifuga, es rico en albumina que no tiñe con el colorante específico empleado.



**Figura 5.4.3. Electroforesis en gel de agarosa:** 1, control de LDL purificada; calles 2-7, grupos de fracciones A-F del gradiente.

#### 5.4.2. CONCENTRACIÓN DE HT EN PLASMA Y LOS DISTINTOS GRUPOS DE FRACCIONES DE LIPOPROTEÍNAS.

Los resultados del estudio de absorción en humanos mostraron concentraciones máximas de HT en plasma a los tiempos 10-20 minutos tras la ingesta de HT. Por ello se seleccionaron estos tiempos de toma de muestras para estudiar la posible asociación *in vivo* del HT a las lipoproteínas.

Las concentraciones plasmáticas de HT y HvOH a los 10 y 20 minutos fueron similares a las encontradas en el estudio de absorción y se muestran en la tabla 5.4.1.

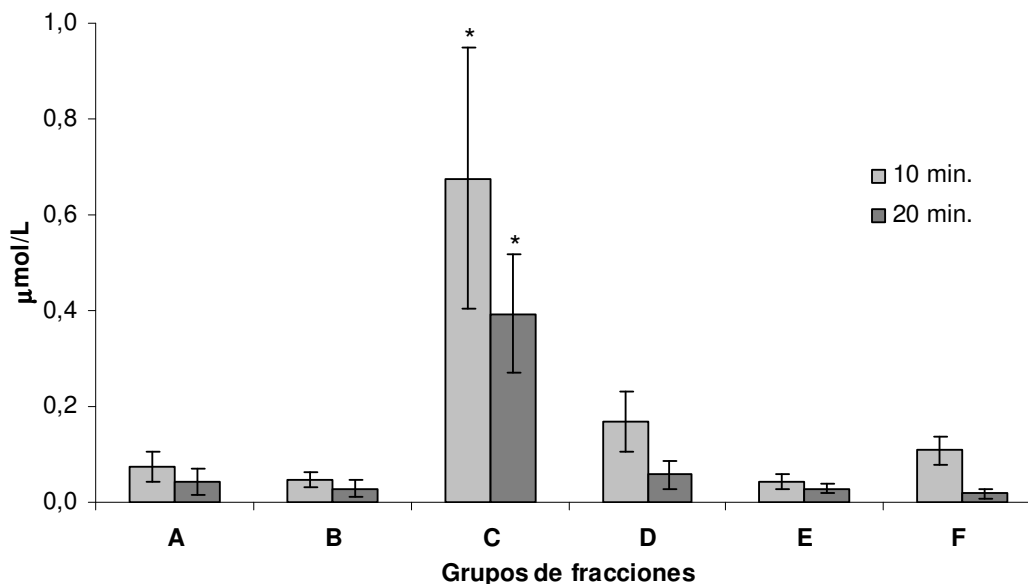
**Tabla 5.4.1. Concentración plasmática de HT y alcohol homovanílico.**

Tiempo	HT ( $\mu\text{mol/L}$ )	HvOH ( $\mu\text{mol/L}$ )
0 min.	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
10 min.	$1.097 \pm 0.539$	$0.244 \pm 0.112$
20 min.	$0.521 \pm 0.139$	$0.518 \pm 0.371$

La eliminación de las sales del gradiente usado para la purificación de lipoproteínas es un proceso de rutina previo a la purificación final de las mismas. Estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio mostraron que el HT era capaz de atravesar las membranas

de diálisis y eliminarse en los sucesivos cambios de tampón de diálisis de las lipoproteínas LDL. Para ello, muestras purificadas de LDL fueron adicionadas de HT e incubadas durante 10 minutos a 37°C. A continuación la LDL se dializó en una membrana de diálisis con 1 L de tampón PBS. Se midieron cantidades de HT en el interior de la membrana de diálisis y el tampón que la contenía. Transcurrida 1 h de diálisis, aproximadamente el 90% del HT adicionado a la muestra de LDL se encontró en el tampón de diálisis, mientras que solo el 10% permanecía en el interior de la membrana. Cambios sucesivos de tampón de diálisis eliminaron completamente el HT añadido a la LDL. Estos resultados nos sugirieron llevar a cabo las determinaciones de HT en los grupos de fracciones del gradiente sin dializar.

Las cantidades de HT detectadas en los grupos de fracciones A-F del gradiente de lipoproteínas a 10 y 20 min después de la ingesta oral se muestran en figura 5.4.4. A los 10 minutos (Tmax) la mayoría del HT se detectó en el grupo C de fracciones ( $51.7 \pm 5.7\%$  del total) a una concentración de  $0.676 \pm 0.273 \mu\text{mol/L}$ . Esta concentración fue significativamente mayor ( $P < 0.001$ ) que las obtenidas en el resto de los grupos que oscilaron entre  $0.044 \pm 0.018 \mu\text{mol/L}$  en el grupo E y  $0.168 \pm 0.063 \mu\text{mol/L}$  en el grupo D. El valor promedio obtenido en los grupos de fracciones A, B, D, E y F fue de  $0.089 \pm 0.031 \mu\text{mol/L}$ . A los 20 minutos, la concentración plasmática de HT disminuyó y con ella la cantidad absoluta de HT presente en los distintos grupos de fracciones. La mayor parte del HT se detectó de nuevo en el grupo C ( $61.4 \pm 8.8\%$ ) a una concentración de  $0.394 \pm 0.122 \mu\text{mol/L}$ . El resto de los grupos obtuvieron concentraciones significativamente menores ( $P < 0.001$ ) que oscilaron entre  $0.018 \pm 0.018 \mu\text{mol/L}$  en el grupo F y  $0.059 \pm 0.030 \mu\text{mol/L}$  en el grupo D. El valor promedio obtenido de en los grupos de fracciones A, B, D, E, y F fue de  $0.035 \pm 0.018$ . No se detectaron alcohol homovanílico ni ningún otro metabolito derivado del HT en ninguno de los grupos del gradiente.

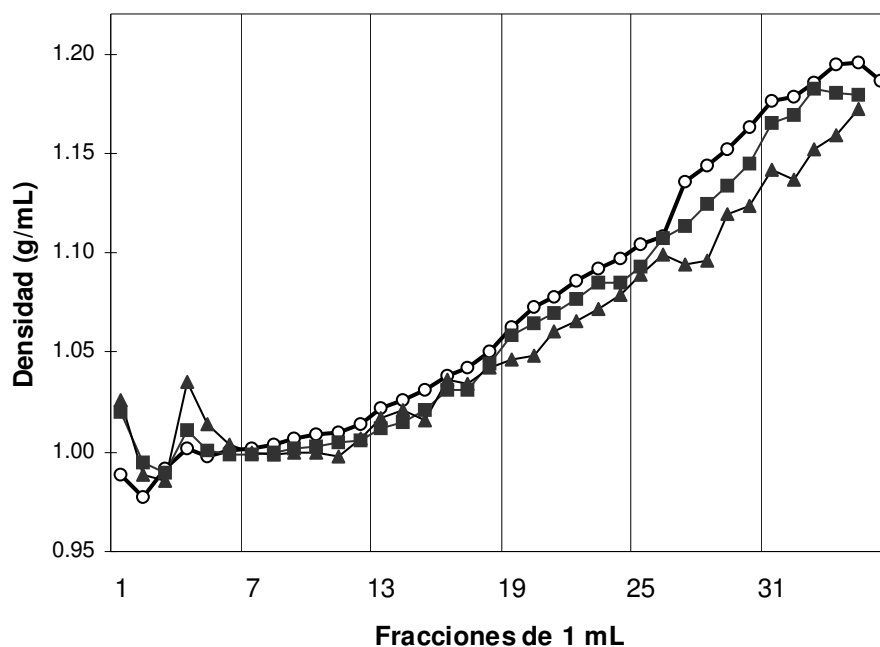


**Figura 5.4.4. Concentración de HT en los distintos grupos de fracciones del gradiente de lipoproteínas del plasma.** Valores expresados como media  $\pm$  EEM. \*, Valores estadísticamente diferentes del resto de los grupos.

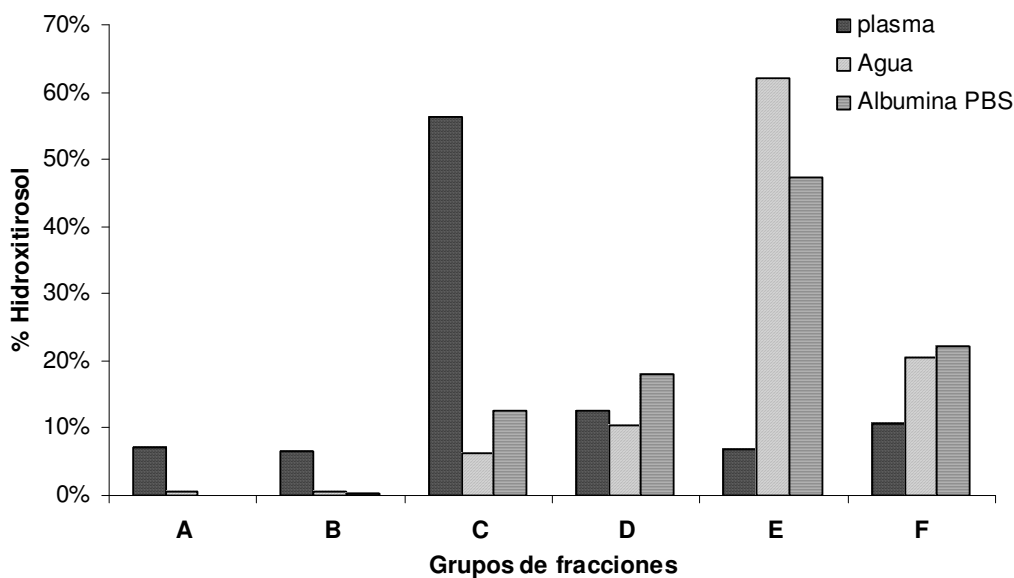
Para comprobar que esta distribución se debía a la existencia de una afinidad específica de esta molécula a las lipoproteínas LDL y no a un efecto de distribución de densidad o de proteínas, se llevaron a cabo dos controles que consistieron en dos disoluciones de HT a una concentración equivalente a la contenida en el plasma (250  $\mu\text{g/L}$ ), una en agua y otra en una disolución acuosa de albúmina sérica bovina en PBS (40 g/L). Esta última disolución tenía el pH, la concentración de proteínas y la densidad semejante a la del plasma. La densidad de ambos controles fue previamente ajustada a 1.3 g/L mediante la adición de BrK tal y como se realizó para las muestras de plasma (apartado 4.2.2.2.).

Se comprobó que la distribución de densidad del gradiente obtenido en ambos controles era similar a la del plasma (Figura 5.4.5). A continuación los gradientes se distribuyeron en 6 grupos de 6 fracciones consecutivas de 1 mL, equivalentes a los grupos de fracciones A-F del gradiente de lipoproteínas del plasma. El análisis de HT por CG-EM reveló que en ambos casos la mayoría del HT se localizó en los grupos de mayor densidad del gradiente (E y F) y no en el grupo C como se observó en el gradiente de lipoproteínas plasmáticas (figura 5.4.6).

Estos resultados sugirieron que existió una cierta afinidad entre el HT y las lipoproteínas LDL no encontrada para el resto de los metabolitos, pero esta unión fue lábil y transitoria ya que dependió de la concentración plasmática.



**Figura 5.4.5.** Gradiente de densidad de los controles de agua (—▲—) y albúmina (—■—) comparado con el plasma (—○—)

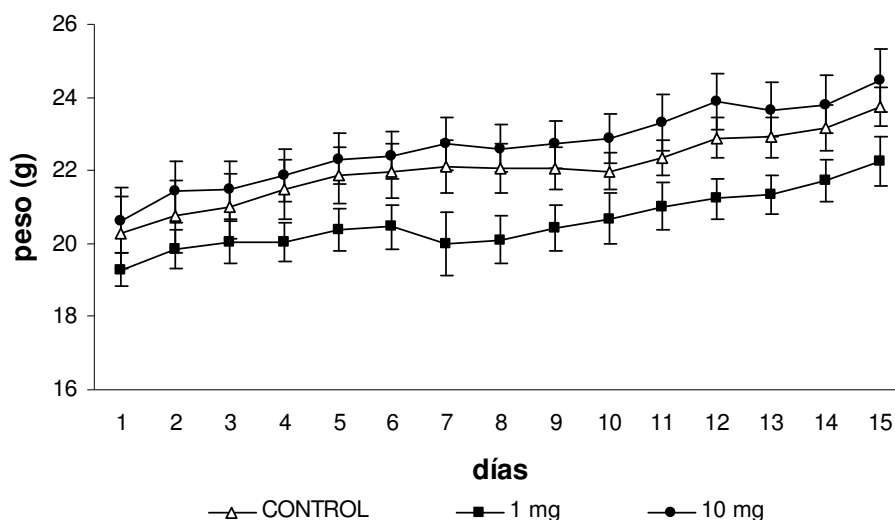


**Figura 5.4.6.** Distribución del HT en los distintos gradientes de densidad. Porcentaje de HT, del total presente en la muestra inicial, detectado en los distintos grupos de fracciones obtenidos de los gradientes de densidad tras la ultracentrifugación de: plasma obtenido tras la ingesta oral de HT, disolución acuosa de 250 ng/mL de HT, disolución de albúmina en agua con 250 ng/mL de HT.

## 5.5. ESTUDIO 5: ESTUDIO DEL EFECTO DEL HIDROXITIROSOLO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN RATONES

### 5.5.1. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL Y EXÁMEN MACROSCÓPICO.

Todos los animales de experimentación finalizaron el estudio. No se observaron diferencias significativas en la evolución del peso corporal entre el grupo control y los grupos a los que se le administro HT (figura 5.5.1). Tampoco se encontró ninguna anomalía en el examen macroscópico de los órganos internos.



**Figura 5.5.1. Evolución del peso corporal de los ratones de los distintos grupos de experimentación.**

### 5.5.2. EFECTO DEL HT EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO DE RATÓN

Los niveles de expresión de más de 12400 genes fueron analizados utilizando microarrays (Murine Genome U74Av2) y un sistema de lectura y análisis de Affymetrix, con el fin determinar si la administración de HT producía cambios significativos en la expresión génica en tejido hepático.

En los estudios de expresión génica los genes más interesantes son aquellos que se inducen o reprimen en una muestra respecto a otra muestra control, que se considera línea base. El factor de cambio (F) indica la relación entre la expresión de un gen en una muestra



problema con respecto a la expresión en la muestra control. Estos cambios se consideraron significativos cuando la expresión de los genes en la muestras se incrementaron al doble ( $F > 2$ ) o se redujeron la mitad ( $F < 0.5$ ) con respecto a la muestra control.

De los 12422 genes analizados se encontraron incrementos en la expresión de 33 genes (0.26% del total) a la dosis más baja (1 mg), de los cuales tan solo 24 (0.19%) presentaron cambios significativos. A la dosis más elevada (10 mg) el número de genes inducidos fue de 28 (0.22%) y de ellos solamente 22 transcritos (0.17%) mostraron cambios significativos.

En relación a los genes cuya expresión se vio inhibida por la ingesta del antioxidante, la dosis más baja ocasionó una reducción de la expresión de 288 genes (2.32% del total), aunque solamente 8 (0.06%) mostraron un cambio significativo. A la dosis más alta el número de genes inhibidos fueron 316 (2.54%) y solo 15 de ellos (0.12%) mostraron cambios significativos.

Entre todos los genes inducidos o inhibidos se seleccionaron aquellos para los que existe una función biológica conocida (tabla 5.5.1) y se dividieron en 5 categorías principales:

- Genes implicados en el metabolismo lipídico y sustancias relacionadas.
- Genes implicados en el metabolismo glucídico.
- Genes implicados en el transporte electrónico.
- Genes implicados en procesos inflamatorios, angiogénesis y coagulación sanguínea.
- Otros genes.

**Tabla 5.5.1. Genes inducidos o inhibidos en hígado de ratón tratado con 1 mg y 10 mg al día de HT frente al grupo control.**

Factor de cambio		Nombre del gen
1 mg	10 mg	
<b>METABOLISMO LIPÍDICO</b>		
0.66	0.76	Phosphatidylserine synthase
0.87	0.81	Low density lipoprotein receptor
0.76	0.81	Sterol regulatory element binding factor 1
0.61	0.54	Oxysterol binding protein-like 1A
0.71	0.61	ATP-binding cassette, subfamily A, member 1
0.71	0.61	Aldehyde dehydrogenase 9A1

Factor de cambio		Nombre del gen
1 mg	10 mg	
0.81	0.87	Fatty acid synthase
<b>NC</b>	<b>0.5*</b>	<b>Sterol-C5-desaturase</b>
NC	0.71	Cytochrome P450 7b1
NC	0.81	Elongation of very long chain fatty acids-like 2
NC	0.76	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
NC	0.76	Sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1
NC	0.81	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase
NC	0.76	2,4-dienoyl CoA reductase 1 mitochondrial
NC	0.61	Lysophospholipase 1
NC	0.81	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12
NC	0.71	Acetyl-CoA dehydrogenase, long chain
NC	0.76	Apolipoprotein B
NC	0.81	Paraoxonase 1
NC	0.81	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1
NC	0.81	Fatty acid binding protein 2, intestinal
<b>METABOLISMO GLUCIDICO</b>		
0.71	0.57	Dihydrolipoamide dehydrogenase
0.81	0.76	Glucokinase
0.71	0.71	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)
0.81	0.65	Succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit
0.76	0.76	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
NC	0.81	Malic enzyme supernatant
NC	0.71	Phosphoglycerate mutase 1
NC	0.76	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
<b>TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL</b>		
0.71	0.71	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2
0.81	0.81	Electron transferring flavoprotein, dehydrogenase

Factor de cambio		Nombre del gen
1 mg	10 mg	
0.81	0.61	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
NC	0.81	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting mitochondrial F1 complex, $\alpha$ subunit, isoform 1
NC	0.76	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
NC	0.57	Sarcosine dehydrogenase
NC	0.81	Ubiquinol-cytochrome c reductasa (6.4kD) subunit
<b>INFLAMACIÓN, COAGULACIÓN SANGUÍNEA, ANGIOGÉNESIS</b>		
<b>16*</b>	NC	<b>Thrombospondin 1</b>
0.65	<b>0.46*</b>	<b>CD1d1 antigen</b>
0.71	0.61	Cd47 antigen
0.61	<b>0.50*</b>	<b>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</b>
0.71	0.76	Plasminogen
0.71	0.61	Tissue factor pathway inhibitor 2
0.71	0.81	Complement component factor h
NC	0.76	Coagulation factor XIII, beta subunit
NC	0.65	Hemolytic complement
NC	0.81	Complement component 9
<b>OTROS GENES</b>		
<b>2.46*</b>	<b>2.46*</b>	<b>Aminolevulinic acid synthase 1</b>
<b>14.00*</b>	<b>13.00*</b>	<b>Calponin 2</b>
<b>2.00*</b>	<b>2.46*</b>	<b>Transgelin</b>
0.71	0.65	Peptidase 4
0.81	0.81	Betaine-homocysteine methyltransferase 2
0.81	0.76	Phenylalanine hydroxylase
NC	0.71	Ferritin light chain 1
1.87	NC	Hemoglobin alpha, adult chain 1
1.74	NC	Hemoglobin beta, adult major chain

*\* , Cambio significativo en el nivel de expresión de los genes respecto al grupo control (remarcados en negrita). (Factor de cambio >2 para los sobreexpresados, y <0.5 para los reprimidos). NC, no se detecta cambio en el nivel de expresión del gen con respecto al control a la concentración indicada.*

Los cambios más representativos fueron los siguientes:

- Aumento en la expresión del gen que codifica la trombospondina 1 en el grupo que recibió la dosis más baja. Esta proteína está implicada en la regulación de la angiogénesis y el crecimiento tumoral.
- Aumento importante en la expresión del gen que codifica la calponina 2 y en menor medida del transgelin a ambas dosis, estas proteínas están implicadas en la contracción muscular y la adhesión celular.
- Aumento a ambas dosis de la expresión del gen que codifica la ácido aminolevulinico sintasa 1, la enzima limitante en la síntesis del grupo hemo.
- Disminución de la expresión del gen de la esterol-C5-desaturasa, enzima que cataliza uno de los últimos pasos de la síntesis de colesterol a partir del latosterol.

# **6**

## *Discusión*



En esta Memoria Doctoral se ha llevado a cabo por primera vez el estudio de los efectos del hidroxitirosol purificado en un modelo animal de aterosclerosis, demostrando que este compuesto podría tener efectos beneficiosos sobre la enfermedad cardiovascular. Así mismo este trabajo ha sido pionero en la realización de estudios de absorción con el compuesto puro, aislado del aceite de oliva, evidenciando su presencia en plasma humano y poniendo de manifiesto la afinidad de este compuesto antioxidante por las lipoproteínas LDL tras su ingesta. Por último, se ha aplicado tecnología genómica para evaluar los posibles efectos del HT sobre la expresión génica en hígado de ratón.

Aunque son muchas las propiedades beneficiosas descritas para el HT y los compuestos fenólicos del aceite de oliva en modelos *in vitro*, son escasos los estudios que analizan los efectos de este compuesto *in vivo* y la mayoría de ellos han sido llevados a cabo con aceite de oliva virgen o aceites enriquecidos con extractos fenólicos. Una de las limitaciones de este trabajo ha sido la imposibilidad de encontrar suministradores de HT puro por lo que fue necesario desarrollar métodos de síntesis y purificación eficaces que permitieran la obtención de HT con un elevado grado de pureza y adecuado para su uso alimentario.

### **6.1. EFECTOS DEL HT SOBRE EL DESARROLLO DE LA ATEROSCLEROSIS**

Existen diversos modelos animales para el estudio de la aterosclerosis y la búsqueda de estrategias dirigidas a prevenir y limitar la progresión de esta enfermedad. El modelo experimental de aterosclerosis en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol presenta algunas ventajas como son el desarrollo de un tipo de lesión aterosclerótica similar a la producida en humanos, tener un periodo de inducción corto, ser fácil de manejar y tener un coste de mantenimiento reducido (Moghadasian, 2002). Los conejos son especialmente sensibles a desarrollar aterosclerosis cuando se les alimenta con una dieta rica en colesterol por que el hígado es incapaz de aumentar la excreción del mismo, lo que resulta en un aumento de la producción y secreción de lipoproteínas VLDL y LDL y una disminución en el número de receptores lipoproteícos. Todo ello ocasiona un exceso en la circulación sanguínea de estas lipoproteínas que conduce a una acumulación de las mismas y al desarrollo de una lesión aterosclerótica similar a la encontrada en humanos (Kolodgie et al., 1996).

En este estudio, la aterosclerosis fue inducida mediante una dieta aterogénica rica en grasa saturada y con 1.33% de colesterol (Aguilera et al., 2002) durante un mes. En este tiempo la dieta aterogénica produjo una dislipemia mixta severa que llevó al desarrollo inicial de una lesión aterosclerótica tal y como se ha descrito previamente por otros trabajos que utilizan este mismo

modelo (Ramírez-Tortosa et al., 1998; Aguilera et al., 2002). A continuación y durante un mes adicional, los animales fueron alimentados con diversas dietas exentas de colesterol y menor contenido en grasa saturada. Los efectos del HT se evaluaron tanto durante el primer mes, administrándose junto a la dieta aterogénica, como durante el segundo mes donde se estudiaron por separado los efectos ocasionados por del HT, que fue administrado junto con la dieta control rica en AGPI, y los producidos por el aceite de oliva virgen.

Un inconveniente de las condiciones experimentales del modelo fue la posible lesión hepática producida por la dieta aterogénica (Kolodgie et al., 1996; Schneider et al., 1999; Aguilera et al., 2003). Se ha descrito que el HT podría tener efectos beneficiosos en un modelo de toxicidad hepática en ratas (Casalino et al., 2002) y el aceite de oliva virgen también produjo un aumento de la defensa antioxidante hepática en conejos ateroscleróticos (de la Cruz et al., 2000; Aguilera et al., 2003). Los resultados derivados del estudio macroscópico mostraron que los hígados de los conejos a los que se administró HT presentaban un aspecto más parecido al de los conejos sanos que al del resto de los conejos ateroscleróticos, sin embargo, hubieran sido necesarios la determinación de marcadores específicos para demostrar un posible efecto hepatoprotector del HT pero esta investigación se centró en el estudio de los efectos a nivel cardiovascular del compuesto.

La influencia de los ácidos grasos procedentes de la dieta en el perfil de ácidos grasos del plasma y las lipoproteínas LDL ha sido descrita extensamente en literatura (Parthasaraty et al., 1990; Berry et al., 1992). El consumo de las distintas dietas por parte de los conejos produjo diferencias en el perfil de ácidos grasos del plasma entre los distintos grupos de experimentación en función de la composición lipídica de las mismas. Por consiguiente los animales que consumieron dieta C, enriquecida en aceite de girasol, obtuvieron los mayores porcentajes de ácido linoleico y AGPI, mientras que la dieta V, con aceite de oliva virgen, condujo a la mayor proporción de ácido oleico. Sin embargo también se observó que los animales alimentados con la dieta C (grupos C y CC), tenían los mayores porcentajes de AGS a pesar de su menor contenido en la dieta, mientras que los animales alimentados con la dieta aterogénica (grupos A y AA), rica en grasas saturadas y colesterol, contenían un porcentaje de AGMI mayor. El aumento de AGS producidos por una dieta rica en AGPI, así como el incremento en AGMI ocasionado por la dieta aterogénica ha sido descrito previamente en plasma (Ochoa et al., 2002) y tejido aórtico (De la Cruz et al., 2000b) usando este mismo modelo animal. Una posible explicación para este fenómeno es la adaptación del organismo mediante mecanismos compensatorios para controlar la fluidez de la membrana. Así los AGPI podrían inducir la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Perona et al., 2004b) y disminuir la actividad de el enzima delta-9 desaturasa (Seiquer et al., 1994; Mataix et al., 1998) aumentando de esta forma el contenido de AGS, cuyo uso evitaría también el empleo de PUFA para su oxidación permitiendo su empleo para otras funciones. Por otra parte, el consumo de una dieta rica en grasa saturada y colesterol, podría aumentar la actividad del enzima delta-9-desaturasa, con el fin de



generar más AGMI que aumentaran la fluidez de la membrana y favorecieran el transporte del exceso de colesterol (Sivaramakrishnan y Pynadath, 1982; Garg et al., 1988). La delta-9-desaturasa es una enzima clave en la regulación de la fluidez de las membranas y en el metabolismo lipídico y es la encargada de transformar los AGS en AGMI. El ácido oleico es el sustrato preferido de la Acil-CoA colesterol aciltransferasa, la enzima responsable de la esterificación del colesterol. Esta esterificación previene la acumulación de colesterol libre en el hígado y aumenta la disponibilidad de colesterol esterificado para su transporte en forma de VLDL (Ntambi, 1999). Estos mecanismos podrían explicar el porcentaje superior de AGS en el plasma obtenido en los animales de los grupos C y CC, así como de AGMI en los grupos A y AA. No se observaron diferencias en el perfil de ácidos grasos del plasma cuando el HT fue administrado con la dieta aterogénica. Sin embargo, cuando se administró con la dieta control, el HT produjo diferencias significativas en la proporción relativa de AGMI en el plasma que igualmente podrían tener su origen en la regulación de la delta-9 desaturasa (Ntambi 1999) si bien estos cambios fueron relativamente pequeños y podría tener poca relevancia nutricional.

La administración de HT no produjo ningún efecto sobre los lípidos sanguíneos en el contexto de una dieta aterogénica (grupo H vs. A). Sin embargo cuando se administró junto a una dieta control a los conejos ateroscleróticos (grupo AH) los efectos fueron notables. Así la concentración de triglicéridos fue un 48% menor, llegando incluso a alcanzar los valores obtenidos en los controles sanos, el colesterol total se redujo un 42% y la concentración de HDL-colesterol se duplicó con respecto al grupo AC alimentado con las mismas dietas pero que no recibió el compuesto.

Los estudios de intervención realizados en humanos con aceite de oliva virgen proporcionan resultados contradictorios en cuanto a los efectos sobre los lípidos plasmáticos. Un aumento de los TG fue observado por Ramirez-Tortosa et al. (1999) y Gimeno et al. (2002) tras el consumo de aceite de oliva virgen comparado con un aceite de oliva refinado, mientras que Visioli et al., (2004) encontraron una tendencia no significativa a la disminución de las concentraciones plasmáticas de TG. También se ha descrito en humanos una disminución en la concentración de LDL-colesterol (Fito et al., 2001; Gimeno et al., 2002) y un aumento significativo de HDL-colesterol tras la ingesta de aceite de oliva virgen (Weinbrenner et al., 2004a, Marrugat et al., 2004). En animales de experimentación, Wiseman et al. (1996) no encontraron efectos cuando estos compuestos formaban parte de una dieta con un alto contenido en grasa (40% energía). Tampoco otros antioxidantes mostraron efectos positivos cuando se administraron junto con una dieta aterogénica. (Wilson et al., 1996, Chen et al., 1999). Sin embargo, la oleuropeina, que al hidrolizarse libera HT, administrada con una dieta estándar conteniendo aceite de oliva produjo una disminución del 15% en el CT en conejos (Coni et al., 2000). En otro estudio empleando dietas con aceites de oliva de elevado contenido en compuestos fenólicos, también observaron resultados positivos sobre el

perfil lipídico en ratas, incluyendo un aumento significativo de HDL, una disminución de la razón de colesterol LDL/HDL y una tendencia no significativa a reducir los TG (Mangas Cruz et al., 2001). Existen antecedentes de efectos hipolipemiantes de antioxidantes fenólicos procedentes de frutas y verduras en otros modelos animales de aterosclerosis (Yugarani et al., 1992; Kirk et al., 1998; Gorinstein et al., 1998). Estudios realizados sobre células hepáticas e intestinales han atribuido dichos efectos a una disminución del ensamblaje y la secreción de lipoproteínas VLDL y LDL (Borradaile et al., 1999; Yee et al., 2002; Pal et al., 2003; Vidal et al., 2005). De hecho, se ha descrito que el estado oxidativo del hígado puede influenciar en la función hepática en procesos como la síntesis de lipoproteínas por lo que un mecanismo antioxidante no puede excluirse (Botham et al., 2003). Los compuestos fenólicos presentes en el té verde redujeron los lípidos sanguíneos mediante una disminución en la solubilización del colesterol en el tracto digestivo y un aumento en la excreción de sales biliares y colesterol en modelos animales. (Chan et al., 1999; Yang y Koo 2000; Raederstorff et al., 2003). Krzeminski et al. (2003) observaron un efecto hipocolesterolémico del aceite de oliva virgen en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol que se relacionó con una mayor excreción fecal de colesterol y sales biliares. Los resultados del estudio de expresión génica muestran que otro posible mecanismo podría ser la inhibición de la síntesis de colesterol que se discutirá más adelante.

El aumento en el colesterol HDL en los conejos que ingirieron HT podría haber contribuido a las reducciones de la lesión aterosclerótica encontrada en este estudio. Las HDL podrían proteger contra el desarrollo de la aterosclerosis mediante varios mecanismos: por un lado recogen el exceso de colesterol y peróxidos lipídicos de las células y de la LDL y por otra parte poseen actividades antiinflamatorias y antioxidantes. (Barter et al., 2004). Este efecto antioxidante de las HDL puede deberse a que estas lipoproteínas se encuentran en plasma asociadas a la enzima paraxonasa (Mackness et al., 2000). Se ha descrito que esta enzima es muy susceptible a la inactivación por oxidación y su actividad disminuye en presencia de lípidos oxidados y LDLox (Aviram et al., 1999). Sin embargo, algunos antioxidantes fenólicos procedentes de la dieta, como la quercetina y glabridina, fueron capaces de prevenir esta pérdida de actividad (Aviram et al., 1999). Por otra parte el consumo de un zumo de granada, rico en polifenoles y antioxidantes, aumentó la actividad de la paraxonasa en 20% tanto en ratones ApoE como en humanos (Kaplan et al., 2001) y los polifenoles del vino también aumentaron la actividad de este enzima en ratones (Hayek et al., 1997).

Las especies reactivas del oxígeno están implicadas en los procesos de iniciación y desarrollo de la aterosclerosis (Berliner, 2002). Se ha descrito que dietas ricas en lípidos y colesterol promueven la producción de radicales libres de oxígeno, elevan los peróxidos plasmáticos y aumentan la susceptibilidad de las lipoproteínas a la oxidación (Ursini et al., 1999). El organismo posee toda

una serie de sistemas antioxidantes no enzimáticos (vitamina E y C, ceruloplasmina, albúmina) y enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa), que protegen frente a la acción de tales especies (Halliwell y Gutteridge, 1999). Por otra parte no existe un claro consenso respecto a cuales son los marcadores del estado de oxidación del organismo que deben ser empleados para evaluar los efectos de compuestos antioxidantes (Meagher y Rader, 2001). Si bien, la capacidad antioxidante total del plasma (CAO) proporciona una determinación global poco específica del estado antioxidante general, la determinación del malondialdehído por cromatografía líquida se considera como uno de los marcadores más aceptados en lo que se refiere a peroxidación lipídica (Moore y Roberts 1998).

Los resultados del modelo de aterosclerosis en conejos mostraron que la dieta aterogénica produjo una drástica disminución en la CAO y un aumento de la peroxidación lipídica medida como MDA. La administración de HT en esta primera etapa inhibió parcialmente la pérdida de CAO pero no afectó a las concentraciones plasmáticas de MDA. Durante el segundo mes de estudio, el consumo de las dietas no aterogénicas normalizaron la CAO del plasma de los conejos aterogénicos y redujeron a la mitad la concentración de MDA. La administración de HT durante este periodo produjo un aumento del 30% en el valor de CAO del plasma y redujo significativamente la concentración de MDA en los conejos ateroscleróticos. El efecto antioxidante del HT ha sido demostrado en multitud de estudios *in vitro* e *in vivo* (Manna et al., 1999). Entre los mecanismos antioxidantes del HT se incluyen la capacidad del HT de captar radicales libres de oxígeno, actuar como aceptor final en las reacciones de oxidación en cadena o de secuestrar metales de transición iniciadores de reacciones de peroxidación lipídica (Aeschbach et al., 1994).

Los efectos de las diferentes dietas y del HT se estudiaron en secciones de cayado aórtico por ser esta una de las zonas preferentes de desarrollo de la lesión aterosclerótica (Moghadasian, 2002). El HT produjo una clara reducción en el área total de la aorta y en el área de la capa íntima, así como un menor grado de avance de la lesión en comparación con los grupos que consumieron las mismas dietas pero sin el aporte de HT (grupo H vs. A y AH vs. AC). Una tendencia no significativa en este sentido también fue observada con la dieta de aceite de oliva virgen, aunque la cantidad de HT aportado en esta dieta fue aproximadamente 10 veces inferior al HT que el que se administró a los grupos AH y H. Estudios previos usando este mismo modelo animal mostraron reducciones en la lesión aterosclerótica de los animales que consumieron un aceite de oliva virgen comparado con otros tipos de aceites (Mortensen et al., 1998; de la Cruz et al., 2000; Coni et al., 2000; Aguilera et al., 2002) pero de nuevo en estos casos no distinguió entre los efectos derivados de los compuestos fenólicos de los ocasionados por los AGMI presentes en el aceite de oliva. En este estudio, se evaluaron por separado los efectos producidos por el HT y por el aceite de oliva virgen. En este caso el HT fue administrado junto a una dieta rica en grasa saturada y colesterol (grupo H) y junto a una dieta de continuación rica en AGPI (grupo AH).

Se ha descrito que la dieta aterogénica produce un fenotipo inflamatorio y una disfunción endotelial en la aorta de los conejos aterogénicos (Scalia et al., 1998). El factor nuclear-  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) es un factor de transcripción que se activa en respuesta a múltiples estímulos entre los que se encuentra la LDLox, el estrés oxidativo, la hiperglucemia, etc (de Martin et al., 2000) a través del cual se activan genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria como interleuquinas, factores de crecimiento y citoquinas contribuyendo de este modo al desarrollo del proceso aterosclerótico (Pahl, 1999). Un trabajo reciente compara los efectos a nivel postprandial de una dieta rica en AGS con otra con aceite de oliva encontrando que los AGS pueden producir un aumento en la expresión de genes inflamatorios a través de la activación del NF- $\kappa\beta$ , pero este efecto no fue observado en el caso de una dieta de aceite de oliva rica en AGMI (Bellido et al., 2004). También se ha descrito que los compuestos fenólicos del aceite de oliva pueden inhibir la activación endotelial posiblemente a través de una modulación de diferentes factores de transcripción, principalmente NF- $\kappa\beta$  (Carluccio et al., 2003). El menor desarrollo de la lesión aterosclerótica en ambos grupos indica claramente un efecto beneficioso del HT independiente del que podría tener el ácido oleico del aceite de oliva. Además de las mejoras en el perfil lipídico y del estado oxidativo observado en los animales a los que se administró HT, otras propiedades del HT que podrían explicar este menor grado de desarrollo de la lesión aterosclerótica, entre los que se incluyen: protección frente a la oxidación de lipoproteínas LDL (Visioli et al., 1995; Salami et al., 1995, Covas et al., 2000), la mejora de la defensa antioxidante (Vissers et al., 2004), la actividad antiinflamatoria (della Ragione et al., 2000), la reducción de la captación de LDL oxidada por macrófagos (Ramírez-Tortosa 1999), la actividad antiagregante plaquetaria (Petroni et al., 1995) o una modificación del tamaño de la partícula de LDL haciéndola menos aterogénica (Coni et al., 2000).

Pocos trabajos en modelos animales han mostrado un efecto sobre los lípidos sanguíneos con la administración de antioxidantes pero sí que en la mayoría de los casos se ha observado una mejora en los parámetros antioxidantes del plasma, hígado o aorta acompañados de un menor grado de lesión en las arterias. La relación entre la actividad antioxidante de determinados compuestos y la protección que ejercen los mismos sobre la aterosclerosis refuerza la teoría de la oxidación de la LDL como proceso esencial en el desarrollo de la aterosclerosis y pudiendo su inhibición resultar beneficiosa en la progresión de la enfermedad. (Steinberg et al., 1989; Berliner y Heinecke, 1996). Por ello en esta memoria doctoral se ha estudiado el efecto del HT y su posible afinidad a las lipoproteínas LDL en voluntarios humanos.

## **6.2. ABSORCIÓN DEL HT EN ANIMALES Y EN HUMANOS.**

Los resultados obtenidos en el estudio del modelo de ECV en conejos indicaron que el HT podría tener propiedades cardiovasculares beneficiosas y por lo tanto, entre otras aplicaciones, podría ser

empleado como un ingrediente funcional en la elaboración de alimentos enriquecidos. En este sentido nuestra investigación se dirigió hacia el estudio de la absorción oral del compuesto así como su metabolismo en modelos animales y en sujetos humanos.

Hasta la fecha se han encontrado 9 trabajos publicados que analizan la absorción del HT o compuestos fenólicos del aceite de oliva en humanos (Visioli et al., 2000b; Bonanome et al., 2000; Miro-Casas et al., 2001a, Miro-Casas et al., 2001b; Caruso et al., 2001; Vissers et al. 2002; Miro-Casas et al., 2003; Visioli et al., 2004; Weinbrenner et al., 2004b). Todos estos trabajos de investigación fueron realizados con aceite de oliva virgen o aceites enriquecidos en compuestos fenólicos pero nunca con HT purificado. Una de las limitaciones de estos estudios fue la estimación de la cantidad total de HT suministrado ya que el aceite de oliva contiene otros compuestos, como son la oleuropeina, oleuropeina aglicon o acetato de HT (Brenes et al., 1999), que al hidrolizarse liberan cantidades adicionales de HT. Por otra parte, la mayoría de estos trabajos estudiaron la presencia de HT en orina y solo uno de ellos (Miro-Casas et al., 2003) determinó la concentración HT en plasma. En animales se han encontrado 6 estudios que analizaron la absorción oral de HT tanto en plasma como en orina (Bai et al., 1998; Coni et al., 2000; Tuck et al., 2001; Visioli et al., 2001; Del Boccio et al., 2003; Christian et al, 2004) y otros dos que estudiaron el metabolismo del HT tras su administración intravenosa empleando compuestos marcados radiactivamente (D'Angelo et al., 2001; Tuck et al., 2002).

El estudio de absorción presentado en esta Memoria Doctoral es el primer estudio en humanos que evalúa la biodisponibilidad del HT aislado, con una elevada pureza y administrado en disolución acuosa sin la intervención de otros nutrientes. Este estudio evaluó además la presencia en plasma de este compuesto y sus metabolitos mediante un método de análisis optimizado que permitió calcular las principales constantes farmacocinéticas obtenidos a partir de la curva de concentración plasmática en función del tiempo que fueron: la concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ), el tiempo al que se alcanzó la concentración máxima ( $T_{max}$ ), el tiempo de vida media en plasma ( $t_{1/2}$ ) y el área bajo la curva de absorción (AUC) (Flórez, 1997). Así mismo se estudió la excreción urinaria del HT y los efectos antioxidantes producidos por el consumo de una dosis única de HT. Antes del estudio en humanos se realizó un estudio empleando animales de experimentación que proporcionó un conocimiento previo de la absorción del compuesto y facilitó la selección de los tiempos más apropiados para la determinaciones plasmáticas.

Los resultados mostrados en esta Tesis indicaron que tanto en ratones como en humanos la absorción del HT puro en solución acuosa fue muy rápida originando un pico de concentración plasmática a los pocos minutos de su administración oral. Teniendo en cuenta la cantidad de HT administrada, la  $C_{max}$  de HT obtenida en el plasma de ratas (0.34 mg/L al administrar una dosis de 15 mg de HT/Kg) fue similar a la obtenida previamente por Bai et al. (1998) (1.877 mg/L tras la

administración de 55 mg de HT/Kg) que en ambos casos se alcanzó a los 10 minutos. En humanos sin embargo, solo existe referencia de la concentración plasmática de HT cuando se consumió aceite de oliva virgen y mostró un perfil de absorción bastante diferente al obtenido en nuestro estudio. Mientras que la administración de HT en disolución acuosa produjo un pico prominente de concentración plasmática a los 10 minutos, el consumo de aceite de oliva produjo una curva de absorción más mantenida, con concentraciones máximas a los 32 minutos y con un tiempo de vida media mayor (Miro-Casas et al., 2003). Considerando que el aporte de HT por el aceite de oliva fue mucho menor que el administrado en el presente estudio, la  $C_{max}$  y el AUC de HT obtenida por el consumo de aceite fue relativamente mayor. En un estudio llevado a cabo en ratas (Tuck et al., 2001) se observó que la absorción de este compuesto cuando se administraba disuelto en agua era un 25% menor que cuando se administraba disuelto en aceite. Estas diferencias podrían también explicarse por a una subestimación de la cantidad de HT ingerida, por las razones anteriormente mencionadas. Se ha descrito que la absorción del HT tiene lugar preferentemente en el intestino delgado y en el colon (Vissers et al., 2002). En el estudio presentado en esta Memoria Doctoral el HT se administró en disolución acuosa y en ayunas por lo que el compuesto alcanzaría rápidamente a los lugares de absorción. La administración de HT en aceite de oliva podría haber retrasado el  $T_{max}$  posiblemente debido al proceso de digestión de la grasa y el retraso que experimenta el vaciado gástrico. Aún así, la absorción del HT fue muy rápida comparada con la de otros compuestos fenólicos (Mannach et al., 2005).

La estructura simple y el carácter anfipático de este compuesto sugiere que el compuesto podría atravesar fácilmente las membranas celulares. En efecto, en un estudio realizado en un modelo de transporte intestinal con células caco-2 se observó que el transporte de HT era muy rápido, no saturable, bidireccional y no era inhibido por la presencia de compuestos de estructura similar que pudieran actuar como posibles inhibidores competitivos de sistemas de transporte, indicando que la absorción del HT podría tener lugar por difusión pasiva (Manna et al., 2000).

Los resultados de AUC obtenidos en los distintos voluntarios del estudio mostraron que la absorción del compuesto tenía una amplia variabilidad interindividual que también fue encontrada, aunque en menor medida, en otros trabajos anteriores (Visioli et al., 2000b; Miro-Casas et al., 2001a; Miro-Casas et al., 2003). Esta variabilidad puede ser debida al importante metabolismo de primer paso que, como indicaron los resultados de este y otros estudios, sufre el HT durante su absorción. Este fenómeno de primer paso en el metabolismo del HT fue mayor en ratas donde además del HT, a los 5 minutos de la ingesta se detectaron 3 metabolitos adicionales distintos: El HvOH, el HvAc y el DHPA. Todos estos compuestos habían sido identificados previamente por otros autores en plasma (D'Angelo et al., 2001) y orina de ratas (Tuck et al., 2001). En humanos, el HvOH también apareció inmediatamente en plasma pero no se detectaron los compuestos ácidos (HvAc y DHPA). La incubación del plasma con glucuronidasa o con sulfatasa no aumentó la

cantidad detectada en el plasma por lo que podemos decir que estos compuestos no se encontraban conjugados en el plasma o se encontraban en cantidades muy reducidas en relación a las formas libres. El HvOH también se detectó en plasma humano en el estudio publicado por Miro-Casas et al. (2003), salvo que en este caso la presencia de ambos compuestos (HT y HvOH) en plasma solo se observó tras la hidrólisis ácida o enzimática del plasma y no se encontraron sus formas libres. Esta diferencia podría tener su explicación en una saturación de los enzimas de conjugación implicados producida en nuestro estudio llevado a cabo con una dosis más elevada (Manach et al., 2004). Si se tienen en cuenta todos los compuestos derivados del HT, la cantidad de HT absorbida estimada a partir de las concentraciones plasmáticas en ratas fue mayor que en humanos (46% y 9.4%, respectivamente), pero esta relación se invierte si considera sólo la cantidad de HT del plasma (0.59% y 6.2%, respectivamente). Estas diferencias entre ratas y humanos en la absorción del HT fue observada también por Visioli et al. (2003) y puede deberse a diferencias en los enzimas implicados en el metabolismo de este compuesto entre las especies (White y Wu, 1975). La aparición inmediata de los metabolitos del HT sugiere que el metabolismo del HT pudo comenzar durante su absorción en las propias células intestinales probablemente por la acción de la enzima catecol-ortometil-transferasa (COMT) (Manna et al., 2001). La COMT esta presente en todas las células del organismo y juega un papel fundamental en el metabolismo de catecolaminas endógenas en el cerebro. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-metionina a los compuestos fenólicos que tengan una estructura o-difenólica en su molécula (Zhu, 2002). Por acción de este enzima el HT incorpora un grupo metilo en el hidroxilo situado en posición 3 del HT originando HvOH. El DHPA y el HvAc son el resultado de la oxidación del grupo etanólico del HT y del HvAc, respectivamente, posiblemente por las enzimas alcohol-deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa (D'Angelo et al., 2001). Estos compuestos ácidos no se detectaron en el plasma de los voluntarios humanos pero si en la orina indicando que las rutas de transformación metabólica no fueron tan diferentes entre ratas y humanos. Aún así no podemos descartar la presencia de estos compuestos en plasma de los voluntarios ya que el método de análisis empleado en este estudio (CG-EM) tiene unos límites de detención superiores a 100 µM para el HvAc y el DHPA en el plasma humano.

Este metabolismo rápido del HT podría sugerir en un primer momento una pérdida de actividad del compuesto. Sin embargo, cuando se analizaron las capacidades antioxidantes de los metabolitos procedentes del HT se encontró que todos ellos tenían una CAO similar o mayor que la del propio HT, ya descrita en (Tuck et al. 2002), por lo que los metabolitos también podrían ejercer un efecto antioxidante y contribuir al efecto global del HT observado en el modelo experimental de aterosclerosis en conejos. Algunas de las propiedades descritas *in vitro* para el HT también se han observado para algunos de sus metabolitos. Así, el DHPA fue capaz de inhibir el crecimiento e inducir la apoptosis de células cancerosas HL60 (leucemia promielocítica) (Ragione et al., 2000). Además se ha descrito que los compuestos fenólicos también podrían tener un efecto indirecto al

utilizar las mismas rutas metabólicas que varios xenobioticos u hormonas endógenas (Manach et al., 2004). Se ha sugerido que el HT puede ser mejor sustrato para la COMT que algunos de los compuestos endógenos, catecolaminas y estrógenos (Manna et al., 2000). La regulación de las reacciones de metilación de estos compuestos, que actúan como neurotransmisores y hormonas, tienen una importante función en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, algunas enfermedades neurodegenerativas como el alzheimer y el cancer. Por lo tanto el HT podría tener un efecto beneficioso indirecto en estas patologías a través de la inhibición competitiva de la actividad de la COMT (Zhu, 2002).

En la orina de los voluntarios humanos se detectaron, además de las formas libres del HT, el HvOH, el HvAc y el DHPA, las formas conjugadas con glucurónico y sulfato de estos mismos compuestos. De nuevo se encontró una gran variabilidad en cuanto a las formas de eliminación urinaria entre los distintos voluntarios. La metilación, la oxidación y la conjugación son elementos comunes en el metabolismo de los compuestos fenólicos. La conjugación con glucurónico puede tener lugar en células de la mucosa intestinal por parte de una subfamilia de enzimas UDP-glucuronidasas (Spencer et al., 1999) que poseen un amplio patrón de expresión polimórfica, resultando en una amplia variabilidad interindividual (Boersma et al., 2002). En el hígado estos compuestos pueden transformarse de nuevo (Mannach et al., 2004): por una parte pueden metilarse y por otra pueden perder el glucurónido y se conjugarse con sulfato. (O'Leary et al., 2003). La actividad de estas enzimas dependen de la naturaleza del compuesto fenólico y de la dosis administrada y puede estar influenciada por circunstancias fisiológicas y polimorfismos genéticos que conducen a importantes diferencias interindividuales en la capacidad de metabolizar los compuestos fenólicos. (Manach et al., 2004). Todo ello contribuiría a explicar la alta variabilidad encontrada en este estudio.

La cantidad total de HT absorbida, calculada como la suma de todas sus formas metabólicas detectada en orina humana de 24 horas, fue del  $7.45 \pm 3.27\%$  de la cantidad administrada. Este valor fue ligeramente inferior al porcentaje de absorción teórico estimado a partir de las concentraciones plasmáticas ( $9.4 \pm 1.8\%$ , considerando también al HvOH), que podría explicarse si consideramos que la orina podría no ser la única vía de excreción de los metabolitos de HT (D'Angelo et al., 2001). Por otra parte, el porcentaje de recuperación urinaria fue menor que los encontrados en otros trabajos donde se utiliza aceite de oliva virgen: 29 - 64% en et al., 2000b; 72% en Miro-Casas et al., 2001; 28% en Caruso et al., 2001, 44% en Visioli et al., 2004. De nuevo estas diferencias observadas en los porcentajes de recuperación urinaria podrían explicarse por una mayor absorción del compuesto cuando es administrado en una matriz alimentaria oleosa (Tuck et al., 2001) o por una subestimación de la cantidad de HT suministrada por el aceite de oliva. La hidrólisis de la oleuropeína y de otros precursores del HT contenidos en el aceite de oliva podría tener lugar durante la digestión, en el estómago, el intestino o por las bacterias del colon, o



también podrían ser absorbidos como tales y ser hidrolizados en el organismo por las propias células intestinales, sanguíneas o hepáticas, liberando el HT. (Vissers et al., 2002). Es posible también que alguno de estos compuestos se absorba en mayor proporción que el propio HT. En este sentido, en un estudio realizado en sujetos con ileostomía se encontró que la oleuropeína era más estable en el contenido intestinal que el HT por lo tanto podría ser que la fracción disponible de oleuropeína que llegase a los lugares de absorción fuera mayor (Vissers et al., 2002). Además se ha descrito que algunos compuestos fenólicos como la quercetina son absorbidos en mayor proporción cuando se encuentran en forma de glucósidos que cuando se encuentran en forma libre (Hollman et al., 1995). La presencia de oleuropeína en el plasma de conejos (Coni et al., 2000) y de ratas (Del Boccio et al., 2003) indica que la oleuropeína puede ser absorbida como tal. Además, en este trabajo el metabolito más abundante procedente de la oleuropeína detectado en orina fue el HT (Del Boccio et al., 2003). En un trabajo llevado a cabo por Visioli et al. (2003) se observó que cuando la administración de HT no se llevó a cabo en del aceite de oliva virgen, el porcentaje de la cantidad de HT administrada que se recuperó en orina de 24 horas fue bastante menor: un 5.8% para un yogurt con HT y de 6.7% en el caso de un aceite de oliva refinado adicionado de un extracto de compuestos fenólicos. Estos valores son más similares a los encontrados en nuestro estudio y a los obtenidos con otros compuestos fenólicos (Manach et al., 2005).

La administración de una sola ingesta de HT no produjo cambios significativos en la concentración de peróxidos en plasma ni en la oxidabilidad de la LDL durante las dos horas posteriores a su consumo. Otros autores que analizaron los efectos a nivel postprandial de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen tampoco encontraron cambios en los marcadores de estrés oxidativo (Weinbrenner et al., 2004a) o en marcadores de peroxidación lipídica de LDL a las pocas horas de la ingesta de aceite de oliva virgen (Fito et al., 2002; Gimeno et al., 2002). Sin embargo, trascurridas 24 horas después de la administración, sí se observaron efectos antioxidantes tales como un aumento significativo del "lagtime" de LDL (Gimeno et al., 2002) y una disminución en la excreción de 8-isoprostano en orina de 24 horas que fue proporcional al contenido de compuestos fenólicos del aceite ingerido (Visioli et al., 2000a). Tampoco otros compuestos fenólicos que han mostrado actividad protectora frente a la oxidación de la LDL *in vitro* mostraron efectos positivos *in vivo* justo después de su consumo, a pesar de que fueron absorbidos (Abu-Amsa Caccetta et al., 2000)

En función de estos resultados podemos decir que cuando el HT fue administrado en disolución acuosa tuvo una absorción efectiva y rápida pero mostró un importante metabolismo de primer paso y sus concentraciones plasmáticas descendieron rápidamente. Dado que la incorporación del compuesto en una matriz alimentaria podría modificar su perfil de absorción serían necesarios nuevos estudios en el alimento final.

### 6.3. ASOCIACIÓN DEL HIDROXITIROSO A LA LDL *IN VIVO*.

Uno hallazgo interesante obtenido en esta Tesis es el descubrimiento de una afinidad específica del HT a las lipoproteínas LDL humanas.

Los resultados presentados en esta Memoria Doctoral muestran como el HT presente en el plasma humano después de su consumo, se distribuyó en el gradiente de densidad de lipoproteínas plasmáticas obtenido localizándose preferentemente en el grupo de fracciones del gradiente que contenían las LDL ( $51.7 \pm 5.7\%$  a los 10 minutos y  $61.4 \pm 8.8\%$  a los 20 minutos respecto a la cantidad total detectada en todas las fracciones). Sin embargo, en los gradientes control que no contenían lipoproteínas plasmáticas, el HT permaneció en el fondo del tubo resultante del gradiente de densidad. Los resultados mostraron además que esta unión fue transitoria ya que a medida que disminuyó la concentración plasmática de HT también disminuyó la cantidad de HT presente en la fracción de LDL. Si bien se detectó la presencia de HvOH en el plasma humano, este no se detectó en ninguna de las fracciones de lipoproteínas. Aunque el HvOH posee una actividad antioxidante similar a la del HT no ha encontrado ningún estudio que ponga de manifiesto un efecto protector de este compuesto sobre la oxidación de las LDL. Un problema que se planteó al demostrar esta posible asociación *in vivo* a partir de la ingesta de HT fue que la purificación de las lipoproteínas LDL requiere usualmente de un paso final de diálisis para eliminar la gran cantidad de sales añadidas para generar el gradiente. Nuestro laboratorio comprobó que durante el paso final diálisis el HT difundía a través de las membranas por lo que se eliminaba en los sucesivos cambios de tampón de diálisis. Esta puede ser la causa de que no se observaran cambios en la resistencia a la oxidación o "lagtime" de las LDL aisladas en nuestro estudio de absorción, así como el hecho de que otros estudios anteriores no encontraron afinidad *in vivo* ni cambios en la oxidabilidad de las lipoproteínas aisladas (Bonanome et al., 2000).

Se ha descrito que la oxidación de las LDL tiene un papel central en la patología de la aterosclerosis y la ECV. Cuando la LDL se modifica, principalmente por oxidación, se produce un cambio en la estructura de la apoB100 que puede ocasionar la alteración de los lugares de reconocimiento de los receptores, por lo que estas LDL oxidadas (LDL<sub>ox</sub>) son captadas por los receptores "scavenger" de los macrófagos de forma no controlada dando lugar a la formación de células espumosas, cargadas de lípidos, que se acumulan en la intima arterial (Berliner et al, 1996; Lusis, 2000). Además se ha descrito que la LDL<sub>ox</sub> puede tener funciones no solo en el inicio sino en todas las etapas del proceso aterosclerótico ya que entre los efectos ocasionados por las LDL<sub>ox</sub> se encuentran la alteración de la función endotelial, la atracción de monocitos y linfocitos al endotelio, actividad proinflamatoria y citotóxica y el aumento de las señales e intermediarios de la coagulación (Witztum y Steinberg 2001). Esta teoría oxidativa de la aterosclerosis es una de las más aceptadas y de ahí el creciente interés por los antioxidantes en la prevención de ECV.

El HT es un antioxidante natural con una elevada actividad captadora de radicales libres (Aeschbach et al., 1994; Visioli et al., 1998; De la Puerta et al., 1999). Numerosos trabajos de investigación han demostrado, *in vitro* e *in vivo*, que el HT ejerce un efecto protector frente a la oxidación de las LDL. Así, el HT previno la oxidación de vitamina E, inhibió la peroxidación lipídica, redujo la modificación de la ApoB100 y prolongó la duración del “lagtime” de la LDL ocasionados por iones Cu *in vitro*. (Visioli et al., 1995; Salami et al., 1995). En conejos, el consumo de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos originó un aumento de la resistencia a la oxidación de la LDL *ex vivo* (Wiseman 1996) y a un aumento en el contenido de antioxidantes de esta lipoproteína, como la vitamina E o el coenzima Q (Ochoa et al., 2002). En estudios de intervención en humanos también se ha observado una disminución de la susceptibilidad a la oxidación de la LDL (Ramírez Tortosa et al., 1999 ; Masella et al., 2001; Fito et al., 2001; Gimeno et al., 2002, Marrugat et al., 2004), un aumento de los antioxidantes de esta lipoproteína (Gimeno et al., 2002) o una disminución de la LDLox en plasma (Weinbrenner et al., 2004a, Marrugat et al., 2004) comparando el consumo de aceite de oliva virgen con un aceite de oliva refinado u otros tipos de aceites de similar perfil de ácidos grasos. Estos efectos protectores sobre las lipoproteínas LDL sugirieron de forma indirecta una posible afinidad del HT y de los compuestos fenólicos por las lipoproteínas LDL.

La unión de los compuestos fenólicos del aceite de oliva a las lipoproteínas ya había sido investigada “*ex vivo*” por Covas et al. (2000) que puso de manifiesto la presencia de compuestos fenólicos en la LDL aislada de plasma incubado con un extracto etanólico de aceite de oliva. El contenido de estos compuestos en la fracción LDL fue proporcional a la cantidad añadida en plasma y produjeron un aumento de la resistencia de esta lipoproteína a la oxidación por cobre (“lagtime”). En este caso, la LDL fue purificada para el estudio de “lagtime” por medio de una columna de exclusión aunque no especifica si la determinación de compuestos fenólicos se llevó a cabo antes o después de la misma. Bonanome et al. (2000) también detectó a nivel postprandial compuestos fenólicos, fundamentalmente tirosol, en las lipoproteínas plasmáticas de voluntarios que ingirieron aceite de oliva virgen. Este estudio no fue capaz de establecer una afinidad específica por ninguna de las lipoproteínas plasmáticas posiblemente debido a la eliminación del HT en el paso de diálisis. Recientemente Lamuela-Raventós et al. (2004) encontró un aumento en el contenido de compuestos fenólicos en las LDL después de una semana de consumo de aceite de oliva. En este trabajo también se empleó un método de purificación en columna de las lipoproteínas. A pesar de ello, al igual que en los casos anteriores, el método de análisis fue inespecífico ya que cuantificaba compuestos fenólicos totales y solamente se identificaron quercetina y rutin (Lamuela-Raventós et al., 1999), compuestos que pueden estar presentes también en frutas, vegetales o vino tinto (Manach et al., 2004). Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en el contenido de compuestos fenólicos de la LDL a nivel postprandial entre

dos y ocho horas después de la ingesta del aceite de oliva. Esto podría ser debido a que, como se ha mencionado con anterioridad, la absorción y el metabolismo del HT ocurre de forma rápida y además la ingesta de aceite de oliva pudo no proporcionar cantidades suficientes de HT en plasma para poder ser detectado en la LDL. (Miró-Casas et al., 2003).

Los efectos y la localización del HT fue estudiado en un modelo de liposomas (Paiva-Martins et al., 2003). Cantidades micromolares de HT (0.75  $\mu\text{M}$ ) adicionadas a los liposomas prolongaron el tiempo peroxidación lipídica ("lagtime") inducida por AAPH, un compuesto que genera radicales libres de oxígeno en la fase acuosa. Este efecto protector fue mayor en combinación con  $\alpha$ -tocoferol y vitamina C. Debido a su lipofilia, el  $\alpha$ -tocoferol se situó en el interior de las membranas fosfolípicas, mientras que el HT y la vitamina C se localizaron en su superficie. La vitamina C y sobre todo el  $\alpha$ -tocoferol son antioxidantes endógenos que pueden proteger de la oxidación a las lipoproteínas LDL (Stocker et al., 1991; Esterbauer et al., 1992a). Se ha descrito que los radicales libres de oxígeno son generados en las lesiones ateroscleróticas por los sistemas celulares y enzimáticos y podrían ser responsables de la oxidación de la LDL *in vivo* (Berliner y Heinecke, 1996). Estos radicales libres de oxígeno actuarían desde la fase acuosa iniciando las reacciones de peroxidación lipídica de los fosfolípidos de la superficie de la lipoproteína (Terao et al., 1994). En esta situación, el HT podría actuar como una primera línea de defensa sobre los radicales libres presentes en la fase acuosa, protegiendo de la oxidación a la vitamina E presente en la lipoproteína que actuaría como una segunda línea de defensa impidiendo la propagación de los radicales peroxilipídicos (Paiva-Martins et al., 2003). La protección y reducción de la vitamina E de la LDL por el HT y otros polifenoles vegetales ha sido descrita anteriormente. Visioli et al. (1995) y Salami et al. (1995) encontraron que la presencia de cantidades micromolares de HT previnieron la pérdida de vitamina E en la LDL inducida por iones Cu *in vitro*. Ochoa et al. (2002) compararon los efectos de varios aceites de oliva virgen con distinto contenido con compuestos fenólicos incorporados en la dieta de conejos durante 8 semanas, encontrando que aquellos animales alimentados con el aceite que contenía el mayor contenido de compuestos fenólicos (entre 4 y 18 veces más que los otros dos aceites de oliva estudiados) contenían en su LDL casi 3 veces más vitamina E y cerca del doble de coenzima-Q que las LDL aisladas del resto de grupos animales. Sin embargo este aumento no fue significativo cuando se determinaron estos antioxidantes en el plasma total donde aparte de la en LDL, están presentes en las otras lipoproteínas. Estos resultados sugirieron que los compuestos fenólicos del aceite de oliva podrían proteger específicamente a los antioxidantes contenidos en las LDL. En estudios de intervención en humanos, una semana de ingesta de aceite de oliva virgen también ocasionó un aumento significativo de la vitamina E presente en las lipoproteínas LDL de los voluntarios, sin embargo este efecto no se observó a nivel postprandial entre las 2 y 24 horas después de una única ingesta. Hay que tener en cuenta que en este trabajo, desde los 4 días anteriores a la 1ª administración del aceite y durante todo el estudio, los voluntarios consumieron una dieta donde se excluyeron los

alimentos que contenían compuestos fenólicos como el café, el vino, la fruta y las verduras. En solo 4 días esta dieta redujo la concentración de vitamina E de la LDL en un 30% lo que indicó una vez más el efecto protector de este tipo de compuestos sobre la vitamina E de las LDL. Una sola ingesta de aceite de oliva no consiguió recuperar estos niveles, pero si lo hizo el consumo continuado del aceite de oliva virgen durante una semana ocasionando además un aumento del “lagtime” y una disminución de peróxidos de estas lipoproteínas (Gimeno et al., 2002).

Otros compuestos fenólicos procedentes de la dieta también fueron capaces de proteger de la oxidación a las lipoproteínas LDL y de unirse a ellas. (Ivanov et al., 2001). Se ha descrito como las catequinas (flavanoles) del té presentaron afinidad por las lipoproteínas LDL, pero la mayoría se encontraron en la fracción que contenía la HDL (23%) y en la fracción rica en proteínas del plasma (60%), compuesta principalmente albúmina (van het Hof et al., 1999). Lo mismo se observó para el resveratrol (Belguendouz et al., 1998) o la isoflavona de la soja genisteína (kaamanen. Bioch Biophys Acta 2003;1631). En nuestro estudio sin embargo el HT mostró una mayor afinidad por las lipoproteínas LDL que por otras fracciones proteicas del plasma. No obstante, en los controles empleados que no contenían LDL, el HT se localizó en las fracciones de mayor densidad del gradiente (parte inferior) donde sedimenta la albúmina sin que se observaran diferencias en la localización del HT en los gradientes control usados con o sin albúmina, por lo que no pudimos confirmar si una parte del HT puede unirse también a la albúmina.

Los resultados de este estudio muestran que el HT tiene una afinidad específica por las lipoproteínas LDL y esta unión podría proteger frente a la oxidación de esta lipoproteína *in vivo* bien directamente captando los radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas, quelando iones metálicos desencadenantes de las reacciones de peroxidación, o bien indirectamente a través de la regeneración de la vitamina E presente en la lipoproteína.

#### **6.4. EFECTOS DEL HIDROXITIRO SOL SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO DE RATÓN.**

La tecnología microarray permitió el análisis simultáneo de la expresión de más de 12000 genes en hígado de ratón con el fin de investigar posibles efectos tóxicos y mecanismos de acción del HT.

Los resultados obtenidos muestran la ausencia de efectos tóxicos del HT a las dosis empleadas (0.05 y 0.5 g/Kg/día), tanto por el mantenimiento del peso de los animales como por el leve efecto ocasionado sobre la expresión génica en hígado de ratón. Los resultados de toxicidad aguda obtenidas por D'Angelo et al. (2001) también mostraron ausencia de efectos tóxicos a una dosis de 2 g/Kg de peso, excepto una piloerección que desapareció a las pocas horas. En un estudio más extenso de toxicidad llevado a cabo para un extracto acuoso de aceituna conteniendo 24 mg/g de

HT y 60 mg/g (HIDROX<sup>®</sup>), se estableció que la dosis oral aguda en la cual no se observaron efectos adversos fue de 2 g/Kg. Los resultados de toxicidad crónica a 90 días indicaron que una dosis diaria de 2 g/Kg de este producto no ocasionó ningún efecto adverso. Tampoco se encontraron efectos sobre el desarrollo del feto, ni actividad mutagénica (Christian et al., 2004).

El HT afectó de forma significativa a la expresión de solo un 2.5% de los genes analizados a la dosis más baja y un 2.9% a la dosis más alta. En ambas dosis, el número de genes cuya expresión se vio reducida por la ingesta de HT fue mayor que los genes inducidos. De entre los genes que se modificaron se realizó una selección de los genes que tuvieran una función conocida y se agruparon en 5 categorías, encontrando que el consumo de HT produjo un ligero efecto (en la mayoría de los casos no significativo) en la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico y glucídico, la cadena de transporte electrónico, la inflamación, la angiogénesis, la apoptosis y la coagulación sanguínea, que podrían explicar en parte algunos de los resultados obtenidos en esta Memoria Doctoral, y otros efectos del HT reflejados en la literatura científica.

La interpretación y extrapolación de los resultados de microarray para explicar los efectos del HT en el modelo experimental de aterosclerosis con conejos hipercolesterolemicos debe realizarse con cautela ya que el estudio de expresión génica se llevó a cabo con ratones sanos, donde es de esperar que no estén activados los genes que podrían estar implicados en el desarrollo de la aterosclerosis. Sin embargo algunos de los resultados podrían arrojar luz sobre los posibles mecanismos de acción del HT para así orientar la investigación futura.

Se observó una disminución significativa en la expresión del enzima latosterol-C5-desaturasa, un enzima implicada en uno de los últimos pasos la síntesis de colesterol a partir de latosterol. Es posible por tanto que parte del efecto hipocolesterolemico ocasionado por el HT en el modelo experimental de aterosclerosis en conejos se deba a una disminución de la síntesis de colesterol. Sin embargo sería necesario la confirmación mediante RT-PCR de estos resultados y la realización de otros ensayos que permitan evaluar el efecto del HT sobre la síntesis de colesterol.

El efecto del HT sobre el perfil de ácidos grasos en plasma de conejos ateroscleróticos, donde se encontró un aumento de AGMI en el grupo AH, también podría explicarse teniendo en cuenta que el HT produjo una disminución de la expresión de la sintasa de ácidos grasos y que la regulación de la transcripción de la enzima delta-9 desaturasa, que cataliza la instauración de AGS a AGMI, por los AGPI y el colesterol ocurre a través de un factor de transcripción, el SREBP-1 ("sterol regulatory element binding protein-1") (Ntambi, 1999), cuya expresión se encuentra reducida en el hígado de los ratones en las dos dosis empleadas. El SREBP-1 también regula la expresión del receptor de la LDL y algunos genes implicados en la síntesis de colesterol. Aún así, la variación en la expresión de ambos genes fue muy leve y no alcanzó significación estadística. La administración

de HT a los ratones también redujo la expresión de varios enzimas hepáticas implicadas en el metabolismo glucídico, lipídico y proteico, así como varios componentes de la cadena electrónica mitocondrial, lo que sugiere que el HT podría tener un efecto en el metabolismo hepático. En el estudio de toxicidad crónica del HIDROX citado anteriormente se observó una disminución de la actividad de enzimas hepáticas, alanino aminotransaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y sorbitol deshidrogenasa (SDH) y un descenso en el colesterol plasmático (Christian et al., 2004). En este mismo estudio se observó también un aumento significativo en el número de glóbulos rojos entre las ratas hembras a las que se administró una dosis de producto equivalente a 0.05 g/Kg de peso.

La expresión del gen de la trombospondina 1 también fue aumentada de forma importante en los animales a los que se administró la dosis más baja de HT respecto al control, pero no se modificó a la dosis más alta. Esta proteína está implicada en la regulación de la angiogénesis y se ha descrito que inhibe del crecimiento tumoral (Lawler, 2002). Algunos genes con funciones en la inflamación y la respuesta inmunitaria como el "CD1d1", implicado en la presentación de antígenos y la activación de células T (Ichimiya et al., 1994), o el gen "Chemokine (C-X-X motif) ligand 12", cuyo homólogo humano está implicado en la quimiotaxis de monocitos y células T (Shirozu et al., 1995), también redujeron su expresión a ambas dosis respecto al control, aunque fue significativa solo con la dosis más alta. La expresión del gen "CD47 antígeno" que actúa activando la fagocitosis (Lindberg et al., 1993), también mostró una pequeña reducción no significativa a ambas dosis. Otros genes implicados en la coagulación sanguínea como el del plasminógeno o algunos factores del complemento, vieron reducida su expresión aunque los cambios fueron muy leves y no alcanzaron significación con ninguna de las dosis empleadas. Los estudios *in vitro* con el HT mostraron que este compuesto fue capaz de reducir la respuesta inflamatoria en células endoteliales activadas con LPS y citoquinas (Carluccio et al., 2003) y de reducir la agregación plaquetaria inducida por colágeno y ADP (Petroni et al., 1995).

Uno de los genes que experimentó una mayor inducción correspondió al gen que codifica la calponina-2. Esta proteína está implicada en la regulación y la modulación de la contracción del músculo liso (Masuda et al., 1996). En menor medida, aunque también de forma significativa, el HT indujo la expresión del gen que codifica la transgelina, otra proteína implicada en la contracción muscular.

Los resultados del array mostraron que a las dos dosis ensayadas se produjo un aumento significativo en la expresión del gen que codifica la enzima ácido aminolevulinico sintasa, el enzima limitante de la síntesis del grupo hemo (Kawasaki et al., 1996). La administración de la dosis más baja (1 mg de HT, equivalente a 0.05 g/Kg de peso) produjo un aumento significativo en la expresión de hemoglobina  $\alpha$  y  $\beta$  con respecto al grupo control. Aunque sería necesario su

confirmación por RT-PCR, estos resultados sugieren que el HT podría tener un efecto sobre la hematopoyesis lo que abre una nueva vía de investigación para el HT. Este efecto pudo observarse en el estudio de toxicidad crónica del HIDROX<sup>®</sup> donde se encontró un aumento en el número de glóbulos rojos con la administración de una dosis de producto equivalente a 0.05 g de HT/kg de peso (Christian et al., 2004). Estudios *in vitro* también demostraron un efecto protector del HT frente a los radicales libres en eritrocitos, inhibiendo la lipoperoxidación a las membranas y reduciendo la hemólisis (Manna et al., 1999).

Por último se observó una disminución no significativa de la expresión del gen que codifica la ferritina, proteína plasmática que transporta el hierro, con a la dosis más alta administrada a los ratones. La capacidad del HT de quelar iones hierro (Aeschbach et al., 1994) podría ocasionar una menor disponibilidad del mismo. En este sentido será necesario prestar una especial atención a una posible alteración de la disponibilidad del hierro y en los futuros estudios de intervención con HT.





## *Conclusiones*



**CONCLUSIONES:**

1. La administración diaria de 4 mg/Kg de hidroxitirosol purificado produjo beneficios a nivel cardiovascular en un modelo experimental de aterosclerosis inducida en conejos por una dieta rica en grasas saturadas y colesterol, ocasionando una reducción de las concentraciones plasmáticas de colesterol total y triglicéridos, un aumento de colesterol HDL y una mejora de los parámetros antioxidantes. Así mismo, la administración de HT condujo a un menor desarrollo de la lesión aterosclerótica cuantificada en el cayado aórtico.
2. El hidroxitirosol administrado en disolución acuosa fue absorbido rápidamente por el organismo tanto en ratones como en humanos, encontrándose concentraciones plasmáticas máximas a los 10 minutos. Una vez alcanzada la concentración máxima, el hidroxitirosol mostró una vida media en plasma de 9 minutos y su concentración descendió rápidamente. Los metabolitos procedentes del hidroxitirosol encontrados fueron alcohol homovanílico, ácido homovanílico y ácido dihidroxifenil-acético, todos ellos con actividad antioxidante, que en humanos fueron excretados por orina en forma libre o conjugados con glucurónido y sulfato. Las estimaciones del porcentaje de absorción de hidroxitirosol administrado en solución acuosa fueron del 46% y 9.4% en ratas y en humanos, respectivamente.
3. En el plasma el hidroxitirosol muestra una afinidad específica por las lipoproteínas LDL. Esta unión es lábil y transitoria y no se encontró para el resto de los metabolitos procedentes del hidroxitirosol.
4. La administración diaria de 0.5 mg/Kg durante 15 días a los ratones sanos produjo efectos débiles sobre la expresión de genes implicados en la síntesis de colesterol, el metabolismo lipídico, glucídico y proteico, la inflamación, la coagulación sanguínea, la angiogénesis y la contracción del músculo liso en hígado de ratón.



# 8

## *Bibliografía*



1. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol.* 1994 Jan;32(1):31-6.
2. Aguilera CM, Mesa MD, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Gil A. Virgin olive and fish oils enhance the hepatic antioxidant defence system in atherosclerotic rabbits. *Clin Nutr.* 2003 Aug;22(4):379-84.
3. Aguilera CM, Ramirez-Tortosa MC, Mesa MD, Ramirez-Tortosa CL, Gil A. Sunflower, virgin-olive and fish oils differentially affect the progression of aortic lesions in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002;162:335-44
4. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974 Apr;20(4):470-5.
5. Anitschkow N, Chalataw S. Ueber experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentralbl Allg Pathol Anat* 1913; 24: 1-9
6. Aranceta J, Serra-Majem LI (ed.). *Guías Alimentarias para la población española.* Madrid: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, 2001.
7. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Aug;19(8):1819-24.
8. Aviram M, Eias K. Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Ann Nutr Metab.* 1993;37(2):75-84.
9. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1999 Apr;26(7-8):892-904.
10. Bai C, Yan X, Takenaga M, Sekiya K, Nagata T. Determination of Synthetic Hydroxytyrosol in Rat Plasma by CG-MS. *J Agric Food Chem.* 1998; 46:3998-4001
11. Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1996; 73:1589-1593.
12. Banegas JR, Rodríguez Artalejo F, Cruz JJ, Guallar P, Rey J. Blood pressure in Spain: distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. *Hypertension* 1998; 32: 998-1002.
13. Banegas JR, Rodríguez Artalejo F. El problema de la hipertensión arterial en España. *Rev Clín Esp* 2002; 202: 12-15.

14. Banegas JR, Villar F, Pérez C, Jiménez R, Gil E, Muñoz J, Juane R. Estudio epidemiológico de los factores de riesgo cardiovascular en la población española de 35 a 64 años. *Rev San Hig Pub* 1993; 67:419-445.
15. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004 Oct 15;95(8):764-72.
16. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991 Apr;40(4):405-12.
17. Bazzano LA, Serdula MK, Liu S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2003 Nov;5(6):492-9.
18. Beadenkopf WQ, Daoud AS, Love BM. Calcification in the coronary arteries and its relationship to arteriosclerosis and myocardial infarction. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1964 Oct;92:865-71.
19. Beaudoux JL, Cesarini ML, Gardes-Albert M, Maclouf J, Merval R, Esposito B, Peynet J, Tedgui A. Native and gamma radiolysis-oxidized lipoprotein(a) increase the adhesiveness of rabbit aortic endothelium. *Atherosclerosis*. 1997 Jul 11;132(1):29-35.
20. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(4):1620-4.
21. Belguendouz L, Fremont L, Gozzelino MT. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol*. 1998 Mar 15;55(6):811-6.
22. Bellido C, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Perez-Martinez P, Muriana FJ, Martin-Ventura JL, Marin C, Gomez P, Fuentes F, Egido J, Perez-Jimenez F. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6):1487-91.
23. Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res*. 1999 Feb;41(2):361-8.
24. Berliner J. Introduction. Lipid oxidation products and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2002 Apr;38(4):187-91.
25. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(5):707-27.
26. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995 May 1;91(9):2488-96.
27. Berry EM, Eisenberg S, Friedlander Y, Harats D, Kaufmann NA, Norman Y, Stein Y. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins--the Jerusalem



- Nutrition Study. II. Monounsaturated fatty acids vs carbohydrates. *Am J Clin Nutr* 1992;56:394-403.
28. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* 1999 Aug;51(8):971-4.
  29. Blekas G, Vassilakis C, Harizanis C, Tsimidou M, Boskou DG. Biophenols in table olives. *J Agric Food Chem.* 2002 Jun 19;50(13):3688-92.
  30. Blomhoff R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2005 Feb;16(1):47-54.
  31. Blot W, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *Journal of the National Cancer Institute* 1993; 85: 1483–92.
  32. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2000 Oct 7;356(9237):1213-8.
  33. Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NH, van Iersel ML, van Bladeren PJ, Rietjens IM. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem Res Toxicol.* 2002 May;15(5):662-70.
  34. Boissonneault GA, Wang Y, Chung BH. Oxidized low-density lipoproteins delay endothelial wound healing: lack of effect of vitamin E. *Ann Nutr Metab.* 1995;39(1):1-8.
  35. Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sorgato F, Dorella M, Maiorino M, Ursini F. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb.* 1992 Apr;12(4):529-33.
  36. Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E, Berra B, Zamburlini A, Ursini F, Galli G. Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2000; 20:111-120
  37. Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest.* 1998 Jun 15;101(12):2658-64.
  38. Borradaile NM, Carroll KK, Kurowska EM. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids* 1999;34:591-8.

39. Bostom AG, Cupples LA, Jenner JL, Ordovas JM, Seman LJ, Wilson PW, Schaefer EJ, Castelli WP. Elevated plasma lipoprotein(a) and coronary heart disease in men aged 55 years and younger. A prospective study. *JAMA*. 1996 Aug 21;276(7):544-8.
40. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993 Apr;91(4):1800-9.
41. Botham KM, Zheng X, Napolitano M, Avella M, Cavallari C, Rivabene R, Bravo E. The effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids delivered in chylomicron remnants on the transcription of genes regulating synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by the liver: modulation by cellular oxidative state. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:143-51.
42. Brenes M, Garcia A, Garcia P, Garrido A. Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. *J Agric Food Chem*. 2000 Nov;48(11):5178-83.
43. Brenes M, Garcia A, Garcia P, Rios JJ, Garrido A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J Agric Food Chem*. 1999 Sep;47(9):3535-40.
44. Briante R, Patumi M, Terenziani S, Bismuto E, Febbraio F, Nucci R. *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *J Agric Food Chem*. 2002 Aug 14;50(17):4934-40.
45. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:223-261.
46. Brzosko S, De Curtis A, Murzilli S, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L. Effect of extra virgin olive oil on experimental thrombosis and primary hemostasis in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2002 Dec;12(6):337-42.
47. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem*. 1973 May;19(5):476-82.
48. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *Scand J Clin Lab Invest*. 1980;40:583-95.
49. Caccetta RA, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr*. 2000 Jan;71(1):67-74.
50. Campos H, Genest JJ Jr, Blijlevens E, McNamara JR, Jenner JL, Ordovas JM, Wilson PW, Schaefer EJ. Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*. 1992 Feb;12(2):187-95.
51. Capasso R, Evidente A, Avolio S, Solla F. A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *J Agric Food Chem*. 1999;47(4):1745-8.

52. Cardell M. Plant response to solar ultraviolet radiation. In Lange O, Nobel C, Osmod H, Ziegler H. *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol 12A*. Berlin:Spring Verlag; 1981:169-197.
53. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:622-9.
54. Caruso D, Visioli F, Patelli R, Galli C, Galli G. Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism*. 2001 Dec;50(12):1426-8.
55. Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina V, Felice Tecce M, Landriscina C. Antioxidant effect of hydroxytyrosol (DPE) and Mn(2+) in liver of cadmium-intoxicated rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002;133:625-632
56. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(3):255-64.
57. Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R, Carlini EA. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids* 2000;35:45-54.
58. Cooke JP, Tsao PS. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb*. 1994 May;14(5):653-5.
59. Covas MI, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Sebastia N, de la Torre-Boronat C, Marrugat J. Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation. *Int J Pharm Res* 2000; XX:49-54
60. Crawford RS, Kirk EA, Rosenfeld ME, LeBoeuf RC, Chait A. Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the LDL receptor-deficient mouse. Dietary antioxidants inhibit development of fatty streak lesions in the LDL receptor-deficient mouse.
61. Chan PT, Fong WP, Cheung YL, Huang Y, Ho WK, Chen ZY. Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed a high fat diet. *J Nutr* 1999;129:1094-101.
62. Chen MF, Hsu HC, Liao CS, Lee YT. The role of vitamin E on the anti-atherosclerotic effect of fish oil in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1999 May;57(2-3):99-111.
63. Chimi HJ, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, 1991;68:307-12
64. Chisolm GM, Irwin KC, Penn MS. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cell injury in diabetes. *Diabetes*. 1992 Oct;41 Suppl 2:61-6.

65. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med.* 2000 Jun 15;28(12):1815-26.
66. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
67. Christen W, Gaziano J, Hennekens C. Design of Physicians' Health Study II – a randomized trial of beta-carotene, vitamins E and C, and multivitamins, in prevention of cancer, cardiovascular disease, and eye disease, and review of results of completed trials. *Annals of Epidemiology* 2000; 10(2): 125–34.
68. Christian MS, Sharper VA, Hoberman AM, Seng JE, Fu L, Covell D, Diener RM, Bitler CM, Crea R. The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug Chem Toxicol.* 2004 Nov;27(4):309-30.
69. Chung BH, Wilkinson T, Geer JC, Segrest JP. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. *J Lipid Res.* 1980 Mar;21(3):284-91.
70. Crawford T. Some aspects of the pathology of atherosclerosis. *Proc R Soc Med* 1960;53:9-12
71. D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, Masella L, Tufano MA, Zappia M, Galletti P. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2005 Apr 1;38(7):908-19.
72. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos.* 2001 Nov;29(11):1492-8.
73. Dawber TR, Kannel WB. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation.* 1966 Oct;34(4):553-5.
74. de Gaetano G. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet* 2001; 357: 89–95.
75. De Klerk N, Musk AW, Ambrosini GL, Eccles JL, Hansen J, Olsen N, et al. Vitamin A and cancer prevention II: comparison of the effects of retinol and beta-carotene. *International Journal of Cancer* 1998; 75(3): 362–7.
76. De La Cruz JP, Quintero L, Villalobos MA, Sanchez de la Cuesta F. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1485:36-44. (a)

77. De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martin-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thromb Res* 2000;100:305-15. (b)
78. de la Puerta R, Martinez Dominguez ME, Ruiz-Gutierrez V, Flavill JA, Hoult JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitregric neurotransmission. *Life Sci.* 2001 Jul 27;69(10):1213-22.
79. de la Puerta R, Martinez-Dominguez E, Ruiz-Gutierrez V. Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z Naturforsch [C]*. 2000 Sep-Oct;55(9-10):814-9.
80. de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol.* 1999 Feb 15;57(4):445-9.
81. de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P, Delaye J. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet.* 1994 Jun 11;343(8911):1454-9.
82. de Lorgeril M, Salen P, Caillat-Vallet E, Hanauer MT, Barthelemy JC, Mamelle N. Control of bias in dietary trial to prevent coronary recurrences: The Lyon Diet Heart Study. *Eur J Clin Nutr.* 1997 Feb;51(2):116-22.
83. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Nov;20(11):E83-8.
84. Deiana M, Aruoma OI, Bianchi ML, Spencer JP, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu FP. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radic Biol Med.* 1999 Mar;26(5-6):762-9.
85. Del Boccio P, Di Deo A, De Curtis A, Celli N, Iacoviello L, Rotilio D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 Feb 25;785(1):47-56.
86. della Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Nov 30;278(3):733-9.
87. Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Matsumura T, Ohta Y, Nakano T, Nakajima K, Yasue H. Remnants of chylomicron and very low density lipoprotein impair endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis.* 1998 Apr;137(2):341-9.
88. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1249-56.

89. Edwards DJ, Rizk M. Conversion of 3, 4-dihydroxyphenylalanine and deuterated 3, 4-dihydroxyphenylalanine to alcoholic metabolites of catecholamines in rat brain. *J Neurochem.* 1981 May;36(5):1641-7.
90. Ehrenwald E, Chisolm GM, Fox PL. Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1994 Apr;93(4):1493-501.
91. Erdinçler DS, Seven A, İnci F, Beger T, Candan G. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: effects of aging and hypercholesterolemic diet. *Clin Chim Acta.* 1997 Sep 8;265(1):77-84.
92. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992 Oct;13(4):341-90.
93. Esterbauer H, Puhl H, Waeg G, Krebs A, Deiber-Rothender M. The role of Vitamin E in lipoprotein oxidation. In: Packer I, Fuchs J. eds. *Vitamin E: Biochemistry and clinical application.* New York: Marcel Dekker, Inc. 1992:649-71. (b)
94. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 1989;6(1):67-75.
95. Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5 Suppl):779S-786S
96. Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev.* 2002 Aug;11(4):351-8.
97. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, Suh J, Frei B, Mudge GH, Selwyn AP, Ganz P. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet.* 2002 Mar 30;359(9312):1108-13.
98. Fernandez-Bolanos J, Rodriguez G, Rodriguez R, Heredia A, Guillen R, Jimenez A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *J Agric Food Chem.* 2002 Nov 6;50(23):6804-11.
99. Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L, Guida L, Dello Russo A, Marotta T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med.* 2000 Mar 27;160(6):837-42.
100. Fito M, Gimeno E, Covas MI, Miro E, Lopez-Sabater Mdel C, Farre M, de TR, Marrugat J. Postprandial and short-term effects of dietary virgin olive oil on oxidant/antioxidant status. *Lipids.* 2002 Mar;37(3):245-51.
101. Flórez J. *Farmacología humana.* Ed Masson. Barajoz. 1997
102. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982 Oct;28(10):2077-80.

103. Fruebis J, Steinberg D, Dresel HA, Carew TE. A comparison of the antiatherogenic effects of probucol and of a structural analogue of probucol in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits. *J Clin Invest*. 1994 Jul;94(1):392-8.
104. Fukao H, Ijiri Y, Miura M, Hashimoto M, Yamashita T, Fukunaga C, Oiwa K, Kawai Y, Suwa M, Yamamoto J. Effect of trans-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004 Sep;15(6):441-6.
105. Fukunaga K, Yoshida M, Nakazono N. A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 1998 Sep-Oct;12(5):300-3.
106. Furneri PM, Piperno A, Sajja A, Bisignano G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Dec;48(12):4892-4
107. Garg ML, Wierzbicki AA, Thomson AB, Clandinin MT. Dietary cholesterol and/or n-3 fatty acid modulate delta 9-desaturase activity in rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1988;962:330-6.
108. Genest J Jr, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Silberman SR, Wilson PW, Schaefer EJ. Prevalence of lipoprotein (a) [Lp(a)] excess in coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1991 May 15;67(13):1039-145.
109. Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1999 Oct;10(5):417-28.
110. Ghiselli A, D'Amicis A, Giacosa A. The antioxidant potential of the Mediterranean diet. *Eur J Cancer Prev*. 1997 Mar;6 Suppl 1:S15-9.
111. Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1999 Jul;155(1):1-5.
112. Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, Covas M, Farre M, de La Torre-Boronat MC, Lopez-Sabater MC. Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur J Clin Nutr*. 2002 Feb;56(2):114-20.
113. GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999; 354: 447-55.
114. Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2000 Feb;10(1):38-44.
115. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):503-16.
116. Glassman AH, Shapiro PA. Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry*. 1998 Jan;155(1):4-11.

117. Goday A. Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:657-670.
118. Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988; 6:357-77.
119. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*. 1989 Nov 9;321(19):1311-6.
120. Gorinstein S, Bartnikowska E, Kulasek G, Zemser M, Trakhtenberg S. Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol. *J Nutr* 1998;128:2023-7.
121. Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett*. 1993 Sep 13;330(2):181-5.
122. Greenberg E, Baron JA, Karagas MR, Stukel TA, Nierenberg DW, Stevens MM, et al. Mortality associated with low plasma concentration of beta carotene and effect of oral supplementation. *Journal of the American Medical Association* 1996; 275(9): 699-703.
123. Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*. 2003 Oct 28;108(17):2034-40.
124. Grove TH. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem*. 1979 Apr;25(4):560-4.
125. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith Jr S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 1281-1292.
126. Grundy SM. What is the desirable ratio of saturated, polyunsaturated, and monounsaturated fatty acids in the diet?. *Am J Clin Nutr*. 1997 Oct;66(4 Suppl):988S-990S.
127. Gurr, Harwood. *Lipid Biochemistry: an introduction*, 4th edn. Chapman and Hall, London. 1991.
128. Gutierrez VR, de la Puerta R, Catala A. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem*. 2001 Jan;217(1-2):35-41.
129. Gutiérrez-Fisac JL, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F, Regidor E. Increasing prevalence of overweight and obesity among Spanish adults, 1987-1997. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 1677-1682.
130. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica (9ª Edición)* (1997) Ed. Mc Graw-Hill•Interamericana. Madrid.



131. Hajjar DP, Pomerantz KB. Signal transduction in atherosclerosis: integration of cytokines and the eicosanoid network. *FASEB J*. 1992 Aug;6(11):2933-41.
132. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J Lab Clin Med*. 1992 Jun;119(6):598-620.
133. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Medicine and Biology*. Oxford University Press: New York, 1999
134. Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, Shimokado K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem*. 1998 Apr 17;273(16):9681-7.
135. Hashimoto T, Ibi M, Matsuno k, Nakashima S, Tanigawa T, Yoshikawa T, Yabe-Nishimura C. An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Rad Bio Med* 2003;36:555-64
136. Hasnain BI, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: what should we be telling our patients? *Cleve Clin J Med*. 2004 Apr;71(4):327-34.
137. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Nov;17(11):2744-52.
138. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 23–33.
139. Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest*. 1984 Nov;74(5):1890-4.
140. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1987 Jul 25;262(21):10098-103.
141. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*. 1998 Nov;141(1):1-15.
142. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996 May 2;334(18):1145-9.

143. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, Rousset AM, Favier A, Briançon S. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med*. 2004 Nov 22;164(21):2335-42.
144. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Rousset AM, Arnaud J, Richard MJ, et al. Background and rationale behind the SU.VI.MAX Study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. *Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants Study*. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 1998; 68(1): 3–20.
145. Herrera MD, Perez-Guerrero C, Marhuenda E, Ruiz-Gutierrez V. Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high-oleic-acid sunflower) on vascular reactivity in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr*. 2001 Sep;86(3):349-57.
146. Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis*. 1983 May-Jun;3(3):215-22.
147. Hodis HN, Chauhan A, Hashimoto S, Crawford DW, Sevanian A. Probucol reduces plasma and aortic wall oxysterol levels in cholesterol fed rabbits independently of its plasma cholesterol lowering effect. *Atherosclerosis*. 1992 Oct;96(2-3):125-34.
148. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*. 1995 Dec;62(6):1276-82.
149. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest*. 1999 Mar;103(5):747-53.
150. Ichimiya S, Kikuchi K, Matsuura A. Structural analysis of the rat homologue of CD1. Evidence for evolutionary conservation of the CD1D class and widespread transcription by rat cells. *J Immunol*. 1994 Aug 1;153(3):1112-23.
151. Ivanov V, Carr AC, Frei B. Red wine antioxidants bind to human lipoproteins and protect them from metal ion-dependent and -independent oxidation. *J Agric Food Chem*. 2001 Sep;49(9):4442-9.
152. Ivarsson L, Appelgren L, Rudenstam CM. Plasma volume after dextran infusion in rats sensitive and non-sensitive to dextran. *Eur Surg Res*. 1975;7(6):315-25.
153. Kaamanen M, Adlercreutz H, Jauhiainen M, Tikkanen MJ. Accumulation of genistein and lipophilic genistein derivatives in lipoproteins during incubation with human plasma in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Mar 17;1631(2):147-52.
154. Kamada C, da Silva EL, Ohnishi-Kameyama M, Moon JH, Terao J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res*. 2005 Feb;39(2):185-94.

155. Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, Aviram M. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J Nutr.* 2001 Aug;131(8):2082-9.
156. Kawasaki N, Morimoto K, Tanimoto T, Hayakawa T. Control of hemoglobin synthesis in erythroid differentiating K562 cells. I. Role of iron in erythroid cell heme synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Apr 15;328(2):289-94.
157. Keys A et al., editor, Seven Countries. A multivariate analysis of death and coronary heart disease. A commonwealth fund book. Cambridge. Harvard University Press, 1980.
158. Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 1998;128:954-9.
159. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* 1980 Sep;93(3):480-9.
160. Klipstein-Grobusch K, Geleijnse JM, den Breeijen JH, Boeing H, Hofman A, Grobbee DE, Witteman JC. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr.* 1999 Feb;69(2):261-6.
161. Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiya K. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997 Feb;61(2):347-50.
162. Kolodgie FD, Katocs AS Jr, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1454-64.
163. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med.* 2002 Dec 30;113 Suppl 9B:71S-88S.
164. Kris-Etherton PM, Pearson TA, Wan Y, Hargrove RL, Moriarty K, Fishell V, Etherton TD. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(6):1009-15
165. Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation.* 1999 Sep 14;100(11):1154-60.
166. Krzeminski R, Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Gralak M, Czerwinski J, Lojek A, Ciz M, Martin-Belloso O, Gligelmo-Miguel N, Trakhtenberg S. Effect of different olive oils

- on bile excretion in rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free diets. *J Agric Food Chem.* 2003 Sep 10;51(19):5774-9.
167. Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H. Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1999 Sep 21;100(12):1280-4.
168. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res.* 1986 Dec;59(6):612-9.
169. Lada AT, Rudel LL. Associations of low density lipoprotein particle composition with atherogenicity. *Curr Opin Lipidol.* 2004 Feb;15(1):19-24.
170. Lamuela-Raventos RM, Covas MI, Fito M, Marrugat J, de La Torre-Boronat MC. Detection of dietary antioxidant phenolic compounds in human LDL. *Clin Chem.* 1999 Oct;45(10):1870-2.
171. Lamuela-Raventos RM, Gimeno E, Fito M, Castellote AI, Covas M, de la Torre-Boronat MC, Lopez-Sabater MC. Interaction of olive oil phenol antioxidant components with low-density lipoprotein. *Biol Res.* 2004;37(2):247-52.
172. Larsen LF, Jespersen J, Marckmann P. Are olive oil diets antithrombotic? Diets enriched with olive, rapeseed, or sunflower oil affect postprandial factor VII differently. *Am J Clin Nutr.* 1999 Dec;70(6):976-82.
173. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med.* 2002 Jan-Mar;6(1):1-12.
174. Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. Beta-carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: the Women's Health Study. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91(24):2102-6.
175. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):1859-67.
176. Leger CL, Carbonneau MA, Michel F, Mas E, Monnier L, Cristol JP, Descomps B. A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 2005 May;59(5):727-30.
177. Leger CL, Kadiri-Hassani N, Descomps B. Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. *J Agric Food Chem.* 2000 Oct;48(10):5061-7.
178. Lepage G, Roy CC. Direct trans-esterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res.* 1986 Jan;27(1):114-20.
179. Leppala JM, Virtamo J, Fogelholm R, Huttonen JK, Albanes D, Taylor PR, et al. Controlled trial of alphatocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and

- mortality in male smokers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20(1): 230–5.
180. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995 Jan 6;270(1):319-24.
181. Lindberg FP, Gresham HD, Schwarz E, Brown EJ. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol.* 1993 Oct;123(2):485-96.
182. Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens.* 1998 Dec;16(12 Pt 2):1871-8.
183. Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. *Textbook of Cardiovascular Medicine.* Ed Topol. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1998;2340-2413.
184. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):233-41.
185. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol.* 2000 Aug;11(4):383-8
186. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):727-47.
187. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1 Suppl):230S-242S.
188. Mangas-Cruz MA, Fernandez-Moyano A, Albi T, Guinda A, Relimpio F, Lanzon A, Pereira JL, Serrera JL, Montilla C, Astorga R, Garcia-Luna PP. Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin olive oil on plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clin Nutr.* 2001;20(3):211-215
189. Manna C, Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, D'Angelo S, Galletti P, Zappia V. Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity. *Adv Exp Med Biol.* 1999;472:115-30.
190. Manna C, Galletti P, maisto G, Cucciolla V, D'Angelo S and Zappia V. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 2000; 470(3):341-344.
191. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr.* 1997 Feb;127(2):286-92.
192. Manson JE, Gaziano JM, Spelsberg A, Ridker PM, Cook NR, Buring JE, et al. A secondary prevention trial of antioxidant vitamins and cardiovascular disease in women.

- Rationale, design, and methods. The WACS Research Group. *Annals of Epidemiology* 1995; 5(4): 261–9.
193. Maor I, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein leads to macrophage accumulation of unesterified cholesterol as a result of lysosomal trapping of the lipoprotein hydrolyzed cholesteryl ester. *J Lipid Res.* 1994 May;35(5):803-19.
194. Marrugat J, Covas MI, Fito M, Schroder H, Miro-Casas E, Gimeno E, Lopez-Sabater MC, de la Torre R, Farre M; SOLOS Investigators. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation—a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004 Jun;43(3):140-7.
195. Martinez-Dominguez E, de la Puerta R, Ruiz-Gutierrez V. Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflamm Res.* 2001 Feb;50(2):102-6.
196. Masella R, Giovannini C, Vari R, Di Benedetto R, Coni E, Volpe R, Fraone N, Bucci A. Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. *Lipids* 2001;36:1195-202.
197. Massaro M, Carluccio MA, De Caterina R. Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: a clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet. *Cardiologia.* 1999 Jun;44(6):507-13.
198. Masuda H, Tanaka K, Takagi M, Ohgami K, Sakamaki T, Shibata N, Takahashi K. Molecular cloning and characterization of human non-smooth muscle calponin. *J Biochem (Tokyo).* 1996 Aug;120(2):415-24.
199. Mata P, Varela O, Alonso R, Lahoz C, de Oya M, Badimon L. Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):2088-95.
200. Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Manas M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1998;24:511-21.
201. Mataix J. *Aceite de Oliva Virgen: nuestro patrimonio alimentario. Aceite de oliva y salud.* Ed. Universidad de Granada-Puleva Food. 2001.
202. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000 Jun 1;108(8):652-9.
203. Meagher E, Rader DJ. Antioxidant therapy and atherosclerosis: animal and human studies. *Trends Cardiovasc Med.* 2001 Apr-May;11(3-4):162-5.

204. Meattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G, Tarli P. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin Chem*. 1978 Dec;24(12):2161-5.
205. Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta Nacional de Salud de España 1987-1997. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 1989-1999.
206. Miro Casas E, Farre Albadalejo M, Covas Planells MI, Fito Colomer M, Lamuela Raventos RM, de la Torre Fornell R. Tyrosol bioavailability in humans after ingestion of virgin olive oil. *Clin Chem*. 2001 Feb;47(2):341-3. (b)
207. Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuno J, Weinbrenner T, Roset P, de la Torre R. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem*. 2003 Jun;49(6 Pt 1):945-52.
208. Miro-Casas E, Farre Albaladejo M, Covas MI, Rodriguez JO, Menoyo Colomer E, Lamuela Raventos RM, de la Torre R. Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem*. 2001 Jul 1;294(1):63-72. (a)
209. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci*. 2002 Jan 11;70(8):855-65.
210. Moore K, Roberts LJ 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 1998 Jun;28(6):659-71.
211. Mortensen A, Hansen BF, Hansen JF, Frandsen H, Bartnikowska E, Andersen PS, Bertelsen LS. Comparison of the effects of fish oil and olive oil on blood lipids and aortic atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. *Br J Nutr* 1998;80:565-73.
212. Moschandreas J, Vissers MN, Wiseman S, van Putte KP, Kafatos A. Moschandreas J, Vissers MN, Wiseman S, van Putte KP, Kafatos A. Extra virgin olive oil phenols and markers of oxidation in Greek smokers: a randomized cross-over study. *Eur J Clin Nutr*. 2002 Oct;56(10):1024-9.
213. Muggli R. Free radical tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. *Free radicals and antioxidants in nutrition*.
214. Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:477-515.
215. National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Final Report. National Institutes of Health NIH Publication No. 02-5215. September 2002
216. Nielsen LB, Juul K, Nordestgaard BG. Increased degradation of lipoprotein(a) in atherosclerotic compared with nonlesioned aortic intima-inner media of rabbits: in vivo evidence that lipoprotein(a) may contribute to foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Apr;18(4):641-9.

217. Ntambi JM. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Lipid Res* 1999;40:1549-58
218. Ochoa JJ, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Mataix J, Huertas JR. Dietary oils high in oleic acid but with different unsaponifiable fraction contents have different effects in fatty acid composition and peroxidation in rabbit LDL. *Nutrition*. 2002 Jan;18(1):60-5.
219. O'Dowd Y, Driss F, Dang PM, Elbim C, Gougerot-Pocidallo MA, Pasquier C, El-Benna J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol*. 2004 Nov 15;68(10):2003-8.
220. O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2003 Feb 1;65(3):479-91.
221. Olson RE. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J Nutr*. 1998 Feb;128(2 Suppl):439S-443S.
222. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* 1996; 334: 1150–5.
223. OMS, 2003 OMS. Serie de informes técnicos 916. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Ginebra 2003.
224. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer*. 2000 Jun;36(10):1235-47.
225. Owen RW, Haubner R, Wurtele G, Hull E, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*. 2004 Aug;13(4):319-26.
226. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6853-66.
227. Paiva-Martins F, Gordon MH, Gameiro P. Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chem Phys Lipids*. 2003 Jun;124(1):23-36.
228. Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J Nutr* 2003;133:700-6.
229. Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3894-8



230. Perona JS, Canizares J, Montero E, Sanchez-Dominguez JM, Catala A, Ruiz-Gutierrez V. Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects. *Clin Nutr*. 2004 Oct;23(5):1113-21. (b)
231. Perona JS, Ruiz-Gutierrez V. Virgin olive oil normalizes the altered triacylglycerol molecular species composition of adipose tissue in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2004;52:4227-33 (a)
232. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 1995;78:151-60
233. Plaza-Pérez I, Villar F, Mata P, Pérez F, Maiquez A, Casasnovas JA, Banegas JR, Abadal LT, Rodríguez F, Gil E. Control de la colesterolemia en España, 2000. Un instrumento para la prevención cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53:815-37.
234. Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. *Am Heart J*. 1993 Apr;125(4):958-73.
235. Puel C, Quintin A, Agalias A, Mathey J, Obled C, Mazur A, Davicco MJ, Lebecque P, Skaltsounis AL, Coxam V. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Br J Nutr*. 2004 Jul;92(1):119-27.
236. Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, Wahle KW. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br J Nutr*. 2002 Sep;88(3):225-34; discussion 223-4.
237. Quiles JL, Huertas JR, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J, Manas M. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. *Nutrition*. 2003 Apr;19(4):363-8.
238. Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem* 2003;14:326-32.
239. Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Nov 30;278(3):733-9.
240. Ramirez-Tortosa MC, Aguilera CM, Quiles JL, Gil A. Influence of dietary lipids on lipoprotein composition and LDL Cu(2+)-induced oxidation in rabbits with experimental atherosclerosis. *Biofactors* 1998;8:79-85.
241. Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, Lopez-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr* 1999;129:2177-83.

242. Rapola J, Virtamo J, Ripatti S, Huttunen JK, Albanes D, Taylor PR, et al. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997; 349(9067): 1715–20.
243. Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, Haukka JK, Huttunen JK, Albanes D, et al. Effects of alpha tocopherol and beta carotene supplements on symptoms, progression, and prognosis of angina pectoris. *Heart* 1998; 79(5): 454–8.
244. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231-7
245. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Almazan F, Mattson FH, Khoo JC, Steinberg D, Witztum JL. Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am J Clin Nutr.* 1991 Oct;54(4):701-6.
246. Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arterioscler Thromb.* 1993 Apr;13(4):590-600.
247. Reglamento CE num. 2472/97 del Comité Oleícola Internacional
248. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med.* 1993 May 20;328(20):1450-6.
249. Rodríguez Artalejo F, Garcés C, Gorgojo L, López García E, Martín Moreno JM, Benavente M, del Barrio JL, Rubio R, Ortega H, Fernández O, de Oya M, on behalf of the Investigators of the Four Provinces Study. Dietary patterns among children aged 6-7 years in four Spanish cities with widely differing cardiovascular mortality. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: 141-148. (a)
250. Rodríguez Artalejo F, López García E, Gutiérrez-Fisac JL, Banegas Banegas JR, Lafuente Urduñigo PJ, Domínguez Rojas V. Changes in the prevalence of overweight and obesity and their risk factors in Spain, 1987-1997. *Prev Med* 2002; 34: 72-81. (b)
251. Ross R, Fuster V. The pathogenesis of atherosclerosis. En: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editores. *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Filadelfia: Lippincott-Raven, 1996; 491-507.
252. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26.
253. Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Dec 1;324(1):15-25.

254. Ruiz-Gutierrez V, Perona JS, Pacheco YM, Muriana FJ, Villar J. Incorporation of dietary triacylglycerols from olive oil and high-oleic sunflower oil into VLDL triacylglycerols of hypertensive patients. *Eur J Clin Nutr.* 1999 Sep;53(9):687-93.
255. Ryan D, Robards K. Phenolic Compounds in Olives. *Analyst* 1998; 123:31R-44R.
256. Salami M, Galli C, De Angelis L, Visioli F. Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacol Res* 1995;31:275-9
257. Scalia R, Appel JZ 3rd, Lefer AM. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jul;18(7):1093-100.
258. Scanner SA et al. *Public Health Nutr.* 2004;7(3):407-22.
259. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Davis CE, Abolafia JM, Lippel K, Levy RI. Lipoprotein(a) levels and risk of coronary heart disease in men. The lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *JAMA.* 1994 Apr 6;271(13):999-1003.
260. Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr.* 2002 Feb;75(2):191-212.
261. Schneider W, Dalferth P, Kelber O, Friedemann G, Haasis R, Heinle H. Oxidizability of low density lipoprotein and total antioxidative capacity of plasma are differently altered during induction and regression of hypercholesterolemia in rabbits. *Atherosclerosis.* 1999 May;144(1):69-72.
262. Seiquer I, Manas M, Martinez-Victoria E, Huertas JR, Ballesta MC, Mataix FJ. Effects of adaptation to diets enriched with saturated, monounsaturated and polyunsaturated fats on lipid and serum fatty acid levels in miniature swine (*Sus scrofa*). *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1994;108:377-86.
263. Seman LJ, DeLuca C, Jenner JL, Cupples LA, McNamara JR, Wilson PW, Castelli WP, Ordovas JM, Schaefer EJ. Lipoprotein(a)-cholesterol and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):1039-46.
264. Sempos CT. Do body iron stores increase the risk of developing coronary heart disease?. *Am J Clin Nutr.* 2002 Sep;76(3):501-3.
265. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics.* 1995 Aug 10;28(3):495-500.
266. Sies H. *Oxidative Stress II. Oxidants and Antioxidants.* Academic Press. London. 1991
267. Sivaramakrishnan MR, Pynadath TI. Increased liver oleic acid synthesis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1982;41:21-5.

268. Sjodin B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 1990 Oct;10(4):236-54.
269. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85.
270. Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srail SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* 1999 Sep 17;458(2):224-30.
271. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med.* 1993 May 20;328(20):1444-9.
272. Stanner SA, Hughes J, Kelly CN, Buttriss J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutr.* 2004 May;7(3):407-22.
273. Stark AH, Madar Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev.* 2002 Jun;60(6):170-6.
274. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989 Apr 6;320(14):915-24.
275. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?. *Circulation.* 2002 Apr 30;105(17):2107-11.
276. Steinberg D, Witztum JL. *Molecular Basis of Cardiovascular Disease.* Ed. Chien. Saunders. Philadelphia. 1999;458-475.
277. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1211-7.
278. Stephens N, Parsons A, Schofield P, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson M. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781–6.
279. Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 1;88(5):1646-50.
280. Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May;20(5):1185-8.

281. Terao J, Piskula M, Yao Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch Biochem Biophys.* 1994 Jan;308(1):278-84.
282. Thomsen C, Rasmussen O, Christiansen C, Pedersen E, Vesterlund M, Storm H, Ingerslev J, Hermansen K. Comparison of the effects of a monounsaturated fat diet and a high carbohydrate diet on cardiovascular risk factors in first degree relatives to type-2 diabetic subjects. *Eur J Clin Nutr.* 1999 Oct;53(10):818-23.
283. Tietz NW. *Fundamentals of Clinical Chemistry* 3rd ed. Philadelphia. WB Saunders. 1987:455
284. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):241-52.
285. Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev.* 1997 Nov;55(11 Pt 1):383-9.
286. Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Lagiou A. Mediterranean diet and coronary heart disease: are antioxidants critical?. *Nutr Rev.* 1999 Aug;57(8):253-5.
287. Truswell AS, Choudhury N. Monounsaturated oils do not all have the same effect on plasma cholesterol. *Eur J Clin Nutr.* 1998 May;52(5):312-5.
288. Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL and Stupans I. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr.* 2001; 131(7):1993-1996.
289. Tuck KL, Hayball PJ, Stupans I. Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *J Agric Food Chem.* 2002 Apr 10;50(8):2404-9.
290. Ursini F, Tubaro F, Rong J, Sevanian A. Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. *Nutr Rev.* 1999 Aug;57(8):241-9.
291. van het Hof KH, Wiseman SA, Yang CS, Tijburg LB. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999 Apr;220(4):203-9.
292. Varani J, Ward PA. Mechanisms of neutrophil-dependent and neutrophil-independent endothelial cell injury. *Biol Signals.* 1994 Jan-Feb;3(1):1-14.
293. Vidal R, Hernandez-Vallejo S, Pauquai T, Texier O, Rousset M, Chambaz J, Demignot S, Lacorte JM. Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. *J Lipid Res.* 2005 Feb;46(2):258-68.

294. Villar F, Banegas JR, Donado MM, Rodríguez-Artalejo F. Sociedad Española de Aterosclerosis. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA 2003.
295. Virtamo J, Rapola JM, Ripatti S, Heinonen OP, Taylor PR, Albanes D, Huttunen JK. Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Arch Intern Med.* 1998 Mar 23;158(6):668-75.
296. Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278: 797-799 (a)
297. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jun 9;247(1):60-4.
298. Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis.* 1995 Sep;117(1):25-32.
299. Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr.* 2004;6:1-7
300. Visioli F, Caruso D, Plasmati E, Patelli R, Mulinacci N, Romani A, Galli G, Galli C. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res.* 2001 Mar;34(3):301-5.
301. Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli C and Caruso D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* 2000; 468(2-3):159-160. (b)
302. Visioli F, Galli C, Plasmati E, Viappiani S, Hernandez A, Colombo C, Sala A. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation.* 2000 Oct 31;102(18):2169-71. (c)
303. Visioli F, Galli C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci.* 1994;55(24):1965-71.
304. Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:955-65
305. Vissers MN, Zock PL, Leenen R, Roodenburg AJ, van Putte KP, Katan MB. Effect of consumption of phenols from olives and extra virgin olive oil on LDL oxidizability in healthy humans. *Free Radic Res.* 2001 Nov;35(5):619-29. (b)
306. Vissers MN, Zock PL, Wiseman SA, Meyboom S, Katan MB. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr.* 2001 May;55(5):334-41. (a)

307. Vissers MN; Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB. Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *J Nutr.* 2002;132:409-417.
308. Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1 Suppl):292S-297S.
309. Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem.* 1997 May 23;272(21):13597-607.
310. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest.* 1994 May;93(5):2106-13.
311. Weinbrenner T, Fito M, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C, Coolen S, Albaladejo MF, Abanades S, Schroder H, Marrugat J, Covas MI. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr* 2004;134:2314-21.
312. Weinbrenner T, Fito M, Farre Albaladejo M, Saez GT, Rijken P, Tormos C, Coolen S, De La Torre R, Covas MI. Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans. *Drugs Exp Clin Res.* 2004;30(5-6):207-12.
313. White HL, Wu JC. Properties of catechol O-methyltransferases from brain and liver of rat and human. *Biochem J.* 1975 Feb;145(2):135-43.
314. WHO/FAO expert consultation. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO technical Report Series nº 916. 2003
315. Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS, Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci.* 1996;59(1):PL15-21.
316. Willet WC. Diet and health: What should we eat? *Science.* 1994 Apr 22;264(5158):532-7
317. Wiseman SA, Mathot JN, de Fouw NJ, Tijburg LB. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 1996;120:15-23.
318. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?. *Trends Cardiovasc Med.* 2001 Apr-May;11(3-4):93-102.
319. Xu CL, Sim MK. Reduction of dihydroxyphenylacetic acid by a novel enzyme in the rat brain. *Biochem Pharmacol.* 1995 Oct 26;50(9):1333-7.
320. Yamaguchi Y, Kitagawa S, Imaizumi N, Kunitomo M, Fujiwara M. Enhancement of aortic cholesterol deposition by dietary linoleic acid in cholesterol-fed mice: an animal model

- for primary screening of antiatherosclerotic agents. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1993 Nov;30(3):169-75.
321. Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Oct 30;1128(2-3):117-31.
322. Yang TT, Koo MW. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci* 2000;66:411-23.
323. Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, Williams CM, Newsholme EA, Calder PC. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr*. 1998 Jan;67(1):129-35.
324. Yee WL, Wang Q, Agdinaoy T, Dang K, Chang H, Grandinetti A, Franke AA, Theriault A. Green tea catechins decrease apolipoprotein B-100 secretion from HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* 2002;229:85-92.
325. Yugarani T, Tan BK, Teh M, Das NP. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids* 1992;27:181-6.
326. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *New England Journal of Medicine* 2000; 342(3): 154–60.
327. Zhu BT. Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab*. 2002 Jun;3(3):321-49.



