

# UNIVERSIDAD DE GRANADA



**DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**Tesis Internacional**

**Efecto cardiometabólico de un aceite de oliva virgen enriquecido  
con componentes bioactivos de la propia aceituna**

*Cardiometabolic effect of a virgin olive oil enriched with  
bioactive components of the olive itself*

**Laura Alejandra Vázquez Aguilar**

Bajo la supervisión de:

**María Dolores Mesa García**

**Estefanía Sánchez Rodríguez**

Granada, 18 mayo del 2022



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Laura Alejandra Vázquez Aguilar  
ISBN: 978-84-1117-418-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/75958>

*“En tiempos de cambio, quienes estén  
abiertos al aprendizaje atesorarán el futuro,  
mientras aquellos que creen saberlo todo estarán  
equipados para un mundo que ya no existe”*

*Eric Hoffer*

Publicaciones asociadas a esta tesis doctoral

*Publications associated with this doctoral thesis*

**Vazquez A**, Sanchez-Rodriguez E, Vargas F, Montoro-Molina S, Romero M, Espejo-Calvo JA, Vilchez P, Jaramillo S, Olmo-García L, Carrasco-Pancorbo A, de la Torre R, Fito M, Covas MI, Martínez de Victoria E, Mesa MD. Cardioprotective Effect of a Virgin Olive Oil Enriched with Bioactive Compounds in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients*. 2019 Jul 26;11(8):1728. doi: 10.3390/nu11081728.

Índice de impacto (2017): 5.719 (Q1, 18/83, Nutrition & Dietetics).

Sanchez-Rodriguez E, **Vazquez-Aguilar LA\***, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Espejo-Calvo JA, Olmo-Peinado JM, de la Torre R, Fito-Colomer M, Covas MI, Romero C, Brenes M, Martinez de Victoria E, Gil A, Mesa MD. May bioactive compounds from the olive fruit improve the postprandial insulin response in healthy adults? *Journal of Functional Foods*. 2021; 83:104561. DOI: 10.1016/j.jff.2021.104561

Índice de impacto (2017): 4.451 (Q1, 35/144, Food Science & Technology).

*Otras publicaciones*

Rodríguez-Lara, A.; Plaza-Díaz, J.; López-Uriarte, P.; **Vázquez-Aguilar, A.**; Reyes-Castillo, Z.; Álvarez-Mercado, A.I. Fiber Consumption Mediates Differences in Several Gut Microbes in a Subpopulation of Young Mexican Adults. *Nutrients* 2022, 14, 1214. doi.org/10.3390/nu14061214

Índice de impacto (2017): 5.719 (Q1, 18/83, Nutrition & Dietetics).

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

EXP 00083147 / ITC-20151142. PROGRAMA FEDER-INNTERCONECTA concedido por el CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial). DESARROLLO DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS A PARTIR DE LOS PRODUCTOS DEL OLIVAR DIRIGIDOS A LA PROTECCIÓN CARDIOVASCULAR HUMANA (CARDIOLIVE) con ITC-20151142, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), a través del “Programa Operativo de Crecimiento Inteligente 2014-2020” y el Ministerio de Economía y Competitividad, a través del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), al amparo de la Orden ECC/1780/2013, de 30 de septiembre, por la que se aprueban las bases reguladoras para la concesión de ayudas públicas del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016.

Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020. Referencia: (B-AGR-257-UGR18). Análisis metabolómico del efecto de un aceite de oliva virgen enriquecido en compuestos bioactivos obtenidos de la propia aceituna, en ratas hipertensas.

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

Doctorado cofinanciado por la Universidad de Guadalajara campus CUSUR aprobada por la Coordinación General Académica y de Innovación en el marco de “Beca Institucional” mediante dictamen número V/2018/582.

Estancia movilidad internacional cofinanciada Santander ERASMUS y la Universidad de Granada, "Movilidad internacional de estudiantes de doctorado en el marco de los programas plan propio de internacionalización modalidad 3.

Quisiera agradecer primeramente a mis dos directoras de tesis, María Dolores Mesa García y Estefanía Sánchez Rodríguez, su tiempo, dedicación y cariño tiene un valor incalculable para mí, he sido muy afortunada y bendecida de tenerlas en este proceso de formación, a este agradecimiento quiero sumar de manera muy especial a Jesús Huertas y Avilene Rodríguez por ser los contactos que me llevaron a mis directoras de tesis, gracias por la confianza y por ponerme en manos de tan valiosas personas además de científicas.

Quiero agradecer también a la Universidad de Guadalajara CUSUR por otorgarme una beca y poder realizar mis estudios de doctorado, y en particular al Dr. Ricardo Xicoténcatl García Cauzor por impulsarme a seguir con mis estudios de doctorado.

Quiero agradecer a todos y cada uno de mis compañeros y compañeras del centro de investigación biomédica CIBM y del INyTA, por ser parte de este caminar tan largo que ha sido compartido con vosotros, Mari Cruz Rico, Sensi Rueda, Anabel Álvarez, Andrea Méndez, Antonio Zarza, Julio Plaza, Lorenzo Rivas, Concepción Aguilera, Luis Fontana, Esther González, Fran Ruiz, Carolina Gómez, Susana Ibañez y Olivia González.

Quiero agradecer a mi familia hermanas, hermano y sobrinos (as) que han sido un apoyo muy grande en este proceso de mi vida. En especial a Gloria que además de hermana ha sido confidente y amiga, gracias por todo tu apoyo y amor incondicional.

A mi familia de Estados Unidos, mi tía Joshy y a Angi por todo el apoyo y el amor incondicional que me han manifestado durante todo mi proceso doctoral.

Quiero elevar un agradecimiento “quizá el más especial” a mi madre † que en el transcurrir de este proceso nos ha dejado, sin embargo, que junto con mi padre nos ha dejado su legado más valioso, el amor por el trabajo, la responsabilidad, la disciplina y la constancia, herramientas que sin ellas no hubiera sido capaz de haber concluido esta tesis.

Quiero agradecer a mis amigas que le dan un toque especial a la vida a mis murcianas favoritas Laura Piqueras, Alejandra García, y mis manchegas Erika González, Lorena Arias, gracias por estar en los momentos más difíciles y desorganizarme la agenda para recordarme que la vida es vida.

Quiero agradecer a mi amiga Yaiza que además que compartimos una estancia en Italia juntas fue un apoyo muy fuerte durante la etapa de movilidad internacional.

Quiero agradecer el cariño y apoyo incondicional que han sido un acompañamiento muy especial en todo este proceso de doctorado y que vosotras (os) sois parte de mi familia Avilene Rodríguez, Emilio Molina, Scarlett Ornelas, Karina García, Lizbeth Jiménez, Priscila López y a mi familia de Barcelona Silvia, José, Nacho y Jony gracias por tanto apoyo y amor.

Y finalmente agradecer a Luigi Lucini y Gabriel Rocchetti por esa acogida tan especial que me brindaron en mi estancia en Italia.

A todos, de corazón Gracias.

<b><i>Índice</i></b>	<b>Pág.</b>
Resumen	9
Summary	11
<b><i>Introducción</i></b>	
Enfermedades cardiovasculares	15
Hipertensión arterial	17
Fisiopatología de la hipertensión	19
Hipertensión renovascular	20
Sistema renina-angiotensina-aldosterona	21
Gasto cardíaco y resistencia periférica	22
Disfunción endotelial, LDL, estrés oxidativo e inflamación	23
Dislipidemias	27
Resistencia a la insulina	31
Relación entre el metabolismo postprandial de carbohidratos y las ECV	32
Hormonas gastrointestinales y pancreáticas implicadas en el control del apetito	34
Dieta, hipertensión y síndrome metabólico	38
Dieta mediterránea	39
Aceite de oliva	41
Tipos de aceite de oliva	41
Beneficios del aceite de oliva	44
Beneficiosos de los componentes individuales del aceite de oliva	46
Ácido oleico	47
Hidroxitirosol	47
Oleuropeína	51
Tirosol	52
Ácidos triterpénicos	54
Modelo experimental de ratas espontáneamente hipertensas	56
Foodómica y metabolómica	57
Métodos analíticos para la extracción de metabolitos	61
Utilidades y enfoques del análisis metabolómico en aceite de oliva virgen	61
Metabolómica del aceite de oliva virgen y relación con la salud y nutrición	62
Justificación e hipótesis	65

Objetivos generales y específicos	66
<b><i>Material y métodos</i></b>	
<b><i>Estudio CARDIOLIVE</i></b>	69
Aceites experimentales	70
Diseño experimental estudio CARDIOLIVE	72
Determinación de la presión arterial y análisis bioquímico plasma y orina	74
Reactividad vascular en anillos aórticos	75
Análisis estadístico	75
<b><i>Análisis metabólico</i></b>	76
Preparación de las muestras para análisis metabólico	76
Extracción de metabolitos	77
El pretratamiento de datos y control de calidad	80
Agrupamiento de características de los datos de metabólica	80
Análisis multivariante	81
Análisis univariante	82
Identificación y elucidación estructural de posibles metabolitos diana	82
Anotación de características relevantes	83
Análisis de enriquecimiento de conjuntos de metabolitos	84
<b><i>Estudio NUTRAOLEUM</i></b>	
Aceites experimentales en el estudio NUTRAOLEUM	85
Sujetos, cálculo del tamaño de la muestra y diseño de estudio	86
Diseño experimental de la intervención posprandial	88
Determinaciones bioquímicas en plasma	90
Índices de sensibilidad y resistencia a la insulina	91
Análisis estadístico	92
<b><i>Resultados</i></b>	
<b><i>Resultados Estudio CARDIOLIVE</i></b>	
Evolución de características basales	95
Variables bioquímicas en orina y plasma	96
Evolución de la presión arterial en SHR	97
Péptidos vasoactivos: endotelina-1 urinaria y angiotensina II plasmática	99
Variables morfológicas	100



Efectos <i>ex vivo</i> sobre la función vascular	100
Biomarcadores oxidativos e inflamatorios	102
Estudio metabolómico. Modelos de comparación en plasma y orina realizados en SIMCA	103
Modelo de análisis OPLS-DA en orina	104
Análisis de metabolitos candidatos en muestras de orina	105
Modelo de análisis OPLS-DA en plasma	107
Análisis de metabolitos candidatos en muestras de plasma	108
Análisis de enriquecimiento del conjunto de metabolitos diferenciales entre grupos SHR y WKY en orina	111
<b><i>Resultados Estudio NUTRAOLEUM</i></b>	
Características clínicas y bioquímicas al inicio del estudio de los 18 sujetos seleccionados para el estudio posprandial.	112
Evolución de las concentraciones plasmáticas posprandiales de glucosa e insulina (desde tiempo 0 hasta los 240 min).	114
Evolución de las concentraciones plasmáticas posprandiales (desde tiempo 0 hasta los 240 min) de hormonas gastrointestinales: GIP, GLP, grelina, PP y PYY	115
<b><i>Discusión</i></b>	
<b><i>Estudio CARDIOLIVE</i></b>	
Efecto de un aceite de oliva enriquecido en extractos de la aceituna sobre la hipertensión y el riesgo cardiovascular en ratas genéticamente hipertensas	119
Efecto de un aceite de oliva enriquecido en extractos de la aceituna sobre los cambios metabolómicos en de ratas genéticamente hipertensas.	127
<b><i>Estudio NUTRAOLEUM</i></b>	
Efecto de un aceite de oliva rico en polifenoles y ácidos triterpénicos procedentes de la aceituna sobre el metabolismo posprandial de carbohidratos en humanos sanos	138
<b><i>Conclusiones y Conclusions</i></b>	
Conclusiones generales	143
Abreviaturas	146
Listado de tablas	149
Listado de figuras	150
Bibliografía	151
Anexos	181

---

## **Resumen**

El aceite de oliva virgen (AOV) es una grasa cardiosaludable por su contenido de ácido oleico y compuestos minoritarios: fenoles y ácidos triterpénicos. Las evidencias demuestran que la ingesta de AOV con alto contenido de polifenoles (150-800 mg por kg de aceite) mejora la concentración plasmática de biomarcadores inflamatorios y colesterol, así como la hipertensión arterial (HTA) (George *et al.*, 2019). Además de la acción antihipertensiva y antioxidante, los ácidos triterpénicos regulan varios factores relacionados con el síndrome metabólico (Sharma *et al.*, 2018). Estos compuestos están presentes en los subproductos del olivar, de donde pueden ser extraídos para enriquecer los aceites y aumentar sus propiedades funcionales. La metabolómica es una tecnología que permite identificar componentes del AOV responsables de la actividad beneficiosa, y contribuye a comprender los mecanismos moleculares que sustentan dichos efectos (Olmo-García y Carrasco-Pancorbo, 2021).

La **hipótesis** de la presente Tesis Doctoral se basa en que la suplementación con AOV ricos en compuestos bioactivos puede mejorar la salud cardiovascular y sus factores de riesgo asociados.

El **objetivo general** de la Tesis Doctoral es evaluar el efecto de unos AOV enriquecidos con compuestos bioactivos obtenidos de la propia aceituna y de las hojas del olivo sobre la hipertensión arterial, y factores de riesgo cardiometabólico. Se han planteado dos estudios:

El estudio **CARDIOLIVE** ha evaluado el efecto de la suplementación durante 8 semanas de un AOV enriquecido con extractos de aceituna y de hoja de olivo, con una concentración de 749.9 mg/kg de polifenoles y 292.6 mg/kg de ácidos triterpénicos, comparado con un aceite con baja concentración 17.6 mg/kg en un modelo experimental de ratas con hipertensión genética (SHR).

Los **objetivos específicos** han sido la evaluación del efecto del aceite rico en compuestos bioactivos sobre: 1) la tensión arterial, 2) la morfología del corazón, 3) la disfunción endotelial *ex vivo*, y 4) biomarcadores plasmáticos de oxidación e inflamación. Además, se ha realizado un estudio metabolómico en plasma y orina para identificar rutas metabólicas afectadas en la HTA y los efectos del AOV.

Se incluyeron 10 animales por grupo de ratas que tomaron 1 mL/d del aceite correspondiente, y 10 ratas SHR controles y un grupo control de ratas Wistar Kyoto sanas que recibieron 1 mL/d de agua. Los resultados de este estudio muestran que el tratamiento durante 8 semanas con 1 mL/d de un AOV enriquecido con extractos ricos en polifenoles y triterpenos en suspensión reduce la presión arterial sistólica (PAS), la hipertrofia cardíaca y la secreción de angiotensina II, endotelina-1 y nitritos en ratas hipertensas. Además, mejora la funcionalidad de las aortas *ex vivo* y las concentraciones plasmáticas de biomarcadores de oxidación y colesterol. El efecto beneficioso sobre

algunos de estos biomarcadores también se produjo tras el consumo del AOV control, pero no se vio reflejado en una disminución de la PAS.

Los resultados de los análisis metabolómicos nos han permitido la anotación de 12 metabolitos (6 en orina y 6 en plasma). El perfil metabolómico en orina de las ratas SHR tratadas con AOC mostró mayores cantidades de enterolactona e isoflavonas comparadas con los animales SHR y AOE. En el perfil metabolómico plasmático las ratas SHR tratadas con AOE mostró mayores cantidades de glicerofosfolípidos y lisofosfolípidos. El análisis de enriquecimiento permitió identificar tres vías metabólicas afectadas en las ratas SHR enfermas sin tratar *versus* las ratas WKY, estas vías son: vía metabólica de las purinas (úrico y uratos), vía metabólica de los aminoácidos (tirosina y fenilalanina) y vía de biosíntesis de las hormonas esteroides, lo que confirma que la rata SHR es idóneo para profundizar en el estudio de la fisiopatología de la HTA. Los datos también sugieren que la microbiota intestinal es determinante en la producción de ciertos metabolitos implicados en el mantenimiento de la HTA, por lo que futuros estudios de intervención nutricional en animales y humanos, deberían de complementarse con análisis de microbiota intestinal.

En el estudio **NUTRAOLEUM** se evaluó el efecto posprandial en humanos sanos (n=18) de un AOV extra (AOVE) optimizado con 490 mg/kg de polifenoles y pocos ácidos triterpénicos (86 mg/kg); un AOV estándar con 124 mg/kg de polifenoles y 86 mg/kg de ácidos triterpénicos; y un AOV funcional preparado a partir del AOVE optimizado (487 mg/kg polifenoles) y al que se le añadieron ácidos triterpénicos de la aceituna (388.8 mg/kg).

El *objetivo específico* ha sido comparar el efecto postprandial de la ingesta de una dosis de 30 mL de los tres aceites sobre la respuesta glucémica, insulínica, las incretinas y las hormonas gastrointestinales implicadas en la regulación del apetito y la saciedad. Se calcularon distintos índices de funcionalidad pancreática (HOMA- $\beta$ ), secreción de insulina (INSI), resistencia a la insulina (HOMA-IR) y sensibilidad a la insulina (QUICKI y Matsuda). Los datos demuestran que la ingesta de aceite de oliva enriquecido con polifenoles y ácidos triterpénicos mejora la funcionalidad de la insulina al aumentar su secreción (INSI) y la sensibilidad periférica (Matsuda), sugiriendo un efecto sinérgico entre los polifenoles y los ácidos triterpénicos.

### **Conclusiones**

Nuestros resultados ayudan a comprender los efectos del AOV y de sus componentes minoritarios sobre la salud cardiovascular y los factores de riesgo asociados. No obstante, son necesarios más estudios para confirmar el efecto sinérgico de los polifenoles y ácidos triterpénicos presentes en el AOV e identificar los mecanismos moleculares responsables de los efectos beneficiosos sobre la salud cardiometabólica y los factores de riesgo asociados.

## Summary

Virgin olive oil (VOO) is a heart-healthy fat for its content of oleic acid and minor compounds: phenols and triterpenic acids. The evidence shows that the intake of VOOs with a high content of polyphenols (150-800 mg/kg of oil) improves plasma inflammatory biomarkers and cholesterol, as well as arterial hypertension (AH) (George *et al.*, 2019). In addition to antihypertensive and antioxidant actions, triterpenic acids regulate several factors related to metabolic syndrome (Sharma *et al.*, 2018). These compounds are present in the by-products of the olive grove, where they can be extracted to enrich the oils and their functional properties. Metabolomics helps to identify the VOO components responsible for the beneficial activity and the molecular mechanisms underlying those effects (Olmo-García and Carrasco-Pancorbo., 2021).

**The hypothesis** of this Doctoral Thesis is based on that the supplementation with VOOs enriched in bioactive compounds can improve cardiovascular health and its associated risk factors

**The general objective** of the Doctoral Thesis is to evaluate the effect of VOOs enriched with bioactive compounds obtained from olives and olive leaves on hypertension and metabolic risk factors associated with cardiovascular risk.

Two studies have been proposed:

The **CARDIOLIVE** study has evaluated the effect of 8-weeks oral supplementation with a VOO enriched with olive and olive leaf extracts, with a concentration of 749.9 mg/kg of polyphenols and 292.6 mg/kg of triterpenic acids compared to an oil with a low concentration 17.6 mg/kg in an experimental model of rats with genetic hypertension (SHR). The specific objectives have been the evaluation of the effect of oil enriched in bioactive compounds on: 1) blood pressure, 2) heart morphology, 3) *ex-vivo* endothelial dysfunction, and 4) oxidation and inflammation plasma biomarkers. In addition, a metabolomic study has been carried out to identify metabolic pathways affected during hypertension and the effects of the VOO.

**Materials and methods:** 10 animals were included per group of rats that took 1 mL/d of the corresponding oil, and 10 control SHR rats and a healthy control group of Wistar Kyoto rats that received 1 mL/d of water.

The results of this study show that treatment for 8 weeks with 1 mL/d of a VOO enriched with extracts rich in polyphenols and triterpenes in suspension reduces systolic blood pressure (SBP), cardiac hypertrophy and the secretion of angiotensin II, endothelin -1 and nitrites in hypertensive rats. In addition, improves the functionality of the aortas *ex-vivo* and the concentrations of plasma oxidation biomarkers and cholesterol.

The beneficial effect on some of these biomarkers also occurred after consumption of the control VOO, but was not reflected in a decrease in SBP, which demonstrates an effect of the added bioactive components that are carried in the VOO.

The results of the metabolomic analyses has allowed us the annotation of 12 metabolites (6 in urine and 6 in plasma). The urinary metabolomic profile of SHR rats treated with VOO control showed higher amounts of enterolactone and isoflavones compared to SHR and enriched VOO animals. In the plasmatic metabolomic profile, SHR rats treated with enriched VOO showed higher amounts of glycerophospholipids and lysophospholipids. The enrichment analysis identified three metabolic pathways affected in sick untreated SHR rats versus WKY rats, these pathways are: purine metabolic pathway (uric and urate), amino acid metabolic pathway (tyrosine and phenylalanine) and biosynthesis of steroid hormones, which confirms that the rat SHR is suitable for study of the pathophysiology of hypertension. Our data suggest that the intestinal microbiota is determinant for the production of certain metabolites, which play a fundamental role in maintaining cardiovascular function, Therefore, future nutritional intervention studies in animals and humans should be complemented with intestinal microbiota analysis.

In the **NUTRAOLEUM** study, the postprandial effect was evaluated in healthy humans (n=18), of an optimized extra VOO (EVOO) with 490 mg/kg of polyphenols and few triterpenic acids (86 mg/kg); a standard VOO with 124 mg/kg of polyphenols and 86 mg/kg of triterpenic acids; and a functional VOO prepared from the optimized EVOO (487 mg/kg polyphenols) with added olive-derived triterpenic acids (388.8 mg/kg).

The specific objective has been to evaluate the effect of intake of a dose of 30 mL of the three different oils on the glycemic response, insulin, incretins and gastrointestinal hormones involved in the regulation of appetite and satiety. Different indices of pancreatic functionality (HOMA- $\beta$ ), insulin secretion (INSI), insulin resistance (HOMA-IR), and insulin sensitivity (QUICKI and Matsuda) were calculated.

The data show that the intake of olive oil enriched with polyphenols and triterpenic acids improves the functionality of insulin by increasing its secretion (INSI) and peripheral sensitivity (Matsuda) suggesting a synergistic effect between polyphenols and triterpenic acids.

### ***Conclusions***

Our results help to understand the effects of VOO and its minor components on cardiovascular health and associated risk factors. However, more studies are needed to confirm the synergistic effect of polyphenols and triterpenic acids present in VOO and to identify the molecular mechanisms responsible for the beneficial effects on cardiometabolic health and the associated risk factors.

# INTRODUCCIÓN





## *Introducción*

### *Enfermedades cardiovasculares*

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs), son la principal causa de muerte y discapacidad en los países desarrollados, y su incidencia está aumentando constantemente a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECVs afectan en mayor medida a países con ingresos medios y bajos, y representan alrededor del 80% de mortalidad por estas causas (OMS, 2020a). Desde el 2012, han muerto 17.5 millones de personas por esta causa, lo que representa un 30% del total de las defunciones registradas en todo el mundo, de las cuales 7.4 millones se debieron a cardiopatías coronarias y 6.7 millones a accidentes cerebrovasculares. Además, se prevé que para el 2030, alrededor de 23.6 millones de personas morirán por alguna ECV, y que si no se toman medidas de prevención adecuadas éstas seguirán siendo la principal causa de muerte en el mundo (OMS, 2020a). En 2018, en España las ECVs también representan la primera causa de muerte, con un 28.3% de las defunciones asociadas en ambos sexos (OMS, 2020a). Estas enfermedades suponen un elevado coste sanitario, y también generan una alta carga socioeconómica para la población en general.

La patología subyacente y la progresión asociada a la mayoría de las ECVs es predominantemente de origen aterosclerótico, y conduce al desarrollo de enfermedades tales como cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, tromboembolismo venoso y enfermedad vascular periférica, que posteriormente pueden causar infarto de miocardio, arritmias cardíacas o accidente cerebrovascular (Flora y Nayak., 2019). Por otro lado, la hipertensión constituye otra patología que también se relaciona y agrava el desarrollo de los procesos ateroscleróticos. De acuerdo con la OMS las ECVs se clasifican en:

- Hipertensión arterial (HTA), que clínicamente está caracterizada por una subida en la presión arterial por encima de los valores normales: presión sistólica  $> 140$  mmHg de y presión diastólica  $> 90$  mmHg).
- Cardiopatía coronaria, enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco.
- Enfermedades cerebrovasculares, de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- Arteriopatías periféricas, enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.



- Cardiopatías reumáticas, que son lesiones del músculo cardíaco y de las válvulas cardíacas, debidas a la fiebre reumática o a una enfermedad bacteriana causada por estreptococos.
- Cardiopatías congénitas, debidas a malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.
- Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares, ocasionadas por coágulos de sangre (trombos) producidas en las venas de las piernas, que pueden desprenderse formando émbolos que terminan alojándose en los vasos del corazón y los pulmones donde provocan daños.

Los infartos de miocardio y los accidentes cerebrovasculares suelen ser fenómenos agudos que se deben sobre todo a coágulos que impiden que la sangre fluya hacia el tejido cardíaco o cerebral. La causa más frecuente es la acumulación de una capa de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos (venas y arterias) que provocan la formación de placas de ateroma. También pueden deberse a la rotura de los vasos cerebrales y la posterior hemorragia en el tejido.

La etiología de las ECVs es multifactorial, el sobrepeso y la obesidad, el tabaquismo y el consumo de alcohol, hábitos alimentarios inadecuados y la inactividad física o sedentarismo son factores de riesgo que contribuyen a su desarrollo (OMS, 2020a). En conjunto, estos factores son responsables de más del 90% del riesgo cardiovascular (Flora y Nayak., 2019). Algunos de estos factores de riesgo pueden ser modificables o conductuales, como la dieta, el sobrepeso y/o la obesidad, el tabaquismo, el consumo elevado de alcohol y el sedentarismo, mientras que otros, como el sexo, la edad y el genotipo, no pueden modificarse (Figura 1).

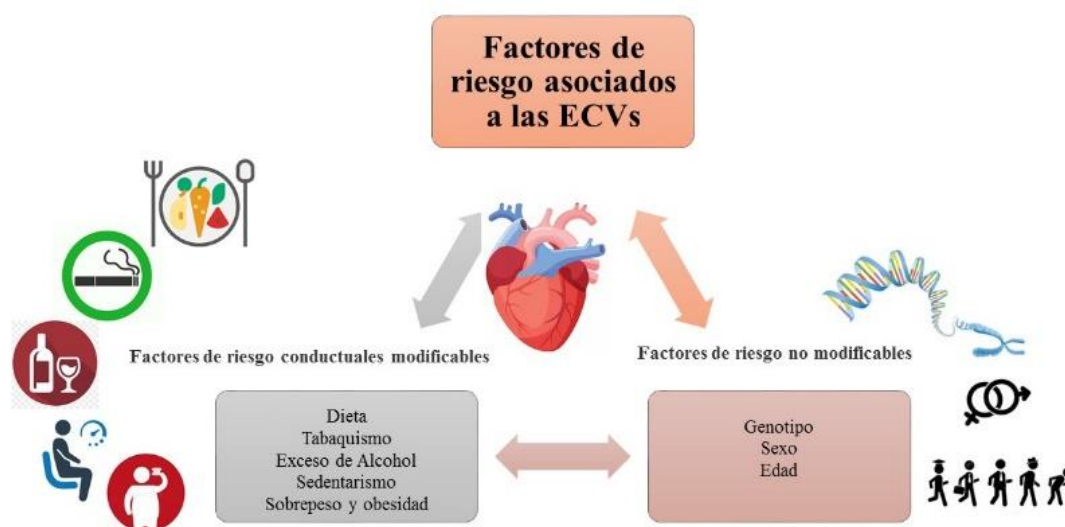


Figura 1. Factores de riesgo conductuales modificables y no modificables de las ECVs

Hay evidencias que confirman que la dieta es clave para evitar muertes prematuras en comparación con otros factores de riesgo conductuales (Meier *et al.*, 2019). Concretamente, una dieta equilibrada, que incluye el consumo diario de frutas y hortalizas, la reducción del consumo de sal y de alcohol, y abandonar el consumo de tabaco, junto con la práctica de actividad física regular, reducen el riesgo de ECVs, de tal manera que estas medidas son fundamentales y deben ser complementarias para su tratamiento (OMS, 2020a). Por otro lado, la globalización, la urbanización y el envejecimiento de la población, así como cambios sociales, económicos y culturales son también determinantes para las enfermedades crónicas, es decir, "las causas de las causas" (OMS, 2020a).

### ***Hipertensión arterial***

Para comprender qué es y cómo se ocasiona la HTA, es preciso mencionar que la tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias. Cuando esta fuerza es demasiado elevada, se considera hipertensión (OMS, 2020b). Existen dos tipos de presión arterial, cuando se produce la sístole del ventrículo izquierdo, se le llama presión arterial sistólica (PAS) y representa la presión que ejerce la sangre sobre los vasos cuando el corazón se contrae o late. Cuando el ventrículo izquierdo se relaja, se le conoce como presión arterial diastólica (PAD) y representa la presión ejercida sobre los vasos cuando el corazón se relaja entre un latido y otro. Se considera que la persona presenta hipertensión cuando su tensión arterial sistólica es demasiado elevada, superior o igual a 140 mmHg y la diastólica superior o igual a 90 mmHg.

**Tabla 1.** Clasificación de la presión sanguínea y definición del grado de hipertensión.

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

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; mmHg, milímetros de mercurio (Williams *et al.*, 2018).

En la Tabla 1, se muestran los valores de PAS y de PAD en condiciones fisiológicas normales, y en las diferentes categorías de hipertensión de acuerdo con la guía de las prácticas clínicas de la Sociedad Europea de la Hipertensión (Williams *et al.*, 2018). Para realizar un buen diagnóstico de HTA se han de tomar dos mediciones en días distintos y en ambas lecturas la PAS ha de ser superior o igual a 140 mmHg y la PAD superior o igual a 90 mmHg (OMS, 2020b).

De acuerdo con la OMS, se estima que 1130 millones de personas sufren HTA en el mundo. En el 2015, uno de cada cuatro hombres y una de cada cinco mujeres sufrían HTA, y, una de cada cinco personas en el mundo no tiene un control médico de este problema. La HTA es una de las principales causas de muerte prematura. Concretamente, en 2015 10 millones de personas murieron a consecuencia de la HTA a pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento durante los últimos 30 años (OMS, 2020b). La HTA es el factor de riesgo modificable más importante causante de accidentes cerebrovasculares; más de la mitad de éstos se atribuyen a la HTA en todo el mundo (Lawes *et al.*, 2008). La mayoría de las muertes relacionadas con PAS por año se deben a cardiopatía isquémica (4.9 millones), accidente cerebrovascular hemorrágico (2 millones) y al accidente cerebrovascular isquémico (1.5 millones). De hecho, el aumento de la presión arterial contribuye a incrementar la incidencia de estos eventos y de otros como la muerte súbita, insuficiencia cardíaca y enfermedad arterial periférica y la enfermedad renal terminal (Williams *et al.*, 2018). Más del 90-95% de la HTA es de origen primario, es decir se debe a factores genéticos o de estilo de vida general, el 5-10% se considera HTA secundaria, debido a trastornos crónicos o provocadores como estenosis de la arteria renal, tumores endocrinos o efectos secundarios de medicamentos (Caprio y Sorond., 2019).

Además, la HTA raramente se produce de forma aislada, es decir que comúnmente va asociada a otros factores de riesgo cardiometabólicos como la dislipidemia y la desregularización de la glucosa y estos factores de riesgo metabólicos tienen un efecto multiplicador sobre el riesgo cardiovascular (Mancia *et al.*, 2005). Por otra parte, la HTA crónica puede producir cambios en la aurícula y el ventrículo izquierdo y las arterias coronarias. Así mismo, la HTA aumenta la carga de trabajo del corazón, induciendo cambios estructurales, en morfología y espesor, y funcionales en el miocardio. Estos cambios incluyen hipertrofia del ventrículo izquierdo, que puede progresar a insuficiencia cardíaca (Tackling y Borhade., 2021). La hipertrofia del músculo puede interrumpir las vías de conducción que predisponen a la fibrilación auricular y que conduce a un accidente cerebrovascular isquémico. Los pacientes que presentan hipertrofia ventricular izquierda tienen una morbilidad y mortalidad significativamente mayor (Tackling y Borhade., 2021).

La enfermedad cardíaca hipertensiva puede provocar insuficiencia cardíaca diastólica, ó sistólica o una combinación de ambas. Cuando se presenta una complicación de este tipo los pacientes tienen un riesgo sustancialmente mayor de desarrollar complicaciones agudas como insuficiencia cardíaca descompensada, síndrome coronario agudo o muerte cardíaca súbita. La HTA también altera el sistema endotelial, lo que aumenta el riesgo de enfermedad arterial coronaria y enfermedad arterial periférica y, por lo tanto, representa un factor de riesgo significativo para el desarrollo de enfermedad aterosclerótica.

En resumen, la enfermedad cardíaca hipertensiva reúne todas las secuelas directas e indirectas de la HTA crónica que incluyen insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica (Tackling y Borhade., 2021). Para el control y el tratamiento de los pacientes es importante modificar el estilo de vida: el abandono del tabaco, la práctica regular de ejercicio físico, la reducción del estrés y una alimentación equilibrada, basada en la ingesta diaria de fruta y verdura, la reducción de ingesta de sal en la dieta a menos de 5 g/día, limitar alimentos ricos en grasas saturadas y grasas *trans*, así como evitar el consumo excesivo de alcohol. Además, se recomienda un control de peso eficaz para quienes tienen una presión arterial mayor de 120/90 mmHg y un evento cardiovascular reciente (OMS, 2020a; Caprio y Sorond., 2019).

### ***Fisiopatología de la hipertensión***

La HTA provoca la disfunción de muchos órganos, incluidos el corazón, los vasos sanguíneos y los riñones (Krzeminska *et al.*, 2022). Las paredes de las arterias se constituyen por tres capas: la íntima, la media y la adventicia. La íntima normalmente consta de una sola capa de células endoteliales adheridas a la capa subendotelial y la membrana elástica interna. La estructura de la íntima cambia con la edad y se vuelve multicapa debido a la migración de las células del músculo liso de la capa media a la íntima (Milutinović *et al.*, 2020). La capa media está compuesta por células de músculo liso y tejido conjuntivo, y la capa más externa se llama adventicia y contiene fibroblastos, células progenitoras, células inmunitarias, microvasos y nervios adrenérgicos y su principal función es el soporte estructural del vaso sanguíneo (Rahman y Siddik., 2021).

El endotelio, es una lámina única de células endoteliales, constituye la superficie interna del sistema circulatorio, además de servir como una barrera para la sangre que regula el intercambio molecular entre la sangre y el interior de la pared vascular. Los fibroblastos adventicios tienen un papel potencial en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que modulan la actividad

de las células del músculo liso que residen en la túnica media y que a su vez inician la remodelación vascular (Haurani y Pagano., 2007).

Existen muchos factores interrelacionados que contribuyen al aumento de la presión arterial en pacientes hipertensos, y sus roles relativos pueden diferir entre individuos. Entre los factores que más se han estudiado se encuentran la ingesta de sal, la obesidad y la resistencia a la insulina, el sistema renina-angiotensina y el sistema nervioso simpático. No obstante, en los últimos años se han evaluado otros factores, como la genética, la disfunción endotelial (manifestada por cambios en la endotelina y el óxido nítrico), el bajo peso al nacer, la nutrición intrauterina y anomalías neurovasculares (Beevers *et al.*, 2001).

Se considera hipertensión primaria cuando se desconoce la causa de la presión arterial elevada, y secundaria cuando es posible determinar la etiología. La mayoría de los pacientes con hipertensión no tienen una etiología clara y se clasifican como hipertensos primarios (Charles *et al.*, 2017). La hipertensión renovascular es una causa común de hipertensión secundaria, que se desarrolla a través de la reducción de la perfusión del flujo sanguíneo al riñón o causada por alguna oclusión o estenosis de la arteria renal (Herrmann y Textor., 2019). Esta respuesta da como resultado la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, con el consiguiente incremento del estrés oxidativo, la disfunción vascular y finalmente de la presión arterial (Campos *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2020). Aproximadamente de un 5% al 10% de estos pacientes pueden tener hipertensión secundaria, lo que indica una causa subyacente y potencialmente reversible (Charles *et al.*, 2017).

### ***Hipertensión renovascular***

Este tipo de hipertensión se caracteriza por la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, que favorece la vasoconstricción, el estrés oxidativo y el aumento de la presión arterial. La activación del sistema renina-angiotensina provoca la reducción de la producción de óxido nítrico, que es un vasodilatador, y su biodisponibilidad se reduce en el riñón lesionado en este tipo de hipertensión. El aumento del estrés oxidativo en la hipertensión renovascular contribuye directamente al daño endotelial y la disfunción renal. El óxido nítrico producido se combina con el anión superóxido, produciendo peroxinitrito que es muy reactivo y promueve la formación de nitrotirosina. La reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico y la formación de peroxinitritos tienen un papel fundamental en la fisiopatología de la hipertensión renovascular, que puede derivar en insuficiencia renal (Pereira *et al.*, 2022).

El óxido nítrico es una molécula con funciones importantes en los riñones, regula la homeostasis del sodio y del agua a través de numerosos mecanismos como la natriuresis y la diuresis. La menor síntesis de óxido nítrico es un mecanismo implicado en el desarrollo de la patología de la hipertensión (Mount y Power., 2006). Las ERO son moduladores importantes de la interacción entre la angiotensina II y el óxido nítrico en la vasculatura renal. El aumento de la activación de ERO conducen a la reducción del óxido nítrico con lo cual se convierte en un factor patogénico para la HTA (Patzak y Persson., 2007).

Los riñones regulan el volumen circulatorio controlando el equilibrio de sodio y agua, manteniendo así la homeostasis del volumen de líquido extracelular. Cuando se aumenta la ingesta de sodio y agua, el volumen extracelular aumenta y aumenta el retorno venoso al corazón, lo que induce un estiramiento auricular, y aumenta el gasto cardíaco y la presión arterial sistémica (Van Beusecum e Inscho., 2015). Para regularizar estas alteraciones, la nefrona aumenta la excreción de sodio y agua para disminuir el volumen extracelular y por tanto controlar la presión arterial, proceso conocido como natriuresis por presión (Van Beusecum e Inscho., 2015). Con una disminución de la presión arterial, la nefrona aumenta la reabsorción de sodio y agua para aumentar el volumen extracelular y, por lo tanto, aumentar la presión arterial es un sistema bidireccional (Van Beusecum e Inscho., 2015).

### ***Sistema renina-angiotensina-aldosterona***

El sistema renina-angiotensina-aldosterona es uno de los sistemas endocrinos más importantes que contribuyen al control de la presión arterial, y un regulador importante del equilibrio de sodio y del volumen de fluidos corporales. La renina es una hormona secretada en el aparato yuxtaglomerular del riñón en respuesta a la hipoperfusión glomerular o a la reducción de la ingesta de sal, pero también se libera en respuesta a la estimulación del sistema nervioso simpático. Su principal acción es controlar la producción de otra hormona llamada aldosterona, producida en las glándulas suprarrenales (Beevers *et al.*, 2001).

La renina es responsable de convertir el angiotensinógeno en angiotensina I, una sustancia fisiológicamente inactiva que se convierte rápidamente en angiotensina II en los pulmones mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II es un potente vasoconstrictor que provoca un aumento de la presión arterial (Figura 2). Además, estimula la liberación de aldosterona de la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal, lo que provoca un mayor aumento de la presión arterial relacionado con la retención de sodio y agua (Beevers *et al.*, 2001).

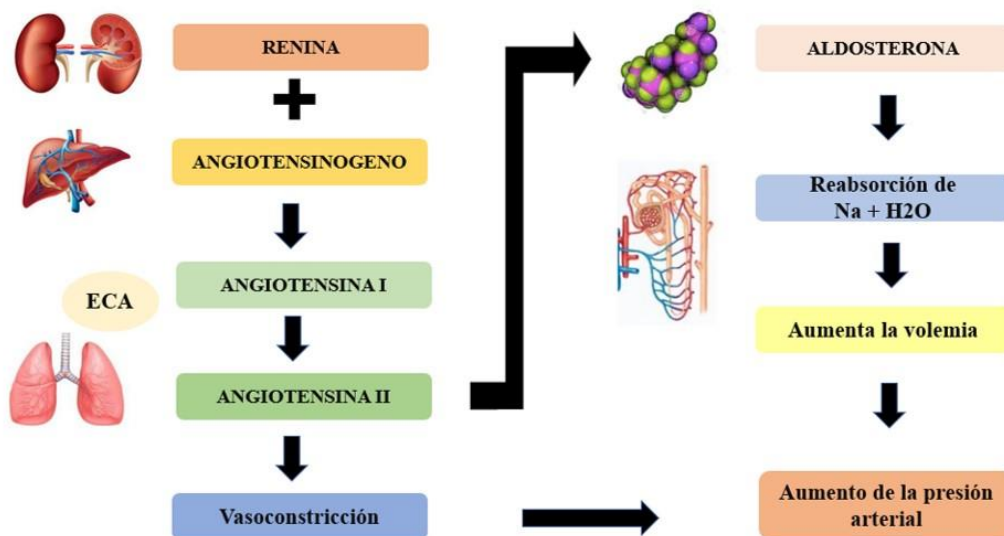


Figura 2. Sistema renina angiotensina aldosterona

Posiblemente el sistema circulante de renina-angiotensina no sea directamente responsable del aumento de la presión arterial en la HTA primaria. En particular, muchos pacientes hipertensos tienen niveles bajos de renina y angiotensina II (adultos mayores y de raza negra), y los medicamentos que bloquean el sistema renina-angiotensina particularmente no son muy efectivos (Beavers *et al.*, 2001).

### ***Gasto cardíaco y resistencia periférica***

El mantenimiento de una presión arterial normal depende del equilibrio entre el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica. La mayoría de los pacientes con hipertensión primaria tienen un gasto cardíaco normal pero una resistencia periférica elevada. La resistencia periférica no está determinada por las grandes arterias o los capilares, sino por los vasos más pequeños llamados arteriolas, cuyas paredes contienen células de músculo liso. Las contracciones de las células del músculo liso están relacionadas con un aumento de la concentración de calcio intracelular, lo que explica el efecto vasodilatador de los fármacos bloqueadores de calcio. Sin embargo, se piensa que la constricción prolongada del músculo liso induce cambios estructurales con engrosamiento de las paredes de los vasos arteriolariales posiblemente mediado por la angiotensina, lo que conduce a un aumento irreversible de la resistencia periférica (Beavers *et al.*, 2001).

Otro de los factores que puede tener implicaciones en la hipertensión arterial es la estimulación del sistema nervioso simpático que puede causar constricción arteriolar y dilatación arteriolar, ejerciendo un papel importante en el mantenimiento de una presión arterial normal. Existe poca evidencia que confirme el papel claro de la epinefrina (adrenalina) y norepinefrina (noradrenalina)

en la etiología de la hipertensión (Beevers *et al.*, 2001). Sin embargo, sus efectos como neurotransmisores son importantes, sobre todo porque los fármacos que bloquean el sistema nervioso simpático reducen la presión arterial y tienen un papel terapéutico para controlarla. En este caso, es probable que la hipertensión esté relacionada con una interacción entre el sistema nervioso autónomo y el sistema renina-angiotensina, junto con otros factores, como el sodio, el volumen circulante y algunas de las hormonas (Beevers *et al.*, 2001).

### ***Disfunción endotelial, LDL, estrés oxidativo e inflamación***

Como ya se había discutido anteriormente, la HTA es una enfermedad multifactorial y se cree que su desarrollo está influenciado por el estrés oxidativo causado por un desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes presentes. La producción excesiva de ERO y un sistema antioxidante deteriorado promueven el desarrollo de disfunción endotelial, inflamación y aumento de la contractilidad vascular, lo que resulta en la remodelación del tejido cardiovascular (Krzeminska *et al.*, 2022). Varios factores como la disfunción endotelial, el estrés oxidativo, la inflamación, y la dislipidemia están relacionados de forma independiente con la HTA. La dislipidemia causada por el aumento de las concentraciones de colesterol total, LDL y una baja concentración de HDL resultan peligrosas ya que pueden conducir a su acumulación y oxidación de LDL en la pared arterial, lo que se asocia con un mayor riesgo de la enfermedad aterosclerótica cardiovascular (Karr, 2017). La dislipidemia y la HTA son condiciones patológicas que dañan el endotelio, desencadenando la proliferación celular, la remodelación vascular, la apoptosis y el aumento de la permeabilidad celular con moléculas de adhesión aumentadas que se unen a los monocitos y linfocitos T para crear un cóctel de factores patológicos (Hurtubise *et al.*, 2016). En consecuencia, los factores son redirigidos por quimioatrayentes y citocinas proinflamatorias hacia la capa íntima de las arterias, donde los monocitos se diferencian en macrófagos que toman LDL oxidada sin control para formar células espumosas y provocar lesiones ateroscleróticas. Esta lesión, produce daño endotelial y provoca pérdida de actividad vasomotora, contractilidad vascular desproporcionada y elevación de la presión arterial, que se perpetúa y agrava con el tiempo (Hurtubise *et al.*, 2016).

El endotelio vascular, se ha reconocido como un factor importante en la homeostasis vascular, al regular el flujo sanguíneo de los vasos pequeños y grandes. De hecho, la disfunción endotelial es una etapa inicial de las enfermedades vasculares y un importante factor de riesgo de ECV y enfermedades metabólicas (Huynh y Heo., 2019). Las múltiples funciones de las células endoteliales, además de la regulación de la hemostasia, incluyen el control de la fluidez sanguínea, de la agregación plaquetaria y del tono vascular. Además, las células endoteliales desempeñan un



papel clave en la regulación cardiovascular produciendo agentes vasoactivos locales importantes como óxido nítrico, que tiene actividad vasodilatadora, y la endotelina que es un péptido vasoconstrictor (Beevers *et al.*, 2001). La desregulación del óxido nítrico, las ERO, la inflamación crónica y el estrés por cizallamiento, están relacionados con diversas enfermedades vasculares, mientras que la disfunción endotelial causa el desequilibrio en el tono vascular, que activa una serie de eventos inflamatorios, tales como la permeabilidad endotelial, la adhesión de leucocitos y la generación de citoquinas, generándose un ciclo vicioso que facilita la iniciación y desarrollo de enfermedades vasculares (Heo *et al.*, 2016; Förstermann *et al.*, 2017).

El endotelio desempeña un papel crucial en la modulación del tono del músculo liso vascular subyacente, liberando hacia el interior de la pared del vaso moléculas como el óxido nítrico y factores de hiperpolarización dependiente del endotelio, de una manera distinta dependiendo del tamaño del vaso y a través de las diversas funciones de las sintasas endoteliales de óxido nítrico (eNOS, *endotelial nitric oxide synthase*). El peróxido de hidrógeno derivado del endotelio ( $H_2O_2$ ) es una molécula de señalización fisiológica que sirve como uno de los principales factores de hiperpolarización dependiente del endotelio, especialmente en los microvasos, resultando muy relevante para el control de la homeostasis cardiovascular (Godo y Shimokawa., 2017).

El óxido nítrico puede difundir a través de la membrana celular, donde estimula la guanililciclase soluble en las células del músculo liso vascular y facilita así la formación de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) que causa una disminución en la concentración intracelular del calcio y provoca vasodilatación (Zhao *et al.*, 2015). El óxido nítrico protege también los vasos sanguíneos a través de la inhibición de la agregación plaquetaria, la inflamación, el estrés oxidativo, y la migración y proliferación de las células del músculo liso vascular, ya que la desregularización de la eNOS, no solo reduce la biodisponibilidad de óxido nítrico, sino que aumenta el estrés oxidativo que a su vez reduce esta biodisponibilidad (Heo *et al.*, 2016; Förstermann *et al.*, 2017; Godo y Shimokawa., 2017).

El estrés por cizallamiento se define como la tensión hemodinámica a la que continuamente está expuesto el endotelio vascular, y es la fuerza por unidad de área que el flujo sanguíneo ejerce sobre la pared vascular; en muchas ocasiones depende del grado de viscosidad de la sangre y del flujo sanguíneo. Diversos estudios muestran que la tensión de cizallamiento vascular normal o aumentada puede proporcionar un efecto beneficioso protector del endotelio, estimulando la proliferación y activando mecanismos antiinflamatorios locales, evitando la apoptosis de las células endoteliales e incrementando la expresión y actividad de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD) y eNOS. Sin embargo, una reducción de la tensión de cizallamiento, como ocurre, por ejemplo, en

determinados segmentos morfológicos como bifurcaciones arteriales puede favorecer acumulación lipídica en la íntima y su oxidación. Al aumentar la permeabilidad de la pared debido a la disfunción del endotelio, las lipoproteínas aterogénicas lo traspasan y se acumulan en la íntima donde las LDL se oxidan o se glucosilan, de manera que los receptores celulares no puedan reconocerlas ni captarlas, acumulándose en el espacio extracelular. Este hecho desencadena una respuesta inflamatoria que atrae leucocitos y monocitos, que se adhieren al endotelio mediante moléculas de adhesión, y penetran hacia el espacio intimal por acción de diversas quimioquinas (Mesa *et al.*, 2017).

La modulación de la función endotelial es una opción terapéutica atractiva para intentar minimizar algunas de las complicaciones importantes de la hipertensión. La terapia antihipertensiva clínicamente efectiva parece restaurar la producción alterada de óxido nítrico, pero no parece restaurar la relajación vascular dependiente del endotelio o la respuesta vascular a los agonistas endoteliales. Esto indica que dicha disfunción endotelial es primaria y se vuelve irreversible una vez que se ha instaurado el proceso hipertensivo (Beavers *et al.*, 2001).

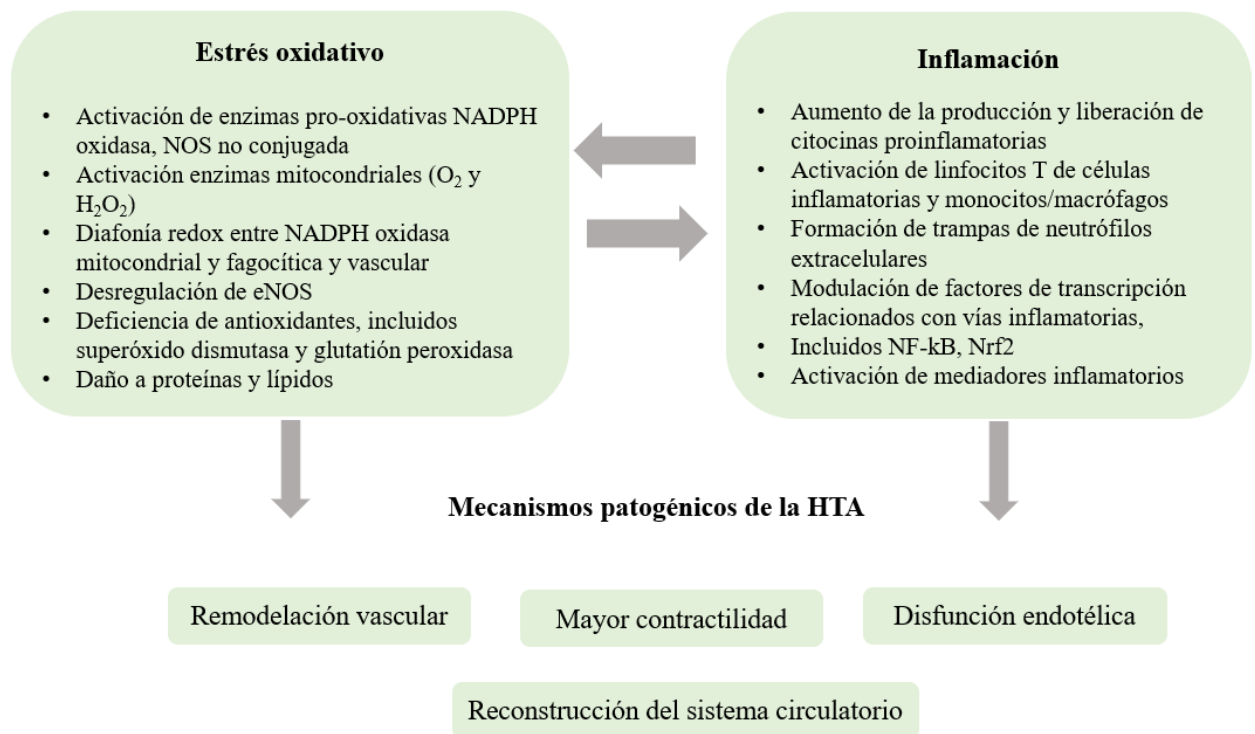
El estrés oxidativo se ha definido como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes propias del organismo, que conlleva a la acumulación de especies reactivas que puede atacar las estructuras de los tejidos (Betteridge, 2000; Peluso *et al.*, 2012). La reacción entre un radical libre y otras moléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, produce una reacción en cadena que conlleva a la formación de nuevos radicales libres que expanden la cadena de oxidación y alteran las estructuras celulares, y por lo tanto su correcto funcionamiento. La peroxidación lipídica puede tener profundos efectos sobre la función de la membrana celular, provocando cambios en la fluidez, una mayor permeabilidad, una disminución en el potencial de membrana y, finalmente, puede provocar cambios en la función celular e incluso la ruptura de la membrana (Betteridge, 2000). La fluidez de la membrana celular está determinada en gran medida por la presencia de cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en sus fosfolípidos. Los AGPI son muy susceptibles al ataque de los radicales libres, desencadenando la peroxidación lipídica. Una vez que se producen los peróxidos lipídicos (ROOH) se combinan con el oxígeno disuelto que hay en las membranas y forman radicales peroxilo, que pueden atacar las proteínas de la membrana y a los AGPI adyacentes, propagando la peroxidación lipídica de la membrana. La presencia de antioxidantes que pueden reaccionar con estas moléculas reactivas y estabilizarlas, rompiendo la cadena oxidativa mediante la eliminación de radicales peroxilo, que son eliminados por antioxidantes liposolubles como la vitamina E o el ubiquinol, o mediante la

reducción de los hidroperóxidos lipídicos, gracias a la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Bayir, 2005).

Actualmente, los F<sub>2</sub>-isoprostanos y la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) son los biomarcadores recomendados para monitorizar el estado oxidativo a lo largo del tiempo (Il'yasova *et al.*, 2012), y que además han sido validados en modelos animales y humanos para estudiar el estrés oxidativo y la inflamación (Kadiiska *et al.*, 2005). El daño oxidativo de los lípidos puede medirse mediante la determinación de los metabolitos estables de las reacciones oxidativas (Qing *et al.*, 2019). Numerosas investigaciones han demostrado que los F<sub>2</sub>-isoprostanos son compuestos que se biosintetizan *in vivo*, principalmente a partir de ácido araquidónico esterificado de los fosfolípidos, a través de reacciones catalizadas por radicales libres tanto enzimáticas como no enzimáticas. Se ha demostrado que poseen potentes actividades biológicas y además sirven como biomarcadores fiables del estado oxidativo e inflamación (Basu, 2010). Los F<sub>2</sub>-isoprostanos junto con las prostaglandinas son protagonistas clave de varias enfermedades agudas y crónicas, y también del proceso de envejecimiento. La evaluación de estos biomarcadores en orina ofrece una oportunidad analítica no invasiva única para estudiar la evolución de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, y también en la evaluación de la efectividad de compuestos antioxidantes, antiinflamatorios, fármacos y la dieta (Basu, 2010).

Por otro lado, el aumento del estrés oxidativo puede también causar daño al ácido desoxirribonucleico (ADN). El daño del ADN juega un papel importante en el desarrollo de carcinogénesis, pero también está asociado con un proceso de envejecimiento en células y tejidos, y por lo tanto relacionado también con la disfunción de los mismos (Bertram y Hass., 2008). El grado de estrés oxidativo en los ácidos nucleicos puede medirse mediante la determinación de los metabolitos estables de las reacciones oxidativas (Qing *et al.*, 2019). La 8-OHdG, es un producto resultante del daño oxidativo de la guanina y es un marcador útil para evaluar el daño oxidativo del ADN (Birben *et al.*, 2012).

Los estudios en animales han proporcionado evidencia convincente que demuestra el papel del estrés oxidativo vascular, la inflamación y del óxido nítrico en la HTA (Figura 3). Por lo tanto, la prevención del estrés oxidativo vascular y de los procesos inflamatorios y la mejora de la producción de óxido nítrico endotelial representan estrategias terapéuticas complementarios para prevenir y tratar la hipertensión y las ECVs (Förstermann *et al.*, 2017).



**Figura 3.** Mecanismos patógenos de la hipertensión arterial. Adaptada de (Krzeminska *et al.*, 2022). eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; NADPH, nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato oxidasa; NF-kB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; Nrf2: factor nuclear eritroide derivado 2, factor de transcripción en humanos codificado por el gen NFE2L2; NOS, óxido nítrico sintasa.

### **Dislipidemias**

Las dislipidemias, son trastornos del metabolismo de los lípidos que se producen cuando existe una alteración en los niveles normales de lípidos plasmáticos, colesterol total y triacilglicéridos (TAG), e incluyen hiperlipidemias e hipolipidemias. El aumento de las concentraciones de colesterol total puede estar asociado a la fracción ligada a la lipoproteína de baja y alta densidad (LDL y HDL, respectivamente). Ambas lipoproteínas regulan la cantidad de colesterol en el organismo, y un desequilibrio entre ellas aumenta el riesgo de eventos cardiovasculares, incluyendo infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.

La elevación del LDL resulta peligrosa ya que puede conducir a su acumulación y oxidación en la pared arterial, lo que se asocia con un mayor riesgo de enfermedad aterosclerótica, incluyendo enfermedad en las arterias coronarias y el accidente cerebrovascular (Karr, 2017). Son varios los factores de riesgo relacionados con las hipercolesterolemias. La mayoría de estos factores de riesgo son conductuales y por lo tanto son modificables. Éstos incluyen: una dieta alta en grasas saturadas o *trans*, el sedentarismo, el tabaquismo y la obesidad (Mozaffarian *et al.*, 2016). No obstante, también pueden atribuirse a condiciones genéticas específicas que ocasionan fallos en la síntesis o

en el funcionamiento de alguna de las apolipoproteínas integrantes de las lipoproteínas circulantes, de los receptores de la LDL o una disfunción en alguna de las enzimas que participan en su metabolismo. Uno de los trastornos más frecuentes es la hiperlipidemia familiar, cuyo origen es genético y puede estar asociada a distintas variantes génicas y ocasionar varias alteraciones en las concentraciones de lípidos en sangre. En todas existe una alteración en el metabolismo de las lipoproteínas para la que el individuo está predispuesto genéticamente (Mesa *et al.*, 2017). Las dislipidemias se diagnostican por la presencia de uno o más de los fenotipos descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación de concentraciones sanguíneas de colesterol total, LDL y HDL.

<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	
Óptimo	<200
Límite alto	200-239
Alto	≥240
<b>Colesterol LDL (mg/dL)</b>	
Óptimo	<100
Cercano al óptimo	100-129
Límite alto	130-159
Alto	160-189
Muy alto	≥190
<b>Colesterol HDL (mg/dL)</b>	
Óptimo	≥60
Bajo	<40

Adaptado de: *Adult Treatment Panel ATP III, 2001 (Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults, 2001).*

La hipertrigliceridemia es la elevación de TAG en la sangre, que puede combinarse con la elevación de colesterol total causando la hiperlipidemia mixta. Tanto la hipertrigliceridemia moderada como la grave se asocian con un aumento sustancial de riesgo de enfermedad aterosclerótica, ECV y de mortalidad total a largo plazo (Tenenbaum *et al.*, 2014). El nivel de TAG en plasma representa las concentraciones de las lipoproteínas transportadoras de TAG, como las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), quilomicrones y sus remanentes (Tenenbaum *et al.*, 2014). La hipertrigliceridemia, está relacionada con diferentes factores de riesgo metabólico que incluyen: una distribución central de adiposidad u obesidad visceral, resistencia a la insulina, baja tolerancia a la glucosa, HTA, niveles altos de LDL y bajos niveles de HDL, lo que se asocia con un estado aterogénico, procoagulante y proinflamatorio (Grundy, 2005). Además, los TAG, también puede estimular la aterogénesis mediante otros mecanismos, que incluyen la producción de citoquinas proinflamatorias, fibrinógeno, factores de coagulación y el deterioro de la fibrinólisis

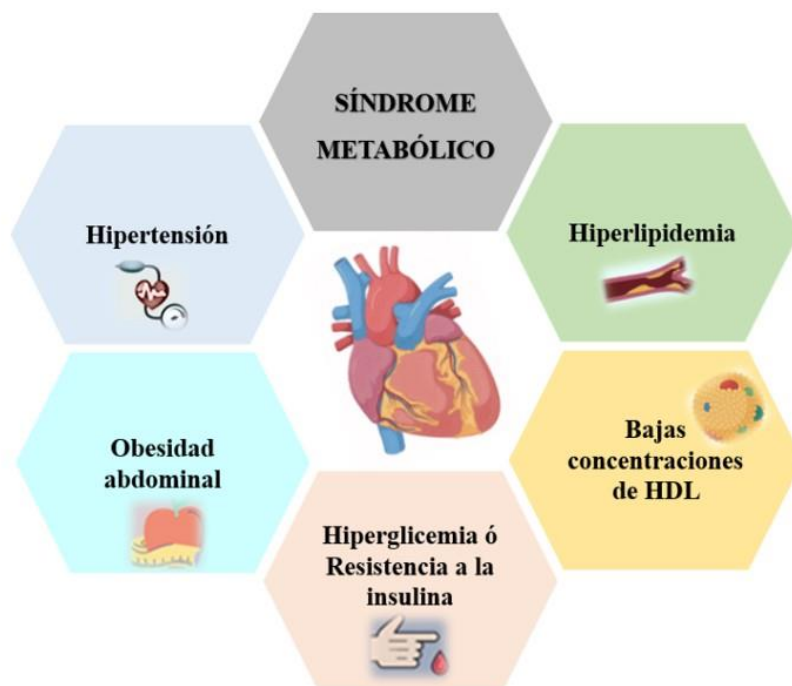
(Tenenbaum *et al.*, 2014). La Tabla 3 muestra los distintos criterios publicados para el diagnóstico de hipertrigliceridemias.

**Tabla 3.** Criterios para el diagnóstico clínico de elevadas concentraciones sanguíneas de TAG en ayunas

<i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP ATP III)</i>	
Normal	< 150 mg/dL o < 1.7 mmol/L
Limítrofe	150-199 mg/dL o 1.7-2.3 mmol/L
Altos	200 a 499 mg/dL o 2.3-5.6 mmol/L
Muy altos	≥ 500 mg/dL      ≥ 5.6 mmol/L
<i>The Endocrine Society</i>	
Normal	< 150 mg/dL o < 1.7 mmol/L
Leve	150-199 mg/dL o 1.7-2.3 mmol/L
Moderado	200-999 mg/dL o 2.3-11.2 mmol/L
Severa	1000-1999 mg/dL o 11.2 – 22.4 mmol/L
Muy grave	≥ 2000 mg/dL o ≥ 22.4 mmol/L

Adaptado de Berglund *et al.*, 2012.

Según el panel de tratamiento de adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (CEP-ATP III por sus siglas en inglés), la prevalencia de hipertrigliceridemia es alta en adultos, en jóvenes y en adolescentes, lo que ha contribuido al aumento de prevalencia de obesidad durante las últimas décadas. Se ha informado que los TAG elevados son consecuencia del exceso de tejido adiposo visceral (obesidad abdominal), independiente de la obesidad en general (Brunzell y Ayyobi., 2003). La obesidad abdominal, está asociada con hiperglucemia, resistencia a la insulina, hiperlipidemia y concentraciones bajas de HDL (Wajchenberg, 2000), además de con la elevación en sangre de biomarcadores de inflamación como proteína C reactiva, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y con concentraciones reducidas de adiponectina (Côté *et al.*, 2005), lo que se conoce como síndrome metabólico (Figura 4). El síndrome metabólico es un estado fisiopatológico progresivo asociado a un conjunto de anomalías metabólicas que se manifiesta clínicamente por un grupo de factores de riesgo que están causalmente interrelacionados que incluyen obesidad central, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, HTA y concentraciones reducidas de colesterol HDL (Sperling *et al.*, 2015), lo que establece que múltiples componentes del síndrome relacionados con el riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Alberti *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Factores de riesgo del síndrome metabólico

La disminución de las concentraciones plasmáticas de HDL es un factor de riesgo para el síndrome metabólico. Las HDL poseen varias propiedades cardioprotectoras, como la de ayudar a eliminar el exceso de colesterol del organismo, devolviendo el exceso de colesterol de los tejidos periféricos al hígado para su eliminación. Por lo tanto, el aumento de las concentraciones de HDL ( $\geq 60$  mg/dL) puede ayudar a disminuir el riesgo de estas enfermedades (Cooney *et al.*, 2009). Por el contrario, una baja concentración de HDL es un factor de riesgo que permite el diagnóstico tanto de síndrome metabólico como de ECV (Hannon *et al.*, 2018), y existe una fuerte relación inversa entre las concentraciones de HDL y la enfermedad coronaria, así como otras ECVs a nivel epidemiológico, por lo que se le considera un biomarcador clave para la evaluación de la salud cardiometabólica (Rader y Hovingh., 2014). Sin embargo, algunos trastornos genéticos se caracterizan por niveles marcadamente elevados de HDL que no se traducen en una disminución del riesgo cardiovascular (Franczyk *et al.*, 2021). Las anomalías en varios genes reguladores de HDL se han asociado con patologías específicas, mientras que el déficit de HDL pueden culminar en enfermedad vascular prematura o insuficiencia renal y un aumento de HDL provocado por error de la lipasa hepática puede elevar el riesgo de enfermedad vascular (Miller *et al.*, 2003). Se han descrito más de 40 genes implicados en la regulación de las concentraciones sanguíneas de HDL, cuyos trastornos se relacionan con los niveles elevados de HDL y se engloban dentro de la hiperalfalipoproteinemia familiar primaria o secundaria (Qasim y Rader., 2006). Un ejemplo es la

mutación del gen *ApoA-I* que resulta en su sobreproducción de apoproteína *ApoA-I*, la cual no solo está involucrada en el transporte inverso del colesterol, sino que también activa la lecitincolesterol acil-transferasa y ejerce efectos antiinflamatorios en distintos tipos de células como los adipocitos. Estos efectos ocasionan la interrupción y eliminación del colesterol de las balsas lipídicas de la membrana, que están regulados por transportadores de colesterol, como el ATP A-1 y el ATP G-1 y el receptor depurador B-1 (Umemoto *et al.*, 2013). A su vez, la ApoC-III presente en las HDL es un regulador del metabolismo de las lipoproteínas y controla la homeostasis de los TAG plasmáticos mediante la inhibición de la actividad de la lipoproteína lipasa y la captación hepática de TAG por parte de los receptores remanentes (Miller *et al.*, 2003; Ooi *et al.*, 2008). La evidencia clínica demuestra que la ApoC-III no solo contribuye a aumentar las concentraciones de TAG en plasma, sino que también promueve la disfunción de las HDL, estimula la proliferación de células de músculo liso y facilita la interacción entre monocitos y células endoteliales, así como altera la actividad plaquetaria, contribuyendo a la formación de lesiones ateroscleróticas y a otros procesos patológicos implicados en la aterosclerosis (Luo y Peng., 2016).

### ***Resistencia a la insulina***

La resistencia periférica a la insulina implica una mala interacción de la insulina con sus receptores que altera la señalización intracelular activada por la insulina y provoca una hiperglucemia. De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2020), la hiperglucemia es el término técnico para referirse a la glucosa elevada en sangre, de acuerdo a los parámetros de normalidad. Es uno de los principales signos del desarrollo de la diabetes mellitus. La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente. La diabetes mellitus de tipo 2 (DM2) también es una enfermedad crónica que se debe principalmente a una utilización ineficaz de la insulina debido a una resistencia periférica a esta molécula, representa la mayoría de los casos mundiales de diabetes (95%), y se debe en gran medida al sobrepeso y obesidad así como a la inactividad física (OMS, 2020b). Con el tiempo, la hiperglucemia no controlada daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los los vasos sanguíneos y las células nerviosas (OMS, 2020c) casionando complicaciones microvasculares, como retinopatía, nefropatía, neuropatía, y complicaciones macrovasculares, como apoplejía, ECV e insuficiencia vascular periférica (Caprio y Sorond, 2019).

Según la OMS, desde 1980 la prevalencia mundial de DM2 ha aumentado considerablemente desde 108 millones de personas (4.7%) a 244 millones de personas en el 2014 (8.5%). Al igual que la obesidad, la DM2 ha avanzado con mayor rapidez en los países de ingresos medianos y bajos. En

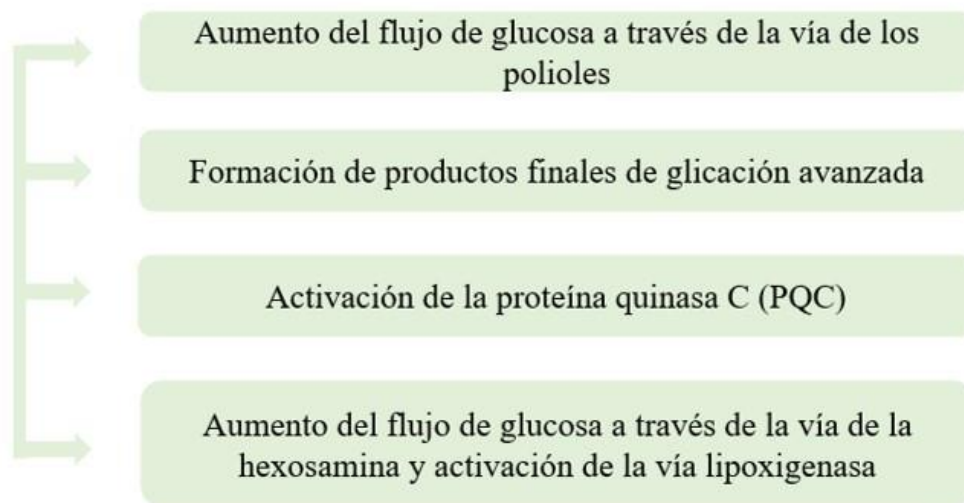


el 2015, la DM2 fue causa directa de mortalidad de 1.6 millones de personas en el mundo, y otros 2.2 millones de personas más fallecieron por otras causas atribuibles a la hiperglucemia y según esta Organización, la DM2 será la séptima causa de mortalidad en 2030 (OMS, 2020c). Existe evidencia que demuestra que el perfil glucémico, además del lipídico, podría contribuir negativamente al desarrollo de las ECVs y al proceso aterosclerótico, debido a un aumento en los radicales libres que causan estrés oxidativo, inflamación, disfunción endotelial e hipercoagulabilidad sanguínea (Mannucci *et al.*, 2012). De hecho, la DM2 es uno de los principales factores de riesgo controlables para las enfermedades metabólicas y cardiovasculares, y nuevamente un estilo de vida saludable como mantener un peso corporal normal y el evitar el consumo de tabaco previenen o retrasan su aparición (OMS, 2020c).

### ***Relación entre el metabolismo postprandial de carbohidratos y las ECV***

Las anormalidades del metabolismo de los carbohidratos y la DM2 se asocian con un aumento sustancial en la prevalencia de HTA y el desarrollo acelerado de la aterosclerosis (Sowers *et al.*, 1993). La HTA es factor de riesgo independiente para la aterosclerosis, aunque algunas de las propiedades aterogénicas de la hipertensión pueden estar relacionadas con las alteraciones que se encuentran en personas con hipertensión primaria. Los resultados de los estudios epidemiológicos sugieren que la elevación en plasma de insulina en ayunas y en estado posprandial tienen un factor de riesgo añadido independiente para la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, como a menudo ocurre en pacientes con hipertensión primaria y en pacientes con DM2 y/o resistentes a la insulina (Sowers *et al.*, 1993). De hecho, existe evidencia epidemiológica demostrada de que varios índices indicativos de glucemia en ayunas, glucosa plasmática posprandial y hemoglobina glucosilada (HbA1c), están asociados con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica incluso en el estado prediabético (Nahmias *et al.*, 2020).

Los mecanismos proaterogénicos y macrovasculares asociados a la hiperglucemia son una característica clave común para todas las formas de hiperglucemia, que pueden explicar en parte las complicaciones microvasculares y macrovasculares, ya que se han identificado diferentes mecanismos moleculares asociados (Figura 5), que finalmente conducen a un incremento en el estrés oxidativo y por lo tanto en el riesgo cardiovascular (Brownlee, 2001). En un entorno hiperglucémico, el aumento de la glucosa intracelular también provoca un aumento de la formación de sorbitol y disminución concomitante de NADPH que contribuye al desarrollo de dichas complicaciones cardiovasculares (Brownlee, 2001).



**Figura 5.** Mecanismos proaterogénicos asociados a la hiperglucemia

La hiperglucemia genera estrés oxidativo que provoca una respuesta inflamatoria cuya disfunción puede conducir a un grupo de trastornos metabólicos crónicos, en particular la obesidad, la DM2 y las ECVs colectivamente (Hotamisligil, 2006). Las células endoteliales tienen una capacidad limitada para regular la entrada de glucosa y por lo tanto son más vulnerables a la hiperglucemia, y en esta situación se incrementan las concentraciones de glucosa intracelulares, y por tanto las ERO y el estrés oxidativo en el endotelio. Posiblemente la producción excesiva de ERO juega un papel clave en la disfunción celular observada en personas con DM2, vinculada a diferentes procesos que promueven la aterosclerosis, la cardiotoxicidad y la resistencia a la insulina (Kolluru *et al.*, 2012). Estas ERO promueven la generación de "metilglioxal", compuesto muy reactivo, formado en el organismo como subproducto de la glucólisis, que genera productos finales de glicación avanzada (AGE, *advanced glycation products*), los cuales contribuyen a la disfunción endotelial, la vasoconstricción y los cambios proinflamatorios y proaterogénicos que subyacen a la ruptura de la placa aterosclerótica y la formación de trombos (Goh y Cooper., 2008). Los AGES pueden interactuar con ciertos receptores, para inducir la señalización intracelular que conduce a un aumento del estrés oxidativo y la generación de citoquinas proinflamatorias y pro-escleróticas. Además, los AGE actúan directamente para inducir el entrecruzamiento de proteínas como el colágeno de los vasos, aumentando la rigidez vascular y, por lo tanto, alterando la estructura y la función vascular (Goh y Cooper., 2008).

### ***Hormonas gastrointestinales y pancreáticas implicadas en el control del apetito y la ingesta***

Las hormonas gastrointestinales que modulan la homeostasis energética y el control de la ingesta han despertado un gran interés recientemente. En términos generales, las señales endocrinas generadas en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso central tienen efecto orexogénico y anorexigénico, y por lo tanto modulan la ingesta dietética (Crespo *et al.*, 2009). Entre dichas hormonas destacan las incretinas: polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y péptido similar al glucagón (GLP-1), el polipéptido pancreático (PP), el péptido YY (PYY), la grelina y la insulina. El efecto que desempeñan cada una de ellas se describe a continuación.

#### ***Insulina***

La insulina es una hormona que tiene un papel importante en la regulación del metabolismo de los alimentos en seres humanos. Es una proteína anabólica secretada por las células  $\beta$  en los islotes de Langerhans. La insulina contiene dos cadenas (a y b) conectadas por enlaces disulfuro y es el producto postraduccionales de un precursor monocatenario, denominado proinsulina y que una vez activado libera insulina y péptido C (Weiss *et al.*, 2000). Dentro de las múltiples funciones de la insulina, destacan las relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos como la estimulación de la captación de glucosa de la circulación sistémica y la supresión de la gluconeogénesis hepática, que en conjunto junto con otros mecanismos regulan la homeostasis de la glucosa.

La DM2 o la resistencia a la insulina se caracterizan por una disminución de la tolerancia a la glucosa, resultante de una falta de sensibilidad a la hormona que conduce a la hiperglucemia característica de estas alteraciones. Como se ha comentado previamente, la exposición prolongada de los tejidos a concentraciones elevadas de glucosa se asocia a complicaciones características de la DM2 que involucran vasos sanguíneos grandes y pequeños, principalmente enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, retinopatía, nefropatía y neuropatía (Weiss *et al.*, 2000).

La absorción tisular de glucosa se realiza a través de transportadores de membrana  $\text{Na}^+$  dependiente e independientes, los cuales facilitan el movimiento de la glucosa al interior celular para reducir las concentraciones en la sangre gracias a la estimulación de la insulina. La glucosa transportada se utiliza posteriormente como combustible metabólico o se almacena en hígado y tejido muscular como una estructura polimérica compleja denominada glucógeno (Weiss *et al.*, 2000). El mantenimiento de la homeostasis normal de la glucosa implica las funciones simultáneas y coordinadas de las células  $\beta$  pancreáticas, del hígado, y de los tejidos periféricos, principalmente el músculo (DeFronzo, 1988).

Para la evaluación de la resistencia y la sensibilidad a la insulina, se han descrito numerosos índices que pretenden valorar la capacidad funcional de esta molécula y su acción sobre el control del metabolismo de la glucosa. La evaluación del modelo homeostático (HOMA) es un método para evaluar por un lado la resistencia a la insulina y por otro lado la funcionalidad de las células  $\beta$  a partir de las concentraciones plasmáticas basales (en ayunas) de glucosa (FPG, en mmol/L) e insulina (FPI en mU/L) (Wallace *et al.*, 2004).

Por un lado, el HOMA-IR, valora la resistencia a la insulina según la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA1-IR} = (\text{FPI} \times \text{FPG}) / 22.5$$

Por otro lado, el HOMA- $\beta$  es un modelo muy usado para la estimación de la función de las células  $\beta$ :

$$\text{HOMA1-\% B} = (20 \times \text{FPI}) / (\text{FPG} - 3.5)$$

Por otra parte, para medir el índice de la sensibilidad a la insulina del tejido periférico se utiliza el modelo de índice de control cuantitativo de la sensibilidad a la insulina QUICKI, y se estima utilizando la inversa de la suma de los logaritmos de la insulina en ayunas ( $I_0$  en  $\mu\text{U/mL}$ ) y la glucosa en ayunas ( $G_0$  en mg/dL) ya que se ha descrito que estos dos valores contienen información crítica sobre la sensibilidad a la insulina (Katz *et al.*, 2000).

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log(I_0) + \log(G_0)]$$

La prueba de tolerancia oral a la glucosa es el método más comúnmente utilizado para evaluar la tolerancia a la glucosa. Aunque se han realizado muchos intentos para evaluar la sensibilidad a la insulina a partir de la prueba de tolerancia a la glucosa, aunque es difícil evidenciar esta información (DeFronzo, 1988). La sensibilidad a la insulina de tejido periférico posprandial se puede evaluar con el índice de Matsuda a partir de las concentraciones de glucosa e insulina en ayunas ( $G_0$  en mg/dL y  $I_0$  en  $\mu\text{U/mL}$ , respectivamente) y la media de las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina durante el tiempo posprandial ( $G_m$  y  $I_m$ , respectivamente) (Matsuda y DeFronzo., 1999):

$$\text{Índice de Matsuda} = 10000 / \sqrt{(G_0 * I_0) * (G_m * I_m)}$$

Por otro lado, el índice insulinogénico refleja los cambios en la secreción de insulina que ocurren durante los primeros 30 min después de la ingesta de una carga oral de glucosa determinada,

y se ha utilizado ampliamente como un índice de secreción de insulina INSI, que se calcula teniendo en cuenta las concentraciones plasmáticas de insulina ( $I_0$  e  $I_{30}$  en mU/L) y de glucosa ( $G_0$  y  $G_{30}$  en mg/dL) en ayunas y tras 30 min de una sobrecarga oral.

$$\text{INSI} = (I_{30} - I_0) / (G_{30} - G_0)$$

### ***Incretinas: Polipéptido inhibidor gástrico y péptido similar al glucagón***

Las incretinas son péptidos que actúan mediante mecanismos paracrinos y endocrinos y promueven la secreción de insulina. Los más conocidos son el GIP y el GLP-1. Se liberan en respuesta a la ingesta de alimentos y estimulan una disminución de las concentraciones de glucosa en sangre al aumentar la secreción de insulina en el páncreas. Ambos péptidos son las principales hormonas responsables del efecto incretínico y actúan como gluco-reguladores (Zazueta, 2007).

El GLP-1 se produce en el intestino delgado y es secretado a partir de las células L (Parikh y Thevenin., 2021). Sus funciones principales son mantener la homeostasis de la glucosa al aumentar la secreción de insulina y disminuir la secreción de glucagón. Sin embargo, el GLP-1 también es importante para la regulación de funciones neurológicas y cognitivas (Muscogiuri *et al.*, 2017).

El GIP es secretado por las células K del duodeno y del yeyuno en respuesta a los tres tipos de macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y grasas), de hecho es la única hormona gastrointestinal que responde a los tres tipos de macronutrientes (Seino *et al.*, 2010). El incremento de las concentraciones plasmáticas de GIP tras una ingesta favorece la secreción de GLP-1, y ambas hormonas son responsables de estimular la secreción de insulina desde las células  $\beta$  pancreáticas (islotos de Langerhans) y esto se conoce como mecanismo incretínico (Crespo *et al.*, 2009).

Ambas incretinas promueven la proliferación de células  $\beta$  e inhiben la apoptosis en el páncreas, incrementando la masa de células  $\beta$  pancreáticas. Por otro lado, mientras que el GIP mejora la respuesta al glucagón posprandial, el GLP-1 la suprime (Seino *et al.*, 2010). La evidencia muestra que al menos dos tercios de la respuesta de la insulina a una carga de glucosa se debe al efecto de las incretinas GIP y GLP-1 en sujetos sanos, a diferencia de los pacientes con DM2 en los que este efecto está disminuido (Holst y Gromada., 2004).

### ***Polipéptido pancreático y Péptido YY***

Los péptidos PP y PYY actúan como señales de saciedad derivadas del intestino y del páncreas. El péptido PP se produce en respuesta a la ingesta dietética y de forma proporcional a la carga calórica, principalmente en el páncreas endocrino, pero también en el páncreas exocrino, el colon y el recto. Es uno de los responsables de la inhibición del apetito (Track *et al.*, 1980). EL PP inhibe la

función exocrina del páncreas, retrasa el vaciamiento gástrico y parece reducir el tránsito intestinal (Kojima *et al.*, 2007). Se ha observado que en personas con anorexia las concentraciones plasmáticas de PP son más elevadas que en individuos sanos, y por el contrario, en personas con obesidad las concentraciones de PP se encuentran disminuidas, por lo que se cree que pueda existir una asociación inversa entre adiposidad y concentraciones plasmáticas de esta molécula (Lassmann *et al.*, 1980).

El PYY también se considera una señal de saciedad (Wren y Bloom., 2007). Es liberado posprandialmente por las células L intestinales en concentraciones que dependen de la cantidad de calorías ingeridas (Konturek *et al.*, 2004). Las concentraciones máximas se alcanzan a los 90 min tras la ingesta de alimento y permanecen elevadas alrededor de 6 h (Adrian *et al.*, 1985). En humanos, las concentraciones plasmáticas totales de PYY después de la ingesta de una dieta alta en proteínas son más altas en comparación con una dieta alta en grasas o carbohidratos (Batterham *et al.*, 2006). El efecto anorexigénico del PYY está mediado fundamentalmente por el nervio vago (Abbott *et al.*, 2005) y la administración exógena de PYY tanto en humanos como en animales puede ayudar a reducir la ingesta calórica y el peso corporal en ratas y humanos (Ueno *et al.*, 2008), incluso se ha propuesto como un agente terapéutico potencial para el tratamiento de la obesidad. No obstante, el uso clínico del PYY está limitado por su corta vida media y por la necesidad de administración parenteral que permite la absorción adecuada (Ueno *et al.*, 2008).

### ***Grelina***

La grelina es el único péptido orexigénico circulante conocido producido por el estómago, que regula el hambre preprandial y el equilibrio energético, actuando como un estimulador e iniciador de comidas. Su elevación en sangre se ha asociado de manera constante con el inicio de la ingesta de alimentos, y se considera la principal señal orexigénica tanto en modelos animales como en humanos (Crespo *et al.*, 2009). Las concentraciones plasmáticas de grelina antes de una ingesta de alimentos son elevadas y descienden rápidamente después de la ingesta de alimentos, para aumentar de nuevo progresivamente antes de la siguiente comida (Cummings y Overduin., 2007).

El efecto orexigénico de la grelina parece estar relacionado con el aumento en la producción de proteínas relacionadas con los neuropéptidos Y y la proteína r-Agouti. Además, la grelina participa en la regulación hipotalámica de la homeostasis energética promoviendo la ingesta de alimentos y, por lo tanto, el aumento de peso corporal (Nakazato *et al.*, 2001). Las dietas ricas en glucosa y aminoácidos parecen suprimir la grelina posprandial más rápidamente que las dietas ricas en lípidos. Se sabe que estas señales inhibitoras que median la supresión posprandial de la grelina no derivan

del estómago o duodeno, aunque los mecanismos no están completamente aclarados (Overduin *et al.*, 2005).

### ***Dieta, hipertensión y síndrome metabólico***

La etiología patológica subyacente del síndrome metabólico, parece que radica en gran parte en el sobrepeso y/u obesidad, la falta de actividad física y en la predisposición genética. El aumento de tejido adiposo intra-abdominal (visceral) presenta un riesgo sustancialmente mayor al desarrollar resistencia a la insulina, en comparación con la grasa subcutánea generalizada, aunque ambas juegan un papel importante en el desarrollo del síndrome metabólico (Swarup *et al.*, 2015). Adoptar un patrón de dieta saludable, ayuda a reducir el riesgo de síndrome metabólico. Un alto consumo de frutas, verduras, granos enteros, proteínas provenientes de aves y pescado, nueces, legumbres y productos lácteos bajos en grasa, tienen un efecto protector, mientras que por el contrario, la adherencia a un patrón de dieta occidentalizado, caracterizado por el consumo de carnes rojas, alimentos procesados e industrializados, así como el consumo elevado de alimentos con alto contenido de azúcares refinados y/o alto contenido de sodio, se asocia al desarrollo de síndrome metabólico (Fabiani *et al.*, 2019).

El papel de la ingesta de grasas en la dieta ha sido un tema de mucho interés y debate en relación con la exacerbación o mejora del riesgo de síndrome metabólico y ECV. Los ácidos grasos en la dieta son un grupo de nutrientes muy diversos entre sí, y sus propiedades moleculares también lo son. La matriz alimentaria de la que provienen cada uno de ellos ejercen efectos diferenciales sobre los lípidos en la sangre. Además, el metabolismo de los diferentes ácidos grasos, pueden estar influenciados por la variación genética individual en respuesta a la ingesta dietética. Los factores biológicos (genéticos) y conductuales (como la dieta) contribuyen al desarrollo de enfermedades complejas, y pueden ofrecer una explicación de por qué las investigaciones llevadas a cabo concluyen efectos diferentes. Estos factores no deben ser considerados como factores de riesgo individuales, sino como elementos que interactúan entre sí (Hannon *et al.*, 2018).

Desde 2001, las pautas dietéticas del NCEP-ATP III (*Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults 2001*), recomiendan que la ingesta de grasa total debe aportar entre el 30-35% de las calorías ingeridas. Sin embargo, puntualiza que la recomendación es limitar la ingesta de grasa saturada hasta un 10% en la población general, y hasta un 7% de las calorías para personas con riesgo mayor de ECV (NCEP-ATP III, 2001). La evidencia científica sugiere que los ácidos grasos saturados (AGS) tienden a aumentar las concentraciones de LDL, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y AGPI tienden a disminuirlas. La

sustitución de la grasa saturada por insaturada, especialmente oleico presente en el aceite de oliva mejora el perfil lipídico del plasma en relación con el riesgo cardiovascular. La ingesta de ácidos grasos omega-3 de cadena larga, ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), está asociada con concentraciones reducidas de TAG y con un menor riesgo de desarrollar ECVs (NCEP-ATP III, 2001). Por otro lado, la ingesta de ácidos grasos *trans* se asocia con concentraciones elevadas de LDL (Lichtenstein, 2003). Por lo tanto, se recomendaría una dieta baja en AGS y *trans*, con cantidades adecuadas de AGMI y AGPI, especialmente ácidos grasos omega-3 de cadena larga (presentes en algunos pescados), para reducir el riesgo de desarrollar ECVs (Lichtenstein, 2003). Por otra parte, la ingesta de fibra soluble encontrada en frutas, salvado de avena y legumbres es capaz de disminuir la absorción de colesterol total y TAG, favoreciendo así la reducción de las concentraciones plasmáticas de LDL entre un 5-10% (Surampudi *et al.*, 2016). Además de la dieta, es necesario ir más allá y considerar hábitos de vida saludable, que incluyen: realización de actividad física, evitar el aumento de peso con la edad, el abandono del tabaco y una ingesta limitada de alcohol (Lichtenstein, 2003).

### ***Dieta mediterránea***

Diversos ensayos clínicos y epidemiológicos en diferentes tipos de poblaciones han confirmado que un patrón dietético puede ejercer efectos beneficiosos o influir de forma negativa sobre la salud. Un patrón dietético rico en algunos grupos de alimentos como frutas, verduras, granos enteros y una fuente de proteína como el pescado puede reducir la incidencia de ECV y enfermedades neoplásicas (Willett, 2006). Desde los años setenta, Keys y col. estudiaron quince cohortes pertenecientes a 7 países geográficamente diferentes y encontraron porcentajes sorprendentemente bajos de enfermedad coronaria en los que pertenecían a la región mediterránea, donde la ingesta de grasas era relativamente alta, pero en gran parte provenía del aceite de oliva rico en ácido oleico, una grasa monoinsaturada. Estos autores mencionaron que las tasas de mortalidad se relacionaban positivamente con el porcentaje promedio de energía proveniente de AGS y negativamente con el porcentaje de energía proveniente de AGMI (Keys *et al.*, 1986). La cantidad de ácido oleico ingerida, que se encuentra mayoritariamente en el aceite de oliva virgen (AOV), era muy diferente entre las cohortes estudiadas, y las tasas de mortalidad por cualquier causa y por enfermedad coronaria fueron menores para los grupos de población en los que el AOV era la principal fuente grasa (Keys *et al.*, 1986).

La dieta mediterránea no es solamente una dieta específica, sino más bien una colección de hábitos alimenticios y de estilo de vida que tradicionalmente siguen las personas en los diferentes



países que bordean el mar Mediterráneo (Sofi *et al.*, 2010). El patrón dietético mediterráneo como tal, constituye una pirámide alimenticia que refleja tradiciones dietéticas mediterráneas, que históricamente se han asociado a la salud. Posteriormente, estudios epidemiológicos han sugerido que los individuos pueden beneficiarse considerablemente al adoptar elementos particulares de las dietas mediterráneas (Willett, 2006). Esta dieta mediterránea se basa en los patrones de alimentos típicos seguidos en Creta, en gran parte de Grecia y en el sur de Italia a principios de la década de los sesenta, donde la esperanza de vida de los adultos estaba entre las más altas del mundo, y las tasas de enfermedad coronaria, ciertos tipos de cáncer y otras enfermedades crónicas relacionadas con la dieta estaban entre las más bajas. Además, esta dieta estaba asociada a un estilo de vida que incluía la práctica regular de actividad física y se asociaba con bajas tasas de obesidad. La dieta mediterránea se caracteriza por abundantes alimentos vegetales (frutas, verduras, cereales en forma de pan, patatas, legumbres, nueces y semillas), fruta fresca tomado como el postre típico diario, aceite de oliva como la principal fuente de grasa, productos lácteos (principalmente queso y yogurt), pescado, aves de corral y huevo consumidos en cantidades bajas o moderadas, carne roja consumida en cantidades bajas, y vino consumido en cantidades bajas o moderadas, normalmente acompañando las comidas. Esta dieta es baja en grasas saturadas ( $\leq 7\text{-}8\%$  de energía), aunque la cantidad de grasa total aporte desde el 25% al 35% de la energía (Willett, 2006). Una revisión sistemática y un meta-análisis han confirmado la protección que brinda la adherencia a la dieta mediterránea, ya que puede disminuir significativamente el riesgo de mortalidad por ECV, el cáncer, la incidencia de la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, el deterioro cognitivo leve y otras enfermedades cerebrovasculares, lo que supone una reducción importante del riesgo de muerte prematura en la población general (Sofi *et al.*, 2008; Sofi *et al.*, 2010).

Estos hallazgos han sido confirmados también en España por el estudio de Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) (Estruch *et al.*, 2018) en el que se demostró la eficacia de dos dietas mediterráneas, una suplementada con AOVE y otra suplementada con frutos secos (nueces), en comparación con una dieta de control (dieta baja en grasas), sobre la prevención cardiovascular primaria. Después de cinco años de seguimiento, se pudo demostrar la eficacia de un patrón de dieta mediterránea suplementada con AOVE o frutos secos en la prevención de la enfermedad cardiovascular y sus principales factores de riesgo, reduciendo en un 30% la incidencia de complicaciones cardiovasculares mayores (Toledo *et al.*, 2013; Estruch *et al.*, 2018). Estos resultados respaldan los beneficios previamente encontrados en los estudios epidemiológicos acerca de la dieta mediterránea como herramienta para la reducción del riesgo cardiovascular y otras patologías.

### ***Aceite de oliva***

El olivo (*Olea europaea L.*) pertenece a la familia Oleaceae del género *Olea*. El árbol es autóctono de la región sirio-palestina, aunque también se ha sugerido que procede del cruce de especies muy emparentadas: *Olea africana*, autóctona de Arabia y Egipto, *Olea ferruginosa*, de la zona asiática, y *Olea laperrini*, de las montañas del sur de Marruecos. Otros autores consideran que procede del acebuche (*Olea europea var. Sylvestri*) conocido desde el Neolítico (Castellano-Orozco, 2017). Su cultivo se extiende tradicionalmente por las regiones de la cuenca mediterránea (Ray *et al.*, 2015), aunque actualmente se ha extendido a regiones de América del sur y China (Ray *et al.*, 2015). El cultivo del olivo para la producción de AOV se inició en Creta en el siglo VI aC, desde ahí se extendió por toda la cuenca mediterránea. En España fue introducido por los fenicios y alcanzó un notable desarrollo con las dominaciones romana y árabe (Castellano-Orozco, 2017). Posteriormente, con la conquista de América, en 1492, su cultivo se extendió a México, Perú, California, Chile y Argentina. En la actualidad continúa su expansión y actualmente se cultiva en lugares tan alejados de su origen como la región sudafricana, Brasil y Argentina, y en otros países como Australia, Japón y China (Castellano-Orozco, 2017). El cultivo del olivo siempre ha tenido implicaciones históricas y culturales en los países que bordean el mediterráneo, donde se cultiva el 97% de la producción mundial. Anualmente se producen 3 millones de toneladas de AOV a nivel mundial, y aproximadamente 2 millones de toneladas de esta producción tienen lugar en la Unión Europea. Los principales países productores son: España (66% de la producción de la Unión Europea), Italia (15%), Grecia (13%) y Portugal (5%) (COI, 2021). Casi un tercio de la pulpa de la aceituna es aceite que se extrae fácilmente con una simple presión ejercida por un molino y por ello el 90% de la producción mundial de aceituna se destina a la elaboración de aceite.

El AOV y la aceituna son productos alimenticios con una amplia tradición milenaria. Son componentes esenciales de la dieta mediterránea y se consumen en gran medida en el mundo como un alimento importante en relación a su valor nutricional, no solo por sus alta concentración de AGMI y compuestos fenólicos, sino también, porque constituyen una rica fuente de antioxidantes naturales (Uylaşer y Yildiz., 2014).

### ***Tipos de aceite de oliva***

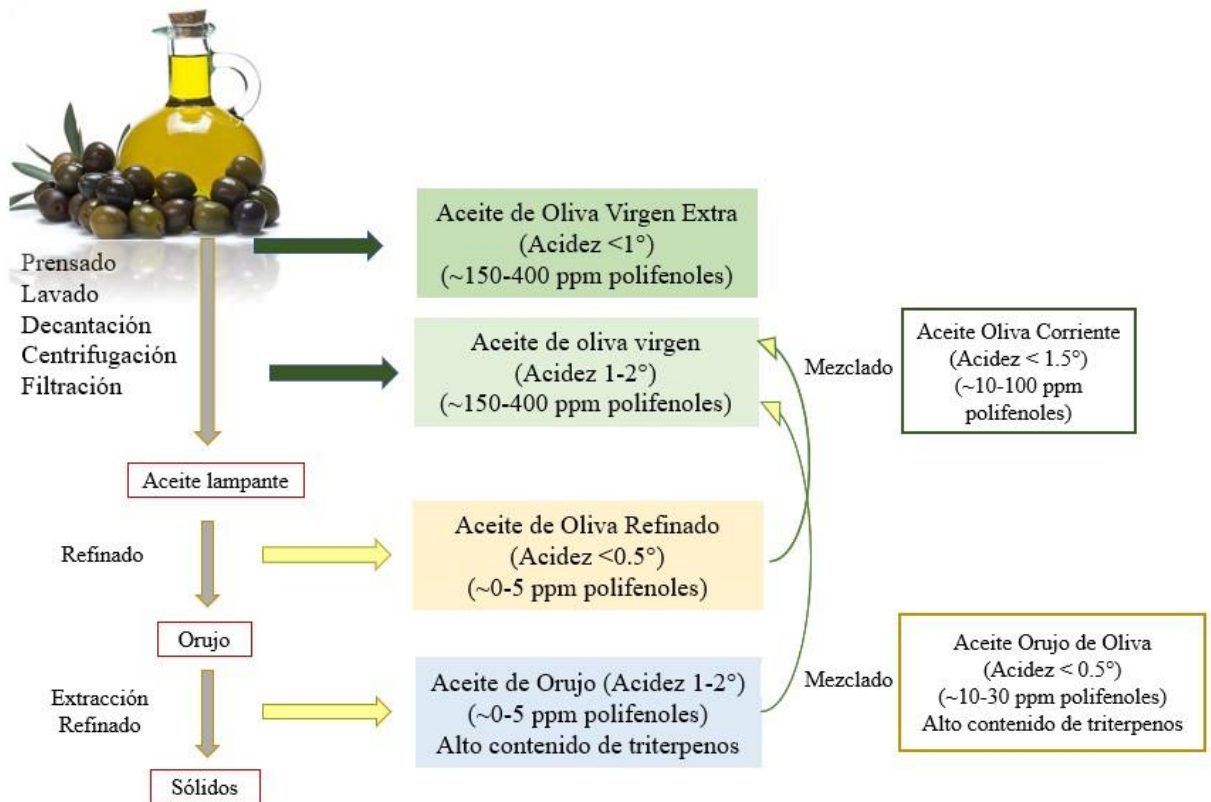
El aceite de oliva se considera todo aquel aceite que su origen de procedencia sea única y exclusivamente del fruto del olivo, con exclusión del aceite obtenido mediante disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. De acuerdo con

el Comité Oleícola Internacional (COI), los AOV son los aceites obtenidos únicamente por medios mecánicos o medios físicos en condiciones particulares de temperatura que no conducen a alteraciones en el aceite, y que no hayan sufrido ningún tratamiento que no sea alguno de los siguientes: recolección, lavado, molienda, batido, prensado, decantación, centrifugación y filtración en el proceso de su elaboración (COI, 2020). Existen diferentes tipos de aceites de oliva que son aptos para el consumo humano los cuales se describen a continuación (Figura 6):

- **Aceite de oliva virgen extra (AOVE):** es un zumo oleoso obtenido mediante el prensado en frío del fruto del olivo en perfecta madurez, con una acidez libre de no más de 0.8 gramos por 100 gramos expresada como ácido oleico. La denominación extra, se da a los aceites de mayor calidad y lo lleva a cabo un panel de cata de expertos que evalúan cualidades positivas como el frutado y picor entre otras, así como posibles defectos del aceite.
- **Aceite de oliva virgen (AOV):** es un zumo oleoso obtenido mediante el prensado en frío del fruto del olivo en perfecta madurez, con una acidez libre de no más de 2 gramos por 100 gramos expresada como ácido oleico, y que no alcanza los parámetros de calidad del AOVE.
- **Aceite de oliva virgen ordinario:** es AOV con una acidez libre de no más de 3.3 gramos por 100 gramos, expresada en ácido oleico.
- **Aceite de oliva refinado:** es un aceite de oliva extraído a partir de los residuos obtenidos al producir el AOV, mediante métodos de extracción con disolventes orgánicos que no conducen a alteraciones en la estructura glicérica inicial. Tiene una acidez libre de no más de 0.3 gramos por 100 gramos expresada como ácido oleico.
- **Aceite de oliva:** este aceite es una mezcla de aceite de oliva refinado y AOV aptos para el consumo humano. Tiene una acidez libre de no más de 1 gramo por 100 gramos expresada como ácido oleico.
- **Aceite de oliva lampante:** es un aceite de oliva extraído a partir de los residuos obtenidos al producir el aceite de oliva refinado, con una acidez libre de más de 3.3 gramos por 100 gramos expresada como ácido oleico, presenta un color y olor prácticamente desagradable y un análisis químico con valores inadecuados para el consumo humano, por lo que está destinado a refinado o para uso técnico.
- **El aceite de orujo de oliva refinado:** es un aceite obtenido del aceite de orujo de oliva crudo, mediante métodos de refinado que no conducen a alteraciones en la

estructura glicérica inicial. Tiene una acidez libre de no más de 0.3 gramos por 100 gramos expresada como ácido oleico.

- **El aceite de orujo de oliva:** es el aceite que comprende la mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y AOV, aptos para el consumo tal como son. Tiene una acidez libre de no más de 1 gramo por 100 gramos.



**Figura 6.** Tipos de aceites de oliva

Otro producto que forma parte de la dieta mediterránea y que es ampliamente consumido son las aceitunas de mesa, que se entiende como el producto preparado a partir de los frutos sanos de variedades de olivo cultivado, aptos para el aderezo, sometidos a tratamientos u operaciones pertinentes y ofrecidos al consumidor para su consumo final. El fruto de la aceituna es una drupa. Tiene bajo contenido de azúcar (2.6-6%) en comparación con otras drupas ( $\geq 12\%$ ) y un alto contenido de aceite (12-30%) que varía según la época del año y la variedad. Además, contiene diferentes componentes característicos, como por ejemplo la oleuropeína, que le aporta sabor amargo (Reglamento de Ejecución (UE) n° 2016/81903; Convenio Internacional del Aceite de Oliva y las Aceitunas de Mesa 2015) (BOE, 2015).

Según los datos oficiales de los países y las estimaciones de la Secretaría Ejecutiva, la producción mundial de AOV en el año de cosecha agrícola 2019/20 se estimó en alrededor de 3,144 toneladas a nivel mundial, mientras que los países miembros del COI estiman una producción total de 2,942.5 toneladas, que representa el 93.6% del total de la producción mundial para la campaña agrícola 2019/20 (COI, 2020).

España es el principal productor de aceite de oliva y concretamente en Andalucía, la producción durante el periodo 2009/10-2013/14 superó las 1,100 toneladas anuales, representando un 80% del total a nivel nacional. Concretamente, la provincia de Jaén, con el 40% de la superficie, y la provincia de Córdoba con el 24%, son las dos principales provincias productoras de AOV en esta región. La principal variedad de aceituna cultivada en Andalucía es la Picual, con el 58.2% de la superficie total, que se distribuyen por las provincias de Jaén, Granada y Córdoba. Después, la variedad de Hojiblanca, con el 18.1% de la producción total se distribuye principalmente al sur de Córdoba, norte de Málaga y sudeste de Sevilla. Otra variedad también frecuente es la Arbequina, que destaca por su alto rendimiento y excelente calidad (COI, 2020b).

El AOV se encuentra principalmente constituido por triacilglicéridos (98%) y otra pequeña cantidad de diferentes compuestos bioactivos (2%). En la fracción saponificable del AOV los AGMI son mayoritarios, representando hasta un 85% de su composición, dentro de los cuales el ácido oleico puede oscilar entre el 70-85% y el palmitoleico también está presente. Dentro de los AGPI el ácido linoleico es el mayoritario. Los AGS en el AOV representan un 14% de la composición del aceite, y básicamente están presentes el ácido palmítico y el ácido esteárico.

En la fracción no saponificable se encuentran los compuestos minoritarios, dentro de los cuales los mayoritarios son compuestos de naturaleza fenólica, además de algunos compuestos lipofílicos como el  $\alpha$ -tocoferol (Jimenez-Lopez *et al.*, 2020). Además de aportar aroma, gusto y color al aceite, los compuestos fenólicos del AOV también son responsables de la mayoría de sus efectos beneficiosos y propiedades funcionales (Angerosa *et al.*, 2004).

### ***Beneficios del aceite de oliva***

Desde la antigüedad, el aceite de oliva y los subproductos del olivo, como los extractos de las hojas, se han utilizado como remedios tradicionales para el tratamiento de diversas dolencias, gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. El aceite de oliva era muy apreciado como un remedio para curar las quemaduras, las llagas, los escalofríos y para fortalecer la piel y los músculos, para aliviar los dolores de estómago e hígado y para evitar los dolores de cabeza, siendo también eficaz para el tratamiento de las úlceras (Ray *et al.*, 2015). La evidencia

epidemiológica y clínica más reciente han proporcionado la base científica que demuestran estos beneficios para la salud del AOV y las aceitunas (Ray *et al.*, 2015).

El AOV es el componente principal de la dieta mediterránea que se considera como una de las dietas más saludables a nivel mundial, no solo por su contenido de AGMI, sino también por su alto contenido en compuestos fenólicos. En 2011, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió una opinión científica sobre las alegaciones de salud del AOV rico en polifenoles sobre la salud cardiovascular, que menciona que 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (oleuropeína y tirosol) contenidos en 20 mL de AOV proporcionan beneficios sobre la salud cardiovascular principalmente porque ayuda a prevenir la oxidación del colesterol LDL y así contribuye a la disminución del riesgo cardiovascular (EFSA, 2011).

Del estudio PREDIMED se han derivado un gran número de estudios diferentes en los que se confirma que la dieta mediterránea suplementada con AOVE proporciona una protección considerable frente a la HTA. Este estudio demostró que después de administrar los dos tipos de dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva o nueces se observaron valores más bajos de PAD en los sujetos de ambos sexos (Toledo *et al.*, 2013). De la misma manera, otro estudio derivado del PREDIMED en una subpoblación de mujeres hipertensas demostró la eficacia de estas dietas para mejorar la HTA (Storniolo *et al.*, 2017) y la fibrilación auricular (Barrio-López *et al.*, 2020). Por otro lado, en personas con alto riesgo cardiovascular el AOVE acompañado de una dieta mediterránea reduce el riesgo de desarrollar DM2 (Salas-Salvadó *et al.*, 2014; Seguí-Díaz, 2014) y puede disminuir o retrasar la necesidad de medicamentos hipoglucemiantes (Basterra-Gortari *et al.*, 2019).

Otros beneficios descritos del AOVE son el aumento del HDL y la reducción del estrés oxidativo y por tanto esto ralentiza las primeras etapas del desarrollo de aterosclerosis, también disminuye la inflamación, la PAS y la disfunción endotelial, y mejora el control glucémico y, en consecuencia, el síndrome metabólico (Yubero-Serrano *et al.*, 2019). Una revisión sistemática y metaanálisis en adultos con DM2 o con riesgo de desarrollar DM2, proporcionó evidencia de que la ingesta de AOVE podría ser beneficiosa para prevenir y tratar la DM2, mejorando el metabolismo de la glucosa (Schwingshackl *et al.*, 2017). Además, también se pudo demostrar que mejora la actividad antioxidante y disminuye la actividad de la xantina oxidasa en pacientes con síndrome metabólico (Sureda *et al.*, 2016).

Todos estos beneficios del AOVE también han sido demostrados en modelos experimentales en animales. La suplementación con una dieta enriquecida con AOVE en un modelo experimental de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) provocó la reducción de la HTA (Villarejo *et al.*, 2015) y

mejoró la función endotelial, el estado oxidativo y el inflamatorio (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2016).

### ***Beneficios de los componentes individuales del aceite de oliva***

Los componentes minoritarios presentes en el AOV y en los subproductos como sus hojas, varían según la variedad, el clima, la madurez de las aceitunas en la cosecha y el sistema de procesamiento empleado para su elaboración (Covas *et al.*, 2006). Entre los componentes menores, los más conocidos por sus propiedades antioxidantes son los compuestos fenólicos, comúnmente llamados “polifenoles”, pero también contiene ácidos triterpénicos que recientemente están siendo investigados por sus potenciales efectos saludables. Los ácidos triterpénicos se encuentran principalmente en la piel y el hueso de la aceituna, y por lo tanto pasan a formar parte del aceite de orujo que se caracteriza por tener un alto contenido (Sánchez-Rodríguez y Mesa., 2018).

Se han realizado una gran cantidad de estudios en animales para evaluar el efecto de ciertos componentes menores del aceite de oliva. No obstante, los hallazgos encontrados no siempre pueden extrapolarse a los humanos, y las normas establecidas por la medicina basada en la evidencia, requieren que se proporcione evidencia científica de alto nivel antes de poder formular recomendaciones nutricionales para el consumidor general. La evidencia científica requerida es proporcionada por ensayos clínicos aleatorizados, controlados, doble ciego (evidencia de nivel I) y, en cierta medida, por grandes estudios de cohortes (evidencia de nivel II) (Covas *et al.*, 2006). De esta manera, y después de hacer una amplia revisión de todos aquellos estudios que proporcionan evidencia científica y siguen criterios que les brinda una alta calidad en su realización (validez externa e interna, homogeneidad de la muestra y poder estadístico), las autoridades sanitarias, como la EFSA, emiten recomendaciones nutricionales basadas en dicha evidencia científica.

Una revisión sistemática y metaanálisis reciente, donde se han evaluado el efecto del AOVE con alto contenido de polifenoles (150-800 mg por kg de aceite) frente a AOVE con bajo contenido de polifenoles (0-132 mg por kg de aceite) sobre factores de riesgo cardiovascular ha concluido que existen evidencias que demuestran mejoras en los biomarcadores inflamatorios y en la HTA tras la ingesta de los aceites ricos en estos compuestos (George *et al.*, 2019).

Hay un creciente número de estudios experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales, así como ensayos clínicos de intervención que revelan nuevos aspectos y efectos para la salud en relación con la biodisponibilidad de los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva (hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína, oleocantal). El hidroxitirosol y la oleuropeína del AOVE son responsables de su peculiar sabor picante y de su alta estabilidad, siendo estos dos componentes los

más importantes por sus efectos antiaterogénicos, cardioprotectores, anticancerígenos, y neuroprotectores (Karković-Markovic *et al.*, 2019). De manera general, se sabe que los compuestos fenólicos son capaces de reducir la morbilidad y/o ralentizar la progresión de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cancerosas. El mecanismo de acción de los polifenoles se relaciona fuertemente con su actividad antioxidante por su capacidad de disminuir la presencia de ERO en el cuerpo humano (Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018).

### ***Ácido oleico***

El ácido oleico es el principal ácido graso del aceite de oliva. Es un ácido graso con 18 carbonos y una insaturación en el carbono 9 (C18:1n9). Su presencia en la fracción saponificable puede oscilar entre el 70-85%. El ácido oleico no es un ácido graso esencial, ya que se puede sintetizar de forma endógena en humanos (Piccinin *et al.*, 2019). Al tener una única insaturación, el ácido oleico se considera un ácido graso muy estable frente a la oxidación, y esta estabilidad la transfiere a las membranas y los tejidos de los que forma parte (Hernández, 2015).

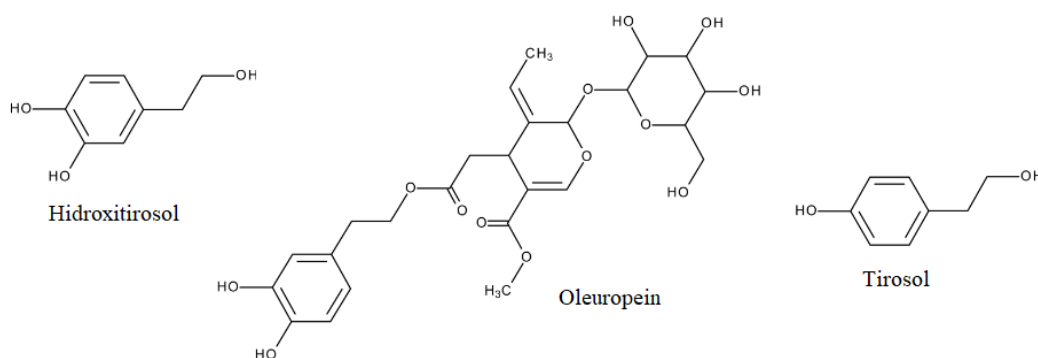
En general, se reconoce que una mayor ingesta de ácido oleico y una ingesta limitada de grasas saturadas son beneficiosas y protectoras frente a las ECVs (Hernández, 2015). Diferentes estudios epidemiológicos refieren que una mayor proporción de AGMI en la dieta, en particular ácido oleico procedente del aceite de oliva, se relaciona con una menor prevalencia de enfermedades coronarias, y se cree que el efecto beneficioso del ácido oleico se refleja en modificaciones en las concentraciones plasmáticas de lípidos y lipoproteínas como el incremento de HDL (Berglund *et al.*, 2012), en la composición y por tanto fluidez y permeabilidad de las membranas (Muriana *et al.*, 1997), y por la reducción de la presión arterial (Ruíz-Gutiérrez *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha descrito que el ácido oleico mejora la homeostasis de la glucosa al inducir una mejor respuesta a la insulina (Soriguer *et al.*, 2004). Así mismo, el ácido oleico exhibe efectos antiinflamatorios al prevenir la liberación de determinadas moléculas quimiotácticas (Mesa *et al.*, 2006), ya que juega un papel en la activación de diferentes mecanismos de señalización de las células del sistema inmunitario (Carrillo *et al.*, 2012).

### ***Hidroxitirosol***

El hidroxitirosol se puede considerar el principal compuesto fenólico presente en el aceite de oliva. El 3,4-dihidroxiifeniletanol (Figura 7) es un alcohol fenólico estable en forma libre y que penetra fácilmente en los tejidos, donde se han descrito una amplia gama de efectos biológicos, cardioprotectores, anticancerígenos, neuroprotectores, antimicrobianos y endocrinos entre otros



(Karković-Markovic *et al.*, 2019). Es una molécula soluble en lípidos y también es soluble en agua, lo que influye en su biodisponibilidad, y por tanto en sus efectos biológicos. Se absorbe de manera dependiente de la dosis ingerida en humanos, se metaboliza y se excreta en orina. Se ha observado que la biodisponibilidad del hidroxitirosol es mayor cuando se administra vehiculizado en AOV en comparación con la administración de una solución acuosa o incorporarlo a una matriz alimentaria diferente (Visioli *et al.*, 2003) ya que el aceite de oliva previene la pérdida de los compuestos fenólicos en el tracto gastrointestinal, antes de su absorción, actuando como un vehículo protector de sus propios fenoles (Tuck y Hayball., 2002). Sus propiedades beneficiosas para la salud humana están fuertemente relacionadas con la capacidad de la molécula para eliminar las ERO y las especies reactivas de nitrógeno, así como para activar los sistemas antioxidantes endógenos en el cuerpo (Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018). El hidroxitirosol también tiene capacidad de quelar metales y su alta eficacia antioxidante se le atribuye a la presencia del resto *o*-dihidroxifenilo (Visioli *et al.*, 2002). Actúa principalmente rompiendo la cadena de oxidación, al donar un átomo de hidrógeno a los radicales peroxilo que se estabilizan y se reemplazan con el radical hidroxitirosol no reactivo, debido a la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular en el grupo fenoxi (Karković-Markovic *et al.*, 2019). Se ha demostrado que los fenoles del aceite de oliva, en especial el hidroxitirosol, reducen la eliminación de isoprostanos, que son compuestos de tipo prostaglandinas que se producen por la peroxidación de los lípidos en los seres humanos (Visioli *et al.*, 2000).



**Figura 7.** Estructuras del hidroxitirosol, la oleuropeína y el tirosol

El hidroxitirosol puede disminuir la HTA y mejora la disfunción endotelial, inhibiendo la activación endotelial y la adhesión de células monocíticas en una concentración compatible con lo esperado dentro de un patrón de dieta mediterránea (Carluccio *et al.*, 2003). Los ensayos clínicos han demostrado que la ingesta regular de 15 mg/d de hidroxitirosol durante 3 semanas, administrado mediante una cápsula dos horas antes del almuerzo para asegurar la estabilidad gástrica, modifica los parámetros de composición corporal y el perfil antioxidante, la expresión de genes relacionados

con la inflamación y el estrés oxidativo en la aterosclerosis, en voluntarios sanos (Colica *et al.*, 2017). Estos efectos contribuyen a su potencial terapéutico antiaterogénico y cardioprotector, ya que es muy eficaz para prevenir la peroxidación de lípidos y proteger las LDL de la oxidación (Rietjens *et al.*, 2007), tiene capacidad antiinflamatoria *in vivo* (Wu *et al.*, 2018) y también ejerce efectos beneficiosos sobre las HDL, manteniendo las propiedades fisicoquímicas que mejoran su funcionalidad especialmente la capacidad de promover el eflujo de colesterol, lo que predice la incidencia de eventos coronarios y está inversamente relacionada con el desarrollo de aterosclerosis temprana (Berrougui *et al.*, 2015). Se ha identificado también un efecto protector vascular a través de la disminución de las moléculas de adhesión de las células vasculares implicadas en la aterogénesis temprana (Scoditti *et al.*, 2014). Las mitocondrias son orgánulos celulares fundamentales para producir energía, pero también ERO, sus funciones deterioradas juegan un papel clave en la disfunción endotelial y se ha sugerido que el hidroxitirosol puede prevenir la disfunción mitocondrial, contribuyendo a sus beneficios sobre la función endotelial (Calabriso *et al.*, 2018).

La lipemia posprandial es un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis, se ha descrito que el hidroxitirosol es eficaz en la protección contra la dislipidemia al disminuir las concentraciones sanguíneas de colesterol total, TAG y LDL, y aumentar el HDL. Además, también mejora el estado antioxidante, al reducir la peroxidación de lípidos y mejorar las enzimas antioxidantes (Jemai *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2014). La administración durante un mes de hidroxitirosol en conejos hiperlipémicos mejoró el perfil de lípidos en sangre, el estado antioxidante y reduce el riesgo de desarrollo de aterosclerosis (González-Santiago *et al.*, 2006). También se ha evaluado el efecto antiagregante plaquetario del hidroxitirosol en ratas sanas y se pudo demostrar que previenen la agregación plaquetaria de forma similar al ácido acetilsalicílico (González-Correa *et al.*, 2008). También se ha demostrado actividad cardioprotectora al modular las proteínas relacionadas con la proliferación y migración de células endoteliales y la oclusión de los vasos aórticos así mismo con las proteínas relacionadas con la insuficiencia cardíaca en el tejido cardíaco (Catalán *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha descrito que el hidroxitirosol puede ejercer propiedades beneficiosas en personas con obesidad y diabetes. Un estudio clínico realizado en una cohorte de adultos con sobrepeso evaluó el efecto del hidroxitirosol sobre factores de riesgo cardiovascular modificables, sobrepeso y obesidad, tras la administración de cápsulas con extractos de 9.67 mg/d de hidroxitirosol y 51.1 mg de oleuropeína durante 12 semanas. El estudio observó una mejora en la sensibilidad a la insulina y en la capacidad de secreción de las células  $\beta$  pancreáticas, sin embargo, no se observaron

cambios en la composición corporal y en el índice de masa corporal, posiblemente porque la dosis administrada y/o el tiempo de intervención el estudio fueron escasos (De Bock *et al.*, 2013).

El hidroxitirosol también demuestra actividad hipoglucémica en varios modelos animales e *in vitro* de diabetes al influir en los principales procesos bioquímicos que conducen a la vasculopatía diabética. La suplementación durante 4 semanas con extractos ricos en hidroxitirosol y oleuropeína disueltos en agua potable (16 y 8 mg/kg de peso corporal, respectivamente) redujo significativamente las concentraciones séricas de glucosa y colesterol y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), además de mejorar el sistema de defensa antioxidante (Jemai *et al.*, 2009). En ratas con diabetes inducida con estreptozotocina, el hidroxitirosol redujo significativamente la proliferación celular en la pared vascular, el estrés oxidativo y nitrosativo, las concentraciones plasmáticas de LDLox, VCAM-1 y mediadores inflamatorios, la agregación plaquetaria y la producción de tromboxano B<sub>2</sub> que son biomarcadores indicativos de los principales procesos bioquímicos que conducen a la vasculopatía diabética (López-Villodres *et al.*, 2016). Un estudio experimental en ratas con síndrome metabólico inducido por la dieta, a las que se les administraba hidroxitirosol (20 mg/kg) demostró una mejor tolerancia a la glucosa e insulina y función endotelial al disminuir la HTA sistólica, así como la fibrosis ventricular izquierda, además de una reducción de los marcadores de daño hepático inducida por el hidroxitirosol. Adicionalmente, se observó una reducción los niveles de malondialdehído y 4-hidroxinonal producidos como resultado de una menor peroxidación lipídica (Poudyal *et al.*, 2017).

Otras investigaciones confirman que el hidroxitirosol previene el deterioro metabólico reduciendo la inflamación hepática y restaurando la integridad duodenal en un modelo de rata resistente a la insulina, modulando el estrés oxidativo y restaurando la homeostasis de la glucosa (Pirozzi *et al.*, 2016). También se observó una mejora de la resistencia a la insulina al modular el estrés del retículo endoplásmico y una prevención de la esteatosis hepática en ratones con obesidad inducida por la dieta (Wang *et al.*, 2018). Un estudio metabólico ha descrito que la administración de hidroxitirosol en un modelo de ratas con síndrome metabólico mejora la función cardiovascular y hepática (Lemonakis *et al.*, 2017), tiene un efecto beneficioso en la hiperlipidemia, ya que puede modificar la expresión de genes relacionados con la maduración y diferenciación de los adipocitos e inhibe la formación de lípidos (Dagla *et al.*, 2018).

Otros modelos experimentales han demostrado los efectos beneficiosos del hidroxitirosol en distintas situaciones patológicas. En modelos *in vitro* se ha descrito que el hidroxitirosol aumenta la función y la biogénesis mitocondrial. Concentraciones relativamente bajas de hidroxitirosol en los adipocitos aumentan la expresión de todos los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial,

incluida la ATP sintasa, protegiendo a las mitocondrias contra la reducción de la síntesis de ADN mitocondrial y modulando la actividad de factores críticos de transcripción, lo que sugiere que el hidroxitirosol puede ser usado como un compuesto terapéutico para la prevención y tratamiento de DM2 y la obesidad (Hao *et al.*, 2010). En un modelo astrocítico de enfermedad de Alzheimer se ha demostrado que el hidroxitirosol desempeña funciones tanto preventivas como correctivas frente a la citotoxicidad y la resistencia a la insulina inducida por  $\beta$ -amiloides en los astrocitos. En este modelo se observó que el hidroxitirosol mejora la sensibilidad a la insulina y restaura la señalización adecuada de la insulina, confirmando una asociación inversa entre el consumo de AOV y la prevalencia del deterioro cognitivo (Crespo *et al.*, 2017). También se han demostrado propiedades neuroprotectoras atribuidas a la reducción del estrés oxidativo a nivel neuronal, protegiendo las células neuronales contra la toxicidad inducida por  $\beta$ -amiloide (Rodríguez-Morató *et al.*, 2015; De las Hazas *et al.*, 2018).

Se han atribuido propiedades anticancerígenas al hidroxitirosol en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*, que han demostrado que puede ejercer un beneficio frente a la proliferación celular, el crecimiento celular, la migración, la invasión y la angiogénesis. El hidroxitirosol y su precursor, la oleuropeína regulan negativamente la expresión de las proteínas BCL-2 y COX-2 y reducen el daño del ADN, contribuyendo a la inhibición de múltiples etapas de la carcinogénesis del colon (Imran *et al.*, 2018). Así mismo, pueden brindar protección frente a otros cánceres humanos como el colorrectal, de piel, de mama, tiroides, digestivo, pulmón, cerebro, sangre y cervical (Fabiani *et al.*, 2016; Parkinson y Cicerale., 2016). La amplia evidencia científica confirma que los polifenoles del AOV y en particular el hidroxitirosol tiene importantes propiedades farmacéuticas, que se pueden emplear como tratamiento no farmacológico en el manejo de varias enfermedades crónicas (Parkinson y Cicerale., 2016).

### ***Oleuropeína***

La oleuropeína es el compuesto fenólico más predominante en las aceitunas y puede alcanzar concentraciones de hasta 140 mg/g del peso seco en las aceitunas jóvenes y 60-90 mg/g de materia seca en las hojas (Omar, 2010). Químicamente pertenece al grupo de los secoiridoides que son abundantes en oleáceas, gentianales, cornales y muchas otras plantas. Los iridoides y secoiridoides son compuestos generalmente unidos glicosídicamente, producidos a partir del metabolismo secundario de terpenos como precursores de varios alcaloides indólicos (Soler-Rivas *et al.*, 2003).

Concretamente, la oleuropeína es el éster de ácido elenólico y el 3,4-dihidroxifeniletanol o hidroxitirosol (Figura 7). Es el principal glucósido de las aceitunas, cuya degradación da lugar a la

formación de hidroxitirosol en el AOV (Imran *et al.*, 2018). Por lo tanto, sus beneficios están relacionados con los ya descritos para esa molécula, y entre los que destaca su alta actividad antioxidante gracias a su capacidad de eliminar radicales libres y quelar metales. Se ha descrito que reduce considerablemente las enfermedades coronarias y ciertos tipos de cánceres (Imran *et al.*, 2018).

La oleuropeína tiene un efecto beneficioso asociado a la prevención y mejora de la enfermedad cardiovascular a través de diferentes mecanismos como: antioxidantes (inhibición de la oxidación de LDL), vasodilatadoras, antiagregantes plaquetarias, antiinflamatorias y antioxidantes, siendo uno de los componentes de la dieta mediterránea a los que se le ha atribuido su efecto cardioprotector (Moreno *et al.*, 2003). Además, la oleuropeína aumenta la producción de óxido nítrico y la expresión de iNOS *in vitro*, lo que modifica favorablemente los procesos fisiopatológicos a nivel celular (Visioli y Galli., 2001). Estudios en roedores han demostrado que los compuestos minoritarios del AOV y las hojas de olivo, como la oleuropeína, son responsables de los efectos vasodilatadores independientes del endotelio en las aortas de rata SHR (Zarzuolo *et al.*, 1991). También se ha demostrado que mejora el perfil glucémico posprandial al reducir la glucosa y aumentar la actividad de la insulina y la dipeptidil-peptidasa-4, además de reducir el estrés oxidativo derivado de NOX<sub>2</sub> en sujetos sanos (Carnevale *et al.*, 2018).

### **Tirosol**

El tirosol (2-(4 hidroxifenil)-etanol) es otro de los fenoles más abundantes del AOV capaz de proteger frente a las lesiones celulares inducidas por las LDL oxidada (Giovannini *et al.*, 1999). Se ha demostrado que a pesar de su débil actividad antioxidante, el tirosol es capaz de restaurar las defensas antioxidantes intracelulares probablemente debido a su acumulación intracelular, contribuyendo a la prevención de las enfermedades cardiovasculares y aquellas enfermedades que se deriven del estrés oxidativo (Di Benedetto *et al.*, 2007). Además, al tirosol también se le atribuyen otros beneficios relacionados con la salud cardiovascular relacionada con la inhibición de la producción de leucotrieno B<sub>4</sub> que es un quimioatrayente y activador de neutrófilos que afectan la función endotelial (Perona *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha demostrado que el tirosol protege el miocardio y retrasa el envejecimiento en un modelo murino de infarto de miocardio suplementado con una dosis de 5 mg de tirosol por kg de peso durante 30 días. En este modelo el tirosol inducía proteínas de supervivencia y longevidad, por lo que puede considerarse como una terapia antienvjecimiento para el corazón (Samuel *et al.*, 2008).

En la actualidad y debido al gran aumento de prevalencia de ECVs, las estrategias terapéuticas para la prevención y el tratamiento de la HTA son muy necesarias. El consumo de AOV como vehículo de tirosol y otros componentes bioactivos podría formar parte de estas estrategias que buscan mejorar las alteraciones microcirculatorias y las propiedades reológicas de la sangre. En este sentido, se ha demostrado que el tirosol limita el aumento de viscosidad de la sangre de forma comparable con la pentoxifilina (un fármaco específico), y que además aumenta la capacidad de transportar oxígeno a los tejidos en ratas hipertensas jóvenes (Plotnikov *et al.*, 2018).

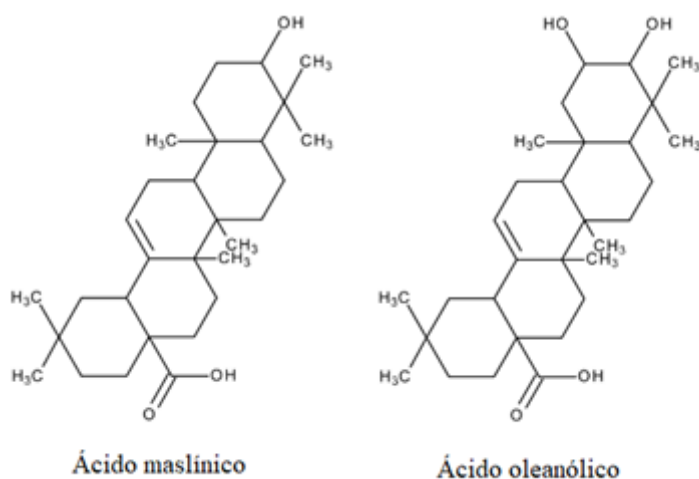
También se ha descrito que el tirosol tiene efectos beneficiosos en enfermedades metabólicas, mejorando la hiperglucemia mediante la regulación de enzimas clave del metabolismo de los carbohidratos en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. El mecanismo molecular parece que está relacionado con un efecto antiinflamatorio en el hígado y el páncreas además de la disminución de la peroxidación lipídica, proteína C reactiva y de la secreción de marcadores de inflamación (Chandramohan y Pari., 2016). La disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas es un determinante importante en la patología de la diabetes, en la que el estrés del retículo endoplásmico juega un papel de mediador central que provoca el fallo en la secreción de insulina. Se ha comprobado que el tirosol protege frente a la disfunción de las células  $\beta$  asociado con el estrés del retículo endoplásmico ya que inhibe la apoptosis inducida por estrés en estas células (Lee *et al.*, 2016).

Varios estudios describen que una mayor adherencia a la dieta mediterránea se asocia con una mejor función cognitiva, menores tasas de deterioro cognitivo y menor riesgo de enfermedad de Alzheimer (Lourida *et al.*, 2013). En 2011, un estudio identificó el tirosol y el hidroxitirosol como agentes neuroprotectores, ya que pueden proteger las células N2a frente a la toxicidad inducida por proteínas  $\beta$ -amiloides implicadas en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Estos autores demostraron que la muerte celular inducida por  $\beta$ -amiloide disminuye al tratar las células con tirosol e hidroxitirosol conjuntamente, demostrando los efectos protectores de dos componentes alimentarios individuales de la dieta mediterránea que pueden funcionar como neuroprotectores en la prevención de enfermedades demenciales (St-Laurent-Thibault *et al.*, 2011).

Finalmente, se han descrito propiedades antimicrobianas de los fenoles del AOV incluido el tirosol que se relacionan con la inhibición de la ATP sintasa bacteriana de *Escherichia coli* (Amini *et al.*, 2017).

### Ácidos triterpénicos

Los ácidos triterpénicos son metabolitos secundarios de las plantas que están presentes principalmente en la piel de la fruta, las hojas y la corteza del tallo. En la planta del olivo estos derivados terpénicos se concentran en la piel y el hueso del fruto y en las hojas, por lo que se encuentran principalmente en los aceites de orujo. Los más importantes encontrados en el fruto del olivo y en el AOV son dos dihidroxiterpenos: eritrodiool (homo-olestranol, 5 $\alpha$ -olean-12-en-3 $\beta$ , 28-diol) y el uvaol ( $\Delta$ -12-ursen-3 $\beta$ , 28diol) y los ácidos hidroxiterpénicos pentacíclicos, que son la forma oxidada de los dialcoholes triterpénicos, como el ácido oleanólico, ácido maslínico, ácido ursólico, ácido botulínico, ácido 2 $\alpha$ -hidroxi-ursólico y ácido deoxiursólico (Pérez-Camino *et al.*, 1999; Allouche *et al.*, 2009). El ácido oleanólico y maslínico (Figura 8) han demostrado varios efectos farmacológicos y carecen de toxicidad, por lo que estos componentes están siendo estudiados para justificar el desarrollo de nuevos agentes bioactivos procedentes del olivo (Jäger *et al.*, 2009).



**Figura 8.** Estructuras del ácido maslínico y oleanólico

Para evaluar los beneficios para la salud humana proporcionados por los triterpenos del AOV, se requieren métodos analíticos adecuados, capaces de cuantificar las bajas concentraciones esperadas en los fluidos humanos. Recientemente se ha analizado la biodisponibilidad y farmacocinética en humanos del ácido maslínico y ácido oleanólico presentes en el AOV tras ingestas dietéticas normales de aceites enriquecidos en estas moléculas. Se ha descrito la presencia de sus derivados en plasma y en la orina (Pozo *et al.*, 2017) y que la biodisponibilidad del ácido maslínico es siete veces mayor que la del oleanólico (De la Torre *et al.*, 2020), confirmando que estos componentes pueden ser absorbidos y, por lo tanto, pueden contribuir a algunas propiedades cardioprotectoras al AOV (De la Torre *et al.*, 2020).

Los ácidos triterpénicos pueden ayudar en la disminución de esta oxidación de LDL y por tanto, en la disminución de la incidencia de ECVs (Sánchez-Quesada *et al.*, 2013). Los triterpenos ejercen un efecto cardioprotector por diferentes mecanismos de acción relacionados con las actividades antioxidantes y antitrombóticas demostradas *in vitro* e *in vivo*, y se ha demostrado que el uvaol, eritrodiool, ácido oleanólico y ácido maslínico ejercen un efecto antiaterogénico. En particular el ácido maslínico es el más activo, ejerciendo un efecto antioxidante dependiente de la dosis, mediante la eliminación de radicales libres y la quelación de cobre (Allouche *et al.*, 2009), la inhibición de la lipoperoxidación y la protección de la actividad antioxidante y también gracias a su potencial antihiperlipidémico (Hussain-Shaik *et al.*, 2012).

Con respecto al ácido oleanólico, se ha descrito que ejerce potentes efectos antiaterogénicos independientemente de su efecto sobre los lípidos plasmáticos (Buus *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la suplementación con una dosis diaria de 60 mg/kg de ácido oleanólico y ursólico durante 6 semanas en un modelo de hipertensión genética de rata sensible a la sal (DAHL) y resistente a la insulina, protege frente al desarrollo de hipertensión severa. Este efecto antihipertensivo se le atribuyó a su potente actividad diurética, natriurética y salurética, y además, se observó una disminución de la frecuencia cardíaca (34% y un 32%, respectivamente), un efecto antihiperlipidémico (disminución de las concentraciones de LDL y triacilglicéridos), efectos antioxidantes e hipoglucemiantes (Somova *et al.*, 2003).

Estudios *in vitro* e *in vivo*, sugieren que estos compuestos regulan varios factores relacionados con el síndrome metabólico (Sharma *et al.*, 2018). El ácido oleanólico mejora la respuesta a la insulina, preservando la funcionalidad y supervivencia de las células  $\beta$ , y proporcionando una protección frente a las complicaciones de la DM2, al modular directamente las enzimas relacionadas con la biosíntesis, secreción y señalización de insulina (Castellano *et al.*, 2013). De hecho, los ácidos triterpénicos pueden aumentar la síntesis de glucógeno y simultáneamente inhibir la gluconeogénesis y la glucogenólisis, reduciendo así la producción de glucosa hepática que influye en la liberación de insulina y ayudando al control de la glucosa (Wen *et al.*, 2008).

El estudio de intervención en pacientes prediabéticos suplementados con AOV enriquecido con ácido oleanólico PREDIABOLE (Prevención de la diabetes con ácido oleanólico) mostró que el consumo de un AOV rico en ácido oleanólico puede disminuir y retrasar la necesidad de medicamentos hipoglucemiantes (Santos-Lozano *et al.*, 2019). En ratones obesos, suplementados con aceite de orujo rico en ácido oleanólico y maslínico se observó una reducción sustancial del peso corporal, la resistencia a la insulina, la inflamación del tejido adiposo y, en particular, una mejora de la función vascular (Claro-Cala *et al.*, 2020). Otros autores han encontrado que el



consumo de oleanólico durante 12 semanas disminuye significativamente la secreción de grelina (hormona orexogénica) y, en consecuencia, la ingesta calórica en ratas prediabéticas, lo que contribuyó a mejorar la homeostasis de la glucosa y la disminución de la hemoglobina glucosilada (Gamede *et al.*, 2018). Además, se ha descrito que tanto el ácido oleanólico como el maslínico, reducen la expresión de la grelina y pueden constituir una vía de control glucémico en la DM2 (Luvuno *et al.*, 2016). Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha confirmado la capacidad protectora de los ácidos oleanólico y maslínico del AOVE para disminuir la oxidación del ADN y la inflamación en sujetos sanos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019). En resumen, los triterpenos del AOV, son una fuente natural de antioxidantes, que podrían ser compuestos útiles para la prevención de múltiples enfermedades relacionadas con el daño oxidativo celular, y que también ejercen actividades cardioprotectora y antiinflamatoria (Sánchez-Quesada *et al.*, 2013).

### ***Modelo experimental de ratas espontáneamente hipertensas***

El envejecimiento se asocia con una alta incidencia y prevalencia de HTA. Si bien todas las formas de hipertensión estudiadas hasta la fecha son causadas por una alteración en la asimilación del sodio y agua en el riñón, las alteraciones genéticas, ambientales y neuroendocrinas también contribuyen al desarrollo y mantenimiento de la HTA. Como se ha detallado previamente, existen varios mecanismos que pueden desempeñar un papel clave en la HTA incluido el sistema renina-angiotensina-aldosterona, óxido nítrico, endotelina, inflamación, estrés oxidativo, sistema nervioso simpático, relación andrógeno/estrógeno y obesidad. Los modelos de ratas y ratones con HTA, tanto genéticos, no genéticos y los transgénicos, se utilizan comúnmente para el estudio de la HTA y el envejecimiento (Reckelhoff *et al.*, 2018).

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), abreviación que proviene de la definición en inglés “hypertensive spontaneous rats”, es el modelo de HTA más utilizado. La cepa SHR fue producida en Japón por Okamoto y Aoki (1963) por endogamia selectiva al cruzar ratas Wistar-Kyoto (WKY) con HTA, lográndose una línea genéticamente hipertensa (Okamoto y Aoki., 1963). Las ratas normotensas WKY se emplean como controles en los estudios con SHR. Hasta la fecha, la rata SHR es el modelo experimental más adecuado para el estudio de la hipertensión humana, en el que la causa de la HTA está originada por la desregularización del sistema renina-angiotensina-aldosterona, y que a su vez con el tiempo exhibe la característica típica como lesiones vasculares, y alteraciones renales que causan nefrosclerosis arteriolar y posteriormente puede aparecer la proteinuria (Feld *et al.*, 1977). En las ratas SHR, la hipertensión comienza a desarrollarse a las 5-6 semanas de edad y la presión arterial se estabiliza aproximadamente a los 50-60 días, para

permanecer estable o disminuir ligeramente posteriormente (Dickhout y Lee., 1997). En las primeras etapas de la hipertensión las ratas SHR experimentan un aumento del gasto cardíaco, pero mantienen una resistencia periférica normal. Sin embargo, a medida que el estado hipertensivo se estabiliza el gasto cardíaco vuelve a la normalidad y los vasos sanguíneos hipertrofiados producen una mayor resistencia periférica generalizada (Dickhout y Lee., 1997). La proteinuria, glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial, junto con las características de la ECV como la hipertrofia cardíaca, comienzan a desarrollarse entre el inicio de la hipertensión (5-6 semanas de edad) y su fase de meseta a las 40 semanas (Ofstad y Iversen., 2005). Entre las 14 y 15 semanas, comienza a aparecer la patología renal. Se ha publicado que la expresión de marcadores de estrés oxidativo e inflamatorio y de enfermedad renal en los vasos sanguíneos y el tejido cardíaco de las SHR puede aparecer a partir de las 3 semanas de edad (Biswas y De Faria., 2007). En comparación con otros modelos de enfermedad renal crónica e hipertensión, como el modelo de rata DAHL en el que se produce una alteración en la asimilación de sodio, las SHR desarrollan un nivel mucho más bajo de lesión renal. La ausencia de daño renal progresivo se ha atribuido a un aumento de la vasoconstricción preglomerular, que evita que la hipertensión sistémica se transmita a los glomérulos (Kinuno *et al.*, 2005). Además, este modelo es especialmente resistente a la sal a medida que avanza la patología renal.

Las ratas SHR se han convertido en el modelo de elección para probar fármacos antihipertensivos. Otra valiosa contribución de este modelo es el mapeo e identificación de genes responsables del desarrollo de la HTA. Al igual que los seres humanos, el modelo de SHR experimenta una progresión que comienza con una fase prehipertensiva hasta una hipertensiva. La esperanza de vida de las ratas SHR es de 1.5-2.5 años, mientras que los controles normotensos suelen vivir de 2.5-3 años. Esto hace que el modelo de SHR sea conveniente para el estudio de la HTA y el envejecimiento. Además, las ratas SHR se han cruzado con otras cepas para crear nuevos modelos, como la rata SHR con insuficiencia cardíaca, para modelar la insuficiencia cardíaca congestiva secundaria a HTA esencial, y el modelo de ratas SHR propensas a accidentes cerebrovasculares, que es un modelo único de HTA grave y accidente cerebrovascular hemorrágico (Mohammed-Ali *et al.*, 2017).

### ***Foodómica y metabolómica***

Las disciplinas ómicas aplicadas en el contexto de la nutrición y la salud tienen el potencial de identificar la interacción de los alimentos con los genes y posteriormente con las proteínas y los metabolitos, a través del análisis de biomarcadores de salud y/o enfermedad. La información obtenida podría usarse para identificar biomarcadores útiles para evaluar diferentes intervenciones

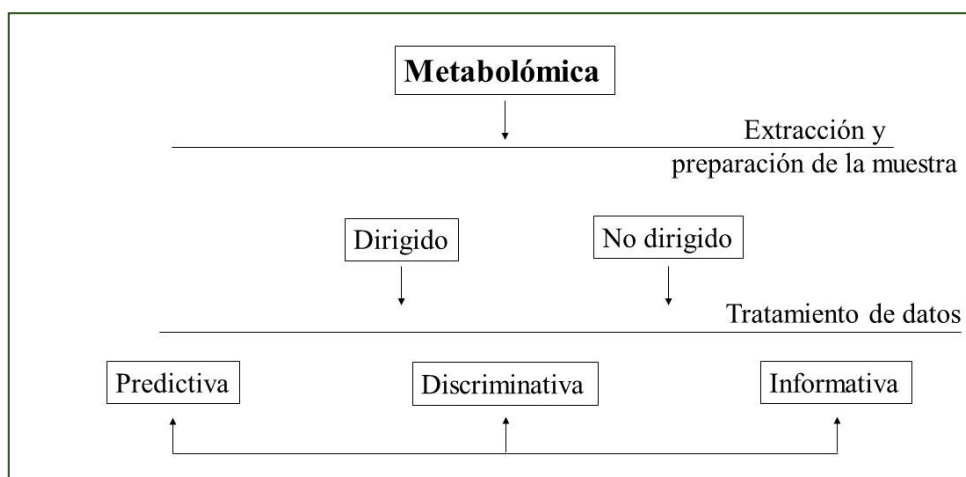
dietéticas, y esta información podría usarse para implementar nuevas estrategias para manipular la función celular a través de la dieta. Los estudios ómicos también puede revelar indicadores tempranos de una enfermedad y ayudar a diferenciar posibles efectos dietéticos dañinos para la salud y/o algún efecto beneficioso de algún componente bioactivo (Braconi *et al.*, 2018). La foodómica también puede ayudar al desarrollo de nutraceuticos y alimentos funcionales, ya que permite identificar componentes bioactivos que pueden ser responsables de efectos sobre la salud (Remely *et al.*, 2015). La integración de nuevas plataformas analíticas y sistemas de procesamiento de datos como la bioinformática han permitido el desarrollo de la foodómica, para estudiar los dominios de la alimentación y la nutrición a través de tecnologías ómicas avanzadas (Cifuentes, 2009). Esta disciplina ha evolucionado rápidamente, y en la actualidad los estudios relacionados con la foodómica permiten satisfacer las necesidades de los consumidores en cuanto a trazabilidad, sostenibilidad, calidad, seguridad e integridad de los alimentos, aportando pruebas sólidas de los mecanismos que apoyan los beneficios que brindan algunos alimentos para promover la salud o el bienestar (Braconi *et al.*, 2018). El metaboloma es como un "espejo" que si se mira a través de él, puede mostrar información sobre el estado fisiológico o el desarrollo patológico de un sistema biológico, y los metabolitos representan entidades funcionales (Ryan y Robards., 2006).

Para comprender el metabolismo de los alimentos y las biotransformaciones en el organismo humano es fundamental entender la interacción de la dieta con la salud, y para ello la metabolómica revela los productos finales de la expresión génica y proteica (Baharum y Azizan., 2018) y permite detectar y medir cambios en los perfiles y concentraciones de metabolitos de bajo peso molecular a nivel celular, en tejidos y fluidos corporales como plasma, orina y en leche humana, en respuesta a una condición genética, fisiológica o patológica determinada (Rangel-Huerta *et al.*, 2015). También permite la identificación de moléculas derivadas de ciertos componentes de los alimentos que confirman su ingesta y permiten identificar moléculas bioactivas responsables de actividades específicas asociadas a ciertos alimentos (Gibney *et al.*, 2005; Rangel-Huerta *et al.*, 2015). En este sentido, se puede decir que el "metaboloma alimentario" es la suma de todos los metabolitos derivados directamente de la digestión de los alimentos, su absorción en el intestino y su biotransformación por los tejidos y la microbiota del huésped, y cuyas concentraciones en plasma y orina generalmente aumentan en proporción a la cantidad de cada alimento o nutriente ingerido (Fardet *et al.*, 2008; Manach *et al.*, 2009). Por su naturaleza, la metabolómica representa una fuente muy grande de información, en gran parte sin explorar aún, que podría identificar nuevos biomarcadores de ingesta útiles para medir las exposiciones dietéticas con un alto nivel de detalle y precisión, lo que representa una ventaja ya que la mayoría de los biomarcadores dietéticos conocidos

actualmente se han identificado con enfoques basados en hipótesis y en función de la composición de los alimentos (Fiehn, 2001). Sin embargo, la rápida evolución de las técnicas analíticas que han permitido el desarrollo de instrumentos analíticos modernos altamente sensibles, junto con la cuidadosa elección de los protocolos para la preparación de muestras, la disponibilidad de bases de datos de metabolitos y el gran progreso en herramientas bioinformáticas están permitiendo identificar y cuantificar simultáneamente varias clases de compuestos químicamente diferentes (Fiehn, 2001) y permiten que los enfoques diagnósticos sean más precisos, como lo demuestra la reciente identificación de nuevos biomarcadores de ingesta de frutas, verduras, bebidas, carnes o algún tipo de dieta en particular (Scalbert *et al.*, 2014). La identificación de metabolitos es bastante extensa y diversa, y resulta de mucha utilidad para analizar sistemas dinámicos sometidos a influencias dietéticas y ambientales (Dettmer y Hammock., 2004).

Debido a las diferencias químicas de los compuestos del metaboloma, no existe una sola técnica analítica que sea la más adecuada para la identificación y cuantificación precisa y exacta de todos los metabolitos de interés. Pero independientemente de la configuración analítica, los estudios de metabolómica se pueden dividir en dos diferentes enfoques: estudios de metabolómica dirigida y no dirigidos (Figura 9), según la etapa en la que se realiza la identificación del metabolito durante el procesamiento de datos (Griffiths *et al.*, 2010).

La metabolómica dirigida se centra en la identificación de un grupo específico de metabolitos previstos (Ramautar *et al.*, 2006). Los análisis dirigidos son importantes para evaluar el comportamiento de un grupo específico de compuestos en la muestra en determinadas condiciones, y este enfoque generalmente requiere un mayor nivel de purificación y una extracción selectiva de metabolitos que dependerá de la naturaleza química de los mismos (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009). Por otra parte, la metabolómica no dirigida se utiliza para el análisis del metaboloma global, es decir, el análisis integral de todos los analitos medibles en una muestra, incluida para la identificación de analitos de señales desconocidas, y debe acoplarse a métodos quimiométricos para comprimir los datos en un pequeño conjunto de señales (Griffiths *et al.*, 2010). Estos análisis no dirigidos se centran en la detección de tantos grupos de metabolitos como sea posible para obtener patrones o huellas metabolómicas (Monton y Soga., 2007). Normalmente se utiliza para identificar enfermedades o plagas en plantas comestibles (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009).



**Figura 9.** Clasificación general de metabolómica (adaptado de Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios metabolómicos, también pueden clasificarse como discriminativos, informativos y/o predictivos en función del tratamiento de los datos (Figura 9). Recientemente, la combinación de estas tres clasificaciones se ha utilizado para mejorar la calidad de los análisis de componentes alimentarios (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009). Los análisis discriminativos, tienen como objetivo encontrar diferencias entre las poblaciones de muestras sin necesariamente crear modelos estadísticos o evaluar posibles vías que puedan dilucidar tales diferencias. La discriminación se logra generalmente mediante el uso de técnicas de análisis de datos multivariantes destinadas a maximizar la clasificación, siendo el análisis de componentes principales la herramienta más utilizada (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009). Por el contrario, la metabolómica informativa, se ha centrado en la identificación y cuantificación de metabolitos dirigidos o no dirigidos para obtener información intrínseca de la muestra. Se utiliza en el desarrollo y actualización continua de bases de datos de metabolitos (Wishart *et al.*, 2013), como la base de datos de metaboloma humano (HMDB), de libre acceso que contiene información detallada sobre los metabolitos de moléculas pequeñas que se encuentran en el cuerpo humano, y que puede ser utilizada para aplicaciones en metabolómica, química clínica, descubrimiento de biomarcadores y educación general. La base de datos está diseñada para contener o vincular tres tipos de datos químicos, clínicos y de biología molecular y bioquímica (Metabolome, 2022). La metabolómica informativa, también puede llevar a cabo posibles vías de descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos y de biomarcadores, la creación de bases de datos especializadas de metabolitos y estudios de funcionalidad de los mismos. Por otra parte, en la metabolómica predictiva se crean modelos estadísticos basados en el perfil y cantidad de metabolitos, para predecir una variable que es difícil de cuantificar por otros medios. Estos

modelos generalmente se producen mediante análisis estadísticos complejos, por ejemplo, la regresión de mínimos cuadrados parciales (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

### ***Métodos analíticos para la extracción de metabolitos***

En general, las técnicas analíticas utilizadas para la extracción de metabolitos dependen del tipo de muestra que puede ser de alimentos o muestras biológicas, y actualmente la herramienta más utilizada para la exploración de los metabolitos por su alta sensibilidad, disponibilidad y cobertura del metaboloma es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), (Baharum y Azizan., 2018; Lioupi *et al.*, 2020). Se han aplicado con éxito una gran cantidad de métodos analíticos basados en LC-MS analizando muestras complejas de varios orígenes para identificar huellas metabolómicas. En los últimos años, la LC-MS ha demostrado su enorme potencial en estudios metabolómicos debido al requisito mínimo de pretratamiento de muestras y a la capacidad de analizar muestras en su estado natural (Aszyk *et al.*, 2018).

Otras técnicas analíticas son la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) acoplada a la espectrometría de masas. Estas técnicas analíticas e instrumentos tienen un alto rendimiento y desempeñan un papel importante y crucial en la metabolómica para generar los datos metabolómicos (Baharum y Azizan., 2018). El GC-MS es la técnica analítica más efectiva para la evaluación más detallada de fracciones volátiles en investigaciones de muestras de alimentos (Lioupi *et al.*, 2020; Magagna *et al.*, 2016). La RMN se ha utilizado para realizar estudios metabólicos, perfiles metabólicos y metabolómica en biofluidos y tejidos humanos durante más de 40 años. Se caracteriza por altos niveles de robustez y reproducibilidad, estabilidad del instrumento, fácil preparación de muestras, fuerte carácter cuantitativo, y fácil automatización. Sin embargo, tiene algunas limitaciones ya que es un instrumento de gran tamaño y su mantenimiento es muy costoso (Lioupi *et al.*, 2020; Magagna *et al.*, 2016).

### ***Utilidades y enfoques del análisis metabolómico en aceite de oliva virgen***

En general, las aplicaciones de la metabolómica al estudio del AOV se centran en el control de calidad y autenticidad para el análisis de seguridad alimentaria, es decir, la detección de adulteraciones con aceites vegetales o cualquier modificación de la calidad del AOV. Dado que el AOV es una grasa considerada saludable y con propiedades beneficiosas por sus componentes fenólicos, se considera un producto de alto valor, por lo que puede sufrir numerosos fenómenos de fraude y adulteración. El estudio de la composición metabolómica se ha utilizado ampliamente para

identificar marcadores de calidad y autenticidad (Nikou *et al.*, 2020) como los fitoesteroles, compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos típicos de este aceite. El uso de LC-MS ha sido ampliamente utilizado para la cuantificación de polifenoles y esteroides que se han cuantificado según subclases químicas, y se ha podido identificar una gran diversidad de polifenoles y esteroides, detectándose un promedio de 1000-2000 mg de esteroides/kg y 420.2 mg de tirosol/kg de aceite. Del mismo modo, es posible identificar los marcadores para discriminar muestras de AOVE según su origen geográfico (ácidos hidroxibenzoicos, colesterol y derivados del estigmasterol), mostrando el potencial de las huellas metabolómicas esterólicas y fenólicas para evaluar la autenticidad del AOVE (Mohamed *et al.*, 2018). Por otro lado, nos permite analizar la seguridad del aceite, es decir, la detección de metabolitos residuales de plaguicidas (Lioupi *et al.*, 2020; Magagna *et al.*, 2016). Pero también tiene otras aplicaciones como la investigación agrotecnológica e industrial, con el fin de mejorar los cultivos, y cada vez más en investigaciones relacionadas con la salud y la nutrición que actualmente son áreas muy demandadas (Olmo-García y Carrasco-Pancorbo., 2021).

Concretamente se han encontrado alrededor de 30 compuestos presentes en los diferentes tipos de olivos (Arbequina, Picual, Cornicabra, Hojiblanca y Frantoio) que se pueden agrupar en cuatro familias químicas diferentes: 1) fenoles simples, que incluyen hidroxitirosol, hidroxiacetato, hidroxitirosol oxidado y tirosol; 2) lignanos representados por pinosresinol, acetoxipinosresinol y siringaresinol; 3) los flavonoides, siendo la luteolina y la apigenina los metabolitos más importantes de esta familia; y 4) los secoiridoides, con más de 20 compuestos pertenecientes a esta clase química, lo que lo convierte en el grupo de fenoles más abundante identificados en los perfiles por LC-MS (Bajoub *et al.*, 2016).

Por otra parte, recientemente se ha validado un método de LC-MS para la determinación de ácidos triterpénicos y dialcoholes. Los dos compuestos triterpénicos más abundantes encontrados en AOV son el ácido maslínico y el oleanólico, además de ácido betulínico, ursólico, eritrodil y uvaol en menor proporción (Olmo-García *et al.*, 2018).

### ***Metabolómica del aceite de oliva virgen y relación con la salud y nutrición***

La identificación de metabolitos específicos contenidos en el AOV que pueden prevenir o tratar enfermedades y la investigación de sus mecanismos moleculares son una base fuertemente sustentada por los estudios metabolómicos (Olmo-García y Carrasco-Pancorbo., 2021). Estudios previos de metabolómica en humanos han demostrado la presencia de determinados metabolitos individuales asociados con el consumo de AOV y algunos alimentos característicos de la dieta mediterránea como pescado, nueces y verduras. Los hallazgos sugirieron que una mayor adherencia

a la dieta mediterránea puede conducir a cambios profundos en el metaboloma que se asocian con una salud cardiometabólica favorable (Li *et al.*, 2020).

Estudios metabolómicos en humanos en diferentes subcohortes del estudio PREDIMED han evaluado el efecto beneficioso del AOV dentro del contexto de la dieta mediterránea. Lo más sobresaliente de este estudio fue la asociación positiva entre los niveles basales de concentraciones de ceramidas plasmáticas (un miembro de la familia de los esfingolípidos) y la incidencia de ECV, y cómo una intervención con dieta mediterránea podría disminuir sus concentraciones en plasma, lo que estaría relacionado con una menor incidencia de ECV (Wang *et al.*, 2017). Otros estudios de metabolómica tanto en humanos como en modelos animales han demostrado la presencia en plasma de determinados compuestos relacionados con el consumo de AOV como los compuestos fenólicos (Agrawal *et al.*, 2017; Fernández-Arroyo *et al.*, 2012). Sin embargo, no hemos podido encontrar estudios sobre ácidos triterpénicos.

Estos estudios han demostrado que los compuestos del AOV exhiben cierta protección frente al síndrome metabólico. Un estudio experimental en un modelo de rata Wistar joven con síndrome metabólico inducido por dieta a las que se les administraba hidroxitirosol (20 mg/kg) encontró 31 metabolitos que se expresan diferencialmente entre el grupo tratado y su control, e identificó, mediante LC-MS en Orbitrap, 19 metabolitos característicos que pertenecen a vías metabólicas que se ven afectadas diferencialmente en ratas con síndrome metabólico. Estos autores demostraron que el hidroxitirosol disminuye la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, la biosíntesis de ácidos grasos y el metabolismo del ácido linoleico, retinol, esfingolípidos y ácido araquidónico, mientras que el metabolismo de los glicerolípidos es la principal vía metabólica regulada positivamente en el grupo tratado con hidroxitirosol (Lemonakis *et al.*, 2017). Los autores sugieren que la disminución de la regulación del metabolismo del ácido linoleico y del ácido araquidónico después de la administración de hidroxitirosol podría estar asociada con una biosíntesis reducida de prostaglandinas, sustancias que median la inflamación crónica de bajo nivel y están directamente asociadas con la obesidad abdominal. Además, los autores indican que la reducción de las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos en las ratas tratadas con hidroxitirosol se correlacionaba positivamente con un metabolismo eficiente debido a una menor resistencia a la insulina, y negativamente con la enfermedad del hígado graso no alcohólico, es decir, las células metabolizan eficientemente los ácidos grasos libres tras el tratamiento con hidroxitirosol, lo que conduce a una menor concentraciones plasmáticas de ácidos grasos (Lemonakis *et al.*, 2017). Por otro lado, estos autores revelaron que el metabolismo del retinol se reduce por la actividad del hidroxitirosol, afectando de forma crucial el desarrollo de enfermedades como la disfunción



pancreática, la resistencia a la insulina y el metabolismo de los lípidos. Las concentraciones plasmáticas elevadas de glicerol en ratas tratadas con hidroxitirosol es una indicación de una tasa más alta de lipólisis en el tejido adiposo, lo que a su vez indica una tasa más alta de producción de energía a través de la lipólisis. Por otro lado, el hidroxitirosol ayudó a normalizar las concentraciones de esfingolípidos circulantes, lo que indica una mayor eficiencia de la movilización de los lípidos en plasma después del tratamiento con hidroxitirosol (Lemonakis *et al.*, 2017). En general, los autores concluyen que el hidroxitirosol induce cambios importantes en el metaboloma, ya que facilita la movilización de varias clases de lípidos, y en particular los ésteres de ácidos grasos de ácidos hidroxioleicos (OAHSA) se regulan positivamente en ratas tratadas con hidroxitirosol, lo que denota alivio en los factores de riesgo de síndrome metabólico (Dagla *et al.*, 2018; Lemonakis *et al.*, 2017).

## ***Hipótesis y objetivos***

### ***Justificación e hipótesis***

A partir de diversos estudios que evidencian las propiedades cardioprotectoras, antioxidantes, antiinflamatorias y protectoras del daño vascular del AOV (Covas *et al.*, 2006; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2007; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009; Toledo *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2016; Storniolo *et al.*, 2017; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018; George *et al.*, 2019; Yubero-Serrano *et al.*, 2019b), se puede afirmar que los compuestos fenólicos del AOV modulan la tensión arterial y el estado oxidativo, y que los ácidos triterpénicos pueden contribuir a mejorar el daño endotelial y la resistencia a la insulina, contribuyendo a mejorar el riesgo de síndrome metabólico. No obstante, se necesitan más estudios en situaciones patológicas específicas, relacionadas con el síndrome metabólico y en las que aumenta el estrés oxidativo. Además, las ciencias ómicas nos permiten identificar y medir moléculas derivadas de determinados componentes alimentarios responsables de actividades concretas asociadas a alimentos en respuesta en alguna condición genética, fisiológica o patológica (Gibney *et al.*, 2005; Rangel-Huerta *et al.*, 2015).

La hipótesis de la presente Tesis Doctoral es que la suplementación con AOV enriquecido en compuestos bioactivos procedentes de la propia aceituna puede ser beneficiosa frente a la HTA y factores de riesgo cardiovascular, como el estrés oxidativo y la inflamación. Así mismo, podrían aportar beneficios adicionales comparado con un AOV sin enriquecer sobre el control glucémico posprandial y la respuesta a la insulina.

El análisis metabolómico permitirá identificar metabolitos relacionados con el consumo de AOV y biomarcadores plasmáticos que pueden ayudar a establecer conclusiones sobre posibles mecanismos de acción por los que los componentes bioactivos del AOV enriquecido puedan ejercer efectos beneficiosos para la salud.

### ***Objetivo general***

Evaluar las propiedades beneficiosas del aceite de oliva virgen extra (AOVE) con extractos ricos en compuestos de alto valor biológico procedentes de la propia aceituna sobre la salud cardiometabólica.

**Objetivos específicos**

***“Evaluación del efecto de un aceite de oliva virgen extra enriquecido con extractos procedentes de las aceitunas en un modelo experimental de ratas con hipertensión genética”***

***Proyecto CARDIOLIVE.***

1. Evaluar el efecto de la ingesta de un AOV enriquecido en compuestos bioactivos sobre la evolución de la tensión arterial.
2. Evaluar el efecto de la ingesta de un AOV enriquecido en compuestos bioactivos sobre biomarcadores de funcionalidad vascular en plasma y orina.
3. Evaluar el efecto de la ingesta de un AOV enriquecido en compuestos bioactivos sobre los mecanismos moleculares que regulan la disfunción endotelial *in vitro*.
4. Evaluar el efecto de la ingesta de un AOV enriquecido en compuestos bioactivos sobre biomarcadores de daño oxidativo en orina.
5. Evaluar el efecto de la ingesta de un AOV enriquecido en compuestos bioactivos sobre biomarcadores de inflamación en plasma.
6. Análisis metabolómico para la identificación de biomarcadores plasmáticos y de orina relacionados con el consumo de AOV.

***“Evaluación del efecto de tres aceites de oliva virgen extra con distintas cantidades de compuestos bioactivos, polifenoles y ácidos triterpénicos procedentes de las aceitunas en humanos sanos con riesgo de síndrome metabólico” Proyecto NUTRAOLEUM.***

1. Evaluar el efecto de la ingesta de los aceites enriquecidos en compuestos bioactivos sobre la respuesta glucémica posprandial.
2. Evaluar el efecto de la ingesta de los aceites enriquecidos en compuestos bioactivos sobre la respuesta insulínica posprandial.
3. Evaluar el efecto de la ingesta de los aceites enriquecidos en compuestos bioactivos sobre secreción posprandial de hormonas gastrointestinales implicadas en la regulación del apetito y la ingesta.

## MATERIALES Y MÉTODOS





## *Materiales y métodos*

### **ESTUDIO CARDIOLIVE**

El estudio CARDIOLIVE es un estudio experimental en un modelo animal de ratas con hipertensión arterial genética. Fue un estudio paralelo, en el que se administraron durante 8 semanas dos aceites de oliva, uno enriquecido con distintos extractos obtenidos del propio aceite y de las hojas de olivo, y otro AOVE control que contenía poca cantidad de compuestos bioactivos. Se evaluó el efecto de la suplementación con los aceites sobre la hipertensión arterial, biomarcadores de riesgo oxidativo e inflamatorio y posteriormente se llevó a cabo un análisis metabólico en plasma y orina para identificar compuestos procedentes de los aceites que pudieran ser responsables de los efectos observados.

### ***Aceites experimentales***

Los AOVE se prepararon específicamente para el estudio en la Cooperativa San Francisco de Asís de Montefrío, Granada, España. Como aceite de base, se seleccionó un AOVE con elevadas cantidades de compuestos fenólicos obtenido mediante la mezcla de distintas variedades de aceitunas ricos en estos compuestos. Parte de este AOVE se enriqueció selectivamente con tres extractos diferentes obtenidos del aceite de oliva y de las hojas de olivo para preparar el aceite enriquecido (AOE). En la Tabla 4, se muestran los extractos fueron seleccionados en base a las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticoagulantes y vasoactivas evaluadas en un ensayo previo *in vitro* (Hernández *et al.*, 2021).

**Tabla 4.** Extractos fenólicos utilizados en la elaboración del aceite enriquecido

	<b>Extracto fenólico 1</b>	<b>Extracto fenólico 2</b>	<b>Extracto fenólico 3</b>
Composición	76% de 3,4-dihidroxifenil glicol, 10% de hidroxitirosol, 5% de luteolina-7glucósido, 3% de ácido clorogénico y 2% de vanilina	95% de hidroxitirosol y 5% de tirosol	70 % oleuropeína, 7,5% de vanilina, 5% de luteolina-7-glucósido, 4,5% de ácido ferúlico y 2% de verbascósido
Procedimiento de obtención	Patente PCT/ES2012/070491 (Fernández-Bolaños <i>et al.</i> , 2013)	Patente PCT/ES2002/00058 (Fernández-Bolaños <i>et al.</i> , 2002)	Fraccionamiento cromatográfico mediante una resina AmberChrom™ CG161M (en proceso de obtención de patente)
Concentración del extracto	6 g/L	6 g/L	2 g/L

La composición del extracto está referida a la molécula principal

Los extractos fenólicos se prepararon inicialmente a unas concentraciones de entre 2 y 6 g/L de la molécula principal (3,4-dihidroxifenil glicol, hidroxitirosol y oleuropeína para los extractos 1, 2 y 3, respectivamente). Posteriormente, se concentraron hasta 80 g/L, concentración a la cual estos extractos se disolvieron en el AOVE base para preparar el AOE. El AOE fue analizado por triplicado. Para preparar el aceite control (AOC), parte del AOVE seleccionado como base se lavó con etanol alimentario para reducir el contenido de compuestos fenólicos hasta 17.6 mg/kg de aceite, de manera que los dos aceites experimentales tenían el mismo perfil de ácidos grasos y sólo se diferenciaron en el contenido de compuestos bioactivos. La Tabla 5 muestra las características fisicoquímicas y la composición lipídica de los aceites utilizados en el estudio CARDIOLIVE.

**Tabla 5.** Características físicoquímicas y composición lipídica de los aceites de oliva utilizados en el estudio CARDIOLIVE

<b>Características</b>	<b>AOC</b>	<b>AOE</b>
Acidez (%)	0.14	0.14
Índice de peróxidos (meq/kg)	5.3	9.5
K270	0.14	0.15
K232	1.79	1.85
Delta K	<0.01	<0.01
<b>Principales ácidos grasos</b>		
Ácido palmítico (C16) (%)	10.12	10.09
Ácido esteárico (C18) (%)	3.81	3.79
Ácido oleico (C18:1) (%)	79.71	79.87
Ácido linoleico (C18:2n6) (%)	3.95	3.91
Ésteres etílicos totales (mg/kg)	7	13
Esteroles totales (mg/kg)	1316	1328

Cada resultado es el valor medio de tres repeticiones independientes. Los valores de desviación estándar relativa fueron inferiores al 8.4% en todos los casos. AOC, aceite de control. AOE, aceite de oliva enriquecido.

Las Tablas 6 y 7 muestran los compuestos fenólicos y los ácidos triterpénicos presentes en los aceites utilizados en el estudio, respectivamente. Los aceites se prepararon y congelaron en alícuotas para cada día, de modo que el aceite congelado estaba preservado de la oxidación.

**Tabla 6.** Composición en compuestos fenólicos de los aceites de oliva utilizados en el estudio CARDIOLIVE

	<b>AOC</b>	<b>AOE</b>
Ácido quínico*	n.d.	92.3
3,4-dihidroxifenilglicol	n.d.	26.3
Ácido clorogénico	n.d.	22.2
Ácido p-cumárico*	n.d.	3.0
Vanilina*	n.d.	0.32
Ácido ferúlico*	n.d.	0.80
<b>Ácidos orgánicos y fenólicos y aldehídos</b>	<b>n.d.</b>	<b>144.9</b>
Hidroxitirosol*	n.d.	110.0
Tirosol*	0.15	69.0
<b>Fenoles simples</b>	<b>0.15</b>	<b>179.0</b>
Hexósido de ácido aciclodihidroelenólico	n.d.	21.0
Oleósido/secologanósido	n.d.	103.2
Glucósido de ácido elenólico	n.d.	31.9
Hidroxioluropeína	n.d.	32.3
Oleuropeína*	n.d.	16.4
<b>Secoiridoides glicosilados y derivados</b>	<b>n.d.</b>	<b>204.8</b>
Ácido elenólico	0.01	2.6
Hidroxidecarboximetil oleuropeína aglicona	n.d.	4.7
Descarboximetiloleuropeína aglicona	1.3	8.2
10-hidroxi-oleuropeína aglicona	0.11	0.3
Decarboximetil ligstrósido aglicona	2.4	6.3
Ligstrósido aglicona	6.1	2.2
Oleuropeína aglicona	7.1	58.5
<b>Secoiridoides y derivados en forma de aglicona</b>	<b>17.0</b>	<b>82.9</b>
Luteolin-7-O-glucósido*	n.d.	4.6
Isómeros de luteolina-O-glucósido	n.d.	12.3
Apigenina-7-O-glucósido*	n.d.	1.7
Isómeros de apigenina-O-glucósido	n.d.	3.6
Luteolina*	0.03	14.5
Apigenina*	0.04	1.6
Diosmetina	0.03	2.5
<b>Flavonoides</b>	<b>0.1</b>	<b>40.9</b>
Jeringaresinol	0.10	1.8
Pinoresinol*	0.11	2.5
Acetoxipinoresinol	0.10	2.8
<b>Lignanós</b>	<b>0.31</b>	<b>7.1</b>
<b>TOTAL</b>	<b>17.6</b>	<b>749.9</b>

\*Compuestos fenólicos cuantificados en términos de su estándar puro. Cada resultado (expresado en mg/kg de aceite de oliva) es el valor medio de tres réplicas independientes. Los valores de desviación estándar relativa fueron inferiores al 8.4 % en todos los casos. AOC, aceite de oliva control; AOE, aceite de oliva enriquecido; n.d, no detectado.



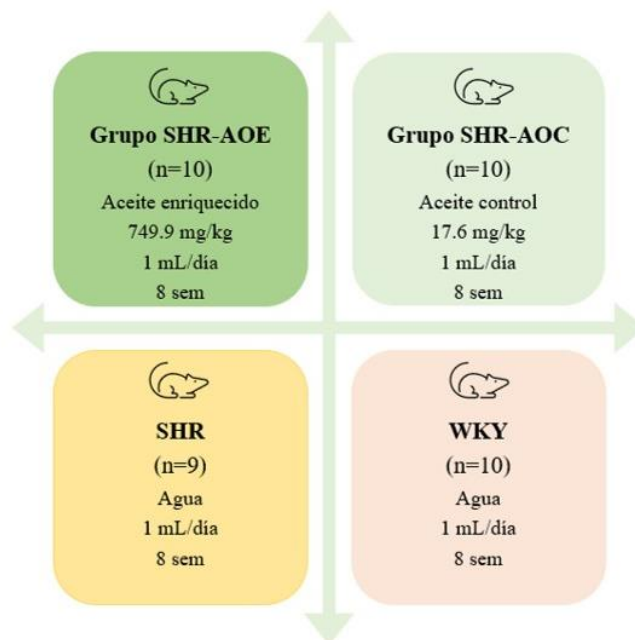
**Tabla 7.** Composición inicial en ácidos triterpénicos de los aceites de oliva administrados en el estudio CARDIOLIVE

	<b>AOC</b>	<b>AOE</b>
Ácido maslínico, mg/kg	4.3	138.4
Ácido betulínico, mg/kg	0.06	5.6
Ácido oleanólico, mg/kg	4.2	148.5
<b>Ácidos triterpénicos totales (mg/kg)</b>	<b>8.5</b>	<b>292.6</b>

Cada resultado es el valor medio de tres réplicas independientes. Los valores de desviación estándar relativa fueron inferiores al 8.4 % en todos los casos. AOC, aceite de oliva control; AOE, aceite de oliva enriquecido.

### *Diseño Experimental estudio CARDIOLIVE*

Treinta ratas genéticamente hipertensas SHR de ocho semanas de edad fueron divididas en tres grupos experimentales ( $n=10$ ). Un grupo de ratas fue suplementado diariamente con 1 mL del AOE, enriquecido en compuestos bioactivos (grupo SHR-AOE). El segundo grupo de ratas hipertensas fue suplementado diariamente con 1 mL del aceite control (grupo SHR-AOC). El tercer grupo de ratas SHR recibió 1 mL/d de agua y sirvió como grupo control enfermo (SHR). Además, como controles normotensos se incluyeron 10 ratas macho Wistar Kyoto sanas (grupo WKY) de la misma edad, que recibieron 1 mL/d de agua (Figura 10). Los animales fueron adquiridos en Janvier Labs, CEDEX, Francia.



**Figura 10.** Grupos experimentales CARDIOLIVE

Tras un periodo de cinco días de aclimatación a las condiciones experimentales, se comenzó el periodo de tratamiento que duró 8 semanas, durante las que se administraron diariamente los aceites y el agua mediante una sonda orogástrica rígida que depositaba directamente el aceite o el

agua en el estómago. Todas las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua. Los animales fueron alimentados con una dieta de mantenimiento estándar (Panlab), con 76.2% de carbohidratos (fibra 3.9%), 3.1% de lípidos, 16.1% de proteína y 4.6% de cenizas minerales. El experimento se realizó de acuerdo con las directrices indicadas en las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea para el cuidado ético de los animales (86/609/CEE) y fue aprobado por el Comité Ético de animales de laboratorio de la Universidad de Granada, España (permiso número 18/07/2017/099). Para evaluar la biodisponibilidad del AOE, al inicio del estudio las ratas SHR fueron introducidas en jaulas metabólicas (Panlab, Barcelona, España) para la recogida de orina de 24 h. Trascurridas las 24 h, se les administró 1 mL de AOE mediante sonda orogástrica rígida y se recogió orina durante distintos periodos de tiempo: de 0-5 h, de 5-10 h y de 10-24 h. Posteriormente, se determinó la presencia de compuestos bioactivos en estas muestras de orina en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Biomédicas del Hospital del Mar (IMIM, Barcelona, España). El mismo protocolo se realizó en las 10 ratas WKY sanas que reciben 1 mL de agua. De la misma manera cada dos semanas y al final de las 8 semanas de intervención, las ratas fueron introducidas en jaulas metabólicas para recoger la orina de 24 h. De esta manera se pudo evaluar los efectos a largo plazo de la suplementación sin que interfiriera con los efectos agudos provocados tras la administración. Durante el transcurso del experimento se determinó semanalmente la tensión arterial, el peso corporal, el consumo de alimento, el consumo de agua y la diuresis (Figura 11).

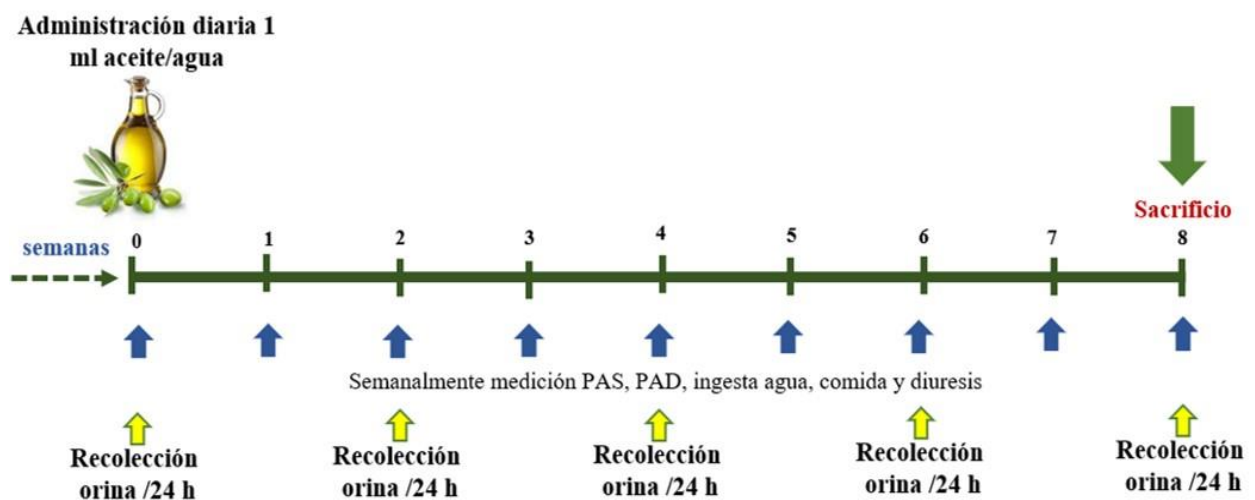


Figura 11. Diseño experimental del estudio CARDIOLIVE

### ***Sacrificio y preparación de las muestras***

Tras 8 semanas de intervención, las ratas en ayunas fueron anestesiadas con 2.5 mL/kg de equitensina mediante punción aórtica abdominal en dos fases, mediante la técnica del biselado que permite una extracción fraccionada, para determinar las variables plasmáticas que requieren una extracción sin hemorragia. Inicialmente se extrajo 1 mL de sangre para medir las concentraciones plasmáticas de angiotensina II. Este procedimiento permite una medición precisa de este péptido, sin la activación del sistema renina-angiotensina debido a la hemorragia. Posteriormente se procedió a la extracción del resto de la sangre que se utilizó para medir las otras variables plasmáticas, que no se ven afectadas por la hemorragia. La sangre se centrifugó a  $1750 \times g$  durante 10 min a 4°C. El plasma se alicuotó y se congeló inmediatamente a -80°C hasta su análisis. Por último, una vez exanguinadas las ratas fueron diseccionadas y se extrajeron y pesaron los riñones, el corazón y la aorta torácica. El corazón se dividió en ventrículo derecho y ventrículo izquierdo más el tabique y se midió la longitud de la tibia para normalizar las variables morfológicas.

### ***Determinación de la presión arterial***

La PAS se midió semanalmente mediante pletismografía en la cola de la rata (Kubota *et al.*, 2006) en estado consciente (LE 5001-Medidor de presión, Letica SA, Barcelona, España). Se realizaron al menos siete determinaciones en cada sesión, y la media de los tres valores más bajos dentro de un rango de 5 mmHg fue el valor final de PAS.

### ***Análisis bioquímico de plasma***

Las variables determinadas en plasma fueron: electrolitos sodio y potasio; parámetros lipídicos: colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL; urea y creatinina. Estos análisis se realizaron utilizando un autoanalizador (Hitachi-912, Roche, Granada, España). La angiotensina II, la endotelina-1, la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se determinaron en plasma mediante los kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (CEA 005Ra, CEA482Ra, SEA079Ra, SEA133Mi, SEA143Ra, respectivamente, Corp, Katy, TX, EE. UU).

### ***Análisis bioquímico de orina***

Al final del período experimental, se recogió la orina de 24 horas y se midió el volumen, los electrolitos (sodio y potasio), la urea y la creatinina en un autoanalizador (Hitachi-912, Roche, Granada, España). La proteinuria se determinó utilizando un Kit de ensayo de proteínas (Bio-Rad, Madrid, España). El aclaramiento de creatinina y el balance de agua y sodio se calcularon en orina

de 24 horas. Los nitritos se determinaron en la orina mediante un kit colorimétrico (Cayman Chemicals Company, Ann Arbor, MI, EE. UU.).

Se utilizaron kits de ELISA para medir endotelina-1 como biomarcador de daño endotelial (CEA482RA, de Cloud Clone Corp, Katy, TX, EE. UU.), y F<sub>2</sub>-isoprostanos y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) como biomarcadores de estrés oxidativo en orina de 24 horas (EA85, de Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, MI, EE. UU., y JAI-KOG-200SE, de Bio-Connect BV Holanda, Países Bajos, respectivamente).

### ***Reactividad vascular en anillos aórticos***

Tras la extracción de la arteria aorta, los segmentos de anillos aórticos torácicos se montaron en una cámara de órganos que contenía solución de Krebs (NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM y glucosa 11 mM) a 37°C. Los segmentos fueron gaseados con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, y se mantuvo a una tensión de reposo de 2 g. Los anillos se estiraron hasta 2 g de tensión de reposo por medio de dos alambres de acero inoxidable en forma de L insertados en el lumen y unidos a la cámara y a un transductor de desplazamiento de fuerza isométrica (Letigraph 2000, Madrid, España) conectado a un sistema de adquisición de señal, como se describe en (Vera *et al.*, 2007).

Las curvas de respuesta de concentración-relajación a la acetilcolina (10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup>M) se analizaron en los anillos precontraídos a la misma tensión con fenilefrina (0.3 × 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-6</sup> M, en WKY y grupos SHR, respectivamente). Las curvas de respuesta de concentración-relajación al nitroprusiato (10<sup>-10</sup>-10<sup>-6</sup> M) se obtuvieron en anillos sin endotelio precontraídos a la misma tensión con fenilefrina y en oscuridad.

Las contracciones del endotelio dependientes de acetilcolina se analizaron en anillos aórticos inicialmente estimulados con KCl 80 mM. Después de lavar con solución de Krebs e incubar durante 30 min con éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME) (10<sup>-4</sup> M), se agregaron dosis crecientes de acetilcolina (10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup> M). Las respuestas contráctiles a la acetilcolina se expresaron como un porcentaje de la respuesta al KCl (Vera *et al.*, 2007).

### ***Análisis estadístico***

Todos los datos de las variables se presentan como los valores medios ± error estándar de la media (SEM). La normalidad de las variables se comprobó con las pruebas de Kolmogorov y Shapiro-Wilk. En todas las pruebas, se analizaron más del 95% de los datos. Se utilizó ANOVA de un factor para variables de distribución normal y Kruskal-Wallis para variables de distribución no normal. Para identificar la diferencia entre grupos, se utilizó la prueba *post hoc* de Bonferroni. Se

consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software Statistical Package for the Social Sciences versión 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU).

### ***Análisis metabolómico***

#### ***Preparación de las muestras para el análisis metabolómico***

Para el análisis metabolómico las muestras de plasma y orina se descongelaron en hielo y se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso analítico. Las muestras de plasma fueron desproteinizadas con una mezcla de precipitación que contenía acetonitrilo (MeCN), metanol (MeOH) y acetona (Ace) en proporciones 8:1:1. Se añadieron 200 µL de la mezcla de precipitación a 100 µL de plasma, se agitaron durante 30 s y se incubaron a -20°C durante 30 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 14800 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se evaporaron en una centrífuga evaporadora Eppendorf® Concentrator Plus durante 2 h. Las muestras se reconstituyeron en 100 µL de una dilución de ácido fórmico al 0.1% en H<sub>2</sub>O. Se mezclaron durante 20 s en un vórtex y se incubaron en baño de hielo durante 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a 14800 rpm durante 10 min a 4°C. Finalmente, 40 µL del sobrenadante fueron transferidos a un vial de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con inserto, donde se añadieron 5 µL del estándar interno y se almacenaron a -80°C hasta el análisis (Liu *et al.*, 2015; Lui *et al.*, 2017).

Para el análisis metabolómico de las muestras de orina es necesario medir la osmolaridad y ajustarla en todas por igual, lo que permite trabajar en todas con las mismas condiciones como lo describe Ulaszewska *et al.*, (2019). Por ello, tras descongelar las muestras en hielo, se utilizó un osmómetro (Gonotec Osmomat 030 D Osmometer) para medir y ajustar la osmolaridad. Doscientos µL de orina fueron diluidas con agua miliQ hasta obtener una osmolaridad de 200 mOsm/kg  $\pm$  20 mOsm/kg. Posteriormente, se añadieron 100 µL de una dilución de ácido fórmico al 0.1% en H<sub>2</sub>O, las muestras se centrifugaron a 14800 rpm durante 10 min a 4°C, y 40 µL del sobrenadante se transfirieron a un vial de HPLC (con inserto), a los que se les añadió 5 µL del estándar interno. Las muestras preparadas se almacenaron a -80°C hasta el análisis.

En paralelo, se prepararon unas muestras denominadas quality control (QC, por sus siglas en inglés) agrupando volúmenes iguales de todas las muestras de plasma u orina incluidas en este estudio.

### ***Extracción de metabolitos***

La separación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo de alta resolución Agilent Series 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) utilizando una columna cromatográfica C18 Waters Atlantis T3 (2,1 mm x 150 mm, 3  $\mu$ m) (Waters Corporation, Milford, MA, USA), la cual se mantuvo a una temperatura de 30°C en el horno. El volumen de muestra que se inyectó fue de 5  $\mu$ L. Las fases móviles que se emplearon para eluir la mezcla a través de la columna fueron ácido fórmico al 0.1 % en una mezcla de agua: MeCN (90:10), que se utilizó como eluyente A, y ácido fórmico al 0.1% en MeCN: agua (90:10), que se utilizó como eluyente B. La elución procedió a una velocidad de flujo constante de 0.3 mL/min. Durante el periodo de 0 a 0.5 min se utilizó eluyente A al 100%, seguido de una elución en gradiente lineal de 100 % de eluyente B de 0.5-11 min, que se mantuvo hasta los 15.50 min. Después, se continuó con el 100% del eluyente A desde 15.50-15.60 min y desde 15.60-20 min.

Para la detección de los analitos se utilizó un espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF-MS) AB SCIEX TripleTOF 5600. Las muestras fueron analizadas mediante los métodos de ionización por electropulverización (ESI) en modo positivo y negativo (AB SCIEX, Concord, ON, Canadá). Las fases estacionarias inversas (especialmente la columna C18) son ampliamente utilizadas para separaciones cromatográficas en el campo de la metabolómica, proporcionando una retención aceptable de compuestos apolares y de polaridad intermedia.

El Triple TOF 5600 usó una fuente Duo Spray con sondas separadas, una de ionización por ESI y otra de ionización química a presión atmosférica. La ESI se utilizó para analizar el perfil metabolómico de la muestra, mientras que la sonda de ionización química a presión atmosférica funcionó como el segundo calentador de gas y para calibrar las masas exactas en el QTOF-MS. Con respecto a la similitud de las respectivas fuentes de iones, se usaron ajustes de parámetros idénticos. Los parámetros de ESI fueron los siguientes:

Modo positivo:

- Tensión capilar de 5000 V
- Presión del gas nebulizador de 50 psi
- Presión del gas de secado de 50 psi
- Temperatura de 500°C
- Potencial de focalización de 100 V

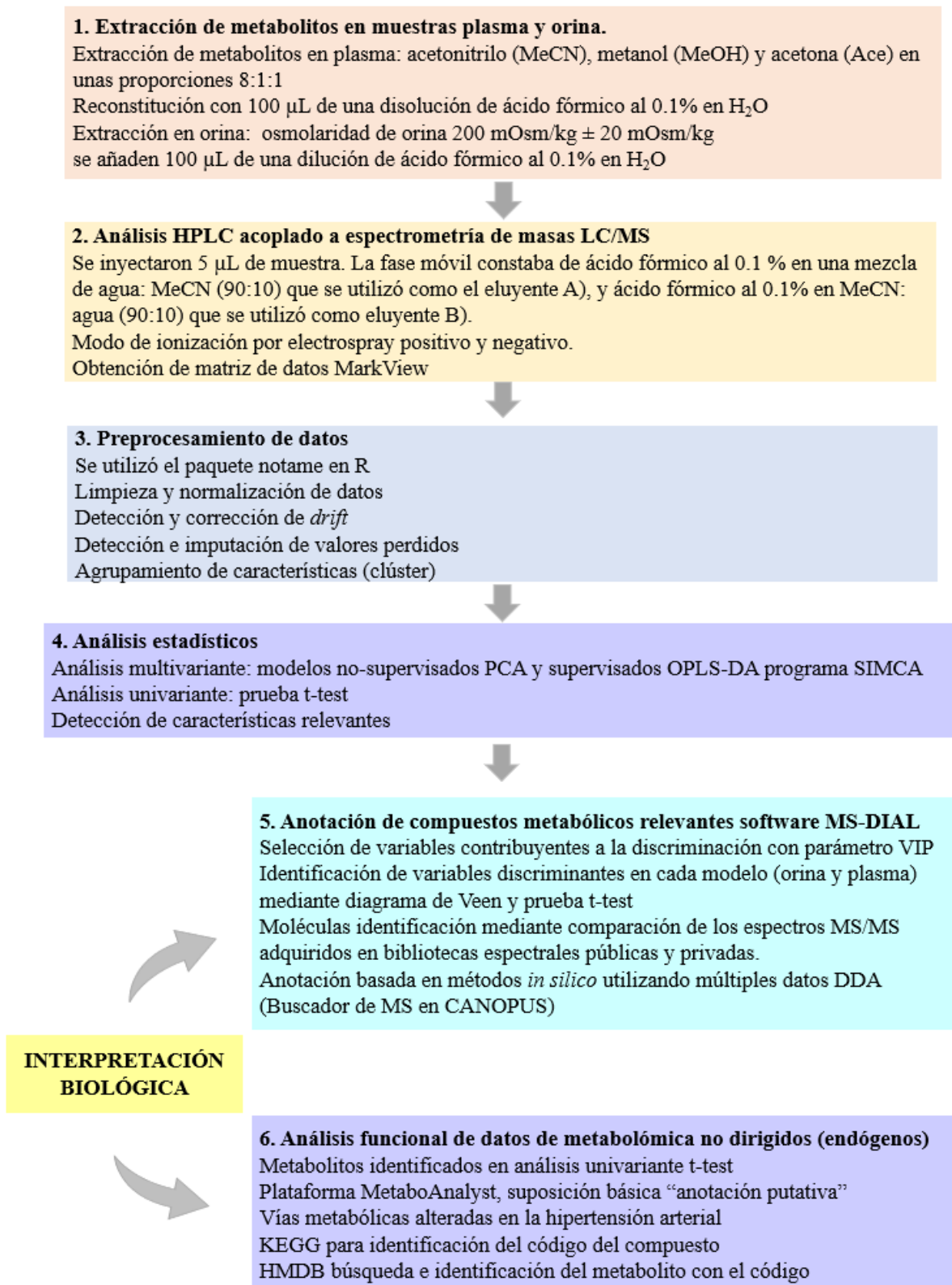
Modo negativo:

- Tensión capilar de -4500 V

- Presión del gas nebulizador de 50 psi
- Presión del gas de secado de 50 psi
- Temperatura de 500°C
- Potencial de focalización de 100 V

La secuencia de inyección de las muestras fue aleatoria para evitar posibles sesgos que puedan deberse a la inyección secuencial dentro de un mismo grupo en el perfil cromatográfico de HPLC-MS. Dentro de la ejecución de la secuencia, también se analizaron muestras QC y los blancos. Las muestras QC se analizaron cada cinco inyecciones para proporcionar una medida de la estabilidad y del rendimiento del sistema. Los blancos (contenían una dilución de ácido fórmico al 0.1% en H<sub>2</sub>O), se analizaron junto con las muestras de QC para identificar las impurezas de los disolventes o del procedimiento de extracción, y para comprobar la contaminación por arrastre de analitos.

Para depurar los datos obtenidos en el análisis cromatográfico, se utilizó el software Markerview con los siguientes parámetros de extracción: tiempo de retención (RT, por sus siglas en inglés) entre 1.20-15.00 minutos; sustracción offset 10 scans; sustracción Mult. factor 1.3; umbral ruido 50 cuentas por segundo (cps); mínima anchura de pico espectral 0.02 Da; mínima anchura de pico RT 4 scan; tolerancia de RT 0.12 minutos; tolerancia de masa 100.00 ppm; número requerido de muestras 6; número máximo de picos 5000. Tras poner los parámetros de extracción y de alineamiento en el software Markerview (matriz de datos) se hizo un filtrado de resultados anómalos haciendo uso de criterios adecuados y se obtuvo una matriz de datos que contenía información de masa, RT y áreas de pico de espacios de las muestras, los blancos y QC normalizados para cada una de las muestras de orina y plasma analizadas en modo positivo y negativo. En la Figura 12 se proporciona una descripción general del flujo de trabajo experimental, incluido el procesamiento de datos.



**Figura 12.** Flujo de trabajo del procesamiento de datos de metabolómica. Ace, acetona; HMDB, base de datos del metaboloma humano; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; KEGG pathway, plataforma online que contiene diferentes rutas que representan las redes de interacción, reacción y relación molecular del metabolismo; MeCN, acetonitrilo; MeOH, metanol; VIP, importancia de la variable en proyección.



### ***El pretratamiento de datos y control de calidad***

De la matriz de datos crudos obtenidos en el paso previo se extrajo otra matriz con los datos filtrados de RT, la relación masa-carga ( $m/z$ ) y las áreas de características metabólicas detectadas. Se calcularon las medidas alternativas no paramétricas de la desviación estándar relativa y el D-ratio (D-ratio, es parámetro indica relación de dispersión de las mediciones de las muestras) con un punto de corte de 0.2 y 0.4, respectivamente. En el caso de valores perdidos se realizó una imputación mediante el algoritmo Random Forest. Todos estos cálculos se realizaron utilizando el paquete *notame* en R (v0.0.900) (Klávus *et al.*, 2020).

Posteriormente, se evaluaron los datos para identificar el potencial *drift* (desvío de datos), que normalmente se observa en experimentos de LC/MS, que fueron corregidos por un modelado utilizando una regresión spline-cúbica basado en las muestras de QC, y luego corrigiendo la abundancia de todas las muestras al invertir el efecto modelado de los *drift*. Al eliminar el *drift* se aumenta la calidad de los datos de LC-MS y permite estimar los efectos biológicos reales con mayor precisión. Este proceso se desarrolló de forma independiente para cada característica, teniendo en cuenta que una característica suele ser un pico o una señal que representa una composición química determinada.

### ***Agrupamiento de características de los datos de metabolómica***

En estudios de metabolómica no dirigida, varias características pueden originarse a partir del mismo metabolito y, por lo tanto, se presupone que están altamente correlacionadas. Una característica suele ser un pico o una señal que representa una composición química determinada. Por lo tanto, hemos implementado el algoritmo de agrupamiento de características incluido en el paquete *notame* en R (Klávus *et al.*, 2020), en el flujo de trabajo de procesamiento de datos. Este algoritmo identifica pares de características correlacionadas dentro de una ventana de RT especificada (0.1 min) y un umbral de correlación de 0.90 para este estudio. La ventaja de utilizar este proceso no solo es que facilita la identificación de características correlacionadas (*clúster*), sino que también genera conjuntos de datos más limpios, lo que reduce la cantidad de ruido que puede perturbar la matriz de datos para un posterior análisis multivariante. Un *clúster* es una agrupación de características moleculares de cada modo analítico (+/-) que representan una variable que agrupa varias, pero que pueden tener pequeñas diferencias en cuanto a su  $m/z$  por estar ionizada, sin embargo, puede ser el mismo compuesto, un fragmento de este o un aducto.

### *Análisis multivariante*

Los datos se escalaron utilizando el método de Pareto, en el programa SIMCA (v16; Sartorius Stedim Biotech, Umeå, Suecia). Se realizaron análisis multivariantes para los que se han utilizado modelos no supervisados, como el análisis de componentes principales (PCA) y modelos supervisados de análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). El PCA se utilizó para evaluar la calidad de los datos metabolómicos en función de los QC, con el fin de detectar posibles valores atípicos e identificar patrones de agrupamiento. Los modelos OPLS-DA se construyeron para identificar patrones de metabolitos y las características específicas que discriminan entre los diferentes tiempos o métodos de procesamiento.

En el modelado OPLS-DA, es posible reagrupar los datos en información "predictiva" relacionada con la respuesta a  $Y$  (la  $Y$  representa la variable categórica) así como la información estructurada "ortogonal", es decir, que no está correlacionada con la respuesta y podría estar asociado con factores como la variación biológica. Los componentes predictivos y ortogonales se caracterizan por tipos respectivos de importancia variable en proyección (valor VIP), que ayudan a interpretar las variables más discriminantes del modelo; los valores por encima de 1 se consideran de interés (Chong y Jun, 2005), sin embargo, este valor puede cambiar considerando valores más elevados para ser más restrictivos.

En este modelo se aplicó una validación cruzada de siete rondas, y posteriormente se realizó una validación cruzada de los residuos mediante ANOVA (CV-ANOVA) para evaluar la confiabilidad de los modelos. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos.

Las variables más discriminantes en los modelos significativos se extrajeron comparando los valores  $p$  (corr), (un vector que representa la correlación, y por tanto la fiabilidad, de los datos en valores  $Y$ ) de cada modelo OPLS-DA. Este enfoque facilitó la extracción de metabolitos relevantes relacionados con un modelo específico, lo que permitió la identificación de características compartidas entre los dos modelos incluidos en una tendencia similar o inversa. Y  $p(1)$  es un vector que indica la covariación en cada modelo.

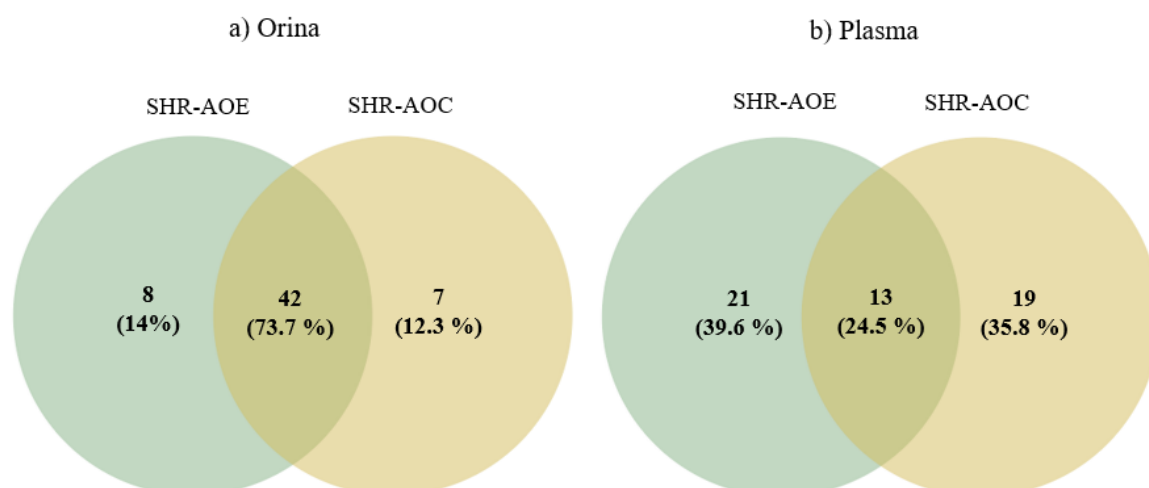
Para este propósito, se consideraron significativas aquellas variables que cumplieran la siguiente condición:  $p(\text{corr}) \geq |0.50|$  y  $p(1) \geq |0.05|$ . Este enfoque facilitó la extracción de metabolitos relevantes relacionados con un modelo específico, y permitió la identificación de características compartidas entre dos o más modelos con tendencias compartidas o inversas.

### ***Análisis Univariante***

Para el análisis univariante, se realizó una prueba *t*-test comparando cada par de datos generados en orina (SHR)/(WKY) y (SHR-AOE/SHR-AOC), y se utilizó un límite de proporción para identificar falsos positivos ( $p=0.05$ ) para corregir múltiples pruebas.

### ***Identificación y elucidación estructural de posibles metabolitos diana***

Tras elegir el modelo más significativo, se extrajeron las 50 variables (moléculas elegidas en cada modelo) más discriminantes de acuerdo con el valor VIP. Si el modelo era 1+1 o 1+2, se consideraron los valores VIP predictivos, si el modelo era 1+0 entonces se consideraron los VIP generales. El +1 o +2 indica el número de componentes ortogonales en el modelo, es decir que tienen peso en el modelo, pero están relacionados con factores distintos a los de la clase de estudio (la variable independiente: AOE y AOC). Posteriormente, con este listado de variables discriminantes se realizó un diagrama de Venn (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), con el propósito de identificar qué variables son únicas en cada modelo en las diferentes muestras de orina y plasma (Figura 13). De esta manera, para las muestras de orinas se identificaron 8 variables discriminantes que nos permitían diferenciar las muestras de los grupos SHR vs AOV, y 7 variables que permitían diferenciar las muestras de los grupos SHR vs AOC, quedando 42 metabolitos comunes en ambos grupos que no permitían la discriminación (Figura 13a). De la misma manera, para las muestras de plasmas se identificaron 21 variables discriminantes que nos permitían diferenciar las muestras de los grupos SHR vs AOV, y 19 variables que permitían diferenciar las muestras de los grupos SHR vs AOC, quedando 13 metabolitos comunes en ambos grupos que no permitían la discriminación (Figura 13b).



**Figura 13.** Diagrama de Venn de metabolitos diferenciales en muestras de orina (a) y plasma (b).

Posteriormente se realizó un listado de los compuestos de interés identificados mediante la prueba *t*-test univariante, utilizando el valor FDR (*false discovery rate*) que es el q-valor ajustado, y se seleccionaron las variables con un q-valor  $\leq 0.05$ . Se aplicó un filtrado por descartes para aquellos compuestos que no resultaron significativos, de esta manera se obtuvo un listado final de los compuestos, para posteriormente identificar datos de masa y RT de cada una de las variables y *clúster*. El clúster representa la agrupación de varios iones que pueden representar la misma molécula, ya sea con una carga diferente, un aducto diferente o fragmentos de la misma.

#### ***Anotación de características relevantes***

Las anotaciones, o identificación de los compuestos, se obtuvieron automáticamente en MS-DIAL haciendo coincidir los espectros de masas medidos con los repositorios de espectro MS/MS en bases de datos de acceso libre y comparando las precisiones de masa, RT y proporciones de isótopos (Tsugawa *et al.*, 2015), o seleccionándolos manualmente. Las puntuaciones de similitud espectral entre las características medidas y los metabolitos de referencia se determinaron en MS-DIAL utilizando los valores combinados del producto escalar y el producto escalar inverso, que se basan en las sumas relativas de las abundancias máximas y la proporción de fragmentos coincidentes. En el presente estudio, se ha fijado el límite para la identificación de metabolitos con una coincidencia de al menos 850 (el valor máximo de similitud espectral es 1000), y se seleccionaron las mejores coincidencias de aquellos metabolitos que podían referenciarse a una posible identificación con las bibliotecas.

### ***Análisis de enriquecimiento de conjuntos de metabolitos***

Para el análisis de enriquecimiento del conjunto de metabolitos en orina se empleó un análisis de representación implementado en la caja de herramientas de la plataforma MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>). De esta manera se comparan los metabolitos que han sido identificados en el análisis univariante al realizar un *t*-test entre cada par de datos, para lo que se utilizó el *p* valor generado en las muestras de orina de los animales pertenecientes al grupo de los controles, es decir aquellos que no recibieron aceite, considerándose el control positivo las ratas SHR enfermas, y el control negativo las ratas WKY sanas. Para este procedimiento se seleccionó el módulo de análisis funcional en la plataforma de MetaboAnalyst, que permite el análisis funcional de datos de metabolómica no dirigidos generados a partir de espectrometría de masas de alta resolución. La suposición básica es que la “anotación putativa” a nivel de compuesto individual puede predecir colectivamente cambios a niveles funcionales definidos por conjuntos o rutas de metabolitos. Esto se debe a que los cambios a nivel de grupo se basan en el "comportamiento colectivo", que es más tolerante a los errores aleatorios en la anotación compuesta para utilizar este enfoque, como lo demuestra (Li *et al.*, 2013). Los parámetros elegidos en modo mixto (positivo y negativo) fueron los siguientes: 1) precisión de masa del instrumento de 10 ppm; 2) RT en minutos que permitió encontrar un total de 1078 características de *m/z* (relación masa/carga) entre los datos cargados en el programa en 4 columnas que corresponden a *m/z*; 3) *p* valor; 4) RT y modo analítico positivo/negativo; y 5) se utilizaron algoritmos Mummichog, con valor de corte de  $p=0.001$  (picos predeterminados del 10% superior). Se seleccionó la vía KEGG *Rattus norvegicus* (rata) [KEGG] para estos análisis. Posteriormente, se accedió a KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) utilizando los códigos de los compuestos previamente identificados en MetaboAnalyst y, aplicando el filtro de conjuntos de metabolitos asociados a la ruta, se buscaron los compuestos químicos identificados en este análisis. Finalmente, en la plataforma HMDB (<https://hmdb.ca/>) se realizó la búsqueda e identificación con el código del compuesto, así como la descripción de este, utilizando el nombre del compuesto que previamente se había identificado en KEGG, que es una plataforma de acceso libre que contiene una colección de mapas de rutas que representan conocimiento a cerca de las redes de interacción, reacción y relación molecular para el metabolismo.

## ***ESTUDIO NUTRAOLEUM***

El estudio NUTRAOLEUM es un estudio de intervención en humanos sanos con riesgo de síndrome metabólico. Es un estudio doble cruzado, aleatorizado, doble ciego, en el que los voluntarios ingirieron durante 3 semanas 30 mL de tres tipos de aceites de oliva con distinta cantidad de compuestos bioactivos procedentes de la propia aceituna. Se evaluó el efecto de la suplementación con los aceites sobre la evolución de los factores que definen el síndrome metabólico y sobre biomarcadores de riesgo cardiovascular. En una submuestra del estudio se llevó a cabo un ensayo posprandial para evaluar la biodisponibilidad de los componentes procedentes de los aceites, y los efectos de la ingesta de una dosis de 30 mL de los aceites sobre la glucemia y la secreción postprandial de insulina, incretinas y de las hormonas gastrointestinales que influyen el apetito y la saciedad.

### ***Aceites experimentales en el estudio NUTRAOLEUM***

En este ensayo se evaluaron tres aceites de oliva con diferente contenido de compuestos bioactivos y el mismo perfil de ácidos grasos. Estos aceites experimentales fueron los siguientes:

- 1) Un AOVE optimizado (AOVE-Op) con elevado contenido de compuestos fenólicos y pocos ácidos triterpénicos: 490 ppm de compuestos fenólicos y 86 ppm de ácidos triterpénicos, obtenido a partir de una mezcla de distintas variedades de aceituna con elevado contenido de este tipo de compuestos.
- 2) Un aceite de oliva funcional (AO-F), preparado a partir del AOVE-Op al que se le añadieron ácidos triterpénicos: ácido maslínico y oleanólico para enriquecerlo. Este aceite contenía 487 ppm de compuestos fenólicos y 389 ppm de ácidos triterpénicos procedentes de la piel de la propia aceituna.
- 3) Un AOVE estándar (AOVE-St) obtenido después de lavar en frío el AOVE-Op para disminuir la cantidad de compuestos bioactivos, de manera que contenía 124 ppm de compuestos fenólicos y 86 ppm de ácidos triterpénicos.

Las características y la composición nutricional de los aceites experimentales están descritas en la Tabla 8 (Biel *et al.*, 2016).

**Tabla 8.** Características de los diferentes aceites administrados en el estudio NUTRAOLEUM

<b>Perfil de ácidos grasos (%)</b>	<b>AOVE-St</b>	<b>AOVE-Op</b>	<b>AO-F</b>
Ácido esteárico (C18:0)	2.3	2.2	2.1
Ácido oleico (C18:1)	78.9	78.2	78.4
Ácido linoleico (C18:2n6)	6.6	6.8	6.9
Ácido linolénico (C18:3n6)	0.6	0.7	0.7
Ácido araquídico (C20:0)	0.4	0.4	0.4
Ácido eicosenoico (C20:1)	0.3	0.4	0.4
Ácido behénico (C22:0)	0.1	0.1	0.1
Ácido lignocérico (C24:0)	<0.1	<0.1	<0.1
<b>Compuestos fenólicos totales (ppm)</b>	<b>124</b>	<b>490</b>	<b>487</b>
Hidroxitirosol y derivados	105	424.0	423.0
Lignanós	18.2	61.3	59.2
Flavonoides	0.7	3.4	3.2
Fenoles simples	0.0	0.9	0.9
<b>Triterpenos totales (mg/kg)</b>	<b>86.5</b>	<b>86.3</b>	<b>388.8</b>
Ácido maslínico	47.3	47.3	217.7
Ácido oleanólico	39.2	39.1	171.1
Ácido ursólico	<10	<10	<10
<b><math>\alpha</math>-tocoferol (ppm)</b>	<b>174</b>	<b>183</b>	<b>176</b>
<b>Escualeno (mg/100g)</b>	<b>529.2</b>	<b>536.2</b>	<b>545.5</b>
<b>Pigmentos totales (ppm)</b>	<b>15.73</b>	<b>17.59</b>	<b>16.78</b>
<b>Pigmentos carotenoides totales (ppm)</b>	<b>7.08</b>	<b>6.79</b>	<b>6.97</b>
<b>Esteroles totales (ppm)</b>	<b>1437</b>	<b>1396</b>	<b>1460</b>

AO-F, aceite funcional; AOVE-St, aceite de oliva virgen estándar; AOVE-Op, aceite de oliva virgen optimizado (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2018).

### *Sujetos incluidos en el estudio*

Los candidatos para participar en el estudio tenían una edad comprendida entre 20 y 50 años, y fueron reclutados de la población general de Granada, España, mediante el uso de anuncios en los periódicos y tablones en los centros cívicos. Un total de 73 sujetos acudieron al centro de reclutamiento donde se valoró su posible participación en el estudio en función de si cumplían o no los criterios de inclusión. Finalmente, 58 sujetos (29 hombres y 29 mujeres) fueron reclutados desde octubre de 2013 hasta febrero del año 2014 y comenzaron el estudio, aunque sólo 54 voluntarios completaron el estudio y fueron incluidos para el análisis de los datos.

Los criterios de elegibilidad fueron los siguientes:

- Sujetos sanos en base a un examen físico y a un análisis de laboratorio de rutina hematológico y bioquímico.
- Consentimiento informado debidamente cumplimentado y firmado.
- Índice de masa corporal <30 kg/m<sup>2</sup>

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Tabaquismo
- Ingesta de suplementos antioxidantes
- Tratamiento con aspirina o cualquier medicamento con propiedad antioxidantes establecidos
- Hiperlipemia
- Obesidad (índice de masa corporal  $>30 \text{ kg/m}^2$ )
- Diabetes
- Hipertensión
- Celiaquía u otra enfermedad intestinal
- Limitaciones en la movilidad o cualquier otra enfermedad o condición que pueda afectar el cumplimiento.

### ***Cálculo del tamaño de la muestra***

Para el estudio sostenido se realizó un cálculo de muestra de al menos 40 sujetos para obtener una diferencia estadísticamente significativa mayor o igual a 10 unidades en la LDL (variable principal del estudio) considerando un riesgo  $\alpha$  de 0.05 y un riesgo  $\beta$  de 0.20 en una prueba de dos colas. Se anticipó una tasa de abandono del 15%, por lo que se aumentó el número mínimo de sujetos a 46 voluntarios; los abandonos antes del primer período de intervención fueron reemplazados.

### ***Diseño de estudio***

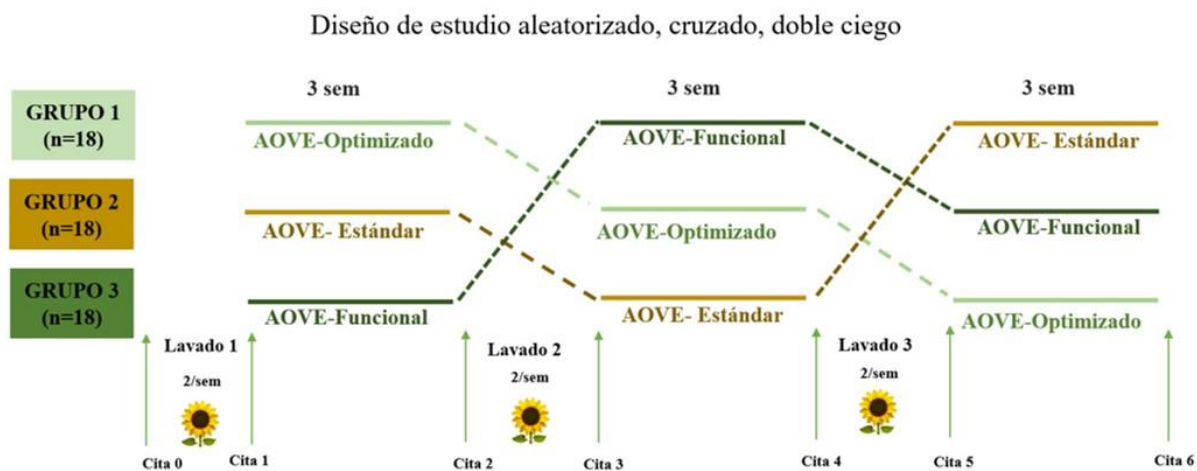
El estudio fue un ensayo clínico de intervención, aleatorizado, triple cruzado, doble ciego en el que los 54 participantes que finalmente se incluyeron en el estudio se distribuyeron de forma aleatoria, ajustada por sexo, edad y peso, en tres grupos de intervención, cada uno de ellos con 18 sujetos. Se aleatorizó la secuencia de intervención con los aceites. Los aceites fueron codificados como A, B y C, y la identificación de estos códigos fue mantenida en un sobre cerrado hasta el final del estudio, de manera que ni los investigadores ni los voluntarios conocieron la identidad de los aceites que estaban consumiendo en cada momento. El primer grupo de intervención correspondió con la secuencia de consumo de aceite A-B-C. El segundo grupo de intervención correspondió con la secuencia de consumo de aceites B-C-A, y el tercero grupo de intervención correspondió con la secuencia de consumo de aceites C-A-B. Al final del estudio se desvelaron los códigos ciegos de los aceites: AOVE-Op correspondía al aceite A, el AOVE-St al B y el AO-F al C.

Los aceites de oliva se administraron secuencialmente durante tres períodos de 3 semanas precedidas por períodos de lavado de 2 semanas en los que se solicitó a los participantes que evitaran



el consumo de aceitunas y aceite de oliva o cualquier fármaco como aspirina o cualquier otro medicamento con propiedad antioxidantes (Figura 14).

La figura 14 representa un esquema de la secuencia del estudio sostenido. Las secuencias de intervención inician con la primera toma de muestra de sangre y orina en la cita cero o basal después de un ayuno nocturno de 10 h, en ese momento a cada sujeto se le proporcionó aceite de girasol para consumir durante las 2 semanas siguientes que correspondía al primer periodo de lavado. Durante estas 2 semanas los sujetos tenían que consumir el aceite de girasol como grasa principal de su dieta y evitar el consumo de aceite de oliva o cualquier producto derivado de la aceituna.



**Figura 14.** Diseño experimental del estudio NUTRAOLEUM

Tras las dos semanas del primer lavado, se citó a los voluntarios (cita 1) para realizar la segunda toma de muestra (pre-intervención) y comenzó el primer periodo de intervención con el aceite asignado según el orden de administración de aceite. A cada uno de los participantes se les proporcionó las monodosis de 30 mL del aceite de oliva asignado necesarias para las tres semanas de intervención. Esta cantidad de aceite debía ser ingerida en crudo, en una sola dosis o bien distribuida hasta en las tres comidas del día. También se les proporcionó aceite del mismo tipo para cocinar durante ese periodo de tiempo (1 L/sem). Una vez finalizadas las tres semanas, los participantes fueron citados para la siguiente visita post-intervención (cita 2) en la que se realizó la tercera toma de muestra de sangre. Posteriormente, comenzó el segundo periodo de dos semanas de lavado en el que los participantes recibieron el aceite de girasol para consumir en crudo o cocinar y no tomaron productos procedentes de la aceituna. En la cita 3 comenzó el segundo periodo de intervención con el segundo tipo de aceite de oliva asignado durante las 3 semanas siguientes, que se completó con la cita 4. Después del tercer periodo de lavado de dos semanas con aceite de girasol

y sin consumir aceitunas y sus derivados, se volvió a citar a los voluntarios en las mismas condiciones para la cita 5, en la que se les proporcionó el tercer tipo de aceite (monodosis y aceite para cocinar) para la tercera intervención de tres semanas, que terminó con la cita 6 para la que se realizó la última toma de muestra tras las 15 semanas totales de intervención (Figura 12).

En todas las visitas (basal, pre-intervenciones y post-intervenciones) los participantes eran citados a primera hora de la mañana con un ayuno mínimo de 10 horas para la extracción de sangre. Se tomaron muestras de sangre en tubos con EDTA y tubos sin anticoagulante que fueron centrifugados a 4°C, 1750 xg, 10 min. El plasma fue separado, alicuotado y congelado a -80°C hasta su análisis. Los participantes trajeron la orina recogida durante las 24 h previas a la visita (para ello cada sujeto tenía a su disposición un contenedor de 4 L de capacidad), cuyo volumen era medido y posteriormente alicuotado y congelado a -80°C hasta su análisis. Además, los participantes debían traer consigo las monodosis vacías al final de las tres semanas, con el objetivo de contabilizar la adherencia al tratamiento.

Al inicio del estudio y durante cada periodo de intervención se realizó una evaluación nutricional mediante un registro de consumo de alimentos de tres días (2 días laborales y 1 día festivo). El consumo de energía y la ingesta diaria de macro y micronutrientes se calculó mediante el programa específico CSG (General ASDE) utilizando la base de datos española de composición de alimentos (BEDCA, 2006). Para evitar una excesiva ingesta de antioxidantes y compuestos fenólicos durante el período de ensayo clínico, se aconsejó a los participantes limitar el consumo de los siguientes alimentos:

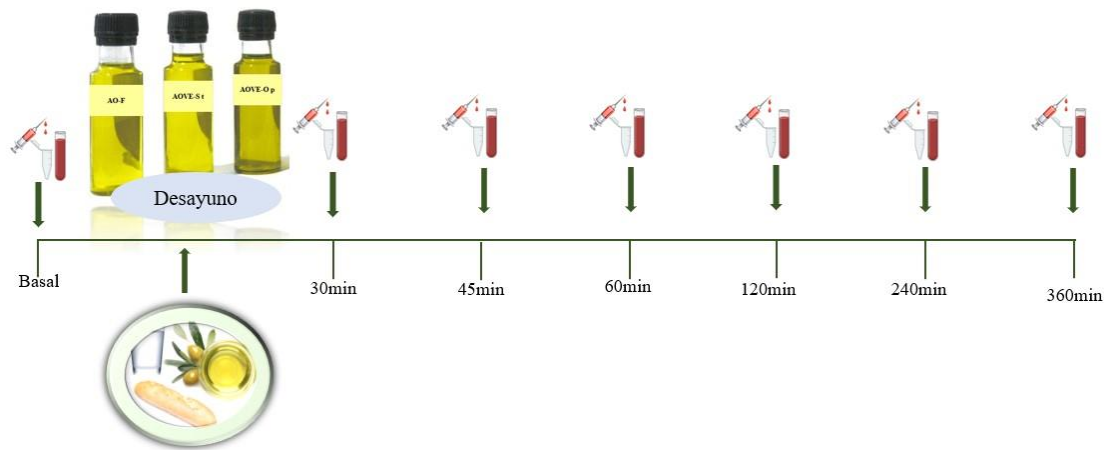
- 2 porciones de verduras o legumbres/d
- 3 porciones de frutas (excepto los zumos)
- 3 tazas de té o café/d
- 1 trozo de una barra de chocolate (15 g) /d
- 2 vasos de vino/d
- 30 g/semana de frutos secos
- pescado blanco preferentemente (150 g/ración)

Así mismo, se aconsejó a los participantes evitar los productos enlatados con aceites, como las sardinas, pimientos, etc. Los participantes fueron asesorados personalmente por un nutricionista sobre cómo registrar el consumo de alimentos y seguir las recomendaciones dietéticas mencionadas.

### ***Diseño experimental de la intervención posprandial***

Del total de participantes del estudio se seleccionó una submuestra de 18 participantes para el estudio posprandial que se realizó el primer día de cada intervención con los diferentes aceites.

Para las intervenciones posprandiales los voluntarios acudieron en ayunas de 10 h a las consultas del hospital. Inicialmente se recogieron muestras de sangre venosa en ayunas y seguidamente se les ofreció un desayuno que consistía una dosis única de 30 mL del aceite de oliva correspondiente a su grupo de intervención (AOVE-St, AOVE-Op o AO-F) acompañado con un trozo de pan blanco (80 g) y un vaso de agua (200 mL) (Biel et al., 2016). Posteriormente, se tomaron muestras de sangre a los 30, 45, 60, 120, 240 y 360 min en tubos de vacío con EDTA como anticoagulante (Figura 15).



**Figura 15.** Diseño de estudio posprandial NUTRAOLEUM

Para la determinación de hormonas gastrointestinales en plasma se añadieron antiproteasas específicas: Pefabloc SC (AEBSF) (Roche) que inhibe la degradación de grelina (a una concentración de 1 mg/mL de sangre), e inhibidor de dipeptidil-dipeptidasa IV (Linco) que inhibe la degradación de GLP-1 (50  $\mu$ M en sangre). Las muestras de sangre se centrifugaron a 1750 xg, 4°C durante 15 min, e inmediatamente se congelaron alícuotas de plasma a -80°C para posteriores análisis.

### ***Determinaciones bioquímicas en plasma***

La glucosa plasmática se analizó mediante un kit colorimétrico (ref. BSIS46-E, Spinreact, España) (coeficiente de variación (CV): 4.79%). Las concentraciones plasmáticas de insulina y hormonas gastrointestinales se determinaron utilizando un kit MILLIplex™, con el sistema de ensayo multiplex Luminex 200 construido sobre tecnología xMAP. Se utilizó el panel Human Gut

Hormone (Millipore Iberica SA, Madrid, España) para determinar insulina, GIP, GLP-1, grelina, PP y PYY (CV: 6.17; 5.97; 8.61; 5.93; 8.38 y 9.85%, respectivamente) (Gonzalez-Anton *et al.*, 2015).

### ***Índices de sensibilidad y resistencia a la insulina***

Para describir el estado metabólico de los voluntarios al inicio del estudio, se estimó la función de las células  $\beta$  pancreáticas como la evaluación del modelo homeostático del índice de funcionalidad de las células  $\beta$  (HOMA- $\beta$ ) en ayunas (Ahren *et al.*, 2008):

$$\text{HOMA1-\% B} = (20 \times \text{FPI}) / (\text{FPG} - 3.5)$$

La resistencia a la insulina del tejido periférico en ayunas se estimó utilizando el índice de evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR) que se calculó en ayunas siguiendo la ecuación (Matthews *et al.*, 1985):

$$\text{HOMA1-IR} = (\text{FPI} \times \text{FPG}) / 22.5$$

La sensibilidad a la insulina del tejido periférico en ayunas también se calculó utilizando el índice de control cuantitativo de la sensibilidad a la insulina (QUICKI) (Katz *et al.*, 2000).

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log (I_0) + \log (G_0)]$$

La sensibilidad a la insulina de tejido periférico posprandial se evaluó en función del índice de Matsuda (DeFronzo, 1999):

$$\text{Índice de Matsuda} = 10000 / \sqrt{(G_0 * I_0) * (G_m * I_m)}$$

El índice insulinogénico (INSI) se calculó según la fórmula propuesta por Aono *et al.*, 2018:

$$\text{INSI} = (I_{30} - I_0) / (G_{30} - G_0)$$

### ***Análisis estadístico***

Las características clínicas y bioquímicas basales de los sujetos y los datos de la intervención se presentan como valores medios ajustados  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las áreas incrementales bajo las curvas (iAUC) de glucosa posprandial, insulina y hormonas gastrointestinales se calcularon utilizando un método trapezoidal (Brouns *et al.*, 2005) desde el inicio hasta los 240 min utilizando el programa R. La normalidad de las variables se evaluó mediante gráficos Q-Q. Los datos faltantes se imputaron utilizando métodos apropiados. Los valores atípicos para cada intervención se eliminaron si la curtosis  $>1$  y la asimetría  $>1$  en la distribución de las respuestas. Las variables se analizaron mediante un modelo lineal de efectos mixtos (LMM). Este modelo tiene en cuenta todas aquellas variables confusoras como la edad, el género, la intervención y el periodo de ingesta de aceite, considerados como efectos fijos, hasta a los propios participantes y al hospital como efectos aleatorios. Este modelo nos permite conocer diferencias en las intervenciones tanto para las iAUC como en tiempos posprandiales concretos, desde el basal hasta los 240 min tras la ingesta del aceite (Brady *et al.*, 2015).

La comparación múltiple post-hoc se analizó mediante la prueba de Sidak. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . Se utilizó el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20 para realizar el análisis estadístico (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.).

## RESULTADOS



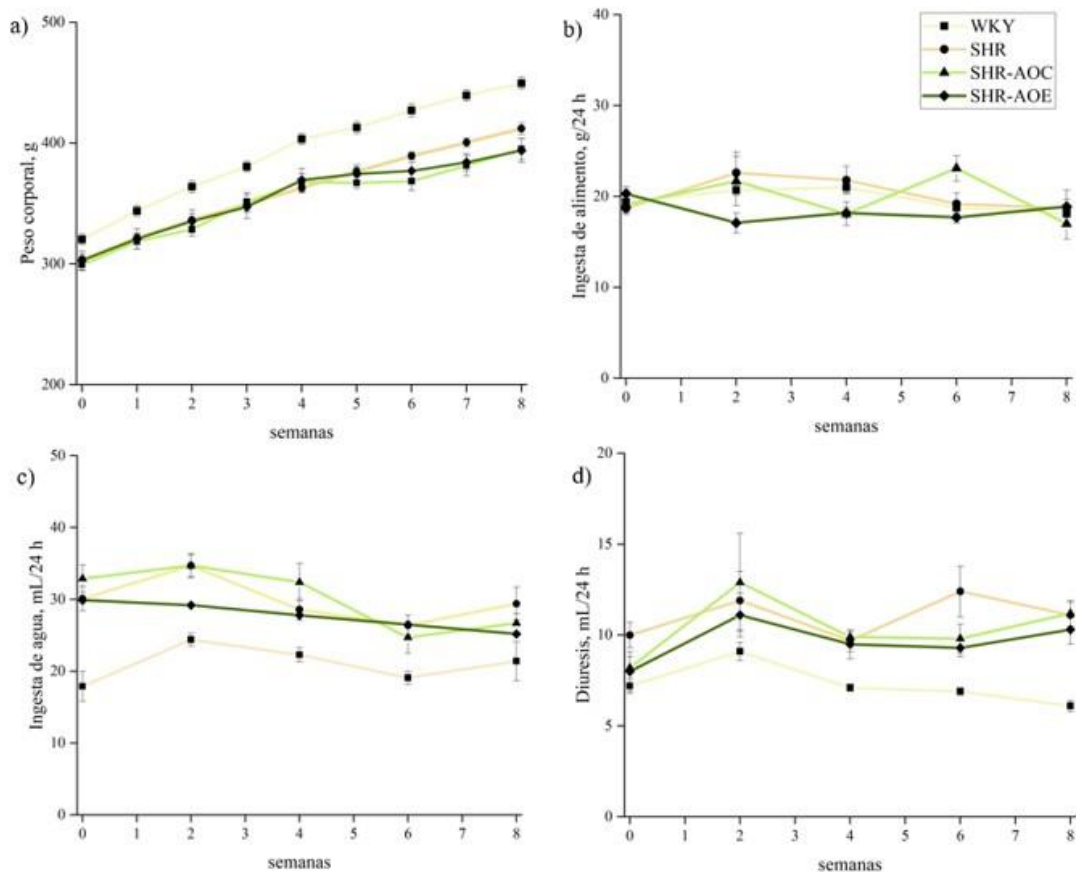


## Resultados

### ESTUDIO CARDIOLIVE

#### Evolución de características basales

La evolución del peso corporal de los animales, así como la ingesta de alimentos, de agua y la diuresis durante el tiempo de intervención se muestran en la Figura 16.



**Figura 16.** Evolución del peso corporal (a), la ingesta de alimentos (b) y agua (c) y la diuresis (d) a lo largo del periodo de intervención en los grupos experimentales. Los datos representan media  $\pm$  SEM. Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos para las variables de distribución normal, la prueba de Kruskal Wallis para las variables de distribución no normal, y la prueba post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples entre grupos. Valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. Diferentes letras indican diferencias significativas (a, b). ANOVA, análisis de la varianza; SEM, error estándar de la media; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; SHR-AOC, grupo de ratas suplementadas con aceite control, SHR-AOE, grupo de ratas suplementadas con aceite enriquecido; WKY grupo de ratas sanas Wistar Kyoto.

El peso corporal fue menor en todas las SHR en comparación con las ratas WKY. No se encontraron diferencias significativas en la evolución del peso corporal entre los grupos de animales SHR tratados y no tratados (Figura 16a). La ingesta de alimentos fue de alrededor de 20 g/d en todos los grupos a lo largo de las 8 semanas de intervención, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 16b). Así mismo, la ingesta de agua fue similar en los cuatro grupos experimentales (Figura



16c). Sin embargo, la diuresis fue mayor en todos los grupos SHR en comparación con los animales WKY sanos a partir de la cuarta semana de tratamiento ( $p=0.001$ ) (Figura 16d).

### **Variables bioquímicas en orina y plasma**

La Tabla 9 muestra las variables bioquímicas en plasma y orina de las ratas tras la suplementación con los aceites durante 8 semanas. No hubo diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de sodio, urea, colesterol-HDL y colesterol-LDL entre los cuatro grupos experimentales.

**Tabla 9.** Variables bioquímicas en plasma y orina en los grupos experimentales después de 8 semanas de intervención.

<b>Plasma</b>	<b>WKY</b>	<b>SHR</b>	<b>SHR-AOC</b>	<b>SHR-AOE</b>	<b>p</b>
Sodio (mEq/L)	144.1 ± 0.7	143.9 ± 1.2	144.7 ± 0.9	144.1 ± 0.8	0.940
Potasio (mEq/L)	4.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	4.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	0.040
Creatinina (mg/dL)	0.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.004
Urea (mg/dL)	37.5 ± 1.4	41.2 ± 2.8	41.9 ± 1.9	40.0 ± 1.4	0.400
CT (mg/dL)	79.9 ± 3.3 <sup>a</sup>	77.9 ± 5.9 <sup>ab</sup>	74.3 ± 2.2 <sup>ab</sup>	65.2 ± 1.9 <sup>b</sup>	0.020
HDL (mg/dL)	63.2 ± 2.6	63.6 ± 5.0	59.4 ± 2.0	63.2 ± 2.7	0.770
LDL (mg/dL)	9.2 ± 0.7	10.8 ± 1.1	10.0 ± 0.7	9.2 ± 0.7	0.500
<b>Orina</b>	<b>WKY</b>	<b>SHR</b>	<b>SHR-AOC</b>	<b>SHR-AOE</b>	<b>p</b>
Diuresis (mL/100gr/24h)	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.001
Natriuresis (μEq/100gr/24h)	243.7 ± 31.1 <sup>a</sup>	285.8 ± 27.0 <sup>ab</sup>	336.7 ± 20.9 <sup>b</sup>	248.4 ± 18.1 <sup>ab</sup>	0.040
Kaliuresis (μEq/100gr/24h)	520.5 ± 50.8	609.4 ± 40.9	617.7 ± 37.9	531.5 ± 50.0	0.320
Creatinina (mL/min/kg)	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.001
Aclaramiento de creatinina (mL/min/kg)	0.64 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.91 ± .08 <sup>b</sup>	0.001
Proteinuria (g/dL)	2.8 ± 2.3	2.9 ± 2.1	2.6 ± 1.0	2.3 ± 2.1	0.200
Nitritos μM	208.1 ± 43.9 <sup>ab</sup>	144.8 ± 50.1 <sup>a</sup>	344.4 ± 41.5 <sup>bc</sup>	393.3 ± 48.7 <sup>c</sup>	0.002
Balance agua (mL/100g/24h)	3.4 ± 0.6	4.6 ± 0.7	3.9 ± 0.3	3.6 ± 0.2	0.510
Balance sodio (μEq/100g/d)	462.9 ± 38.7	528.4 ± 45.7	415.4 ± 82.1	587.4 ± 61.7	0.210

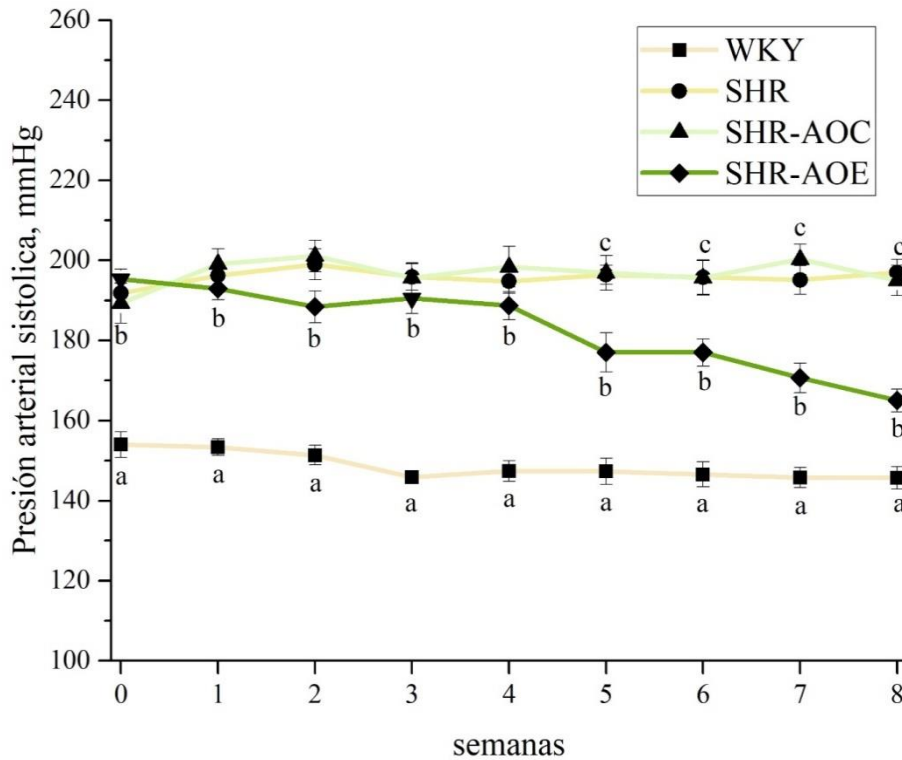
Los datos indican la media ± SEM. Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos para las variables de distribución normal, la prueba de Kruskal Wallis para las variables de distribución no normal, y la prueba post hoc de Bonferroni para múltiples comparaciones entre grupos. El valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas (a, b, c). ANOVA, análisis de la varianza; CT: colesterol total; HDL lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; SEM, error estándar de la media; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; SHR-AOE, grupo de ratas suplementadas con aceite enriquecido; SHR-AOC, grupo de ratas suplementadas con aceite control; WKY grupo de ratas sanas Wistar Kyoto.

En el grupo SHR-AOE las concentraciones plasmáticas de colesterol total fueron menores que en el grupo WKY ( $p=0.03$ ) y tendieron a ser menores en comparación con el grupo SHR ( $p=0.106$ ). La creatinina plasmática fue mayor en el grupo control enfermo SHR en comparación con los grupos tratados SHR-AOC, SHR-AOE y el grupo control sano.

La diuresis y la excreción de creatinina en orina fueron mayores en todas las ratas hipertensas después de 8 semanas de intervención en comparación con WKY sanas. Sin embargo, el aclaramiento de creatinina fue significativamente menor después del tratamiento con el AOC y el AOE en comparación con los animales controles SHR y WKY ( $p=0.001$ ). La natriuresis, fue mayor en los animales SHR-AOC en comparación con los WKY sanos. La concentración de nitritos en orina fue significativamente más alta en el grupo SHR-AOE en comparación con los dos grupos control SHR y WKY ( $p=0.004$  y  $p=0.040$ , respectivamente), y en el grupo SHR-AOC en comparación con el grupo SHR ( $p=0.028$ ). No se observaron diferencias significativas en kaliuresis, proteinuria, balance de agua y balance de sodio entre los grupos (Tabla 9).

### ***Evolución de la presión arterial en SHR***

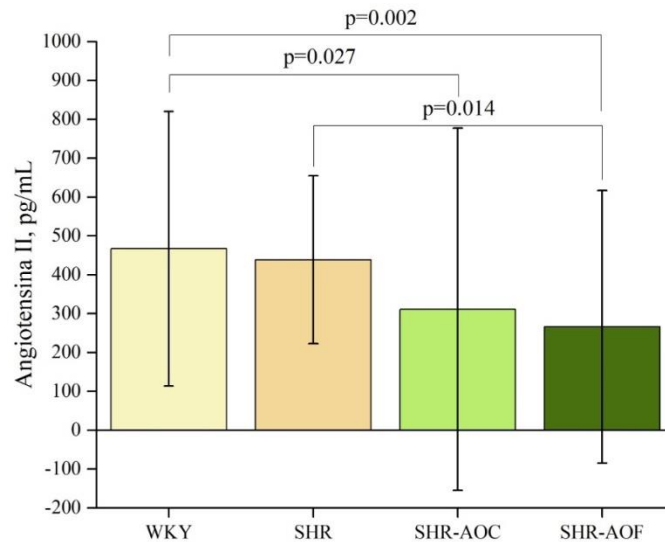
La Figura 17 describe la evolución temporal de la PAS en los animales. Los valores de PAS fueron menores en las ratas controles sanas WKY con respecto a las SHR controles y a las suplementadas con el AOC durante todo el estudio. Al inicio del estudio, los animales suplementados con el AOE tenían una PAS similar a las de las demás ratas SHR, y se mantuvo similar durante las cuatro primeras semanas. A partir de la quinta semana de administración del AOE se observó una reducción significativa y progresiva de la PAS hasta la octava semana de tratamiento, que fue significativamente menor en el grupo SHR-AOE respecto a los grupos SHR-AOC y SHR. La diferencia en la disminución de la PAS a las 8 semanas de tratamiento fue de  $-30.3 \pm 3.2$  mmHg con respecto al grupo de SHR sin tratar, aunque esta disminución no alcanzó los valores de los animales controles sanos WKY. Específicamente, el tratamiento con AOE provocó una disminución del 15% de PAS tras las 8 semanas ( $p=0.001$ ).



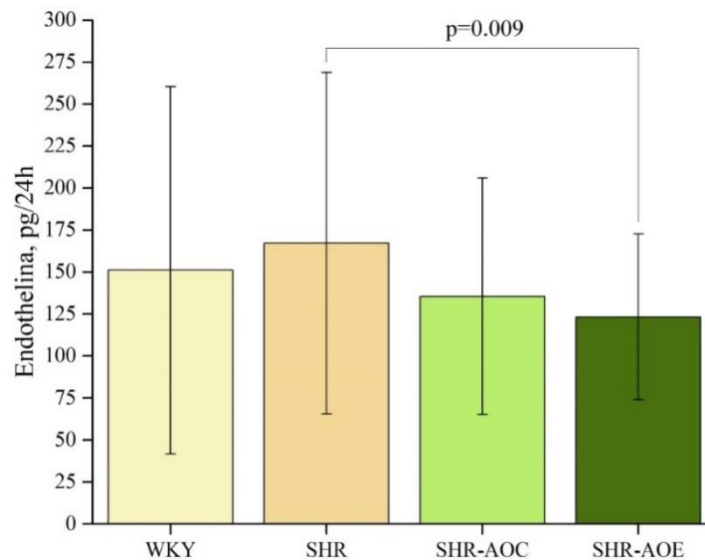
**Figura 17.** Evolución temporal de la PAS durante las 8 semanas de suplementación, determinada por pletismografía del manguito de la cola en los grupos experimentales. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos y la prueba post hoc de Bonferroni para múltiples comparaciones entre grupos, para comparar valores a cada tiempo. El valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. Diferentes letras indican diferencias significativas (a, b, c). ANOVA, análisis de la varianza; PAS: presión arterial sistólica; SEM, error estándar de la media; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; SHR-AOC, grupo de ratas suplementadas con aceite control; SHR-AOE, grupo de ratas suplementadas con aceite enriquecido; WKY grupo de ratas sanas Wistar Kyoto.

### ***Péptidos vasoactivos: endotelina-1 urinaria y angiotensina II plasmática***

Las concentraciones plasmáticas de angiotensina II fueron similares en el grupo WKY y en los animales SHR no tratados. La administración del AOE durante 8 semanas ocasionó una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de angiotensina II comparado con las ratas SHR que no recibieron suplementación, y tendieron a ser más bajas después de la administración del AOC en comparación con el grupo SHR no tratado ( $p=0.125$ ) (Figura 18). Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de ratas SHR suplementadas con los dos tipos de aceites (SHR-AOE y SHR-AOC) y los animales sanos (Figura 18).



**Figura 18.** Concentraciones de angiotensina II en plasma después de 8 semanas de intervención. Los datos representan media  $\pm$  SEM. Se utilizó un test de ANOVA de un factor y como post hoc un test de Bonferroni para comparar los resultados entre los grupos. Valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. ANOVA, análisis de la varianza; SEM, error estándar de la media; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; SHR-AOC, grupo de ratas suplementadas con aceite control; SHR-AOE, grupo de ratas suplementadas con aceite enriquecido; WKY grupo de ratas sanas Wistar Kyoto.



**Figura 19.** Concentraciones de endotelina-1 en orina después de 8 semanas de intervención. Los datos representan media  $\pm$  SEM. Se utilizó un test de ANOVA de un factor y como post hoc un test de Bonferroni para comparar los resultados entre los grupos. Valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. ANOVA, análisis de la varianza; SEM, error estándar de la media; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; SHR-AOC, grupo de ratas suplementadas con aceite control; SHR-AOE, grupo de ratas suplementadas con aceite enriquecido; WKY grupo de ratas sanas Wistar Kyoto.

La excreción urinaria de endotelina-1 mostró un patrón similar al observado para la angiotensina II en plasma, no hubo diferencias entre los animales controles sanos e hipertensos. Las concentraciones de endotelina-1 en orina fueron menores en las ratas que recibieron AOE ( $p=0.009$ ) y tendieron a ser menores en las ratas que recibieron el AOC ( $p=0.102$ ) comparado con los animales SHR sin tratar (Figura 19).

### **Variables morfológicas**

Al final del período de estudio, los animales SHR tenían un peso del corazón y del ventrículo izquierdo significativamente mayores que las ratas controles sanas, así como los índices relativos al peso corporal (peso corazón/peso corporal y peso ventrículo izquierdo/peso corporal). Estas variables fueron significativamente menores en las ratas hipertensas suplementadas con AOE en comparación con el grupo de control SHR. El peso del riñón en valores absolutos y el índice peso riñón/peso corporal fueron similares en los cuatro grupos de ratas (Tabla 10).

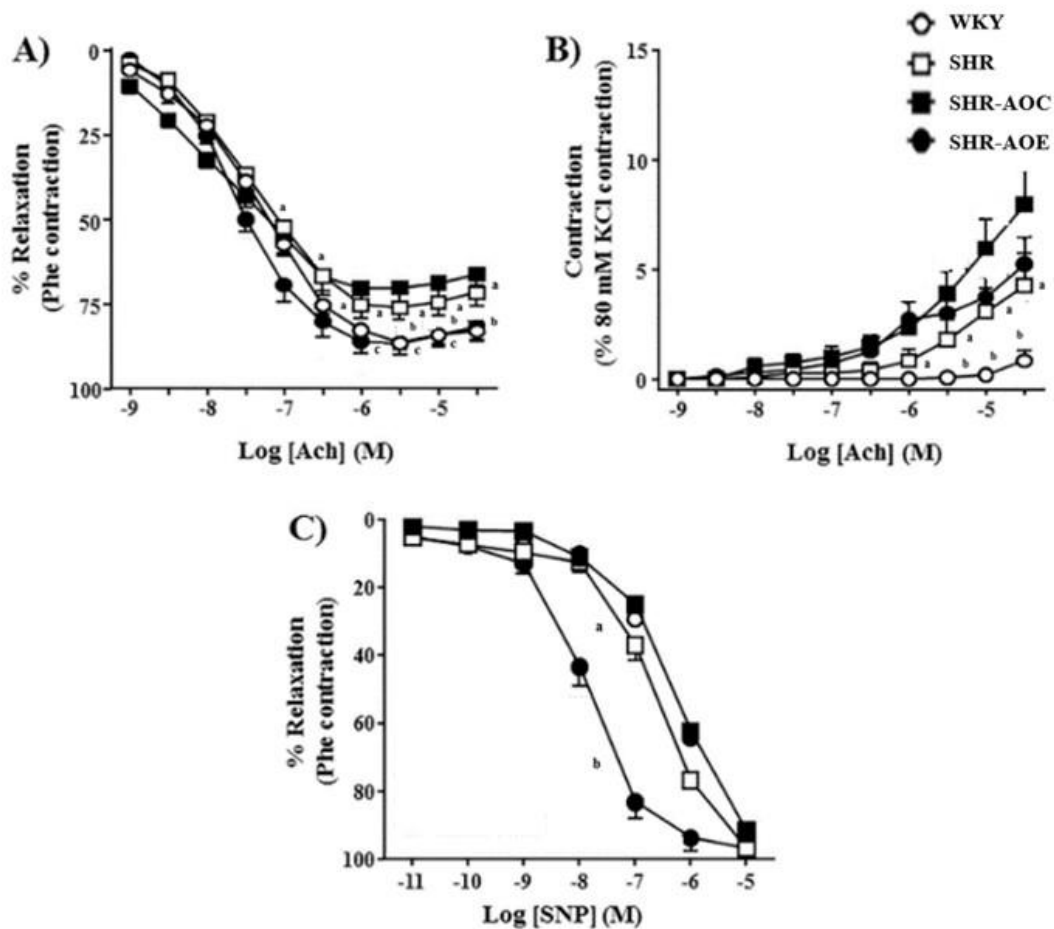
**Tabla 10.** Variables morfológicas en los grupos experimentales después de la intervención

	WKY	SHR	SHR-AOC	SHR-AOE	p
Peso corporal (g)	444.9 ± 4.0 <sup>a</sup>	403.4 ± 9.7 <sup>b</sup>	394.9 ± 8.0 <sup>b</sup>	390.5 ± 10.8 <sup>b</sup>	0.001
Peso corazón (g)	1.0 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.3 ± 0.03 <sup>bc</sup>	1.2 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.001
Peso corazón /Peso rata (mg/g)	2.4 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	3.3 ± 0.08 <sup>bc</sup>	3.1 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.001
Ventrículo izquierdo (mg)	0.86 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.2 ± 0.03 <sup>bc</sup>	1.0 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.001
Ventrículo izquierdo /peso rata (mg/g)	1.9 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.09 <sup>c</sup>	3.0 ± 0.08 <sup>bc</sup>	2.6 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.001
Peso riñón (g)	1.3 ± 0.02	1.2 ± 0.04	1.2 ± 0.03	1.2 ± 0.02	0.020
Peso riñón /peso rata (mg/g)	2.9 ± 0.05	3.1 ± 0.09	3.0 ± 0.06	3.1 ± 0.08	0.147

Los datos indican media ± SEM. Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos para las variables de distribución normal, la prueba de Kruskal Wallis para las variables de distribución no normal y la prueba post hoc de Bonferroni para múltiples comparaciones entre grupos. El valor de  $p<0.05$  se consideró significativo. Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas (a, b, c). ANOVA, análisis de la varianza; SEM, error estándar de la media; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; SHR-AOC, grupo de ratas suplementadas con aceite control; SHR-AOE, grupo de ratas suplementadas con aceite enriquecido; WKY grupo de ratas sanas Wistar Kyoto.

### **Efectos *ex vivo* sobre la función vascular**

La Figura 20 muestra las respuestas vasodilatadoras de la aorta a la acetilcolina dependiente del endotelio: respuesta vasodilatadora a la acetilcolina estimulada con fenilefrina (Figura 20a), respuesta vasoconstrictora a la acetilcolina en presencia de NG-Nitroarginina-metil-ester (L-NAME) (Figura 20b), y la respuesta vasodilatadora al nitroprusiato independiente del endotelio (Figura 20c).



**Figura 20.** Respuestas *ex vivo* de las aortas aisladas de los animales. Respuesta vasodilatadora a la acetilcolina endotelial (a), respuesta vasoconstrictora en presencia de L-NAME ( $10^{-4}$  M) dependiente de la acetilcolina endotelial (b), respuesta vasodilatadora al nitroprusiato independiente del endotelio (c). Los datos representan medias  $\pm$  SEM. Se utilizó la prueba ANOVA y la prueba post hoc de Bonferroni para múltiples comparaciones entre grupos a las diferentes concentraciones. El valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. <sup>a</sup> indica diferencias significativas respecto a las ratas de control SHR; <sup>b</sup> indica diferencias significativas respecto a los animales del grupo sano WKY. <sup>c</sup> indica diferencias significativas respecto a las ratas SHR-AOC. Ach, acetilcolina; ANOVA, análisis de la varianza; L-NAME, Nitroarginina-metilester; Log, logaritmo; Phe, fenilefrina; SEM, error estándar de la media; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; SHR-AOC, grupo de ratas suplementadas con aceite control; SHR-AOE, grupo de ratas suplementadas con aceite enriquecido; SNP, nitroprusiato; WKY grupo de ratas sanas Wistar Kyoto.

La respuesta vasodilatadora de las ratas a la acetilcolina endotelial fue mayor en animales WKY sanos y en animales suplementados con AOE, en las concentraciones más altas en las arterias estimuladas con fenilefrina (un potente vasoconstrictor), en comparación con las aortas del grupo control SHR (Figura 20a). En presencia de L-NAME, un análogo de la L-arginina que inhibe la óxido nítrico-sintasa (NOS) ( $10^{-4}$  M), las aortas de los tres grupos de ratas hipertensas mostraron una respuesta similar vasoconstrictora dependiente del endotelio a la acetilcolina que fue mayor que la de las aortas aisladas de ratas WKY controles (Figura 20b). Para analizar si los cambios en la

capacidad de respuesta a la acetilcolina se deben a un fallo en la señalización del óxido nítrico en el músculo liso vascular, se evaluó el efecto del nitroprusiato, que es una molécula que activa la GCs en este tejido que imita los efectos del óxido nítrico endógeno. Las curvas de dosis/respuesta al nitroprusiato, vasodilatador independiente del endotelio, fueron similares en las aortas de los animales WKY, SHR y SHR-AOC, y el efecto vasodilatador mejoró en las aortas de ratas tratadas con AOE en comparación con el resto de los grupos experimentales (Figura 20c).

### ***Biomarcadores oxidativos e inflamatorios***

En la tabla 11 se muestran las concentraciones de los biomarcadores oxidativos en orina y los biomarcadores inflamatorios en plasma después de 8 semanas de suplementación con los aceites. La excreción urinaria de 8-OH-dG y F<sub>2</sub>-isoprostanos fue menor en todos los animales SHR en comparación con los animales WKY sanos. El tratamiento con AOE indujo una menor excreción de 8-OH-dG comparado con los otros dos grupos de ratas hipertensas. No se observó ninguna diferencia significativa entre los cuatro grupos experimentales respecto a las concentraciones urinarias de F<sub>2</sub>-isoprostanos.

**Tabla 11.** Concentraciones de biomarcadores de estrés oxidativo en orina y biomarcadores inflamatorios en plasma después de 8 semanas de intervención

	WKY	SHR	SHR-AOC	SHR-AOE	<i>p</i>
<b>Orina</b>					
8-OH-dG (ng/mL)	53.2 ± 5.0 <sup>a</sup>	26.7 ± 4.2 <sup>b</sup>	24.5 ± 4.4 <sup>b</sup>	17.1 ± 4.4 <sup>c</sup>	0.001
F <sub>2</sub> -isoprostanos (ng/mL)	7.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.001
<b>Plasma</b>					
IL-6 (pg/mL)	3.6 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.2	0.280
TNF-α (pg/mL)	45.9 ± 8.9 <sup>b</sup>	26.3 ± 2.7 <sup>ab</sup>	24.4 ± 3.2 <sup>ab</sup>	23.6 ± 3.2 <sup>a</sup>	0.021
VEGF (pg/mL)	12.9 ± 1.3	10.6 ± 0.7	9.6 ± 0.5	11.5 ± 0.7	0.060

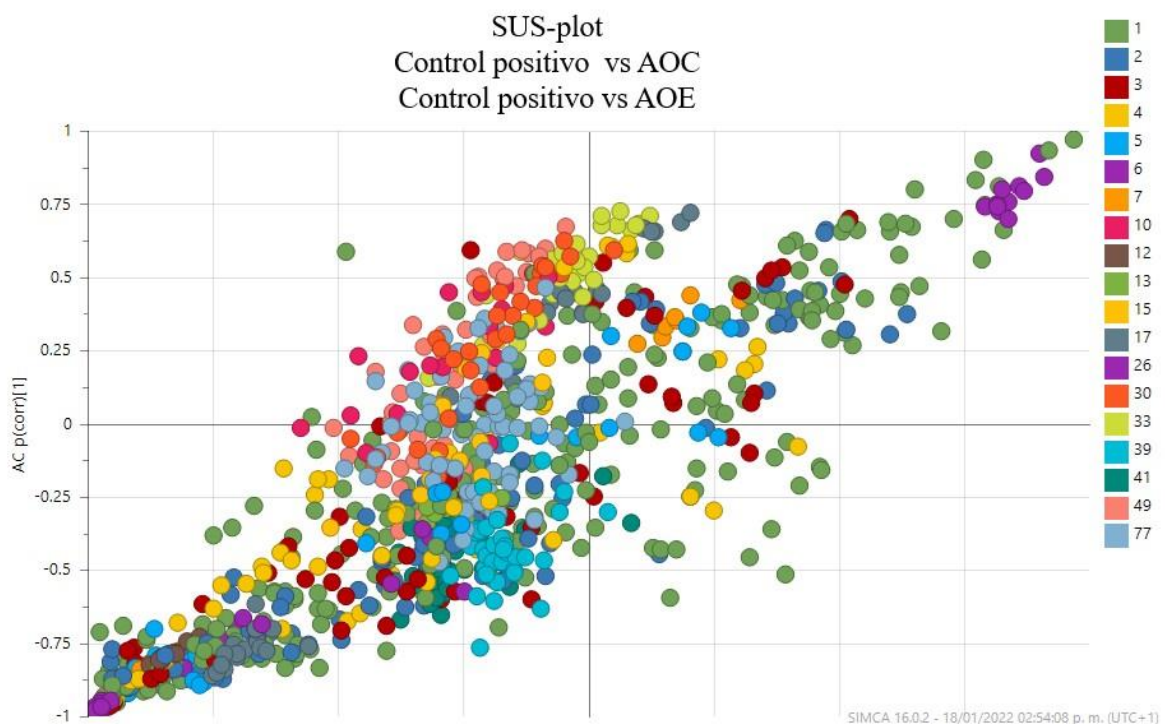
Los datos indican media ± SEM. Se utilizó la prueba ANOVA para comparar los resultados entre grupos para las variables de distribución normal, la prueba de Kruskal Wallis para las variables de distribución no normal y la prueba post hoc de Bonferroni para múltiples comparaciones entre grupos. El valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas (a, b). ANOVA, análisis de la varianza; IL-6, interleucina 6; SEM, error estándar de la media; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; SHR-AOC, grupo de ratas suplementadas con aceite control; SHR-AOE, grupo de ratas suplementadas con aceite enriquecido; TNF-α, factor de necrosis tumoral alfa; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; WKY grupo de ratas sanas Wistar Kyoto.

Las concentraciones plasmáticas de biomarcadores inflamatorios fueron similares en los animales controles sanos y en los controles hipertensos. El TNF-α plasmático fue menor después

del tratamiento con el AOE en comparación con los animales sanos, sin diferencias significativas entre los grupos de animales hipertensos. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de IL-6 y VEGF entre los distintos grupos experimentales del estudio (Tabla 11).

### **Resultados del estudio metabólico**

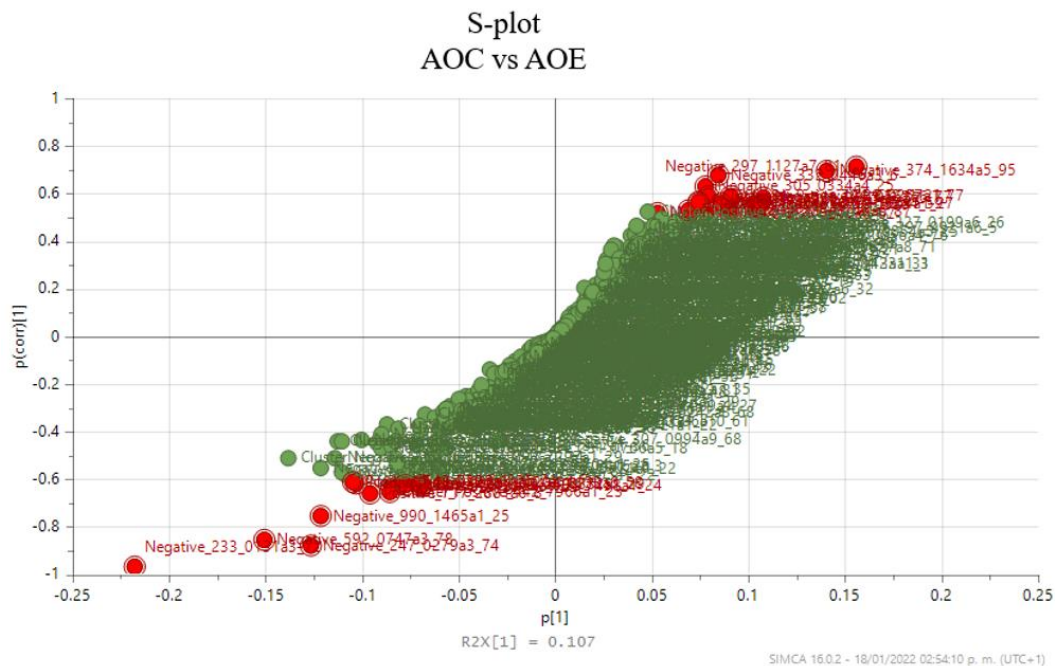
La Figura 21 muestra la comparación de todos los modelos realizados para las muestras de orina y plasma en el programa SIMCA. Los modelos que comparan los SHR vs AOC y SHR vs AOE en orina y plasma muestran cambios en la misma dirección en todos los animales.



**Figura 21.** Modelos de comparación en plasma y orina realizados en SIMCA entre los animales controles enfermos vs los animales tratados con los dos tipos de aceites. AOC, aceite oliva control; AOE, aceite oliva enriquecido; SHR, ratas espontáneamente hipertensas (control positivo enfermo).

A partir de esta comparación se hizo una comparación directa mediante S-plot entre los compuestos diferenciales de los grupos tratados con AOC y AOE (Figura 22), en la que se observa una separación robusta de los animales tratados con los dos aceites. Los puntos verdes representan los metabolitos similares en los dos grupos. Los puntos rojos representan los metabolitos diferenciales entre el grupo AOE y el AOC.





**Figura 22.** Modelos de comparación en plasma y orina entre los animales tratados con el aceite enriquecido en componentes bioactivos y el aceite control. Los puntos verdes representan los metabolitos similares en los dos grupos. Los puntos rojos representan los metabolitos diferenciales entre el grupo AOE y el AOC. AOC, aceite oliva control; AOE, aceite oliva enriquecido.

## Análisis de los resultados de las muestras de orina

### Modelo de análisis OPLS-DA en orina

El modelo de análisis OPLS-DA en orina nos indica que existen diferencias entre SHR (enfermas no tratadas) vs WKY (sanas no tratadas), y entre los modelos SHR vs AOE y SHR vs AOC. Con el OPLS-DA se pudieron identificar de forma robusta 31 variabilidades de metabolitos en orina entre los 3 grupos. Por otro lado, el modelo que compara el AOE vs AOC permite discriminar entre estos dos grupos, pero la variabilidad es elevada ( $Dif(Q^2-R^2)=29$ ) por lo tanto, el modelo no es robusto ni de buena calidad, el único modelo consistente es entre el grupo SHR vs grupo WKY. La Tabla 12 resume las características de los modelos aplicados para comparar los datos de las muestras en orina. La  $Q^2$  indica la capacidad predictiva y el  $R^2$  la variabilidad explicada, también se indica la Dif ( $Q^2$  y  $R^2$ ), este valor nos indica la calidad del modelo (no debe sobrepasar el 20% para considerarse de buena calidad). Los CV-ANOVA indican el p valor de las comparaciones entre los grupos comparativos en cada modelo.

**Tabla 12.** Resumen de modelos multivariante en orina

PCA	Modelo	Q <sup>2</sup> (cum)	R <sup>2</sup> Y(cum)	Dif (Q <sup>2</sup> -R <sup>2</sup> )	CV-ANOVA
OPLS-DA	SHR <i>vs</i> WKY	0.837	0.977	14	0.00253
OPLS-DA	SHR <i>vs</i> AOE	0.948	0.999	5	1.76E-09
OPLS-DA	SHR <i>vs</i> AOC	0.926	0.975	5	2.76E-09
OPLS-DA	AOE <i>vs</i> AOC	0.680	0.967	29	0.04090

AOC, aceite de oliva control; AOE, aceite de oliva enriquecido; CV-ANOVA, coeficiente de variación del análisis de la varianza, indica la diferencia entre los diferentes grupos comparativos en cada modelo; Dif (Q<sup>2</sup>-R<sup>2</sup>), parámetro que se utiliza para identificar la calidad del modelo, se realiza mediante la siguiente ecuación:  $R^2Y - Q^2/R^2Y(cum) * 100$ ; OPLS-DA, análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales; PCA, análisis de componentes principales; Q<sup>2</sup>, capacidad de predicción; R<sup>2</sup>, variabilidad explicada; R<sup>2</sup>Y(acum), variabilidad explicada acumulada; SHR, ratas espontáneamente hipertensas (control positivo enfermo); WKY, ratas Wistar-Kyoto (control negativo sano).

### *Análisis de metabolitos candidatos en muestras de orina*

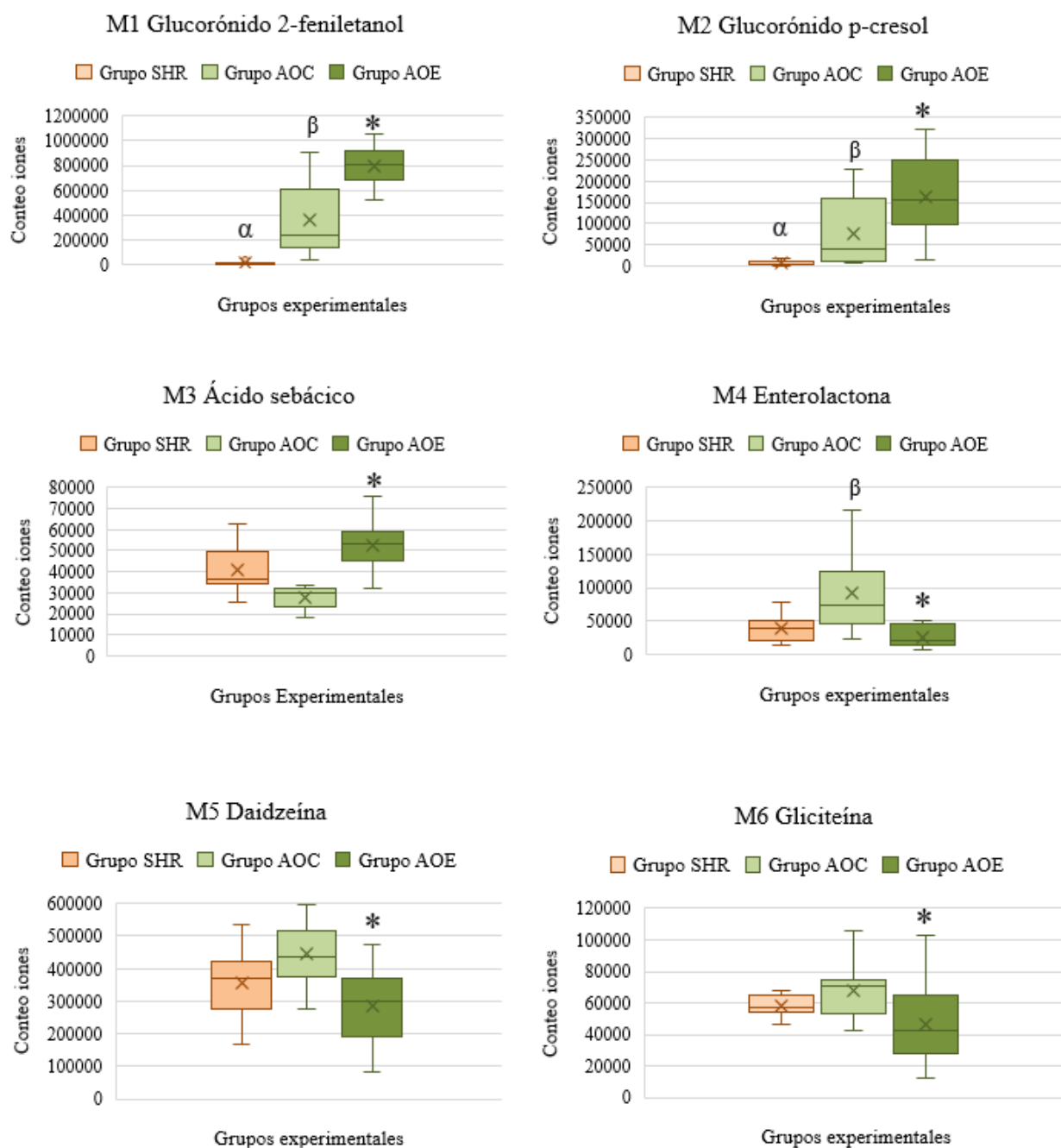
Se identificaron 6 características en muestras de orina (M1-M6) que muestran los metabolitos candidatos tentativamente anotados en los grupos SHR *vs* AOC y AOE en orina (Tabla 13). Las características se presentan con la descripción de masa, RT, modo de ionización, aducto, posible fórmula molecular, posible nombre de la identificación (anotación), tendencia (↑aumenta o ↓disminuye) y parámetro VIP.

**Tabla 13.** Metabolitos candidatos en muestras de orina

M	Masa	RT	Modo (-/+)	Aducto	Fórmula	Anotación	AOC <i>vs</i> SHR	AOE <i>vs</i> SHR	AOC <i>vs</i> AOE	VIP
M1	297.0984	5.7	-	M-H	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	Glucorónido de 2-feniletanol	↑*	↑*	↑*	1.74
M2	283.0819	4.89	-	M-H	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	Glucorónido de p-cresol	↑*	↑*	↑*	2.75
M3	201.1133	6.58	-	M-H	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Ácido sebácico	↓	↑	↑*	1.59
M4	297.1127	7.81	-	M-H	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Enterolactona	↑	↓*	↑*	3.10
M5	253.0503	6.57	-	M-H	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Daidzeína	↑	↓	↓*	1.82
M6	285.0746	6.87	+	M+H	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Gliciteína	↑	↓	↓*	1.81

AOC, aceite de oliva control; AOE, aceite de oliva enriquecido; M, metabolito; RT, tiempo de retención; SHR, ratas espontáneamente hipertensas (control positivo enfermo); VIP, importancia de la variable para la proyección; ↓disminuye; ↑ aumenta; (\*) indica diferencias significativas.

La Figura 23 muestra los diagramas de caja correspondientes a cada uno de los metabolitos de orina tentativamente anotados. Los datos de orina muestran que los metabolitos M1 y M2, tentativamente anotados como glucurónico 2-feniletanol y glucurónico de p-cresol, mostraron una regulación significativa al alza en los grupos AOC y AOE comparados con el grupo SHR (SHR vs AOC  $p=0.0002$  y  $p=0.0007$ , respectivamente. SHR vs AOE  $p=0.003$  y  $p=0.044$  respectivamente), y comparando los dos grupos experimentales, fue significativamente mayor en el grupo AOE comparado con el AOC ( $p=0.040$  y  $p=0.020$ , respectivamente). El metabolito M3, tentativamente anotado como ácido sebácico, fue mayor en el grupo AOE comparado con el AOC ( $p=0.0003$ ). Con respecto al metabolito M4, tentativamente anotado como enterolactona se observó menor presencia en el grupo AOE comparado con AOC ( $p=0.011$ ) y con SHR ( $p=0.032$ ). Los metabolitos M5 y M6, tentativamente anotados como daidzeína y gliciteína, se encontraron en mayor cantidad en el grupo AOC comparado con el AOE ( $p=0.003$  y  $p=0.031$ , respectivamente) (Figura 23).



**Figura 23.** Metabolitos tentativamente anotados en muestras de orina (media de conteo de iones). AOC, aceite de oliva control; AOE, aceite de oliva enriquecido; SHR, ratas espontáneamente hipertensas (control positivo enfermo); Diferentes símbolos indican diferencias significativas:  $\alpha$ , SHR vs AOC;  $\beta$ , SHR vs AOE; \*, AOC vs AOE.

### Modelo de análisis OPLS-DA en plasma

El modelo de análisis OPLS-DA en plasma nos indica que existen diferencias entre el control negativo (grupo WKY) y el control positivo (grupo SHR), y permitió identificar cambios en 65 metabolitos en plasma. Con respecto a los modelos SHR vs AOE y SHR vs AOC se observó que el modelo es capaz de discriminar entre los dos grupos, pero no lo hace de forma robusta, lo que indica que el modelo no es de buena calidad. La Tabla 14 resume las características de los modelos

aplicados para comparar los datos de las muestras en plasma. La  $Q^2$  indica la capacidad predictiva y el  $R^2$  la variabilidad explicada, también se indica la Dif ( $Q^2$  y  $R^2$ ) este valor nos indica la calidad del modelo (no debe sobrepasar el 20% para considerarse de buena calidad). Los CV-ANOVA indican el p valor de las comparaciones entre los grupos comparativos en cada modelo.

**Tabla 14.** Resumen de modelos multivariante en plasma

PCA	Modelo	$R^2Y(\text{cum})$	$Q^2(\text{cum})$	Dif ( $Q^2$ y $R^2$ )	CV-ANOVA
OPLS-DA	SHR vs WKY	0.954	0.874	8	9.38E-06
OPLS-DA	SHR vs AOE	0.792	0.559	29	0.02272
OPLS-DA	SHR vs AOC	0.805	0.49	39	0.05246

AOC, aceite de oliva control; AOE, aceite de oliva enriquecido; CV-ANOVA, coeficiente de variación del análisis de la varianza, indica la diferencia entre los diferentes grupos comparativos en cada modelo; Dif ( $Q^2$ - $R^2$ ), parámetro que se utiliza para identificar la calidad del modelo se realiza mediante la siguiente ecuación:  $R^2Y-Q^2/R^2Y(\text{cum}) \cdot 100$ ; OPLS-DA, análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales; PCA, análisis de componentes principales;  $Q^2$ , capacidad de predicción;  $R^2$ , variabilidad explicada;  $R^2Y(\text{cum})$ , variabilidad explicada acumulada, SHR, ratas espontáneamente hipertensas (control positivo enfermo); WKY, ratas Wistar-Kyoto (control negativo sano).

### Análisis de metabolitos candidatos en muestras de plasma

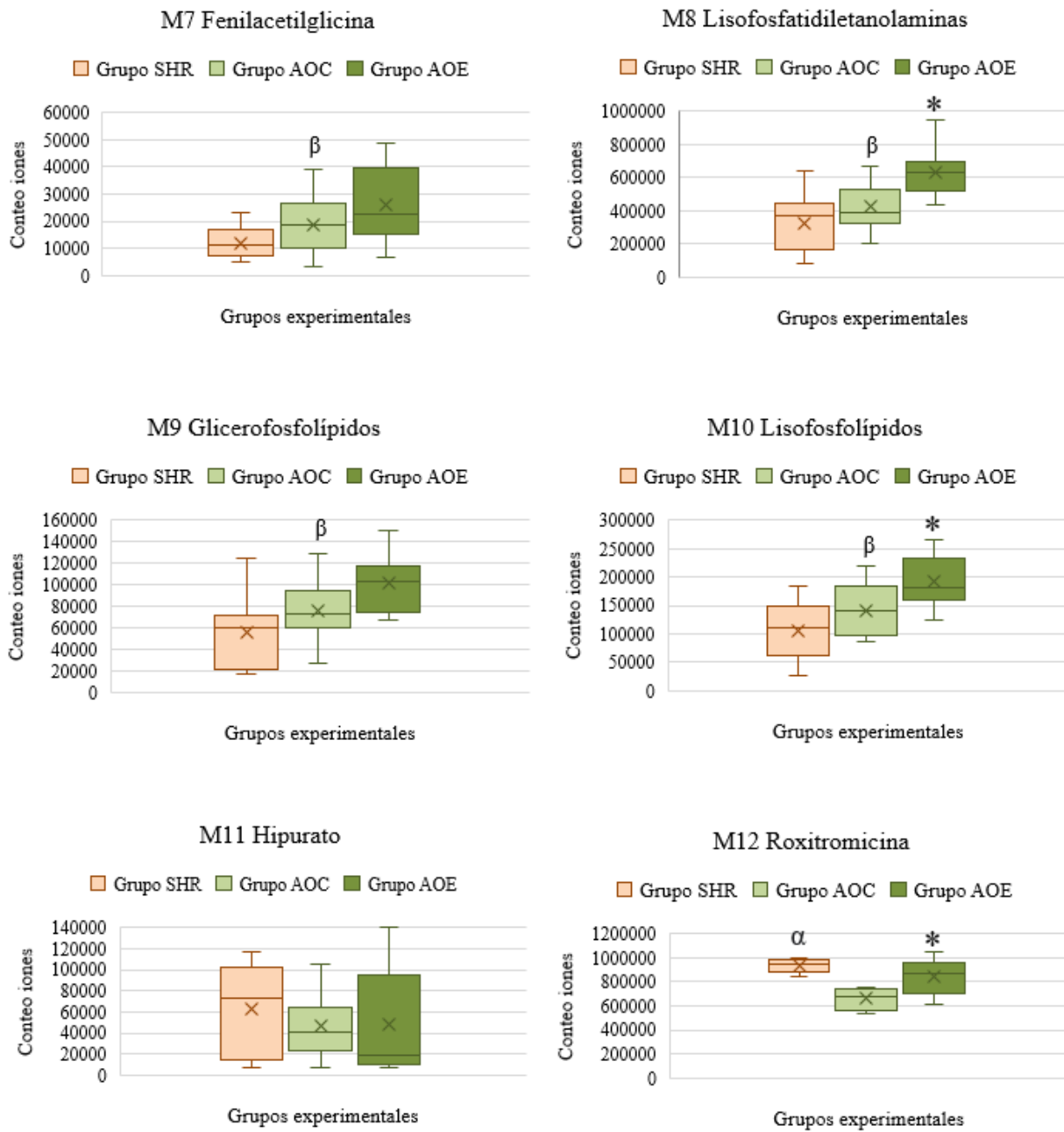
Se identificaron 6 características en muestras de plasma (M7-M12) que muestran los metabolitos candidatos tentativamente anotados en los grupos SHR vs AOC y AOE (Tabla 15). Las características se presentan con la descripción de masa, RT, modo de ionización, aducto, posible fórmula molecular, posible nombre de la identificación (anotación), tendencia ( $\uparrow$  aumenta o  $\downarrow$  disminuye) y parámetro VIP.

**Tabla 15.** Metabolitos candidatos en muestras de plasma

M	Masa	RT	Modo (-/+)	Aducto	Fórmula	Anotación	AOC vs SHR	AOE vs SHR	AOC vs AOE	VIP
M7	192.0669	4.76	-	M-H	$C_{10}H_{11}NO_3$	Fenilacetilglicina	$\uparrow$	$\uparrow^*$	$\uparrow$	1.72
M9	566.3462	11.59	-	M+FA-H	$C_{26}H_{52}NO_7P$	Lisofosfatidiletanolaminas	$\uparrow$	$\uparrow^*$	$\uparrow^*$	1.61
M8	478.2941	11.71	-	M-H	$C_{23}H_{46}NO_7P$	Glicerofosfolipidos	$\uparrow$	$\uparrow^*$	$\uparrow$	1.57
M10	566.3465	11.85	-	M+FA-H	$C_{26}H_{52}NO_7P$	Lisofosfolipidos	$\uparrow$	$\uparrow^*$	$\uparrow^*$	1.40
M11	178.0517	4.3	-	M-H	$C_9H_9NO_3$	Hipurato	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	1.33
M12	837.5337	6.43	+	M+H	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	Roxitromicina	$\downarrow^*$	$\downarrow$	$\downarrow^*$	1.52

AOC, aceite de oliva control; AOE, aceite de oliva enriquecido; M, metabolito; RT, tiempo de retención; SHR, ratas espontáneamente hipertensas (control positivo enfermo); VIP: importancia de la variable para la proyección;  $\downarrow$  disminuye;  $\uparrow$  aumenta; (\*) indica diferencias significativas.

La Figura 24 muestra los diagramas de caja correspondientes a cada uno de los metabolitos tentativamente anotados en plasma. Los metabolitos en plasma M7-M10, tentativamente anotados como fenilacetilglicina, lisofosfatidiletanolaminas, glicerolípidos y lisofosfolípidos, respectivamente, se encontraban en mayor cantidad en el grupo AOE vs SHR ( $p=0.018$ ,  $p=0.007$ ,  $p=0.004$ ,  $p=0.001$ , respectivamente), y se observó la misma tendencia en el grupo AOC vs SHR que no alcanzó la significancia ( $p=0.11$ ,  $p=0.19$ ,  $p=0.14$  y  $p=0.17$ , respectivamente). Los metabolitos M8 y M10, tentativamente anotados como lisofosfatidiletanolaminas ( $p=0.007$ ) y lisofosfolípidos ( $p=0.03$ ), estaban aumentados en el AOE comparado con el AOC. Respecto al metabolito M11, tentativamente anotado como hipurato, también se observó que su presencia fue mayor en los animales del grupo SHR comparado con el AOC y con el AOE, pero sin alcanzar la significación. Finalmente, el metabolito M12, tentativamente anotado como roxitromicina, fue significativamente mayor en los animales del grupo SHR y en el AOE comparado con el AOC (Figura 24).



**Figura 24.** Metabolitos tentativamente anotados en muestras de plasma (media de conteo de iones). AOC, aceite de oliva control; AOE, aceite de oliva enriquecido; SHR, ratas espontáneamente hipertensas (control positivo enfermo); Diferentes símbolos indican diferencias significativas:  $\alpha$ , SHR vs AOC;  $\beta$ , SHR vs AOE; \*, AOC vs AOE.

***Análisis de enriquecimiento del conjunto de metabolitos diferenciales entre grupos SHR y WKY en orina***

El análisis de enriquecimiento en orina arrojó 6 rutas metabólicas con al menos un compuesto significativo en cada ruta. En la Tabla 16, se muestra el nombre de la ruta metabólica, así como los metabolitos identificados con cambios significativos.

<b>Tabla 16.</b> Rutas metabólicas diferenciales identificadas en orina de ratas SHR y WKY		
Ruta metabólica	Código compuesto	Nombre del compuesto
Biosíntesis de hormonas esteroides	C02538	Estrona 3-sulfato
Metabolismo de las purinas	C00366	Urato; ácido úrico
Metabolismo de la tirosina	C00355	Dihidroxi-L-fenilalanina
Metabolismo de la fenilalanina	C01586	Hipurato
Biosíntesis de pantotenato y coenzima A	C00882	Defosfo-CoA
Metabolismo de la porfirina y la clorofila	C02191	Protoporfirina

El código y nombre del compuesto fueron identificados utilizando la base de datos HMDB, Human metaboloma data base; SHR, ratas espontáneamente hipertensas (control positivo enfermo); WKY, ratas Wistar-Kyoto (control negativo sano).



**ESTUDIO NUTRAOLEUM****Resultados estudio NUTRAOLEUM**

En la Tabla 17 se describen las características clínicas y bioquímicas al inicio del estudio de los 18 sujetos seleccionados para el estudio posprandial. Estos datos confirman que los sujetos seleccionados estaban sanos, ya que todos los valores estaban dentro del rango de normalidad. No hubo diferencias en la ingesta dietética nutricional de todos los voluntarios del estudio (datos no mostrados).

**Tabla 17.** Características clínicas y bioquímicas basales de los sujetos (n=18) incluidos en el estudio posprandial.

Edad, años	29 ± 1
Género, (hombres/mujeres)	9/9
IMC, (kg/m <sup>2</sup> )	23.7 ± 0.5
Circunferencia cintura, (cm)	77 ± 2
HDL, (mg/dL)	62 ± 2
LDL, (mg/dL)	101 ± 3
Colesterol total, (mg/dL)	179 ± 4
Triacilglicéridos, (mg/dL)	78 ± 5
PAS, (mmHg)	115 ± 2
PAD, (mmHg)	72 ± 1
Colesterol total /HDL	3 ± 0
LDL/HDL	2 ± 0
Glucosa, (mg/dL)	90 ± 1
Insulina, (mUI/L)	6.7 ± 0.3
GIP, (pg/mL)	53.5 ± 3.1
GLP-1, (pg/mL)	4.3 ± 0.4
Grelina, (pg/mL)	110.9 ± 10.3
PP, (pg/mL)	29.4 ± 3.0
PYY, (pg/mL)	50.5 ± 3.9
HOMA-β	95.9 ± 6.2
HOMA-IR	1.5 ± 0.8
QUICKI	0.364 ± 0.003

Los valores indican la media ± SEM, n = 18 sujetos. GIP, polipéptido inhibidor gástrico; GLP-1, péptido 1 similar al glucagón; HDL, lipoproteína de alta densidad; HOMA-β, modelo homeostático de la funcionalidad de las células beta; HOMA-IR, modelo homeostático de resistencia a la insulina; IMC: índice de masa corporal; LDL, lipoproteína de baja densidad; n, número de participantes; PAD: presión arterial diastólica; PAS, presión arterial sistólica; PP, polipéptido pancreático; PYY, péptido YY; QUICKI, índice de control cuantitativo de la sensibilidad a la insulina; SEM, error estándar de la media.

La Tabla 18 muestra iAUC posprandiales plasmáticas (calculada desde el tiempo basal hasta los 240 min después de haber ingerido el aceite correspondiente) de glucosa, insulina y hormonas gastrointestinales, el índice de Matsuda de sensibilidad a la insulina y el INSI. Se observó que tras consumir una dosis única de los aceites de oliva el iAUC de la glucosa fue mayor en los voluntarios AOVE-Op en comparación con AOVE-St ( $p=0.035$ ). El iAUC de insulina fue menor después de la ingesta de AO-F en comparación con AOVE-St ( $p=0.049$ ). El iAUC de la secreción de GIP posprandial tendió a ser menor después de la ingesta de AOVE-Op en comparación con la ingesta de AOVE-St ( $p=0.083$ ). El índice de Matsuda fue mayor después de la ingesta de AO-F ( $p=0.009$ ) y tendió a ser mayor después de la ingesta de AOVE-Op ( $p=0.093$ ) en comparación con la ingesta de AOVE-St. Finalmente, el índice INSI tendió a ser más alto después del consumo del AOVE-Op que tras la ingesta de AOVE-St ( $p=0.096$ ).

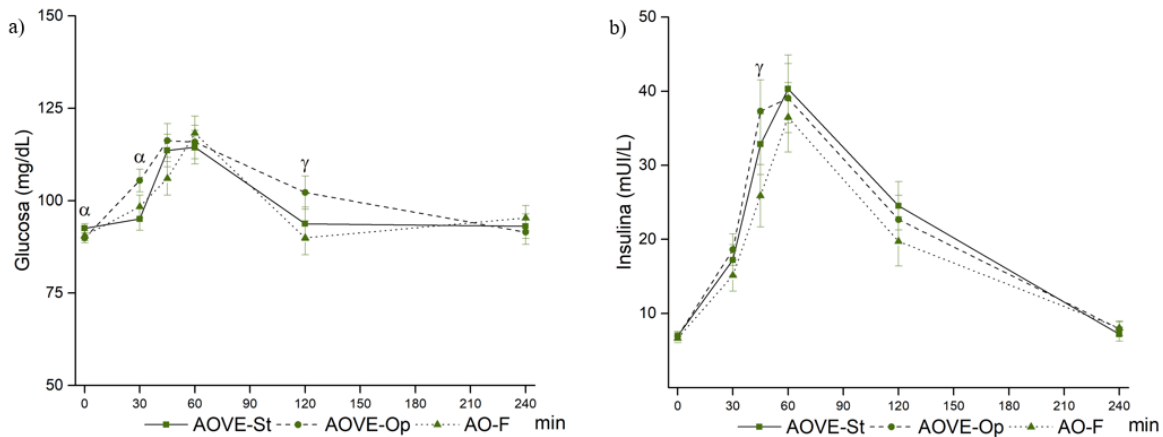
**Tabla 18.** iAUC postprandial de glucosa, insulina y hormonas gastrointestinales en plasma, índice de Matsuda de sensibilidad a la insulina e INSI después de la ingesta de una dosis única de tres aceites de oliva con distinta cantidad de compuestos bioactivos.

	<b>AOVE-St</b>	<b>AOVE-Op</b>	<b>AO-F</b>
Glucosa, (mg/dL·min)	2213±1069 <sup>a</sup>	3213±1068 <sup>b</sup>	2605±1071 <sup>ab</sup>
Insulina, (mUI/L·min)	3546±564 <sup>a</sup>	3191±572 <sup>ab</sup>	2837±578 <sup>b</sup>
GIP (pg/mL·min)	57371±5748	48625±5729	55689±6041
GLP-1, (pg/mL·min)	9062±2844	6864±2842	9672±2833
Grelina, (pg/mL·min)	8419±1967	10654±2082	9845±2150
PP, (pg/mL·min)	19971±3870	19443±3869	24045±4128
PYY, (pg/mL·min)	4606±1113	4215±1220	5933±1079
Índice de Matsuda	9.12±1.25 <sup>a</sup>	10.64±1.31 <sup>ab</sup>	11.60±1.29 <sup>b</sup>
INSI	0.195±0.284	0.875±0.281	0.802±0.333

Los valores indican medias ajustadas  $\pm$  SEM. Todos los voluntarios ingirieron los tres tipos de aceites,  $n=18$  para AOVE-St y AOVE-Op y  $n=17$  para AO-F. En ayunas, los voluntarios ingirieron 30 mL del aceite de oliva correspondiente (AOVE-St, AOVE-Op, AO-F), una pieza de pan estándar (80 g) y un vaso de agua (200 mL). Se utilizó un LMM para comparar entre grupos de intervención. Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas entre grupos (<sup>a,b</sup>).  $p<0.05$  se consideró significativo. AO-F, aceite de oliva funcional; AOVE-Op, aceite de oliva virgen optimizado; AOVE-St, aceite de oliva virgen estándar; GIP, polipéptido inhibidor gástrico; GLP-1, péptido 1 similar al glucagón; iAUC, área incremental bajo la curva; INSI, índice insulinogénico; LMM, modelo lineal mixto; PP, polipéptido pancreático; PYY, péptido YY; SEM, error estándar de la media.

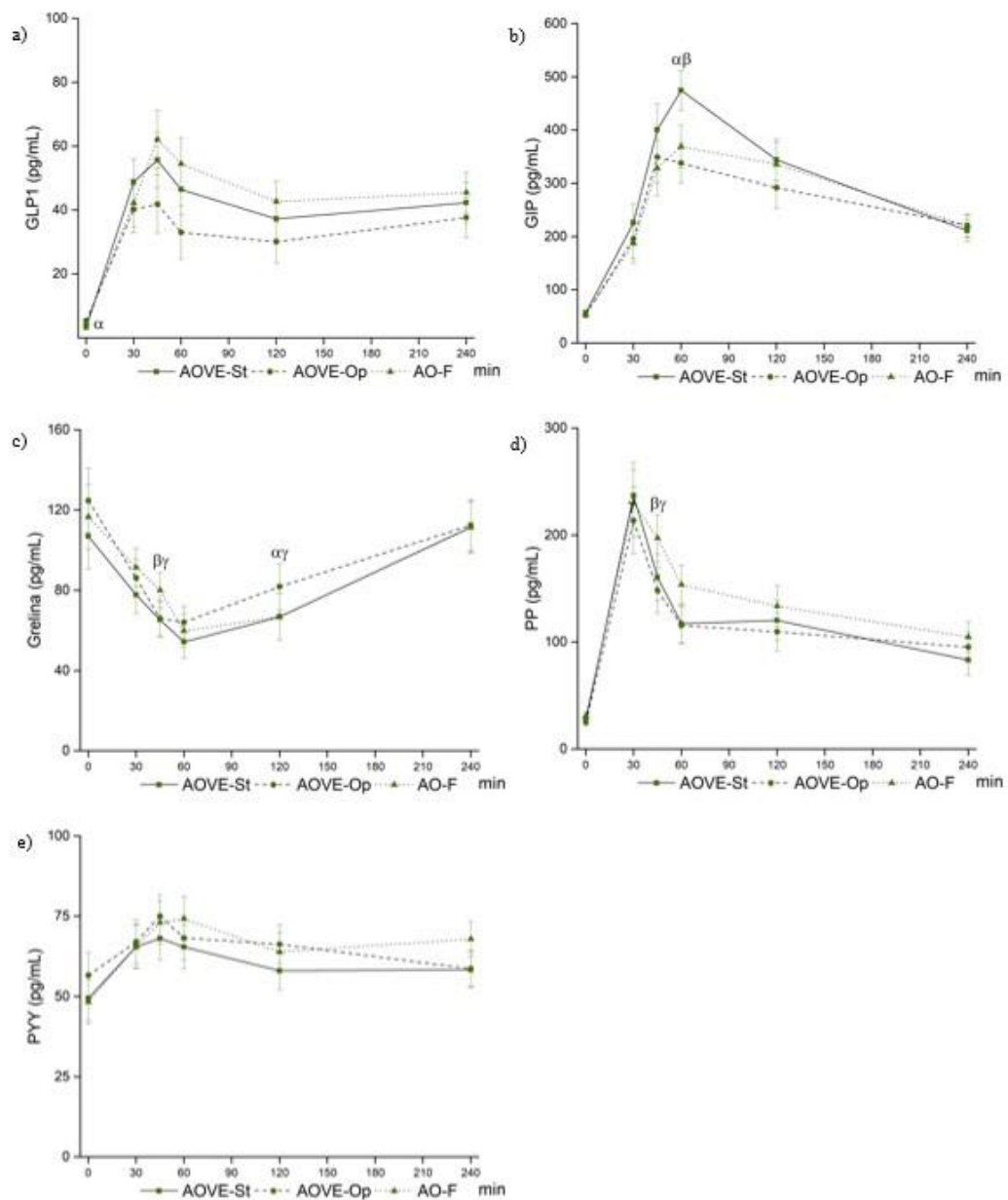
La Figura 25 representa las concentraciones plasmáticas posprandiales de glucosa e insulina. La concentración de glucosa plasmática fue menor en ayunas antes de la ingesta del AOVE-Op en comparación el AOVE-St ( $p=0.017$ ). A los 30 min la glucosa plasmática fue mayor después de consumir el AOVE-Op en comparación con el AOVE-St ( $p=0.017$ ).

A los 120 min la glucosa fue menor tras el consumo de AO-F en comparación con AOVE-Op ( $p=0.014$ ) (Figura 25a). La concentración de insulina plasmática fue mayor 45 min después de consumir AOVE-Op en comparación con el AO-F ( $p=0.023$ ) (Figura 25b).



**Figura 25.** Evolución de las concentraciones posprandiales (desde tiempo 0 hasta los 240 min) de glucosa (a) e insulina (b) tras la ingesta de tres AOV con diferente contenido de compuestos bioactivos. Los valores indican medias ajustadas  $\pm$  SEM. Todos los voluntarios ingirieron los tres tipos de aceites,  $n=18$  para AOVE-St y AOVE-Op y  $n=17$  para AO-F. En ayunas, los voluntarios ingirieron 30 mL del aceite de oliva correspondiente (AOVE-St, AOVE-Op o AO-F) en una sola dosis con una pieza de pan estándar (80 g) y un vaso de agua (200 mL). Se utilizó un LMM para comparar entre grupos de intervención.  $\alpha$  muestra diferencias significativas entre las intervenciones AOVE-St y AOVE-Op.  $\beta$  muestra diferencias significativas entre las intervenciones AOVE-St y AO-F y  $\gamma$  muestra diferencias significativas entre las intervenciones AOVE-St y AO-F. Un valor de  $p<0.05$  se consideró significativo. AO-F, aceite de oliva funcional; AOVE-Op, aceite de oliva virgen optimizado; AOVE-St, aceite de oliva virgen estándar; SEM, error estándar de la media.

La Figura 26 muestra la evolución posprandial de las concentraciones plasmáticas de GLP-1, GIP, grelina, PP y PYY tras la ingesta de los tres aceites de oliva. El GLP-1 plasmático fue menor en ayunas en los voluntarios antes de la ingesta de AOVE-St en comparación con el AOVE-Op ( $p=0.011$ ) (Figura 26a). El GIP fue mayor 60 min después de la ingesta de AOVE-St en comparación con AOVE-OP y AO-F ( $p=0.004$  y  $p=0.029$ , respectivamente) (Figura 26b). La acumulación de grelina en plasma fue mayor 45 min después del consumo de AO-F en comparación con AOVE-St y AOVE-Op ( $p=0.015$  y  $p=0.021$ , respectivamente), mientras que a los 120 min la grelina plasmática fue mayor después de la ingesta de AOVE-Op en comparación con AOVE-St y AO-F ( $p=0.026$  y  $p=0.025$ , respectivamente) (Figura 26c). Después del consumo de AO-F, la concentración del PP en plasma fue mayor que tras el consumo de AOVE-St a los 60 min ( $p=0.032$ ), y en comparación con el AOVE-OP a los 45 y 60 min ( $p=0.022$  y  $p=0.026$ , respectivamente) (Figura 26d). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de PYY después del consumo de los tres tipos de aceites de oliva (Figura 26e).



**Figura 26.** Evolución de las concentraciones plasmáticas posprandiales (desde tiempo 0 hasta los 240 min) de hormonas gastrointestinales: GIP (a); GLP-1 (b); grelina (c); PP (e) y PYY (f). Los valores se expresan como medias ajustadas  $\pm$  SEM. Todos los voluntarios ingirieron los tres tipos de aceites,  $n=18$  para AOVE-St y AOVE-Op y  $n=17$  para AO-F. Los voluntarios ingirieron 30 mL del aceite de oliva correspondiente (AOVE-St, AOVE-Op o AO-F) en una sola dosis con una pieza de pan estándar (80 g) y un vaso de agua (200 mL). Se utilizó LMM para comparar entre grupos de intervención:  $\alpha$  muestra diferencias significativas entre las intervenciones AOVE-St y AOVE-Op.  $\beta$  muestra diferencias significativas entre las intervenciones AOVE-St y AO-F y  $\gamma$  muestra diferencias significativas entre las intervenciones AOVE-Op y AO-F. El valor de  $p<0.05$  se consideró significativo. AO-F, aceite de oliva virgen funcional; AOVE-Op, aceite de oliva virgen optimizado; AOVE-St, aceite de oliva virgen estándar; GIP, polipéptido inhibidor gástrico; GLP-1, péptido 1 similar al glucagón; PP, polipéptido pancreático; PYY, péptido YY; SEM, error estándar de la media.



## DISCUSIÓN





## Discusión

### ***Efecto de un aceite de oliva enriquecido en extractos de la aceituna sobre la hipertensión y el riesgo cardiovascular en ratas genéticamente hipertensas***

El AOV es la principal fuente grasa de la dieta mediterránea. Se ha descrito que la adherencia a esta dieta podría contribuir a la prevención de la hipertensión relacionada con la edad (Núñez-Córdoba *et al.*, 2009). El estudio PREDIMED confirmó valores más bajos de la PAD en individuos que consumían una dieta mediterránea rica en AOV, en comparación con sujetos que consumían una dieta baja en grasas (Toledo *et al.*, 2013). El principal hallazgo del presente estudio es que el tratamiento diario durante 8 semanas con 1 mL de un aceite de oliva enriquecido con extractos ricos en compuestos bioactivos obtenidos de los frutos y hojas del olivo, y que contenían 749.9 mg/kg de polifenoles disueltos en el aceite y 292.6 mg/kg de ácidos triterpénicos en suspensión, reduce la PAS y las concentraciones de péptidos vasoactivos, angiotensina II en plasma y endotelina-1 en orina, así como los nitritos en orina, en un modelo experimental de ratas genéticamente hipertensas. El efecto beneficioso sobre estos biomarcadores también se encontró tras el tratamiento con un aceite de oliva que contenía una baja cantidad de compuestos fenólicos (17.6 mg/kg) y ácidos triterpénicos (8.5 mg/kg), pero no se vio reflejado en una mejora de la PAS durante el periodo de tratamiento. Por otro lado, nuestros datos muestran beneficios adicionales derivados de esta mejora de la PAS, como una menor hipertrofia cardíaca tras las 8 semanas de tratamiento, y la mejora del funcionamiento endotelial *ex vivo* de las aortas de las ratas tratadas con el aceite enriquecido.

Otros estudios han demostrado un efecto similar del consumo continuado durante al menos dos semanas de una dieta enriquecida con AOV, que evitó el aumento de la PAS en ratas SHR más jóvenes sin afectar a la hipertrofia cardíaca (Villarejo *et al.*, 2015). En nuestro estudio, el efecto antihipertensivo no se confirmó después del tratamiento con el aceite control, lo que indica que el efecto puede estar relacionado con la mayor presencia de los compuestos bioactivos presentes en los extractos añadidos. En 2016, un estudio evaluó los efectos del consumo crónico durante cinco semanas de una mezcla de compuestos derivados de la hoja de olivo rica en oleuropeína (15% p/p), ácidos triterpénicos (10% p/p) e hidroxitirosol (1% p/p) sobre la presión arterial, la función endotelial y el estado oxidativo e inflamatorio en este mismo modelo de ratas hipertensas. Concretamente, el trabajo muestra que después de dos semanas de tratamiento disminuyó la presión arterial en los animales, y tras las cinco semanas de tratamiento lo hizo la hipertrofia cardíaca y la



actividad nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH) en células adventicias mediales y endoteliales de la aorta, por lo que los autores concluyeron que la mezcla optimizada de compuestos derivados de la hoja de olivo enriquecido con oleuropeína, ácidos triterpénicos e hidroxitirosol tiene efectos beneficiosos sobre la hipertensión genética, y que estos beneficios estaban relacionados con la mejora de la función vascular derivada de un menor estado prooxidativo y proinflamatorio, gracias a una reducción de la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) en los animales (Romero *et al.*, 2016). Estudios clínicos posteriores, realizados en sujetos sanos han mostrado una disminución de la PAS y PAD después de seis semanas de tratamiento diario con un suplemento líquido que contenía 136 mg de oleuropeína y 6 mg de hidroxitirosol (Lockyer *et al.*, 2017).

Al contrario que otros aceites dietéticos, diferentes estudios en humanos y animales han demostrado la eficacia del consumo de AOV para reducir la presión arterial, un efecto que no sólo está mediado por el contenido de ácido oleico, sino también por sus componentes bioactivos minoritarios, principalmente polifenoles (Lopez *et al.*, 2016; Peyrolet *et al.*, 2017), y también ácidos triterpénicos (Valero-Muñoz *et al.*, 2014). Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos exactos que permitan explicar el efecto antihipertensivo de los componentes del AOV. Por este motivo, se necesitan más estudios para estudiar la base biológica y molecular de dichos efectos beneficiosos.

La disfunción endotelial es un evento central y crítico en el desarrollo de la hipertensión y está controlada por varios péptidos vasoactivos. Entre ellos, la angiotensina II y la endotelina-1 contribuyen activamente a la patogénesis de esta enfermedad y sus complicaciones (Schiffrrin, 2005). La presencia sostenida de antagonistas del receptor de angiotensina II tipo 1 previene y atenúa el desarrollo de hipertensión, la hipertrofia cardíaca, el estrés oxidativo y el consecuente daño renal en las ratas SHR (Chamorro *et al.*, 2004). Además, como se ha comentado previamente, la hipertensión se asocia con una menor producción de óxido nítrico y una menor biodisponibilidad de esta molécula (Oliveira-Paula *et al.*, 2019). Los aniones inorgánicos nitrito y nitrato son productos finales del metabolismo del óxido nítrico, que se produce por la vía endógena de la L-arginina/NOS, y también provienen de la dieta. Estudios recientes demuestran que dichos aniones se reciclan fisiológicamente en la sangre y los tejidos para formar óxido nítrico y otros óxidos de nitrógeno bioactivos, y por lo tanto, deberían considerarse como moléculas de almacenamiento de bioactividad similar al óxido nítrico, que complementa la vía dependiente de la NOS. La bioactivación del nitrato procedente de la dieta o de algunas fuentes endógenas requiere su reducción inicial a nitrito principalmente por bacterias comensales que habitan en el tracto gastrointestinal. Posteriormente, en el organismo se reduce el nitrito a óxido nítrico bioactivo, para lo que puede intervenir la hemoglobina, la

mioglobina, la xantina oxidorreductasa, el ascorbato, los polifenoles y los protones. De esta manera se complementa la producción de óxido nítrico en situaciones en las que las actividades de las enzimas NOS están comprometidas (Lundberg *et al.*, 2008). Un número creciente de estudios sugiere un potencial terapéutico para el nitrato y el nitrito en enfermedades como el infarto de miocardio, la apoplejía, la hipertensión sistémica y pulmonar y la ulceración gástrica (Lundberg *et al.*, 2008). Las concentraciones plasmáticas de angiotensina II no son mayores en ratas SHR controles comparadas con las sanas, lo que nos podría indicar que la hipertensión en este modelo experimental no está mediada por cambios en la formación de esta molécula.

Nuestros resultados muestran que el AOV, independientemente del contenido de polifenoles, produce una disminución de las concentraciones plasmáticas de angiotensina II y de la secreción de endotelina-1 y nitritos en orina, pero sólo después de la ingesta del aceite enriquecido se consigue en efecto sobre la presión arterial, lo que indica que debe haber otros mecanismos moleculares adicionales implicados en el efecto antihipertensivo inducidos por los componentes minoritarios adicionados. Diversos autores han demostrado que la ingesta de AOV provoca cambios en la actividad de la angiotensinasa sérica en animales (Ramírez-Expósito *et al.*, 2001) y humanos (Williams *et al.*, 1987). Además, el extracto acuoso de hojas de *Olea europea* se ha asociado con la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*, y concretamente las agliconas de secoiridoides del tipo oleósido poseen actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina generalmente (Hansen *et al.*, 1996).

Las concentraciones plasmáticas más bajas de angiotensina II observadas después de la administración del aceite de oliva enriquecido y del control pueden contribuir a la disminución de la presión arterial descrita. Martín-Peláez *et al.*, demostraron que la suplementación con 25 mL/d de un AOV que contenía 366 mg/kg de compuestos fenólicos modula la expresión de algunos de los genes relacionados con el sistema renina-angiotensina-aldosterona, y propusieron un posible mecanismo subyacente para esta disminución de la PAS. Los autores mencionan que los inhibidores farmacológicos de la enzima convertidora de angiotensina reducen pasivamente la rigidez arterial a través de la reducción de la presión arterial, así como mediante la promoción de cambios estructurales en la propia pared arterial. Por tanto, la disminución de esta actividad enzimática podría ser un mecanismo que participe en la disminución de la PAS observada. Estos autores sugieren que la influencia sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona a nivel de angiotensina II podría estar mediado por la disminución en la expresión del gen *IL8RA* (Martín-Peláez *et al.*, 2017). Sin embargo, son necesarios más estudios para identificar los mecanismos de acción que median este efecto antihipertensivo de los componentes del aceite de oliva.

Por otra parte, la reducción del óxido nítrico sérico y el aumento de endotelina-1 juegan un rol fundamental en la disfunción endotelial y por tanto en la hipertensión. Se ha intentado evaluar el efecto del AOV sobre dicho mecanismo. En un trabajo previo del estudio clínico PREDIMED (Storniolo *et al.*, 2017), se seleccionó una submuestra de mujeres no fumadoras con hipertensión moderada que tomaron distintas dietas durante 1 año: una dieta mediterránea suplementada con AOV, una dieta mediterránea suplementada con frutos secos y una dieta control baja en grasas (30 participantes por grupo). Los hallazgos mostraron una reducción de la PAD tras la ingesta de dieta mediterránea en ambos grupos, y específicamente se observó una correlación negativa en la concentración de metabolitos derivados del óxido nítrico y la PAS y PAD tras la intervención con dieta mediterránea suplementada con AOV. En dichas voluntarias se produjo un aumento de la expresión de eNOS tras el consumo del AOV y también se observó una disminución de la presión arterial que se relacionó con la disminución de las concentraciones séricas de endotelina-1 y de su expresión génica tras el consumo de este aceite. Dichos resultados sugirieron que los polifenoles del AOV están implicados en la protección del endotelio mediante la modificación de diferentes mecanismos relacionados con el metabolismo del óxido nítrico y de la secreción de endotelina-1 (Storniolo *et al.*, 2017). Nuestros datos coinciden con los presentados en este estudio y con otros que han demostrado que el consumo de AOV rico en polifenoles disminuye la endotelina-1 tanto *in vivo* como *in vitro* (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2018). Este hecho podría explicarse como un proceso similar a lo que ocurre tras la administración de inhibidores de la angiotensina II como el losartán, que reducen la endotelina urinaria en la corteza renal de las ratas SHR (Chamorro *et al.*, 2004), o con enalapril, que disminuye las concentraciones plasmáticas de endotelina (Duarte *et al.*, 2002).

Los mecanismos por los cuales los compuestos fenólicos influyen en la expresión génica no se comprenden completamente, pero posiblemente los compuestos fenólicos del AOV podrían interactuar con las cascadas de señalización celular, regulando la actividad de factores de transcripción y, en consecuencia, afectando la expresión de algunos genes (Martín-Peláez *et al.*, 2017). Además, es posible que la modificación de la secreción de endotelina-1 esté implicada en el aumento del aclaramiento de creatinina producido por el AOE, ya que varios autores han sugerido que la endotelina derivada del riñón ejerce efectos locales considerables, disminuyendo la tasa de filtración glomerular y el flujo sanguíneo renal (Karam *et al.*, 1996).

Otros mecanismos pueden estar detrás de las diferencias observadas entre los dos tratamientos. Dado que la disfunción endotelial es una enfermedad vascular subyacente de la aorta, y que el óxido nítrico es el factor principal que explica la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina, por tanto, la medida de la vasodilatación inducida por acetilcolina nos indica la

bioactividad de óxido nítrico inducida por agonistas. En este sentido, Romero *et al.* demostraron que el tratamiento con oleuropeína mejora las respuestas alteradas a la acetilcolina observadas *ex vivo* en las aortas de ratas genéticamente hipertensas, sugiriendo un mecanismo de acción mediado por el aumento de la bioactividad del óxido nítrico inducida por agonistas que podría mediar la mejora de la disfunción endotelial, la inflamación vascular, el estrés oxidativo vascular, la hipertrofia cardíaca y renal y la hipertensión (Romero *et al.*, 2016). De igual manera, nuestros resultados muestran que el aceite enriquecido mejoró las respuestas activadas por acetilcolina *ex vivo* de las aortas aisladas de las ratas hipertensas, lo que confirma el papel protector en la bioactividad del óxido nítrico inducida por agonistas, previamente descrito.

En nuestro estudio, la vasoconstricción inducida por acetilcolina *ex vivo* no se vio afectada por el aceite enriquecido, lo que sugiere que la reducción en la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores procedentes del endotelio, como el tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) no son responsables del efecto sobre la presión arterial inducido en este modelo. Sin embargo, la respuesta relajante al nitroprusiato aumentó en las aortas del grupo suplementado con este aceite enriquecido *ex vivo*. Este mecanismo no se suele observar con los agentes antihipertensivos, y sugiere que el AOE podría inducir una mayor sensibilidad al óxido nítrico que conduce a una mejor función endotelial y al efecto antihipertensivo observado *in vivo*.

El modelo SHR se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo microvascular, y se cree que el aumento de la producción de aniones superóxido contribuye al desarrollo de la hipertensión en estas ratas (Suzukiet *al.*, 1995). De hecho, se ha comprobado que la reducción de los aniones superóxido, utilizando aloxantina, un inhibidor de la xantina oxidasa (Miyamoto *et al.*, 1996), o con superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZn) (Suzukiet *al.*, 1995) disminuye la presión arterial en ratas SHR. Los tratamientos antihipertensivos suelen ir acompañados de una reducción del estrés oxidativo en las ratas SHR (Chamorro *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2016). Las propiedades antioxidantes de los polifenoles del AOV se han demostrado *in vitro* (Franco *et al.*, 2014), en modelos experimentales (Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018) y en ensayos clínicos (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2019; Yubero-Serrano *et al.*, 2019). Un metaanálisis reciente, ha concluido que un aceite de oliva que contenga al menos 56 mg de polifenoles/L puede ser suficiente para disminuir la formación de 8-OH-dG procedente de la oxidación de las bases púricas en humanos (Tsartsou *et al.*, 2019). De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran que la excreción urinaria de 8-OH-dG fue menor después de la suplementación con el aceite enriquecido en polifenoles y triterpenos presentes en los extractos de las aceitunas y hojas de olivo, pero no después de la ingesta del aceite control, que contiene sólo 17,6 mg/kg de compuestos fenólicos y 8.5 mg/kg de triterpenos.

Estos datos coinciden con la reducción del estrés oxidativo producido por un extracto de hoja de olivo rico en oleuropeína en ratas con DM2 e hipertensión renal simultánea (Nekooeian *et al.*, 2014), y en ratas alimentadas con una dieta rica en carbohidratos y grasa (Poudyal *et al.*, 2010). El hidroxitirosol y/o la oleuropeína están presentes en el AOE y pueden ser los responsables de este efecto antioxidante del aceite, como se ha descrito previamente (Villarejo *et al.*, 2015). Además, los efectos antioxidantes del aceite rico en polifenoles podrían verse influenciados por la reducción de las concentraciones plasmáticas de angiotensina II, ya que la angiotensina II induce la activación de la NADPH (Oskarsson y Heistad., 1997; Wind *et al.*, 2010) y su bloqueo puede reducir el estrés oxidativo (Chamorro *et al.*, 2004).

De acuerdo con estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación en humanos sanos suplementados con un aceite de oliva rico en compuestos fenólicos y enriquecido con ácidos triterpénicos (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2019), no encontramos efectos de los tratamientos con ninguno de los aceites sobre los F<sub>2</sub>-isoprostanos como biomarcadores de la oxidación de lípidos. Este resultado también coincide con un sub-estudio del PREDIMED, en el cual no se detectó cambios en la actividad antioxidante total en suero ni en los niveles de malondialdehído en ninguna intervención después de 1 año de seguimiento (Storniolo *et al.*, 2017). Sin embargo, otro sub-estudio del PREDIMED en una población de sujetos con síndrome metabólico confirmó una disminución de F<sub>2</sub>-isoprostanos y de 8-OH-d en orina, mostrando un efecto protector sobre la oxidación de lípidos y ácidos nucleicos, respectivamente, tras la ingesta de dieta mediterránea suplementada con AOV durante un año (Mitjavila *et al.*, 2013). Por lo tanto, no podemos excluir la posibilidad de que una suplementación más prolongada con el aceite de oliva pudiera ser beneficiosa para prevenir la oxidación de lípidos de las membranas, o en situaciones donde el estrés oxidativo se encuentra elevado.

Curiosamente, en el presente estudio observamos concentraciones plasmáticas más altas de biomarcadores oxidativos e inflamatorios en los animales sanos de forma consistente. Sin embargo, hasta la fecha, no hemos encontrado ningún estudio que describa las diferencias en el estado oxidativo e inflamatorio en este modelo de ratas genéticamente hipertensas respecto a las ratas WKR sanas, por lo que no podemos justificar nuestros resultados. Los datos obtenidos permiten evaluar únicamente los efectos de la suplementación respecto al desarrollo de la enfermedad, lo que parece indicar que este modelo animal no es el más adecuado para valorar los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los alimentos, e incluso de los fármacos. Los efectos antiinflamatorios del AOV se han descrito previamente (Casaset *et al.*, 2017; Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2019; Tsartsou *et al.*, 2019). Una revisión sistemática confirmó que el consumo prolongado de AOV puede reducir las

concentraciones plasmáticas de IL-6 y TNF- $\alpha$  cuando se asocia con la dieta mediterránea y con un estilo de vida saludable (Yarla *et al.*, 2017). Sin embargo, en el presente trabajo no observamos ningún efecto de los tratamientos con los aceites experimentales sobre los biomarcadores inflamatorios plasmáticos, lo indica que no es efectivo o que sería necesario un tratamiento más prolongado para observar algún efecto. Por lo tanto, se necesitan más estudios para evaluar los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los AOV enriquecidos, así como su posible implicación en la modulación de la hipertensión arterial en otros modelos animales experimentales y en ensayos clínicos en humanos.

Por otro lado, no existe un claro consenso sobre el efecto del AOV sobre las concentraciones de colesterol total en sangre. Nuestros datos muestran que el colesterol total se redujo en las ratas hipertensas después del tratamiento con el aceite enriquecido, lo que indica un posible efecto hipocolesterolémico del mismo, aunque esta disminución no está asociada a ninguna lipoproteína en particular. De acuerdo con nuestros resultados, Tsartsou *et al.* (2019) han descrito una disminución del colesterol total cuando se sustituyen las grasas saturadas de la dieta con AOV, lo que contribuía también a proteger los lípidos del estrés oxidativo y ejercía un impacto beneficioso sobre el metabolismo de la glucosa, los triacilglicerolos y el colesterol LDL en plasma, además de un aumento del colesterol HDL y la mejora del estado antioxidante e inflamatorio de los sujetos que se adhieren a un patrón de dieta mediterránea suplementada con AOV, y confirma el efecto funcional del aceite enriquecido con los extractos (Tsartsou *et al.*, 2019). Otros autores también han demostrado esta disminución del colesterol total y de la PAS tras la ingesta de aceite de oliva en ratas SHR (Hidalgo *et al.*, 2018).

Finalmente, además de los beneficios a nivel cardiometabólico, los compuestos fenólicos del AOV también están asociados con la salud intestinal, ya que estimulan una mayor biodiversidad de bacterias intestinales beneficiosas, mejorando su equilibrio (Marcelino *et al.*, 2019). La capacidad del AOVE de actuar como prebiótico estimulando el crecimiento de las bacterias beneficiosas, y como antibacteriano suprimiendo el crecimiento de las bacterias patógenas, es probablemente atribuible a los componentes bioactivos que contiene. Recientemente, están apareciendo datos que demuestran que los beneficios del AOVE para la salud pueden extenderse también a la microbiota intestinal. En 2021, una revisión ha examinado el impacto del AOVE sobre la microbiota intestinal y la salud del intestino, y cómo las variaciones en la composición de la microbiota intestinal, la producción de productos microbianos, y la actividad del sistema inmunitario de la mucosa pueden influir en los resultados favorables atribuidos al AOVE sobre la salud cardiovascular (Millman *et al.*, 2021).

Un ensayo aleatorio, controlado, doble ciego y cruzado, que incluía a 12 pacientes con hipercolesterolemia, demostró que la ingesta de 25 mL/día durante 3 semanas de un aceite de oliva que contenía 500 mg de compuestos fenólicos/kg (obtenido mediante la mezcla de aceite de oliva virgen y tomillo) aumentaba significativamente los niveles de *Bifidobacterias* en comparación con los niveles de los participantes que sólo consumían 80 mg de compuestos fenólicos/kg de aceite (Martín-Peláez *et al.*, 2015). En roedores, el consumo de AOVE aumentó la  $\alpha$ -diversidad, una medida de la riqueza de especies, así como la  $\beta$ -diversidad, una medida de las diferencias de composición entre las muestras, en comparación con los animales que no lo consumían (Millman *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2019). Estos resultados se asocian con efectos favorables para la salud metabólica, ya que la reducción de la diversidad microbiana se asocia con un aumento de la inflamación crónica y el posterior desarrollo de enfermedades metabólicas (van den Munckhof *et al.*, 2018). El consumo de AOV se ha relacionado con el aumento del género *Clostridium XIVa*, uno de los principales grupos de anaerobios del intestino responsable de la producción de butirato. El butirato, un ácido graso de cadena corta, es uno de los principales metabolitos formados por la microbiota intestinal que juega un papel importante en la reducción del colesterol total y tiene actividad antiinflamatoria (Hidalgo *et al.*, 2018).

Aunque en nuestro estudio los ácidos triterpénicos incorporados al aceite enriquecido, concretamente ácido maslínico y ácido oleanólico, se encontraban en suspensión y por lo tanto no se absorbieron eficazmente, estos compuestos estaban presentes en el aceite enriquecido administrado, y podían ejercer un efecto sobre la microbiota intestinal, y así indirectamente contribuir al efecto antihipertensivo observado. Existe evidencia científica que confirma los efectos beneficiosos de ácidos triterpénicos como el oleanólico sobre la microbiota, optimizándola y modificando la función inmunológica de las células epiteliales intestinales, lo que podría mejorar el estado de salud intestinal (Xue *et al.*, 2022). En nuestro estudio, los ácidos triterpénicos, pudieron tener un efecto directo, al menos en parte, sobre la microbiota, sin embargo, esto no ha podido ser confirmado ya que una limitación de nuestro estudio fue que no pudimos recoger muestras de heces de las ratas bajo estudio. En la actualidad, las investigaciones sobre los mecanismos por los que el AOVE puede modular la microbiota intestinal, y como los productos producidos por la microbiota influyen en la salud cardiovascular y metabólica sigue siendo un área de investigación relativamente inexplorada con interesantes perspectivas (Millman *et al.*, 2021).

Asumiendo que las ratas consuman aproximadamente 70 kcal/día, y que aproximadamente una dieta equilibrada en humanos debe aportar 2000 kcal/día, la dosis de aceite de oliva administrada en ratas (1 mL/d) es comparable a una ingesta de aceite de oliva de aproximadamente 26 ml/d lo cual

está dentro de las recomendaciones de ingesta calórica (Guasch-Ferré *et al.*, 2014), y coincide con las recomendaciones nutricionales de la EFSA, que indican que la ingesta de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (oleuropeína y tirosol), contenidos en 20 mL de AOV, proporcionan beneficios sobre la salud cardiovascular (EFSA, 2011). Aunque los resultados obtenidos en nuestro modelo animal son prometedores, se necesitan ensayos clínicos para confirmar este efecto en humanos, particularmente en sujetos pre-hipertensos e hipertensos.

### ***Efecto de un aceite de oliva enriquecido en extractos de la aceituna sobre los cambios metabólicos en de ratas genéticamente hipertensas***

Para mejorar nuestra comprensión sobre el papel que desempeña la dieta en la configuración de los perfiles metabólicos, es importante considerar las influencias dietéticas agudas y crónicas que contribuyen a la variación normal en los perfiles metabólicos (Walsh *et al.*, 2007). Los resultados de los análisis univariados y multivariados nos han permitido seleccionar una lista de metabolitos de interés que resultaron significativos y que nos permiten distinguir entre los modelos aplicados. Se identificaron 12 metabolitos (M1-M6 en orina y M7-M12 en plasma) algunos de los cuales pertenecen a rutas metabólicas que están afectadas de manera diferencial en ratas SHR tratadas con respecto a los controles sanos. El perfil metabólico en orina en los grupos tratados con AOC mostro mayores cantidades de enterolactona e isoflavonas comparados con los animales SHR y tratados con AOE. El perfil metabólico plasmático del grupo tratado con AOE mostró mayores cantidades de glicerofosfolípidos y lisofosfolípidos que en los demás grupos.

El metabolito M1, anotado como glucurónico 2-feniletanol, mostró una regulación significativamente mayor en las orinas de los grupos AOE y AOC. La conjugación metabólica de los polifenoles de la aceituna implica principalmente glucurónidos y sulfatos. El metabolismo de los polifenoles del olivo comienza en los enterocitos y continua en el hígado. La fase metabólica I consiste principalmente en la hidrólisis de oleuropeína lo que resulta en un aumento del contenido de hidroxitirosol. Las reacciones metabólicas de la fase II implican la conjugación de los grupos glucurónido y sulfato (Galmés *et al.*, 2021). La oleuropeína y su glucósido son las principales fuentes del hidroxitirosol, molécula con una fuerte actividad antioxidante. La biodisponibilidad del hidroxitirosol es escasa debido al metabolismo de fase I tanto en el intestino como en el hígado, que conduce a la formación de conjugados de sulfato y glucurónido, hasta el punto de que las concentraciones en los fluidos corporales de su forma libre son casi indetectables (Galmés *et al.*,



2021). El glucurónico 2-feniletanol es un compuesto generado en el hígado por la glucuroniltransferasa (HMDB, 2022). Esta molécula también ha sido relacionada con las vías metabólicas de la pentosa y glucuronato, el metabolismo del almidón, la sacarosa y el metabolismo de la tirosina (Sun *et al.*, 2014) y como un biomarcador del metabolismo de la función renal, formado por interconversiones de pentosa y glucuronato, que ha sido identificado en ratas diabéticas (Jiang *et al.*, 2018). Nuestros resultados indican que está presente mayoritariamente en los animales suplementado con el AOE y en menor cantidad en los suplementados con el AOC, lo que confirma que se trata de un metabolito derivado del metabolismo de los polifenoles de la aceituna.

El hidroxitirosol y el tirosol son los alcoholes fenólicos de las aceitunas y sus derivados. Estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, así como ensayos en humanos, han demostrado que estos compuestos están sujetos principalmente a reacciones metabólicas importantes, pero logran llegar al colon y son catabolizados por la microbiota intestinal humana. Sin embargo, sus metabolitos aún no se han descrito completamente (Sakavitsi *et al.*, 2022). Es un hecho que la microbiota intestinal contribuye significativamente al metabolismo de los xenobióticos, transformando cientos de constituyentes de alimentos, productos químicos o productos farmacéuticos en metabolitos con actividad alterada e incluso con cierta toxicidad, y con tiempo de vida dentro del organismo (Koppel *et al.*, 2017). En 2011, un estudio demostró que un tratamiento con glucurónidos de hidroxitirosol ejerce un efecto protector frente al daño oxidativo en las membranas epiteliales tubulares renales, en las que dicho tratamiento inhibía significativamente la formación de malondialdehído, hidroperóxidos de ácidos grasos y 7-cetocolesterol (Deiana *et al.*, 2011).

De forma similar, el M2, anotado como glucurónido de p-cresol, se encontró en mayor cantidad en los grupos AOE y AOC comparado con el grupo SHR, siendo significativamente mayor en el grupo AOE comparado con SHR y con AOC. El glucurónido p-cresol es un metabolito producido por la microbiota intestinal y se genera principalmente como producto final de la biotransformación de la tirosina por bacterias intestinales anaerobias (Rong *et al.*, 2020), como el *Clostridium difficile* presente en el intestino grueso, que se absorbe y posteriormente se conjuga con glucurónido en el hígado antes de la excreción urinaria (Walsh *et al.*, 2007).

Los cambios en la microbiota intestinal conducen al crecimiento excesivo de bacterias específicas productoras de p-cresol (Wang *et al.*, 2021). Por lo tanto, las concentraciones más altas de glucurónido de p-cresol en la orina pueden ser indicadores de cambios en la homeostasis de la microbiota intestinal (Zhang *et al.*, 2012). Nuestro resultado coincide con otro estudio realizado en ratas SHR suplementadas con taurina, en el que los autores describieron un aumento de la excreción urinaria de dos metabolitos que se originan en la microbiota intestinal glucurónido de p-cresol y la

fenilacetilglicina (también presente en nuestros resultados). Estos autores mencionan cambios en estos metabolitos y los relacionan con una menor presión arterial en las ratas hipertensas (Akira *et al.*, 2013), efecto que también ha sido observado en nuestro trabajo. Los conjugados de fenilacetilglicina y p-cresol se generan a partir de fenilacetato y p-cresol, respectivamente, a través del mecanismo de desintoxicación de fase II en el hígado o la mucosa intestinal. El fenilacetato y el p-cresol se producen a partir de la fenilalanina y la tirosina, respectivamente, por la acción de microorganismos comunes como *Clostridium difficile* como se mencionó anteriormente, por lo tanto, los autores mencionan que los aumentos observados en la producción de estos conjugados indican la proliferación de los microorganismos comunes y la activación del metabolismo microbiota intestinal (Akira *et al.*, 2017). El aumento de glucurónido de p-cresol también se ha comprobado en orina de sujetos sanos tras el consumo de una dieta alta en fitoquímicos (Walsh *et al.*, 2007), lo que coincide con el aumento de este metabolito en nuestros grupos de animales tratados con aceite enriquecido en polifenoles comparado con el grupo SHR no tratado.

El metabolito M3, anotado como ácido sebácico, se encuentra en mayor cantidad en los animales del grupo AOE comparado con el AOC. El ácido sebácico es un ácido graso dicarboxílico que forma parte del metabolismo humano y vegetal; su densidad energética es intermedia entre la glucosa y los ácidos grasos. Se ha demostrado que los ácidos dicarboxílicos son seguros tanto en animales de experimentación como en humanos, y recientemente se ha propuesto su uso para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Estudios en animales y humanos con diabetes mellitus tipo 2 han mostrado que la administración oral de ácido sebácico mejora el control glucémico, al mejorar la sensibilidad a la insulina y reducir la gluconeogénesis hepática tanto en humanos como en animales (Iaconelli *et al.*, 2010; Mingrone *et al.*, 2013).

El ácido sebácico también se ha identificado como un biomarcador antifatiga (Chaoyang *et al.*, 2015) y se ha asociado a alteraciones metabólicas relacionadas con la deficiencia de calcio. Además, la disminución de la excreción de ácido sebácico en la orina de ratas sugiere que la deficiencia de calcio podría afectar la  $\omega$ -oxidación de los ácidos grasos en el citosol de las células mediada por el citocromo P450 (Wang *et al.*, 2013). Estos autores indican que una dieta baja en calcio durante tan solo dos semanas podría provocar cambios metabólicos en los niveles de calcio, y consecuentemente niveles reducidos de este metabolito.

Con respecto al metabolito M4, anotado como enterolactona, se observó una regulación significativa al alza en el grupo AOC comparado con el grupo AOE, sin diferencia con el grupo de animales sin suplementar. La enterolactona pertenece a la familia de los lignanos que son compuestos vegetales bioactivos de naturaleza difenólica, con efectos potencialmente favorables

para la salud humana. En el colon, los lignanos se transforman originando enterodiol y enterolactona por las bacterias intestinales, y después pasan a la circulación (Morisset *et al.*, 2009). Los estudios epidemiológicos han demostrado de manera inconsistente que una ingesta elevada de lignanos y absorción de enterolactona están asociados con un menor riesgo de cáncer de mama, próstata y colorrectal, así como un menor riesgo de desarrollar ECV y de mortalidad total y por causas específicas (Hu *et al.*, 2021; Mali *et al.*, 2019). Las inconsistencias pueden deberse a la variación biológica interpersonal respecto a la composición y actividad de la microbiota intestinal que parece ser el factor más crítico que rige la variabilidad interpersonal en la concentración plasmática de este metabolito (Hålldin *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha confirmado que el uso de antibióticos disminuye las concentraciones de enterolactona, lo que sugiere que puede deberse a los cambios en la diversidad del microbioma intestinal (Bolwing *et al.*, 2017). Nuestros resultados muestran mayores cantidades del metabolito plasmático M12, anotado como el antibiótico roxitromicina, en el grupo SHR y AOE, hecho que no podemos explicar ya que durante el periodo experimental los animales no recibieron ningún tratamiento con antibióticos, aunque tampoco podemos descartar que no los ingirieran previamente o que hubiera restos de estas sustancia en la dieta administrada.

La enterolactona y los lignanos también pueden proteger frente a las ECV, además tienen un efecto reductor en el colesterol total y en el colesterol LDL (Peterson *et al.*, 2010). A pesar de que la evidencia científica no esclarece con exactitud el efecto de las pequeñas cantidades de enterolactona y lignanos presentes en las dietas occidentales habituales frente a la reducción de la enfermedad coronaria y la mortalidad por ECV, sí se ha podido confirmar que, en estudios de intervención en donde la ingesta de enterolactona y lignanos es alta, se han asociado con la protección cardiovascular (Peterson *et al.*, 2010).

Otros dos metabolitos diferenciados mayoritariamente en los animales suplementados con el AOC comparado con AOE son la daidzeína (M5), y la gliciteína (M6), ambos pertenecientes a la familia de las isoflavonas, fitoestrógenos con potente actividad estrogénica. Los fitoestrógenos tienen una estructura similar a la hormona femenina humana 17- $\beta$ -estradiol, que puede unirse a los receptores de estrógeno alfa y beta, mimetizando la acción de los estrógenos en los órganos objetivos, por lo que confieren muchos beneficios para la salud cuando se utilizan en algunas enfermedades dependientes de hormonas (Vitale *et al.*, 2013). Diversos estudios clínicos confirman los beneficios de la daidzeína en la quimioprevención del cáncer de mama y de próstata, las ECV y la osteoporosis, así como en el alivio de los síntomas posmenopáusicos en las mujeres (Vitale *et al.*, 2013).

Las isoflavonas parecen tener la capacidad para restaurar la función endotelial, y sus efectos son variables dependiendo de los individuos y su variabilidad metabólica, en particular de la capacidad interpersonal para convertir daidzeína en equol, un metabolito microbiano producido entre un 33-50% de la población mediante la microbiota intestinal (Gil-Izquierdo *et al.*, 2012). La producción de equol se ha relacionado con una disminución de la rigidez arterial y efectos antiateroscleróticos a través de la producción de óxido nítrico (Gil-Izquierdo *et al.*, 2012), mecanismos que podrían explicar los efectos hipotensores y protectores del daño endotelial observados en los animales suplementados con el AOE. Se han realizado estudios metabolómicos centrando la atención al perfil urinario antes y después del consumo de alimentos funcionales enriquecidos en extractos de soja, y los resultados han mostrado una separación entre grupos (antes y después de la ingesta de isoflavonas). Este hecho sugiere un cambio en el perfil metabolómico urinario alterado tras la ingesta de isoflavonas. Sin embargo, aún no se han encontrado marcadores que indiquen una influencia directa del consumo de este tipo de alimentos funcionales sobre alguna vía o mecanismo cardiovascular. No obstante, dos estudios metabolómicos sugieren diferencias en los perfiles de lipoproteínas plasmáticas, aminoácidos y carbohidratos después de una ingesta dietética rica en isoflavonas, y sugiere una inhibición de la glucólisis y un cambio general en el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos (Solanky *et al.*, 2003; Solanky *et al.*, 2005). La gliciteína es una isoflavona un poco menos estudiada, debido a que es el fitoestrógeno menos abundante que se encuentra en alimentos derivados de la soja, la fuente más rica de isoflavonas (Danciu *et al.*, 2018). No obstante, diferentes estudios muestran efectos terapéuticos de la gliciteína como antioxidante (Rüfer *et al.*, 2006), agente hipocolesterolémico (Sung *et al.*, 2004), antitumoral (Zhang *et al.*, 2015) y por su actividad antiinflamatoria (Park *et al.*, 2007).

Respecto al perfil metabolómico plasmático los metabolitos M7-M10, anotados como fenilacetilglicina, lisofosfatidiletanolaminas, glicerolípidos y lisofosfolípidos, respectivamente, fueron mayores en el grupo AOE con respecto al grupo SHR no tratado. Las lisofosfatidiletanolaminas y otros lisofosfolípidos encontrados contenían C18:1, procedente del aceite de oliva. Estas moléculas son un tipo de monoglicerofosfolípidos precursores para la biosíntesis de otros lípidos en las células. En condiciones normales, sus concentraciones intracelulares son bajas, pero abundan en el entorno extracelular, como el plasma y los fluidos intersticiales. Los lisofosfolípidos se unen a proteínas y a las lipoproteínas para ser transportados (Tan *et al.*, 2020). Estos lípidos tienen propiedades antihemostáticas, inhiben la agregación plaquetaria y estimulan la secreción de óxido nítrico por las células endoteliales, regulando los procesos inflamatorios y trombóticos, es decir dependiendo de su estructura química y del contexto

bioquímico pueden producir efectos proinflamatorios o antiinflamatorios (Tan *et al.*, 2020). La fosfatidiletanolamina es el segundo glicerofosfolípido (LPE 18:1) más abundante en las células eucariotas, tiene diversas funciones celulares, que incluyen servir como precursor de la fosfatidilcolina y sustrato para importantes modificaciones postraduccionales, que influyen en la topología de la membrana, y promueven la fusión de membranas y orgánulos, la fosforilación oxidativa, la biogénesis mitocondrial y la autofagia (Calzada *et al.*, 2016).

Nuestros resultados muestran que después de los tratamientos de ambos aceites AOE y AOC el metabolismo de los glicerolípidos está activado, lo que concuerda con otro estudio metabólico realizado en ratas con síndrome metabólico suplementadas con hidroxitirosol, en donde los autores confirman que este compuesto fenólico de la aceituna produce cambios metabólicos disminuyendo la biosíntesis de ácidos grasos insaturados y el metabolismo del ácido linoleico y el ácido araquidónico, del retinol y de los esfingolípidos, mientras que activa el metabolismo de los glicerolípidos, que podrían afectar y provocar cambios cardiovasculares, hepáticos y metabólicos (Lemonakis *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que el aceite de oliva posee varias clases de glicerofosfolípidos y lisofosfolípidos derivados de la colina (LPC) y etanolamina (LPE) (Alves *et al.*, 2018), y se ha reconocido ampliamente que la ingesta de aceite de oliva ya sea dentro de la dieta mediterránea o solo, tiene un impacto positivo en la salud humana (Covas *et al.*, 2015). Los beneficios del consumo de aceite de oliva relacionados directamente con los ácidos grasos monoinsaturados están relacionados con mejorar varios factores de riesgo cardiovascular (Schwingshackl y Hoffmann, 2012). En los últimos años, los lípidos polares de los subproductos industriales derivados de la aceituna, como las semillas y el orujo de aceituna, se han estudiado como fuentes alternativas de moléculas bioactivas. Sin embargo, se sabe poco sobre la bioactividad o los beneficios para la salud de los fosfolípidos y glicolípidos de las aceitunas y el aceite de oliva (Alves *et al.*, 2018). Algunos estudios *in vivo* e *in vitro* revelaron efectos anticancerígenos y efectos antiinflamatorios en la artritis y la osteoartritis (Hou *et al.*, 2007; Larsen *et al.*, 2007). Otros estudios evaluaron las propiedades bioactivas de la fracción lipídica polar del aceite de oliva y del orujo de oliva y revelaron que poseen actividades antitrombóticas y antiateroscleróticas al inhibir la agregación plaquetaria (Tsantila *et al.*, 2007). Los ácidos grasos son componentes principales de las membranas que están influenciadas por el tipo de grasa presente en la dieta. Las dietas ricas en ácido oleico, como la dieta mediterránea, se asocian con niveles elevados de estos ácidos grasos presentes en las fracciones de LPC y LPE en diversas membranas plasmáticas de ratas y humanos (Escudero *et al.*, 1998).

Se ha comprobado que el ácido oleico, ejerce una modulación sobre las funciones de la membrana y de la célula, produciendo mayor fluidez y permeabilidad de la membrana, formación de dominios intracelulares, exo/endocitosis, división celular, mejor transducción de señalización de las proteínas de señalización (proteínas G, PKC y adenilil ciclasa), así como en el control de la presión arterial, efectos antiproliferativos y antitumorales (Funari *et al.*, 2003).

La cantidad de hipurato en plasma (M11) presente en el grupo SHR fue mayor comparado con el AOC y el AOE, pero no alcanzó significación estadística, así mismo el análisis de enriquecimiento en muestras de orina también confirmó que la vía metabólica de este compuesto estaba afectada en el grupo SHR vs el grupo control sano.

El hipurato también llamado ácido hipúrico, es una acil glicina formada a partir de la conjugación de ácido benzoico con glicina (Lees *et al.*, 2013). No obstante, también se pueden producir a partir del metabolismo de muchos componentes dietéticos, incluida la fenilalanina (Rowe *et al.*, 1975). El hipurato, es un componente normal de la orina con una fuerte asociación con la dieta y la microbiota intestinal, que generalmente aumenta tras el consumo de compuestos fenólicos procedentes del té, vino y zumos de frutas (Lees *et al.*, 2013), y su excreción se ha asociado durante mucho tiempo con el metabolismo de los componentes de la dieta ricos en polifenoles (Clifford *et al.*, 2000). Se ha descrito, que un simple cambio en la dieta puede causar un cambio profundo en su metabolismo, y con ello en su producción (Phipps, 1998).

Un análisis del metaboloma plasmático de adultos sanos que evaluó los efectos de la edad, el sexo y la raza sobre las concentraciones relativas de metabolitos endógenos, reveló que los niveles de hipurato aumentan con la edad (Lawton *et al.*, 2008). No obstante, hallazgos actuales sugieren que un perfil metabólico mejorado se asocia a mayores cantidades de hipurato y asparagina plasmática en mujeres que siguieron un tratamiento intensivo de pérdida de peso con dieta mediterránea hipocalórica y actividad física regular; los valores altos de hipurato se asociaron a la pérdida de peso a través de su impacto en la energía, aminoácidos, lipoproteínas y metabolismo microbiano (Almanza-Aguilera *et al.*, 2018). Por otro lado, el hipurato se ha identificado también como marcador metabólico indicativo de la diversidad del microbioma intestinal, y sus concentraciones en plasma se asocian positivamente con la diversidad del microbioma y con una reducción de las probabilidades de desarrollar síndrome metabólico (Pallister *et al.*, 2017).

Finalmente, el hipurato en orina también ha sido un metabolito que se identificó en nuestros resultados del análisis de enriquecimiento en el grupo de las ratas SHR sin tratar. Se ha explorado una asociación entre la excreción urinaria de hipurato y la presión arterial utilizando los perfiles de metabolitos urinarios de ratas SHR, y se ha encontrado que la excreción de hipurato fue menor en

ratas SHR en comparación con las ratas Wistar Kyoto normotensas, utilizando espectroscopía de RMN (Akira *et al.*, 2008). Estos autores consideraron que esta diferencia en la excreción de hipurato podría reflejar los diferentes microbiomas de las dos cepas, debido a las diferencias en los factores metabólicos y genéticos del huésped, ya que la dieta se mantuvo igual para ambos grupos, y señalaron que los animales fueron criados en las mismas circunstancias, sin embargo, no se puede descartar que los diferentes entornos de las jaulas también pudieran haber contribuido para las variaciones en la excreción de este metabolito (Akira *et al.*, 2008). Al contrario, nuestros resultados muestran valores mayores en las ratas hipertensas que en las ratas sanas y las ratas tratadas AOC y AOE, sugiriendo un posible efecto de los aceites sobre la microbiota que podría mediar el efecto antihipertensivo mediado en general por sus metabolitos. El hipurato excretado en orina también lo han asociado como un biomarcador potencial en modelos de ratas con aterosclerosis (Zhang *et al.*, 2009). Este resultado contrasta con otros estudios que han demostrado que el hipurato está asociado con un fenotipo magro y con la ingesta de una dieta rica en flavonoides (Lees *et al.*, 2013; Daykin *et al.*, 2005; Clifford *et al.*, 2000).

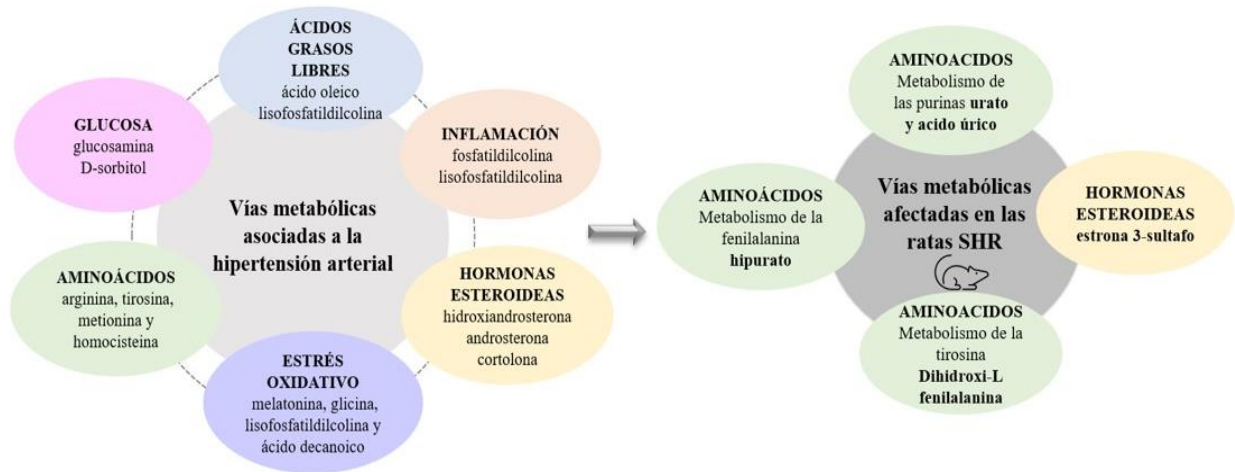
Una limitación de nuestro estudio es que no se recogieron muestras de heces para corroborar los efectos de la suplementación sobre las poblaciones microbianas intestinales, y poder evaluar los efectos fisiológicos que han sido mediados por cambios en el perfil o en la actividad de estas bacterias.

### ***Análisis de enriquecimiento***

El análisis de enriquecimiento se realizó en muestras de orina de las ratas SRH *versus* las ratas WKY (ambos grupos no tratados), mediante resultados de los análisis univariados (prueba *t*-test), con el propósito de identificar las vías metabólicas que se ven afectadas en la HTA en este modelo experimental. Mediante este análisis se pudo identificar seis rutas metabólicas con al menos un compuesto significativo diferencial entre ambos tipos de animales. Tres de estas vías metabólicas activadas en nuestro grupo SHR son la vía metabólica de las purinas, la vía metabólica de los aminoácidos tirosina y fenilalanina y la vía metabólica de las hormonas esteroideas, las cuales se asocian con múltiples vías de señalización involucradas en los mecanismos metabólicos asociados con la HTA como lo describe Onuh y Qiu (2021). Estos datos confirman que este modelo de rata SHR es adecuado para el estudio de la patogenia de la HTA.

Los mecanismos metabólicos asociados con la HTA forman una cascada de eventos que complica la comprensión de la fisiopatología de la HTA, y que están asociados con el inicio y progresión de esta enfermedad (Figura 27). Estos mecanismos se alteran principalmente como

resultado de la desregulación del metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos, glucosa y hormonas esteroideas, así como el aumento del estrés oxidativo y la inflamación crónica (Onuh y Qiu, 2021).



**Figura 27.** Resumen de los procesos metabólicos asociados con la hipertensión. Los metabolitos están asociados con la hipertensión, principalmente como resultado de la desregulación de varios metabolismos de aminoácidos, ácidos grasos, glucosa y hormonas esteroideas, aumento del estrés oxidativo e inflamación crónica. Adaptado de Onuh y Qiu, 2021.

Algunos estudios metabolómicos han demostrado cambios en el perfil metabolómico en orina de ratas SHR en la vía metabólica de las purinas, incluyendo el ácido úrico (Wang *et al.*, 2021), y de los aminoácidos fenilalanina (hipurato) (Akira *et al.*, 2008) y tirosina (Lu *et al.*, 2008), así como en la vía metabólica de las hormonas esteroideas en ratas con síndrome metabólico (Lemonakis *et al.*, 2017).

El ácido úrico es el producto final de oxidación del metabolismo de las purinas. Es un ácido débil que se distribuye por todo el líquido extracelular como urato de sodio y es producido por la enzima xantina oxidasa, que oxida las oxipurinas como la xantina, y la transforma en ácido úrico. Al igual que el ácido ascórbico, el ácido úrico es un antioxidante, y es considerado en los primates como el principal antioxidante presente en el suero, la disminución de la expresión del gen de la uricasa y el aumento del ácido úrico en sangre supuso una ventaja evolutiva para los ancestros del *Homo sapiens*, esta hipótesis se basó en experimentos *in vitro* que demostraron que el ácido úrico es un poderoso eliminador de ERO (Ames *et al.*, 1981), se postuló que el urato que circulaba en concentraciones elevadas en plasma, era uno de los principales antioxidantes, por lo que se cree que es un factor importante en la prolongación de la vida ya que al proteger a las células del daño



oxidativo disminuye el riesgo de cáncer y aumenta la esperanza de vida (Sautin *et al.*, 2008). Sin embargo, su biosíntesis está asociada a la generación de ERO y se ha asociado con varios mecanismos patológicos implicados en la HTA. La evidencia epidemiológica sugiere una asociación positiva entre el aumento del ácido úrico y el riesgo elevado de ECV, en la que el aumento del estrés oxidativo juega un papel importante (Durante *et al.*, 2010). Además, en modelos animales, la hiperuricemia leve inducida con ácido oxónico, inhibidor de la uricasa, puede contribuir a la disfunción endotelial y la reducción de los niveles de óxido nítrico (Khosla *et al.*, 2005). No obstante, también se ha descrito que el ácido úrico impide la progresión de la hipertensión en SHR, lo que plantea una disparidad entre los efectos protectores de la hiperuricemia aguda y los efectos negativos de la hiperuricemia crónica (Durante *et al.*, 2010). Tampoco se conoce si los efectos agudos pueden continuar hasta provocar beneficios cardiovasculares a largo plazo. Por lo tanto, no está claro si esta molécula puede ser un factor de riesgo cardiovascular independiente. Dado que la patología cardiovascular tiene un componente inflamatorio y una mayor producción de radicales libres, la hiperuricemia leve podría considerarse una respuesta compensatoria beneficiosa (Durante *et al.*, 2010), pero se requieren más estudios para explorar los mecanismos moleculares del ácido úrico y sus efectos.

La 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA) es un precursor relevante en el metabolismo secundario de la tirosina y la fenilalanina. Varios estudios clínicos en humanos y en animales sugieren que la presión arterial está íntimamente relacionada con la funcionalidad del riñón, y la dopamina intrarrenal juega un papel importante en la patogenia de la hipertensión al regular el transporte epitelial de sodio. Los sistemas de transporte candidatos para L-DOPA, fuente de dopamina, incluyen los sistemas dependientes e independientes de sodio. Estos sistemas independientes de sodio renal se sobreexpresan en la rata hipertensa, lo que podría contribuir a una mayor captación de L-DOPA en el túbulo proximal y una mayor producción de dopamina, como un intento de superar el defecto en la función del receptor D1 (Pinto *et al.*, 2013). El transporte deficiente de arginina contribuye a la baja biodisponibilidad renal de óxido nítrico observada en la médula renal de las ratas SHR, y la desregulación de los transportadores renales de aminoácidos puede ayudar a definir los mecanismos subyacentes que predisponen a los individuos a un mayor riesgo de desarrollar hipertensión (Pinto *et al.*, 2013). Los cambios en las vías de los aminoácidos y en particular de L-arginina/óxido nítrico han sido reconocidos durante mucho tiempo como asociados con la patogenia de la hipertensión (Onuh y Qiu, 2021). Este metabolito también se ha propuesto como un biomarcador adecuado para medir estrés oxidativo de enfermedades que comparten etiología común (McPherson *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha informado que la biosíntesis de hormonas esteroideas es una de las vías responsables de la patogenia de la hipertensión (Zhao *et al.*, 2018). El aumento de los niveles de estas hormonas se ha asociado con un mayor riesgo de HTA debido al aumento de la absorción de sodio mediante la regulación de los receptores renales de mineralocorticoides y glucocorticoides (Zhao *et al.*, 2018). Uno de los metabolitos identificados en las vías metabólicas afectadas en la HTA es la estrona 3-sulfato, un derivado de estrona sulfatado. La enzima esteroide sulfatasa cataliza la conversión de sulfato de estrona, sulfato de dehidroepiandrosterona, sulfato de colesterol y sulfatos de glucocorticoides en sus formas activas no conjugadas, lo que provoca la elevación de los esteroides biológicamente activos, como los glucocorticoides, los mineralocorticoides y la testosterona, y puede conducir a un aumento de la presión arterial. Se ha descrito que el inhibir la enzima sulfatasa de esteroides reduce significativamente la presión arterial en ratas SHR (Valigora *et al.*, 2000).

Otros compuestos identificados son el defosfo-CoA, un intermediario en la biosíntesis de pantotenato y CoA, y la protoporfirina, que es un isómero natural intermediario en la biosíntesis del hemo de la hemoglobina (HMDB, 2022). De momento, se desconoce si existe una relación entre la alteración de estas vías metabólicas y el desarrollo de HTA.

El análisis metabolómico nos ha permitido identificar metabolitos que se expresan diferencialmente en los grupos SHR *versus* los tratados AOC y AOE, algunos de los cuales podrían estar implicados con efectos beneficiosos para la salud y otros nos permiten dar respuesta al efecto del AOVE sobre la hipertensión arterial.

El análisis de enriquecimiento nos permitió identificar seis vías metabólicas en las ratas hipertensas sin tratar *versus* las sanas. Tres de estas vías metabólicas están implicadas en vías metabólicas afectadas en la hipertensión arterial, lo que confirma que el modelo SHR es idóneo para profundizar en estudios que nos ayuden a comprender la fisiopatología de la hipertensión arterial.

Parece ser que la microbiota intestinal es determinante en la producción de ciertos metabolitos, los cuales desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de una función cardiovascular, por lo que futuros estudios de intervención nutricional en animales y humanos, deberían de complementarse con análisis de microbiota intestinal con el objetivo esclarecer los mecanismos moleculares que se implican en la relación dieta y perfiles metabólicos.

### ***Efecto de un aceite de oliva rico en polifenoles y ácidos triterpénicos procedentes de la aceituna sobre el metabolismo posprandial de carbohidratos en humanos sanos***

El estudio NUTRAOLEUM fue diseñado para evaluar si el enriquecimiento de AOV con polifenoles y ácidos triterpénicos del aceite de oliva puede aumentar los beneficios saludables de un AOV estándar. En concreto, el sub-estudio posprandial incluido en esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo evaluar los beneficios derivados de la ingesta de aceites de oliva con diferentes cantidades de compuestos bioactivos sobre el metabolismo posprandial. Hasta donde sabemos, ningún ensayo controlado y aleatorizado en humanos ha comparado previamente los beneficios *in vivo* de los AOV con diferentes contenidos de polifenoles y ácidos triterpénicos sobre la glucosa posprandial, la secreción y sensibilidad a la insulina, y la secreción de hormonas gastrointestinales. El hallazgo más relevante de este estudio fue que el aceite de oliva enriquecido con compuestos bioactivos procedentes de la aceituna mejoró la funcionalidad de la insulina al aumentar su secreción y la sensibilidad periférica, dos factores de riesgo independientes que son indicativos de tolerancia a la glucosa (Häring, 2016), lo que indica que la presencia de compuestos bioactivos del AOV puede mejorar la respuesta de los tejidos a la insulina posprandial y contribuir a mejorar el control metabólico. No obstante, son necesarios más estudios para evaluar el efecto sinérgico de los polifenoles y ácidos triterpénicos presentes en el AOV.

La regulación de la glucemia está mediada en parte por la liberación de incretinas, GLP-1 y GIP, que estimulan la secreción de insulina en respuesta a la ingesta de alimentos (Diakogiannaki *et al.*, 2012). Si el páncreas puede reaccionar con una hipersecreción compensatoria de insulina tras la ingesta de alimentos, mantendrá la glucosa plasmática y contribuirá a un estado metabólico adecuado (Häring, 2016). Nuestros resultados muestran que la secreción de insulina posprandial, medida como INSI, fue mayor después de la ingesta de los aceites de oliva ricos en polifenoles y en polifenoles más ácidos triterpénicos. Otro estudio posprandial en sujetos sanos ha demostrado el efecto beneficioso del consumo de AOV sobre la glucemia posprandial en comparación con la ingesta de aceite de maíz o un almuerzo tipo mediterráneo sin AOV. Este estudio confirmó que la ingesta de AOV, en comparación con el aceite de maíz, induce una mayor secreción de GIP y GLP-1 y en consecuencia de insulina, contribuyendo a la disminución de los niveles de glucosa plasmática (Violi *et al.*, 2015). También se ha descrito la mejora en la situación metabólica regulada por la modificación de la secreción de GLP-1 después del consumo de AOV comparado con la ingesta de mantequilla o una dieta baja en grasas, en sujetos con enfermedades metabólicas (Bozzetto *et al.*,

2019), así como un aumento de GLP-1 en un estudio de intervención con chocolate enriquecido con 40 g de oleuropeína comparado con el mismo chocolate sin el compuesto bioactivo en sujetos sanos (Del Ben *et al.*, 2020). En nuestro estudio, no observamos estas diferencias en la secreción de GLP-1 tras la ingesta de los aceites, lo que confirma que la matriz alimentaria puede interferir y modular el efecto de estos compuestos bioactivos, y que su efecto metabólico debe estar mediado por otros mecanismos. De hecho, un estudio de intervención con AOVE rico en compuestos fenólicos (577 mg/kg) durante 4 semanas sugirió que los efectos beneficiosos sobre el control metabólico en pacientes con DM2 pueden estar mediados por la modificación en la secreción de adipocinas como visfatina y apelina (Santangelo *et al.*, 2016).

Nuestros datos sugieren un efecto sinérgico de los polifenoles y ácidos triterpénicos, ya que las diferencias observadas en la respuesta metabólica fueron más pronunciadas después de la ingesta del aceite funcional rico en ambos tipos de componentes. Los ácidos triterpénicos (ácido oleanólico y ácido maslínico) han demostrado un efecto beneficioso para la prevención de la diabetes en un estudio de intervención en pacientes prediabéticos (PREDIABOLE: Prevención de la diabetes con ácido oleanólico), en otro estudio con aceite de oliva enriquecido en ácido oleanólico (Santos-Lozano *et al.*, 2019), así como en ratones obesos suplementados con aceite de orujo (Claro-Cala *et al.*, 2020). Además, un trabajo *in vitro* ha demostrado que los ácidos oleanólico y maslínico son capaces de inhibir las actividades de la  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa, mientras que el hidroxitirosol contribuye débilmente a modular estas actividades (Mwakalukwa *et al.*, 2020). Estos datos concuerdan con la mejora de la sensibilidad a la insulina observada tras la ingesta del aceite funcional enriquecido con ácidos triterpénicos en nuestro estudio. La evidencia ha sugerido que los ácidos triterpénicos ofrecen una alternativa interesante para contribuir a mejorarla resistencia a la insulina (Castellano *et al.*, 2013). Además, la biodisponibilidad descrita de los ácidos triterpénicos presentes en el AOV en estos mismos voluntarios (de la Torre *et al.*, 2020) confirma que estas moléculas pueden estar implicadas en la respuesta posprandial observada tras su consumo. De hecho, los ácidos triterpénicos pueden aumentar la síntesis de glucógeno y simultáneamente inhibir la gluconeogénesis y la glucogenólisis, reduciendo así la producción de glucosa hepática que influye en la liberación de insulina (Wen *et al.*, 2005). Hay que destacar que en nuestro estudio todos los voluntarios eran sanos, por lo que su comportamiento metabólico seguía unos parámetros normales. Sin embargo, las pequeñas pero significativas diferencias encontradas tras la ingesta de los aceites de oliva ricos en compuestos bioactivos nos llevan a la hipótesis de que estos efectos podrían ser más pronunciados en personas con alteraciones metabólicas y después de una suplementación prolongada con los aceites. De hecho, un sub-estudio del PREDIMED en sujetos con DM2 confirmó

una disminución de la glucosa plasmática en ayunas después del consumo prolongado de AOV (Basterra-Gortari *et al.*, 2019). Por tanto, se necesitan más estudios para evaluar la respuesta posprandial y los mecanismos relacionados tras una ingesta prolongada de AOV enriquecidos en polifenoles y ácidos triterpenos en sujetos con resistencia a la insulina o enfermedades metabólicas.

Una limitación del presente estudio es que no tuvimos un grupo de control posprandial que consumiera un aceite control sin compuestos bioactivos o un aceite vegetal diferente, de hecho los tres aceites tenían la misma matriz lipídica. Por tanto, no podemos estimar el potencial efecto de esta matriz del aceite sobre el metabolismo de la glucosa.

Hasta la fecha, ningún estudio ha comparado los efectos de diferentes tipos y cantidades de compuestos fenólicos y ácidos triterpénicos sobre las respuestas de las hormonas gastrointestinales posprandiales implicadas en el control de la homeostasis energética, el apetito y la saciedad. La grelina es una hormona orexigénica que juega un papel clave en la secreción de insulina. Una disminución de la secreción de grelina conduce a una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, lo que sugiere una estrategia para la homeostasis de la glucosa (Alamri *et al.*, 2016). El consumo de ácido oleanólico durante 12 semanas ha mostrado una menor secreción de grelina en animales prediabéticos (Gamede *et al.*, 2018), y se ha descrito que los triterpenos pueden disminuir la secreción de grelina y, en consecuencia, disminuir el apetito y la ingesta calórica (Luvuno *et al.*, 2016). Sin embargo, en nuestro estudio la secreción posprandial de grelina fue similar tras el consumo de una dosis única de aceites con distinto contenido en polifenoles y ácidos triterpénicos, probablemente debido a que los efectos previamente descritos se observaron tras el consumo continuado de estos compuestos, no tras la ingesta de una única dosis en un estudio posprandial.

Otros polipéptidos importantes implicados en la regulación de la homeostasis energética son el PP y el PYY. Se liberan en respuesta a una comida de acuerdo con su carga calórica. Estos péptidos contribuyen a inhibir el apetito y modulan la tasa de vaciado gástrico (Katsuura *et al.*, 2002; Wreny Bloom., 2007). Como era de esperar, los iAUC calculados tras la secreción de estos polipéptidos no fueron diferentes entre los grupos, ya que los tres desayunos contenían la misma cantidad de aceite de oliva, pan (80 gr) y agua (200 mL) y proporcionaron las mismas cantidades de energía y macronutrientes.

## CONCLUSIONES





## Conclusiones

### Conclusiones del estudio CARDIOLIVE

La administración durante 8 semanas en ratas con hipertensión genética, con 1 mL/d un aceite de oliva enriquecido con extractos procedentes de la aceituna y las hojas de olivo, y que contiene 750 mg/kg de compuestos fenólicos, y 292.6 mg/kg de ácidos triterpénicos en suspensión, contribuyen a:

- La reducción de la hipertensión arterial.
- La reducción de la hipertrofia cardíaca.
- La disminución de la secreción de péptidos vasoactivos (angiotensina II y endotelina-1), como también ocurrió en los animales que recibieron el aceite control no enriquecido.
- La disminución de la eliminación de nitritos en orina.
- Mejorar la funcionalidad vascular de las aortas *ex vivo*.
- Disminuye las concentraciones de 8-OHdG en orina y colesterol plasmático.
- No modifica los biomarcadores de inflamación ni de oxidación lipídica evaluados.

El análisis metabolómico nos ha permitido identificar metabolitos diferenciales en los animales tratados con los aceites y en los controles sin tratar que podrían estar implicados en los efectos beneficiosos sobre la hipertensión arterial.

El análisis de enriquecimiento nos permitió identificar tres vías metabólicas implicadas en la hipertensión arterial, confirmando que el modelo SHR es idóneo para profundizar en el estudio de la fisiopatología de la hipertensión arterial.

Parece ser que la microbiota intestinal es determinante en la producción de ciertos metabolitos fundamentales en el mantenimiento de la función cardiovascular, por lo que futuros estudios de intervención nutricional en animales y humanos, deberían de complementarse con análisis de microbiota intestinal.



### ***Conclusiones del estudio NUTRAOLEUM***

La ingesta de una dosis única de aceite de oliva enriquecido con compuestos bioactivos procedentes del fruto de la aceituna (487 ppm de compuestos fenólicos y 389 ppm de ácidos triterpénicos) mejora la liberación postprandial de insulina y su sensibilidad periférica en adultos sanos, lo que sugiere un efecto sinérgico de los polifenoles y ácidos triterpénicos. Son necesarios más estudios para evaluar el efecto del aceite de oliva virgen y sus componentes tanto en estudios posprandiales como tras un consumo prolongado del aceite.

### ***Conclusions***

#### ***Conclusions of the CARDIOLIVE study***

The administration for 8 weeks in rats with genetic hypertension, with 1 mL/d of olive oil enriched with extracts from olives and olive leaves, and containing 750 mg/kg of phenolic compounds, and 292.6 mg/kg of triterpenic acids in suspension contribute to:

- The reduction of arterial hypertension.
- The reduction of cardiac hypertrophy.
- The decrease in the secretion of vasoactive peptides (angiotensin II and endothelin-1), as also occurred in the animals that received the non-enriched control oil.
- Decreased elimination of nitrites in urine.
- Improve the vascular functionality of the aortas *ex vivo*.
- Decreases concentrations of 8-OHdG in urine and plasma cholesterol.
- Does not modify the biomarkers of inflammation or lipid oxidation evaluated.

The metabolomic analysis has allowed us to identify differential metabolites in the animals treated with the oils and in the untreated controls that could be involved in the beneficial effects on arterial hypertension.

The enrichment analysis allowed us to identify three metabolic pathways involved in high blood pressure, confirming that the SHR model is suitable for further study of the pathophysiology of high blood pressure.

It seems that the intestinal microbiota is decisive in the production of certain fundamental metabolites in the maintenance of cardiovascular function, so that future nutritional intervention studies in animals and humans should be complemented with analyzes of the intestinal microbiota

#### ***Conclusions of the NUTRAOLEUM study***

The intake of a single dose of olive oil enriched with bioactive compounds from the fruit of the olive (487 ppm of phenolic compounds and 389 ppm of triterpenic acids) improves postprandial insulin release and its peripheral sensitivity in healthy adults, suggesting a synergistic effect of polyphenols and triterpenic acids. More studies are needed to evaluate the effect of virgin olive oil and its components both in postprandial studies and after prolonged consumption of the oil.

*Listado de abreviaturas*

8-OHdG, 8-hidroxi-2´deoxiguanosina

Ace, acetona

ADA, Asociación americana de diabetes

ADN, ácido desoxirribonucleico

AGMI, ácidos grasos monoinsaturados

AGPI, ácidos grasos poliinsaturados

AGS, ácidos grasos saturados

ANOVA, análisis de la varianza

AOC, aceite de oliva virgen Control

AOE, aceite de oliva virgen enriquecido

AO-F aceite de oliva virgen funcional

AOV, aceite de oliva virgen

AOVE, aceite de oliva virgen extra

AOVE-Op Aceite de oliva virgen extra optimizado

AOVE-St, Aceite de oliva virgen extra estándar

ARN, ácido ribonucleico

ATP III, *Adult Treatment Panel*

COI, Consejo Oleícola Internacional

CT, Colesterol Total

DHA, 22:6n-3, docosaheptaenoico

DM2, diabetes mellitus tipo II

ECA, enzima convertidora de angiotensina

ECA, enzima convertidora de angiotensina

ECV, enfermedad cardiovascular

ECVs, enfermedades cardiovasculares

EFSA, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial

ERO, especies reactivas de oxígeno

ESI, electropulverización, electrospray espectrometría de masas)

GC-MS, cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas

GIP, polipéptido inhibidor gástrico  
GLP-1, péptido similar al glucagón  
GMPc, monofosfato de guanosina cíclico  
GMPc, monofosfato de guanosina cíclico  
HDL, lipoproteínas de alta densidad  
HMDB, human metabolome database  
HOMA, *homeostatic model assessment*  
HOMA-IR, Evaluación del modelo homeostático para la resistencia a la insulina  
HOMA- $\beta$  Evaluación del modelo homeostático para la estimación de las células beta  
HPLC, High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)  
HTA, hipertensión arterial  
ICAM-1, molécula de adhesión intercelular de tipo 1  
IDF, *International Diabetes Federation*  
IL-6, interleuquina 6  
IMC, índice de masa corporal  
INE, instituto nacional de estadística  
iNOS, óxido nítrico sintasa inducible  
INSI, índice insulinogénico de la secreción de insulina  
LC-MS, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas  
LDL, lipoproteínas de baja densidad  
LDLox, lipoproteínas LDL oxidasas  
LMM, modelo lineal mixto  
MeCN, acetonitrilo  
MeOH, metanol  
NADPH, nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato oxidasa  
NCEP, *National Cholesterol Education Program*  
OMS, organización mundial de la salud  
ON, óxido nítrico  
OPLS-DA, análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales ortogonales  
PAD, presión arterial diastólica  
PAS, presión arterial sistólica  
PCA, análisis de componentes principales  
PCR, proteína-C reactiva

PP, polipéptido pancreático (PP),  
PREDIMED, estudio de prevención con dieta mediterránea  
PYY, péptido YY  
QC, quality control  
QTOF, quadrupole time of flying, (cuadrupolo tiempo de vuelo)  
QUICKI, modelo de índice de control cuantitativo de la sensibilidad a la insulina  
RMN, resonancia magnética nuclear  
RT, tiempo de retención  
SHR, ratas espontáneamente hipertensas  
SHR-AOC, *Spontaneously Hypertensive Rats* suplementada con aceite control  
SHR-AOE, *Spontaneously Hypertensive Rats* suplementada con aceite enriquecido  
SM, síndrome metabólico  
SOD, superóxido dismutasa  
SPSS, Statistical Package for the Social Sciences  
sVCAM-1, VCAM-1 soluble  
TAG, triacilglicerolos  
TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico  
TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$   
VCAM-1, molécula de adhesión celular vascular de tipo 1  
VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular  
VIP, importancia variable en proyección  
VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad  
WKY, rata Wistar Kyoto

<i>Listado de tablas</i>	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Clasificación de la presión sanguínea y definición del grado de hipertensión	17
Tabla 2. Clasificación de concentraciones sanguíneas de colesterol total, LDL y HDL.	28
Tabla 3. Criterios para el diagnóstico clínico de elevadas concentraciones sanguíneas de TAG en ayunas	29
Tabla 4. Extractos fenólicos utilizados en la elaboración del aceite enriquecido	69
Tabla 5. Características físicoquímicas y composición lipídica de los aceites de oliva utilizados en el estudio CARDIOLIVE	70
Tabla 6. Composición en compuestos fenólicos de los aceites de oliva utilizados en el estudio CARDIOLIVE	71
Tabla 7. Composición inicial en ácidos triterpénicos de los aceites de oliva administrados en el estudio CARDIOLIVE	72
Tabla 8. Características de los diferentes aceites administrados en el estudio NUTRAOLEUM	86
Tabla 9. Variables bioquímicas en plasma y orina en los grupos experimentales después de 8 semanas de intervención.	96
Tabla 10. Variables morfológicas en los grupos experimentales después de la intervención	100
Tabla 11. Concentraciones de biomarcadores de estrés oxidativo en orina y biomarcadores inflamatorios en plasma después de 8 semanas de intervención	102
Tabla 12. Resumen de modelos multivariante orina	105
Tabla 13. Metabolitos candidatos en muestras de orina	105
Tabla 14. Resumen de modelos multivariante plasma	108
Tabla 15. Metabolitos candidatos en muestras de plasma	108
Tabla 16. Rutas metabólicas identificadas en orina de ratas SHR y WKY	111
Tabla 17. Características clínicas y bioquímicas basales de los sujetos incluidos en el estudio posprandial del NUTRAOLEUM	112
Tabla 18. Índice área bajo la curva (iAUC) postprandial de glucosa, insulina y hormonas gastrointestinales en plasma, índice de Matsuda de sensibilidad a la insulina e INSI después de la ingesta de una dosis única de tres aceites de oliva con distinta cantidad de compuestos bioactivos.	113

<i>Listado de figuras</i>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Factores de riesgo conducturales modificables y no modificables de las ECVs	16
Figura 2. Sistema renina angiotensina aldosterona	22
Figura 3. Mecanismos patógenos de la hipertensión arterial.	27
Figura 4. Factores de riesgo del síndrome metabólico	30
Figura 5. Mecanismos proaterogénicos asociados a la hiperglucemia	33
Figura 6. Tipos de aceites de oliva	43
Figura 7. Estructuras del hidroxitirosol, la oleuropeína y el tirosol	48
Figura 8. Estructuras del ácido maslínico y oleanólico	54
Figura 9. Clasificación general de metabolómica	60
Figura 10. Grupos experimentales CARDIOLIVE	72
Figura 11. Diseño experimental del estudio CARDIOLIVE	73
Figura 12. Flujo de trabajo del procesamiento de datos de metabolómica.	79
Figura 13. Diagrama de Veen metabolitos diferenciales muestras orina y plasma	83
Figura 14. Diseño experimental del estudio NUTRAOLEUM	88
Figura 15. Diseño de estudio posprandial NUTRAOLEUM	90
Figura 16. Evolución del peso corporal, la ingesta de alimentos, agua y diuresis en estudio CARDIOLIVE	95
Figura 17. Evolución temporal de la PAS durante las 8 semanas de suplementación	98
Figura 18. Concentraciones de angiotensina II en plasma después de 8 semanas de intervención	99
Figura 19. Concentraciones de endotelina-1 en plasma después de 8 semanas de intervención	99
Figura 20. Respuestas <i>ex vivo</i> de las aortas aisladas de los animales	101
Figura 21. Modelos de comparación en plasma y orina realizados en SIMCA entre los animales controles enfermos vs los animales tratados con los dos tipos de aceites.	103
Figura 22. Modelos de comparación en plasma y orina entre los animales tratados con el aceite enriquecido en componentes bioactivos y el aceite control.	104
Figura 23. Diagrama de cajas de metabolitos tentativamente anotados en muestras de orina.	107
Figura 24. Diagrama de cajas de metabolitos tentativamente anotados en muestras de plasma.	110
Figura 25. Evolución de las concentraciones plasmáticas posprandiales de glucosa e insulina tras la ingesta de tres AOV con diferente contenido de compuestos bioactivos	114
Figura 26. Evolución de las concentraciones plasmáticas posprandiales de hormonas gastrointestinales: GIP, GLP-1, grelina, PP, y PYY.	115
Figura 27. Resumen de los procesos metabólicos asociados con la hipertensión.	135

**Bibliografía**

- Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, Parkinson JR, Ghatei MA, Bloom SR. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.* 2005;1044(1):127-31. doi: 10.1016/j.brainres.2005.03.011.
- ADA, Asociación Americana de Diabetes. Hyperglucemia (High Blood Glucose). <https://www.diabetes.org/healthy-living/medication-treatments/blood-glucose-testing-and-control/hyperglycemia>. 2020. [Consultada: 4 Mar 2022].
- Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology.* 1985;89(5):1070-7. doi: 10.1016/0016-5085(85)90211-2.
- Agrawal K, Melliou E, Li X, Pedersen TL, Wang SC, Magiatis P, Newman JW, Holt RR. Oleocanthal-rich extra virgin olive oil demonstrates acute anti-platelet effects in healthy men in a randomized trial. *J Funct Foods.* 2017;36:84-93. doi: 10.1016/j.jff.2017.06.046.
- Ahrén B, Pratley RE, Soubt M, Dunning BE, Foley JE. Clinical measures of islet function: usefulness to characterize defects in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2008 May;4(2):129-45. doi: 10.2174/157339908784220714.
- Akira K, Hichiya H, Morita M, Shimizu A, Mitome H. Metabonomic study on the biochemical response of spontaneously hypertensive rats to chronic taurine supplementation using (1)H NMR spectroscopic urinalysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2013 Nov;85:155-61. doi: 10.1016/j.jpba.2013.07.018.
- Akira K, Masu S, Imachi M, Mitome H, Hashimoto M, Hashimoto T. 1H NMR-based metabonomic analysis of urine from young spontaneously hypertensive rats. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Feb 13;46(3):550-6. doi: 10.1016/j.jpba.2007.11.017.
- Akira K, Masu S, Imachi M, Mitome H, Hashimoto M, Hashimoto T. 1H NMR-based metabonomic analysis of urine from young spontaneously hypertensive rats. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46(3):550-556. doi:10.1016/j.jpba.2007.11.017
- Alamri BN, Shin K, Chappe V, Anini Y. The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016 Apr 1;26(1):3-11. doi: 10.1515/hmbci-2016-0018.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120(16):1640-5. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.



- Allouche Y, Jiménez A, Uceda M, Aguilera MP, Gaforio JJ, Beltrán G. Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars. *J Agric Food Chem.* 2009;57(9):3604-10. doi: 10.1021/jf803237z.
- Almanza-Aguilera E, Brunius C, Bernal-Lopez MR, et al. Impact in Plasma Metabolome as Effect of Lifestyle Intervention for Weight-Loss Reveals Metabolic Benefits in Metabolically Healthy Obese Women. *J Proteome Res.* 2018;17(8):2600-2610. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00042
- Alves E, Domingues MRM, Domingues P. Polar Lipids from Olives and Olive Oil: A Review on Their Identification, Significance and Potential Biotechnological Applications. *Foods.* 2018;7(7):109. Published 2018 Jul 10. doi:10.3390/foods7070109
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Nov;78(11):6858-62. doi: 10.1073/pnas.78.11.6858.
- Amini A, Liu M, Ahmad Z. Understanding the link between antimicrobial properties of dietary olive phenolics and bacterial ATP synthase. *Int J Biol Macromol.* 2017;101:153-164. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.087.
- Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J Chromatogr A.* 2004;1054(1-2):17-31. doi:10.1016/j.chroma.2004.07.093
- Aono D, Oka R, Kometani M, Takeda Y, Karashima S, Yoshimura K, Takeda Y, Yoneda T. Insulin Secretion and Risk for Future Diabetes in Subjects with a Nonpositive Insulinogenic Index. *J Diabetes Res.* 2018 Mar 22;2018:5107589. doi: 10.1155/2018/5107589.
- Aszyk J, Byliński H, Namieśnik J, Kot-Wasik A. Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry based metabolomics. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2018. 278–95. doi:10.1016/j.trac.2018.09.010
- Baharum SN, Azizan KA. Metabolomics in systems biology. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1102:51-68. doi: 10.1007/978-3-319-98758-3\_4.
- Bajoub A, Pacchiarotta T, Hurtado-Fernández E, Olmo-García L, García-Villalba R, Fernández-Gutiérrez A, Mayboroda OA, Carrasco-Pancorbo A. Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: A botanical classification perspective. *J Chromatogr A.* 2016;1428:267-79. doi: 10.1016/j.chroma.2015.10.059.
- Barrio-Lopez MT, Ruíz-Canela M, Ramos P, Tercedor L, Ibañez Criado JL, Ortíz M, Goni L, Ibañez Criado A, Macías-Ruiz R, García-Bolao I, Martínez-González MA, Almendral J. PREvention of recurrent arrhythmias with Mediterranean diet (PREDIMAR) study in patients with atrial
- Basterra-Gortari FJ, Ruiz-Canela M, Martínez-González MA, Babio N, Sorlí JV, Fito M, Ros E, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Estruch R, Serra-Majem L, Pinto X, González JI, Bulló M, Castañer O, Alonso-Gómez Á, Forga L, Arós F; PREDIMED study investigators. effects of a mediterranean eating plan on the need for glucose-lowering medications in participants with type 2 diabetes: a subgroup analysis of the PREDIMED trial. *Diabetes Care.* 2019 Aug;42(8):1390-1397. doi: 10.2337/dc18-2475.

- Basu S. Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2 $\alpha$ ) and F<sub>2</sub>-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells*. 2010;30(5):383-91. doi: 10.1007/s10059-010-0157-1.
- Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, Le Roux CW, Thomas EL, Bell JD, Withers DJ. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab*. 2006;4(3):223-33. doi: 10.1016/j.cmet.2006.08.001.
- Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S498-501. doi: 10.1097/01.ccm.0000186787.64500.12.
- Beevers G, Lip GY, O'Brien E. The pathophysiology of hypertension. *BMJ*. 2001;322(7291):912-6. doi: 10.1136/bmj.322.7291.912.
- Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, Goldberg IJ, Sacks F, Murad MH, Stalenhoef AF; Endocrine society. Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):2969-89. doi: 10.1210/jc.2011-3213.
- Berrougui H, Ikhlef S, Khalil A. Extra virgin olive oil polyphenols promote cholesterol efflux and improve HDL functionality. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:208062. doi: 10.1155/2015/208062.
- Bertram C, Hass R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem*. 2008;389(3):211-20. doi: 10.1515/BC.2008.031.
- Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49(2 Suppl 1):3-8. doi: 10.1016/s0026-0495(00)80077-3.
- Biel S, Mesa MD, de la Torre R, Espejo JA, Fernández-Navarro JR, Fitó M, Sánchez-Rodríguez E, Rosa C, Marchal R, Alche JD, Expósito M, Brenes M, Gandul B, Calleja MA, Covas MI. The NUTRAOLEOUM Study, a randomized controlled trial, for achieving nutritional added value for olive oils. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Oct 22;16(1):404. doi: 10.1186/s12906-016-1376-6.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Biswas SK, de Faria JB. Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radic Res*. 2007;41(2):216-24. doi: 10.1080/10715760601059672.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). 2015. Convenio Internacional del Aceite de Oliva y las Aceitunas de Mesa. Documento DOUE-L-2016-81903. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2016-81903>. [Consultada: 19 Nov 2020].
- Bozzetto L, Alderisio A, Clemente G, Giorgini M, Barone F, Griffio E, Costabile G, Vetrani C, Cipriano P, Giacco A, Riccardi G, Rivellese AA, Annuzzi G. Gastrointestinal effects of extra-virgin olive oil associated with lower postprandial glycemia in type 1 diabetes. *Clin Nutr*. 2019 Dec;38(6):2645-2651. doi: 10.1016/j.clnu.2018.11.015.
- Braconi D, Bernardini G, Millucci L, Santucci A. Foodomics for human health: current status and perspectives. *Expert Rev Proteomics*. 2018;15(2):153-164. doi: 10.1080/14789450.2018.1421072.

- Brady T. West, Kathleen B. Welch ATG. Linear Mixed Models: A Practical Guide Using Statistical Software, Second. 2015. <http://www-personal.umich.edu/~bwest/C4800%20SIM.pdf> [Consultada: 2020 Oct 23]. doi: 10.1002/sim.3167.
- Brouns F, Bjorck I, Frayn KN, Gibbs AL, Lang V, Slama G, Wolever TM. Glycaemic index methodology. *Nutr Res Rev*. 2005 Jun;18(1):145-71. doi: 10.1079/NRR2005100.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20. doi: 10.1038/414813a.
- Brunzell JD, Ayyobi AF. Dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Am J Med*. 2003;115 Suppl 8A:24S-28S. doi: 10.1016/j.amjmed.2003.08.011.
- Buus NH, Hansson NC, Rodríguez-Rodríguez R, Stankevicius E, Andersen MR, Simonsen U. Antiatherogenic effects of oleanolic acid in apolipoprotein E knockout mice. *Eur J Pharmacol*. 2011;670(2-3):519-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.09.037
- Calabriso N, Gnoni A, Stanca E, Cavallo A, Damiano F, Siculella L, Carluccio MA. Hydroxytyrosol ameliorates endothelial function under inflammatory conditions by preventing mitochondrial dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9086947. doi: 10.1155/2018/9086947.
- Calzada E, Onguka O, Claypool SM. Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016;321:29-88. doi:10.1016/bs.ircmb.2015.10.001
- Campos RR, Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(2):144-52. doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05437.x.
- Cao K, Xu J, Zou X, Li Y, Chen C, Zheng A, Li H, Li H, Szeto IM, Shi Y, Long J, Liu J, Feng Z. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic Biol Med*. 2014;67:396-407. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.029.
- Caprio FZ, Sorond FA. Cerebrovascular disease: primary and secondary stroke prevention. *Med Clin North Am*. 2019;103(2):295-308. doi: 10.1016/j.mcna.2018.10.001.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanto 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(4):622-9. doi: 10.1161/01.ATV.0000062884.69432.A0.
- Carnevale R, Silvestri R, Loffredo L, Novo M, Cammisotto V, Castellani V, Bartimoccia S, Nocella C, Violi F. Oleuropein, a component of extra virgin olive oil, lowers postprandial glycaemia in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(7):1566-1574. doi: 10.1111/bcp.13589.
- Carrillo C, Cavia MdM, Alonso-Torre S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. *Nutr Hosp*. 2012;27(4):978-90. doi: 10.3305/nh.2012.27.4.5783.
- Casas R, Estruch R, Sacanella E. The protective effects of extra virgin olive oil on immune-mediated inflammatory responses. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(1):23-35. doi: 10.2174/1871530317666171114115632.

- Castellano JM, Guinda A, Delgado T, Rada M, Cayuela JA. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*. 2013;62(6):1791-9. doi: 10.2337/db12-1215.
- Castellano-Orozco JM. 2017. Grasas y aceites. En: Gil A, editor. *Tratado de Nutrición*. Tomo III. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana; 279–308. ISBN: 9788491101925
- Catalán Ú, Rubió L, López de Las Hazas MC, Herrero P, Nadal P, Canela N, Pedret A, Motilva MJ, Solà R. Hydroxytyrosol and its complex forms (secoiridoids) modulate aorta and heart proteome in healthy rats: Potential cardio-protective effects. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(10):2114-2129. doi: 10.1002/mnfr.201600052.
- Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci. Technol*. 2009;20(11–12):557–66. doi:10.1016/j.tifs.2009.07.002
- Cevallos-Cevallos JM, Rouseff R, Reyes-De Corcuera JI. Untargeted metabolite analysis of healthy and huanglongbing-infected orange leaves by CE-DAD. *Electrophoresis*. 2009;30(7):1240-7. doi: 10.1002/elps.200800594.
- Chagoyan Ma C, Hu L, Tao G, Lv W, Wang H. An UPLC-MS-based metabolomics investigation on the anti-fatigue effect of salidroside in mice. *J Pharm Biomed Anal*. 2015 Feb;105:84-90. doi: 10.1016/j.jpba.2014.11.036.
- Chamorro V, Wangenstein R, Sainz J, Duarte J, O'Valle F, Osuna A, Vargas F. Protective effects of the angiotensin II type 1 (AT1) receptor blockade in low-renin deoxycorticosterone acetate (DOCA)-treated spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Mar;106(3):251-9. doi: 10.1042/CS20030299.
- Chandramohan R, Pari L. Anti-inflammatory effects of tyrosol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J. Funct. Foods*. 2016; (27):17–28. doi:10.1016/j.jff.2016.08.043
- Charles L, Triscott J, Dobbs B. Secondary hypertension: discovering the underlying cause. *Am Fam Physician*. 2017;96(7):453-461.
- Chong IG, y Jun CH. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intell. Lab. Syst.* 2005. 78:103–112. doi:10.1016/j.chemolab.2004.12.011.
- Cifuentes A. Food analysis and foodomics. *J Chromatogr A*. 2009;1216(43):7109. doi: 10.1016/j.chroma.2009.09.018.
- Claro-Cala CM, Quintela JC, Pérez-Montero M, Miñano J, de Sotomayor MA, Herrera MD, Rodríguez-Rodríguez AR. Pomace olive oil concentrated in triterpenic acids restores vascular function, glucose tolerance and obesity progression in mice. *Nutrients*. 2020;12(2):323. doi: 10.3390/nu12020323.
- Clifford MN, Copeland EL, Bloxside JP, Mitchell LA. Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica*. 2000;30(3):317-326. doi:10.1080/004982500237703

- COI, International Olive Council. [Internet: <https://www.internationaloliveoil.org/>]. 2020a [Consultada: 19 Nov 2020].
- COI, International Olive Council. Aceite de oliva. Estimaciones año de cultivo 2019/2020. <https://www.internationaloliveoil.org/olive-oil-estimates-2019-20-crop-year/>. 2020b [Consultada: 14 Dic 2020].
- Colica C, Di Renzo L, Trombetta D, Smeriglio A, Bernardini S, Cioccoloni G, Costa de Miranda R, Gualtieri P, Sinibaldi Salimei P, De Lorenzo A. Antioxidant effects of a hydroxytyrosol-based pharmaceutical formulation on body composition, metabolic state, and gene expression: A randomized double-blinded, placebo-controlled crossover trial. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2473495. doi: 10.1155/2017/2473495.
- Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, De Backer G, Jousilahti P, Keil U, Thomsen T, Whincup P, Graham IM; SCORE investigators. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis*. 2009;206(2):611-6. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.041.
- Côté M, Mauriège P, Bergeron J, Alméras N, Tremblay A, Lemieux I, Després JP. Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1434-9. doi: 10.1210/jc.2004-1711.
- Covas MI, de la Torre R, Fitó M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *Br J Nutr*. 2015;113 Suppl 2:S19-S28. doi:10.1017/S0007114515000136
- Covas MI, Ruíz-Gutiérrez V, De La Torre R, Kafatos A, Lamuela-Raventós RM, Osada J, Owen RW, Visioli F. Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews*. 2006; 64(s4):20-30. doi:10.1301
- Crespo MA, González Matías LC, Lozano MG, Paz SF, Pérez MR, Gago EV, Ferrer FM. Gastrointestinal hormones in food intake control. *Endocrinol Nutr*. 2009;56(6):317-30. doi: 10.1016/S1575-0922(09)71946-1.
- Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*. 2007;117(1):13-23. doi: 10.1172/JCI30227.
- Danciu C, Avram S, Pavel IZ, et al. Main Isoflavones Found in Dietary Sources as Natural Anti-inflammatory Agents. *Curr Drug Targets*. 2018;19(7):841-853. doi:10.2174/1389450118666171109150731
- Daykin CA, Van Duynhoven JP, Groenewegen A, Dachtler M, Van Amelsvoort JM, Mulder TP. Nuclear magnetic resonance spectroscopic based studies of the metabolism of black tea polyphenols in humans. *J Agric Food Chem*. 2005;53(5):1428-1434. doi:10.1021/jf048439o
- De Bock M, Derraik JG, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, Hofman PL, Cutfield WS. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS One*. 2013;8(3):e57622. doi: 10.1371/journal.pone.0057622.
- De la Torre R, Carbó M, Pujadas M, Biel S, Mesa MD, Covas MI, Expósito M, Espejo JA, Sanchez-Rodríguez E, Díaz-Pellicer P, Jimenez-Valladares F, Rosa C, Pozo O, Fitó M. Pharmacokinetics

- of maslinic and oleanolic acids from olive oil - Effects on endothelial function in healthy adults. A randomized, controlled, dose-response study. *Food Chem.* 2020 Aug 30;322:126676. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126676.
- De Las Hazas MCL, Rubio L, Macia A, Motilva MJ. Hydroxytyrosol: emerging trends in potential therapeutic applications. *Curr Pharm Des.* 2018;24(19):2157-2179. doi: 10.2174/1381612824666180522110314.
- DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.* 1988;37(6):667-87. doi: 10.2337/diab.37.6.667.
- Deiana M, Incani A, Rosa A, Atzeri A, Loru D, Cabboi B, Paola Melis M, Lucas R, Morales JC, Assunta Dessì M. Hydroxytyrosol glucuronides protect renal tubular epithelial cells against H(2)O(2) induced oxidative damage. *Chem Biol Interact.* 2011 Sep 30;193(3):232-9. doi: 10.1016/j.cbi.2011.07.002. Epub 2011 Jul 21. PMID: 21798251.
- Del Ben M, Nocella C, Loffredo L, Bartimoccia S, Cammisotto V, Mancinella M, Angelico F, Valenti V, Cavarretta E, Carnevale R, Violi F. Oleuropein-enriched chocolate by extra virgin olive oil blunts hyperglycaemia in diabetic patients: Results from a one-time 2-hour post-prandial cross over study. *Clin Nutr.* 2020 Jul;39(7):2187-2191. doi: 10.1016/j.clnu.2019.09.006.
- Dettmer K, Hammock BD. Metabolomics: A new exciting field within the "omics" sciences. *Environ Health Perspect.* 2004;112(7):A396-7. doi: 10.1289/ehp.112-1241997.
- Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, Matarrese P, D'Archivio M, Masella R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(7):535-45. doi: 10.1016/j.numecd.2006.03.005.
- Diakogiannaki E, Gribble FM, Reimann F. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. *Physiol Behav.* 2012 Jun 6;106(3):387-93. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.12.001.
- Dickhout JG, Lee RM. Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997 Mar;29(3):781-9. doi: 10.1161/01.hyp.29.3.781.
- Duarte J, Jiménez R, O'Valle F, Galisteo M, Pérez-Palencia R, Vargas F, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Tamargo J. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens.* 2002 Sep;20(9):1843-54. doi: 10.1097/00004872-200209000-00031.
- Durante P, Chávez M, Pérez M, Romero F, Rivera F. Effect of uric acid on hypertension progression in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2010 Jun 19;86(25-26):957-64. doi: 10.1016/j.lfs.2010.05.004.
- EFSA, Agencia Europea de Seguridad Alimentaria. 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to olive oil and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1316, 1332), maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 1316, 1332), maintenance of normal blood HDL concentrations (ID 1316, 1332) and maintenance of normal blood glucosa concentrations (ID 4244) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011;9(4):2044. [Consultada: 13 Feb 2022]. doi:10.2903/J.EFSA.2011.2044

- Escudero A, Montilla JC, García JM, et al. Effect of dietary (n-9), (n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1394(1):65-73. doi:10.1016/s0005-2760(98)00095-2
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruíz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Fitó M, Gea A, Hernán MA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N Engl J Med*. 2018;378(25):e34. doi:10.1056/NEJMoa1800389.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to olive oil and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1316, 1332), maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 1316, 1332), maintainan. (2011) [Consultada: 2022 Feb 13] doi:10.2903/J.EFSA.2011.2044.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97. doi: 10.1001/jama.285.19.2486.
- Fabiani R, Naldini G, Chiavarini M. Dietary patterns and metabolic syndrome in adult subjects: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2019;11(9):2056. doi: 10.3390/nu11092056.
- Fardet A, Llorach R, Orsoni A, Martin JF, Pujos-Guillot E, Lapierre C, Scalbert A. Metabolomics provide new insight on the metabolism of dietary phytochemicals in rats. *J Nutr*. 2008;138(7):1282-7. doi: 10.1093/jn/138.7.1282.
- Feld LG, Van Liew JB, Galaske RG, Boylan JW. Selectivity of renal injury and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int*. 1977;12(5):332-43. doi: 10.1038/ki.1977.120.
- Fernández-Arroyo S, Gómez-Martínez A, Rocamora-Reverte L, Quirantes-Piné R, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Ferragut JA. Application of nano LC-ESI-TOF-MS for the metabolomic analysis of phenolic compounds from extra-virgin olive oil in treated colon-cancer cells. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;63:128-34. doi: 10.1016/j.jpba.2012.01.033.
- Fernández-Bolaños Guzmán, J.; Heredia Moreno, A.; Rodríguez Gutiérrez, G.; Rodríguez Arcos, R.; Jiménez Araujo, A.; Guillen Bejarano, R. Patent PCT/ES2002/000058. Method for Obtaining Purified Hydroxytyrosol from Products and By-Products Derived from the Olive Tree. 2002. Available online: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2002064537>. [Consultado: 21 dec 2021].
- Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *J Agric Food Chem*. 2002 Nov 6;50(23):6804-11. doi:10.1021/jf011712r.
- Fibrillation: Rationale, design and methods. *Am Heart J*. 2020 ;220:127-136.doi:10.1016/j.ahj.2019.10.009.

- Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics*. 2001;2(3):155-68. doi: 10.1002/cfg.82.
- Flora GD, Nayak MK. A brief review of cardiovascular diseases, associated risk factors and current treatment regimes. *Curr. Pharm. Des.* 2019;25(38):4063-84. doi:10.2174/1381612825666190925163827
- Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120(4):713-735. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.
- Franco MN, Galeano-Díaz T, López O, Fernández-Bolaños JG, Sánchez J, De Miguel C, Gil MV, Martín-Vertedor D. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chem*. 2014 Nov 15;163:289-98. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.091.
- Franczyk B, Rysz J, Ławiński J, Rysz-Górzyńska M, Gluba-Brzózka A. Is a high HDL-cholesterol level always beneficial? *Biomedicines*. 2021;9(9):1083. doi: 10.3390/biomedicines9091083.
- Funari SS, Barceló F, Escribá PV. Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes. *J Lipid Res*. 2003;44(3):567-575. doi:10.1194/jlr.M200356-JLR200
- Galmés S, Reynés B, Palou M, Palou-March A, Palou A. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Main Olive Tree Phenols and Polyphenols: A Literature Review. *J Agric Food Chem*. 2021 May 12;69(18):5281-5296. doi: 10.1021/acs.jafc.1c00737.
- Gamede M, Mabuza L, Ngubane P, Khathi A. The effects of plant-derived oleanolic acid on selected parameters of glucose homeostasis in a diet-induced pre-diabetic rat model. *Molecules*. 2018;23(4):794. doi: 10.3390/molecules23040794.
- George ES, Marshall S, Mayr HL, Trakman GL, Tatucu-Babet OA, Lassemillante AM, Bramley A, Reddy AJ, Forsyth A, Tierney AC, Thomas CJ, Itsiopoulos C, Marx W. The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(17):2772-2795. doi: 10.1080/10408398.2018.1470491.
- Gibney MJ, Walsh M, Brennan L, Roche HM, German B, van Ommen B. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(3):497-503. doi: 10.1093/ajcn.82.3.497.
- Gil-Izquierdo A, Penalvo JL, Gil JJ, et al. Soy isoflavones and cardiovascular disease epidemiological, clinical and -omics perspectives. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(5):624-631. doi:10.2174/138920112799857585
- Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M, Malorni W, Masella R. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J Nutr*. 1999;129(7):1269-77. doi: 10.1093/jn/129.7.1269.
- Godo S, Shimokawa H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2017;109:4-10. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.019.



- Goh SY, Cooper ME. Clinical review: the role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1143-52. doi: 10.1210/jc.2007-1817.
- Gonzalez-Anton C, Rico MC, Sanchez-Rodriguez E, Ruiz-Lopez MD, Gil A, Mesa MD. Glycemic responses, appetite ratings and gastrointestinal hormone responses of most common breads consumed in Spain. A randomized control trial in healthy humans. *Nutrients.* 2015 May 27;7(6):4033-53. doi: 10.3390/nu7064033.
- González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J Agric Food Chem.* 2008;56(17):7872-6. doi: 10.1021/jf801502z.
- González-Santiago M, Martín-Bautista E, Carrero JJ, Fonollá J, Baró L, Bartolomé MV, Gil-Loyzaga P, López-Huertas E. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis.* 2006;188(1):35-42. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.022.
- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):686. doi: 10.3390/ijms19030686.
- Griffiths WJ, Koal T, Wang Y, Kohl M, Enot DP, Deigner HP. Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(32):5426-45. doi: 10.1002/anie.200905579.
- Grundy SM. Metabolic syndrome scientific statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(11):2243-4. doi: 10.1161/01.ATV.0000189155.75833.c7.
- Guasch-Ferré M, Hu FB, Martínez-González MA, Fitó M, Bulló M, Estruch R, Ros E, Corella D, Recondo J, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Muñoz MA, Pintó X, Lamuela-Raventós RM, Basora J, Buil-Cosiales P, Sorlí JV, Ruiz-Gutiérrez V, Martínez JA, Salas-Salvadó J. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.* 2014 May 13;12:78. doi: 10.1186/1741-7015-12-78.
- Hålldin E, Eriksen AK, Brunius C, et al. Factors Explaining Interpersonal Variation in Plasma Enterolactone Concentrations in Humans. *Mol Nutr Food Res.* 2019;63(16):e1801159. doi:10.1002/mnfr.201801159
- Hannon BA, Khan NA, Teran-Garcia M. Nutrigenetic contributions to dyslipidemia: a focus on physiologically relevant pathways of lipid and lipoprotein metabolism. *Nutrients.* 2018;10(10):1404. doi: 10.3390/nu10101404.
- Hansen K, Adersen A, Christensen SB, Jensen SR, Nyman U, Smitt UW. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *olea lancea*. *Phytomedicine.* 1996 Mar;2(4):319-25. doi: 10.1016/S0944-7113(96)80076-6.

- Hao J, Shen W, Yu G, Jia H, Li X, Feng Z, Wang Y, Weber P, Wertz K, Sharman E, Liu J. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem*. 2010;21(7):634-44. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.03.012.
- Häring HU. Novel phenotypes of prediabetes? *Diabetologia*. 2016 Sep;59(9):1806-18. doi: 10.1007/s00125-016-4015-3. Epub 2016 Jun 25.
- Haurani MJ, Pagano PJ. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: Bellwether for vascular disease? *Cardiovasc. Res*. 2007;75(4):679-89. doi:10.1016/j.cardiores.2007.06.016
- Heo KS, Berk BC, Abe J. Disturbed flow-induced endothelial proatherogenic signaling via regulating post-translational modifications and epigenetic events. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(7):435-50. doi: 10.1089/ars.2015.6556.
- Hernández Á, Jaramillo S, García-Borrego A, Espejo-Calvo JA, Covas MI, Blanchart G, de la Torre R, Carrasco-Pancorbo A, Mesa MD, Fernández-Prior MÁ, Castañer O, Fitó M. From Green Technology to Functional Olive Oils: Assessing the Best Combination of Olive Tree-Related Extracts with Complementary Bioactivities. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jan 30;10(2):202. doi: 10.3390/antiox10020202.
- Hernández EM. Specialty oils: functional and nutraceutical properties. *Funct. Diet. Lipids Food Formul*. 2015. 69-101. doi:10.1016/B978-1-78242-247-1.00004-1
- Herrmann SM, Textor SC. Renovascular hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48(4):765-778. doi: 10.1016/j.ecl.2019.08.007.
- Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Cobo A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Changes in gut microbiota linked to a reduction in systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats fed an extra virgin olive oil-enriched diet. *Plant Foods Hum Nutr*. 2018 Mar;73(1):1-6. doi: 10.1007/s11130-017-0650-1.
- Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab*. 2004;287(2 50-2). doi:10.1152/ajpendo.00545.2003
- Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(2):E199-206. doi: 10.1152/ajpendo.00545.2003.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7. doi: 10.1038/nature05485.
- Hou CC, Chen YP, Wu JH, et al. A galactolipid possesses novel cancer chemopreventive effects by suppressing inflammatory mediators and mouse B16 melanoma. *Cancer Res*. 2007;67(14):6907-6915. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0158
- Hu Y, Li Y, Sampson L, Wang M, Manson JE, Rimm E, Sun Q. Lignan Intake and Risk of Coronary Heart Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2021 Aug 17;78(7):666-678. doi: 10.1016/j.jacc.2021.05.049. PMID: 34384548; PMCID: PMC8432598.
- Human Metabolome Database (HMDB). <https://hmdb.ca/> [Consultada: 9 Feb 2022].

- Hurtubise J, McLellan K, Durr K, Onasanya O, Nwabuko D, Ndisang JF. The different facets of dyslipidemia and hypertension in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2016;18(12):82. doi: 10.1007/s11883-016-0632-z.
- Hussain-Shaik A, Rasool SN, Abdul-Kareem M, Krushna GS, Akhtar PM, Devi KL. Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J Med Food.* 2012;15(8):741-6. doi: 10.1089/jmf.2012.2191.
- Huynh DTN, Heo KS. Therapeutic targets for endothelial dysfunction in vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2019;42(10):848-861. doi: 10.1007/s12272-019-01180-7.
- Iaconelli A, Gastaldelli A, Chiellini C, Gniuli D, Favuzzi A, Binnert C, Macé K, Mingrone G. Effect of oral sebacic Acid on postprandial glycemia, insulinemia, and glucose rate of appearance in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2010 Nov;33(11):2327-32. doi: 10.2337/dc10-0663.
- Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I. Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin Chim Acta.* 2012;413(19-20):1446-53. doi: 10.1016/j.cca.2012.06.012.
- Imran M, Nadeem M, Gilani SA, Khan S, Sajid MW, Amir RM. Antitumor perspectives of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol: recent updates. *J Food Sci.* 2018;83(7):1781-1791. doi: 10.1111/1750-3841.14198.
- Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules.* 2009;14(6):2016-31. doi: 10.3390/molecules14062016.
- Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem.* 2009;57(19):8798-804. doi: 10.1021/jf901280r.
- Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A, Isoda H, Sayadi S. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem.* 2008;56(8):2630-6. doi: 10.1021/jf072589s.
- Jiang W, Si L, Li P, Bai B, Qu J, Hou B, Zou H, Fan X, Liu Z, Liu Z, Gao L. Serum metabonomics study on antidiabetic effects of fenugreek flavonoids in streptozotocin-induced rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018 Aug 15;1092:466-472. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.06.041.
- Jimenez-Lopez C, Carpena M, Lourenço-Lopes C, Gallardo-Gomez M, Lorenzo JM, Barba FJ, Prieto MA, Simal-Gandara J. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods.* 2020;9(8):1014. doi: 10.3390/foods9081014.
- Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plataras J, Roberts LJ 2nd, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2005;38(6):698-710. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.017.

- Karam H, Heudes D, Bruneval P, Gonzales MF, Löffler BM, Clozel M, Clozel JP. Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension*. 1996 Sep;28(3):379-85. doi: 10.1161/01.hyp.28.3.379.
- Karković-Marković A, Torić J, Barbarić M, Jakobušić Brala C. Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules*. 2019;24(10):2001. doi: 10.3390/molecules24102001.
- Karr S. Epidemiology and management of hyperlipidemia. *Am J Manag Care*. 2017;23(9 Suppl):S139-S148.
- Katsuura G, Asakawa A, Inui A. Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides*. 2002 Feb;23(2):323-9. doi: 10.1016/s0196-9781(01)00604-0.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2402-10. doi: 10.1210/jcem.85.7.6661.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol*. 1986;124(6):903-15. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114480.
- Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int*. 2005;67(5):1739-42. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00273.x
- Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, Block ER, Prabhakar S, Johnson RJ. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int*. 2005 May;67(5):1739-42. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00273.x.
- Kinuno H, Tomoda F, Koike T, Takata M, Inoue H. Effects of uninephrectomy on renal structural properties in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(3):173-8. doi: 10.1111/j.1440-1681.2005.04167.x.
- Klãvus A, Kokla M, Noerman S, Koistinen VM, Tuomainen M, Zarei I, Meuronen T, Häkkinen MR, Rummukainen S, Farizah Babu A, Sallinen T, Kärkkäinen O, Paananen J, Broadhurst D, Brunius C, Hanhineva K. "notame": Workflow for Non-Targeted LC-MS Metabolic Profiling. *Metabolites*. 2020 Mar 31;10(4):135. doi: 10.3390/metabo10040135.
- Kojima S, Ueno N, Asakawa A, Sagiyama K, Naruo T, Mizuno S, Inui A. A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. *Peptides*. 2007;28(2):459-63. doi: 10.1016/j.peptides.2006.09.024.
- Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med*. 2012;2012:918267. doi: 10.1155/2012/918267.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(1 Pt 2):137-54.
- Koppel N, Maini Rekdal V, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*. 2017 Jun 23;356(6344):eaag2770. doi: 10.1126/science.aag2770.

- Krzemińska J, Wronka M, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J. Arterial hypertension-oxidative stress and inflammation. *Antioxidants*. 2022;11(1):172. doi: 10.3390/antiox11010172.
- Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*. 2006 Aug;29(8):1756-8. doi: 10.1248/bpb.29.1756.
- Larsen, Erik, and Lars P. Christensen. "Common vegetables and fruits as a source of 1, 2-di-o- $\alpha$ -linolenoyl-3-o- $\beta$ -d-galactopyranosyl-sn-glycerol, a potential anti-inflammatory and antitumor agent." *Journal of Food Lipids* 14.3 (2007): 272-279.
- Lassmann V, Vague P, Vialettes B, Simon MC. Low plasma levels of pancreatic polypeptide in obesity. *Diabetes*. 1980;29(6):428-30. doi: 10.2337/diab.29.6.428.
- Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A; International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease. 2001. *Lancet*. 2008;371(9623):1513-8. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60655-8.
- Lawton KA, Berger A, Mitchell M, et al. Analysis of the adult human plasma metabolome. *Pharmacogenomics*. 2008;9(4):383-397. doi:10.2217/14622416.9.4.383
- Lee H, Im SW, Jung CH, Jang YJ, Ha TY, Ahn J. Tyrosol, an olive oil polyphenol, inhibits ER stress-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cell through JNK signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469(3):748-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.036.
- Lees HJ, Swann JR, Wilson ID, Nicholson JK, Holmes E. Hippurate: the natural history of a mammalian-microbial cometabolite. *J Proteome Res*. 2013 Apr 5;12(4):1527-46. doi: 10.1021/pr300900b.
- Lemonakis N, Poudyal H, Halabalaki M, Brown L, Tsarbopoulos A, Skaltsounis AL, Gikas E. The LC-MS-based metabolomics of hydroxytyrosol administration in rats reveals amelioration of the metabolic syndrome. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017;1041-1042:45-59. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.12.020.
- Li J, Guasch-Ferré M, Chung W, Ruíz-Canela M, Toledo E, Corella D, Bhupathiraju SN, Tobias DK, Tabung FK, Hu J, Zhao T, Turman C, Feng YA, Clish CB, Mucci L, Eliassen AH, Costenbader KH, Karlson EW, Wolpin BM, Ascherio A, Rimm EB, Manson JE, Qi L, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Hu FB, Liang L. The Mediterranean diet, plasma metabolome, and cardiovascular disease risk. *Eur Heart J*. 2020;41(28):2645-2656. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa209.
- Li S, Park Y, Duraisingham S, Strobel FH, Khan N, Soltow QA, Jones DP, Pulendran B. Predicting network activity from high throughput metabolomics. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(7):e1003123. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003123.
- Lichtenstein AH. Dietary fat and cardiovascular disease risk: quantity or quality? *J Womens Health*. 2003;12(2):109-14. doi: 10.1089/154099903321576493.
- Lioupi A, Nenadis N, Theodoridis G. Virgin olive oil metabolomics: A review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020 Aug 1;1150:122161. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122161.

- Liu H, Garrett TJ, Su Z, Khoo C, Gu L. UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS-based global metabolomics reveal metabolome modifications in plasma of young women after cranberry juice consumption. *J Nutr Biochem*. 2017 Jul;45:67-76. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.03.007.
- Liu H, Garrett TJ, Tayyari F, Gu L. Profiling the metabolome changes caused by cranberry procyanidins in plasma of female rats using (1) H NMR and UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS global metabolomics approaches. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Nov;59(11):2107-18. doi: 10.1002/mnfr.201500236.
- Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *Eur J Nutr*. 2017 Jun;56(4):1421-1432. doi: 10.1007/s00394-016-1188-y.
- López S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, Jaramillo S, Abia R, Muriana FJ. Virgin olive oil and hypertension. *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;14(4):323-9. doi: 10.2174/1570161114666160118105137.
- López-Villodres JA, Abdel-Karim M, De La Cruz JP, Rodríguez-Pérez MD, Reyes JJ, Guzmán-Moscoso R, Rodríguez-Gutierrez G, Fernández-Bolaños J, González-Correa JA. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *J Nutr Biochem*. 2016;37:94-100. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.07.015.
- Lourida I, Soni M, Thompson-Coon J, Purandare N, Lang IA, Ukoumunne OC, Llewellyn DJ. Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review. *Epidemiology*. 2013;24(4):479-89. doi: 10.1097/EDE.0b013e3182944410.
- Lu Y, A J, Wang G, Hao H, Huang Q, Yan B, Zha W, Gu S, Ren H, Zhang Y, Fan X, Zhang M, Hao K. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabonomic approach to differentiating hypertension- and age-related metabolic variation in spontaneously hypertensive rats. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008 Sep;22(18):2882-8. doi: 10.1002/rcm.3670.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Feb;7(2):156-67. doi: 10.1038/nrd2466.
- Luo M, Peng D. The emerging role of apolipoprotein C-III: beyond effects on triglyceride metabolism. *Lipids Health Dis*. 2016;15(1):184. doi: 10.1186/s12944-016-0352-y.
- Luvuno M, Mbongwa HP, Khathi A. The effects of syzygium aromaticum-derived triterpenes on gastrointestinal ghrelin expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2016;13(4):8-14. doi: 10.21010/ajtcam.v13i4.2.
- Magagna F, Valverde-Som L, Ruíz-Samblás C, Cuadros-Rodríguez L, Reichenbach SE, Bicchi C, Cordero C. Combined untargeted and targeted fingerprinting with comprehensive two-dimensional chromatography for volatiles and ripening indicators in olive oil. *Anal Chim Acta*. 2016;936:245-58. doi: 10.1016/j.aca.2016.07.005.
- Mali AV, Padhye SB, Anant S, Hegde MV, Kadam SS. Anticancer and antimetastatic potential of enterolactone: Clinical, preclinical and mechanistic perspectives. *Eur J Pharmacol*. 2019 Jun 5;852:107-124. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.02.022. Epub 2019 Feb 14.

- Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(10):1303-15. doi: 10.1002/mnfr.200800516.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy 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. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S.
- Mancia G, Facchetti R, Bombelli M, Polo Friz H, Grassi G, Giannattasio C, Sega R. Relationship of office, home, and ambulatory blood pressure to blood glucose and lipid variables in the PAMELA population. *Hypertension*. 2005;45(6):1072-7. doi: 10.1161/01.HYP.0000165672.69176.ed.
- Mannucci E, Monami M, Lamanna C, Adalsteinsson JE. Post-prandial glucose and diabetic complications: systematic review of observational studies. *Acta Diabetol*. 2012;49(4):307-14. doi: 10.1007/s00592-011-0355-0.
- Marcelino G, Hiane PA, Freitas KC, Santana LF, Pott A, Donadon JR, Guimarães RCA. Effects of olive oil and its minor components on cardiovascular diseases, inflammation, and gut microbiota. *Nutrients*. 2019 Aug 7;11(8):1826. doi: 10.3390/nu11081826.
- Martín-Peláez S, Castañer O, Konstantinidou V, Subirana I, Muñoz-Aguayo D, Blanchart G, Gaixas S, de la Torre R, Farré M, Sáez GT, Nyyssönen K, Zunft HJ, Covas MI, Fitó M. Effect of olive oil phenolic compounds on the expression of blood pressure-related genes in healthy individuals. *Eur J Nutr*. 2017 Mar;56(2):663-670. doi: 10.1007/s00394-015-1110-z.
- Martín-Peláez S, Mosele JI, Pizarro N, Farràs M, de la Torre R, Subirana I, Pérez-Cano FJ, Castañer O, Solà R, Fernandez-Castillejo S, Heredia S, Farré M, Motilva MJ, Fitó M. Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. *Eur J Nutr*. 2017 Feb;56(1):119-131. doi: 10.1007/s00394-015-1063-2.
- Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999;22(9):1462-70. doi: 10.2337/diacare.22.9.1462.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9. doi: 10.1007/BF00280883.
- McPherson PA, Türemen BT. 3,4-Dihydroxy-l-phenylalanine as a biomarker of oxidative damage in proteins: improved detection using cloud-point extraction and HPLC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):376-381. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.080
- Meier T, Gräfe K, Senn F, Sur P, Stangl GI, Dawczynski C, März W, Kleber ME, Lorkowski S. Cardiovascular mortality attributable to dietary risk factors in 51 countries in the WHO European Region from 1990 to 2016: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study. *Eur J Epidemiol*. 2019;34(1):37-55. doi: 10.1007/s10654-018-0473-x.
- Mesa MD, Aguilera CM, Gil A. Importance of lipids in the nutritional treatment of inflammatory diseases. *Nutr Hosp*. 2006;21 Suppl 2:28-41, 30-43.

- Mesa MD, Sánchez-Rodríguez E, de Luis D. 2017. Nutrición en las enfermedades cardiovasculares. En: Gil A, editor. Tratado de Nutrición. Tomo V. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana; 587-615. ISBN: 9788491101949
- Miller M, Rhyne J, Hamlette S, Birnbaum J, Rodriguez A. Genetics of HDL regulation in humans. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(3):273-9. doi: 10.1097/00041433-200306000-00007.
- Millman J, Okamoto S, Kimura A, Uema T, Higa M, Yonamine M, Namba T, Ogata E, Yamazaki S, Shimabukuro M, Tsutsui M, Matsushita M, Ikematsu S, Masuzaki H. Metabolically and immunologically beneficial impact of extra virgin olive and flaxseed oils on composition of gut microbiota in mice. *Eur J Nutr.* 2020 Sep;59(6):2411-2425. doi: 10.1007/s00394-019-02088-0.
- Milutinović A, Šuput D, Zorc-Pleskovič R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: an updated review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020;20(1):21-30. doi: 10.17305/bjbms.2019.4320.
- Mingrone G, Castagneto-Gissey L, Macé K. Use of dicarboxylic acids in type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Mar;75(3):671-6. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04177.x.
- Mitjavila MT, Fandos M, Salas-Salvadó J, Covas MI, Borrego S, Estruch R, Lamuela-Raventós R, Corella D, Martínez-González MÁ, Sánchez JM, Bulló M, Fitó M, Tormos C, Cerdá C, Casillas R, Moreno JJ, Iradi A, Zaragoza C, Chaves J, Sáez GT. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial. *Clin Nutr.* 2013 Apr;32(2):172-8. doi: 10.1016/j.clnu.2012.08.002.
- Miyamoto Y, Akaike T, Yoshida M, Goto S, Horie H, Maeda H. Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xanthine oxidase inhibitors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996 Apr;211(4):366-73. doi: 10.3181/00379727-211-43982.
- Mohamed MB, Rocchetti G, Montesano D, Ali SB, Guasmi F, Grati-Kamoun N, Lucini L. Discrimination of Tunisian and Italian extra-virgin olive oils according to their phenolic and sterolic fingerprints. *Food Res Int.* 2018;106:920-927. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.010.
- Mohammed-Ali Z, Carlisle RE, Nademi S, Dickhout JG. 2017. Animal models of kidney disease. *Anim. Model. Study Hum. Dis.* 2ª edición. Elsevier.; . <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6/00016-4>.
- Monton MR, Soga T. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1168(1-2):237-46; doi: 10.1016/j.chroma.2007.02.065.
- Morisset AS, Lemieux S, Veilleux A, Bergeron J, John Weisnagel S, Tchernof A. Impact of a lignan-rich diet on adiposity and insulin sensitivity in post-menopausal women. *Br J Nutr.* 2009;102(2):195-200. doi:10.1017/S0007114508162092
- Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol.* 2006;187(4):433-46. doi: 10.1111/j.1748-1716.2006.01582.x.
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey



- DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-360. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.
- Muriana FJ, Villar J, Ruíz-Gutiérrez V. Intake of olive oil can modulate the transbilayer movement of human erythrocyte membrane cholesterol. *Cell Mol Life Sci*. 1997;53(6):496-500. doi: 10.1007/s000180050061.
- Muscogiuri G, DeFronzo RA, Gastaldelli A, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1 and the central/peripheral nervous system: crosstalk in diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(2):88-103. doi: 10.1016/j.tem.2016.10.001.
- Mwakalukwa R, Amen Y, Nagata M, Shimizu K. Postprandial hyperglycemia lowering effect of the isolated compounds from olive mill wastes - an inhibitory activity and kinetics studies on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes. *ACS Omega*. 2020 Aug 7;5(32):20070-20079. doi: 10.1021/acsomega.0c01622.
- Nahmias A, Stahel P, Xiao C, Lewis GF. Glycemia and atherosclerotic cardiovascular disease: exploring the gap between risk marker and risk factor. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:100. doi: 10.3389/fcvm.2020.00100.
- Najmanová I, Pourová J, Vopršalová M, Pilařová V, Semecký V, Nováková L, Mladěnka P. Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Mol Nutr Food Res*. 2016 May;60(5):981-91. doi: 10.1002/mnfr.201500761.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001;409(6817):194-8. doi: 10.1038/35051587.
- Nekoeian AA, Khalili A, Khosravi MB. Effects of oleuropein in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: a study of antihypertensive mechanisms. *J Asian Nat Prod Res*. 2014;16(9):953-62. doi: 10.1080/10286020.2014.924510.
- Nikou T, Witt M, Stathopoulos P, Barsch A, Halabalaki M. Olive oil quality and authenticity assessment aspects employing FIA-MRMS and LC-Orbitrap MS metabolomic approaches. *Front Public Health*. 2020;8:558226. doi: 10.3389/fpubh.2020.558226.
- Núñez-Córdoba JM, Valencia-Serrano F, Toledo E, Alonso A, Martínez-González MA. The Mediterranean diet and incidence of hypertension: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) Study. *Am J Epidemiol*. 2009 Feb 1;169(3):339-46. doi: 10.1093/aje/kwn335. Epub 2008 Nov 26.
- Ofstad J, Iversen BM. Glomerular and tubular damage in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(4):F665-72. doi: 10.1152/ajprenal.00226.2004.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282-93. doi: 10.1253/jcj.27.282.

- Oliveira-Paula GH, Pinheiro LC, Tanus-Santos JE. Mechanisms impairing blood pressure responses to nitrite and nitrate. *Nitric Oxide*. 2019 Apr 1;85:35-43. doi: 10.1016/j.niox.2019.01.015.
- Olmo-García L, Carrasco-Pancorbo A. Chromatography-MS based metabolomics applied to the study of virgin olive oil bioactive compounds: Characterization studies, agro-technological investigations and assessment of healthy properties. *TrAC - Trends Anal. Chem. Elsevier*. 2021. doi:10.1016/j.trac.2020.116153
- Olmo-García L, Polari JJ, Li X, Bajoub A, Fernández-Gutiérrez A, Wang SC, Carrasco-Pancorbo A. Deep insight into the minor fraction of virgin olive oil by using LC-MS and GC-MS multi-class methodologies. *Food Chem*. 2018;261:184-193. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.006.
- Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 2010;78(2):133-54. doi: 10.3797/scipharm.0912-18.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2020a. Enfermedades cardiovasculares. [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/es/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/). 2020a [Consultada: 18 Nov 2020].
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2020b. Hipertensión. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>. 2020b. [Consultada: 18 Nov 2020].
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2020c. Diabetes. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. [Consultada: 18 Nov 2020].
- Onuh JO, Qiu H. Metabolic profiling and metabolites fingerprints in human hypertension: discovery and potential. *Metabolites*. 2021 Oct 7;11(10):687. doi: 10.3390/metabo11100687.
- Ooi EM, Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(10):611-24. doi: 10.1042/CS20070308.
- Oskarsson HJ, Heistad DD. Oxidative stress produced by angiotensin too. Implications for hypertension and vascular injury. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):557-9. doi: 10.1161/01.cir.95.3.557.
- Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology*. 2005;146(2):845-50. doi: 10.1210/en.2004-0609.
- Pallister T, Jackson MA, Martin TC, Zierer J, Jennings A, Mohny RP, MacGregor A, Steves CJ, Cassidy A, Spector TD, Menni C. Hippurate as a metabolomic marker of gut microbiome diversity: Modulation by diet and relationship to metabolic syndrome. *Sci Rep*. 2017 Oct 20;7(1):13670. doi: 10.1038/s41598-017-13722-4.
- Pallister T, Jackson MA, Martin TC, Zierer J, Jennings A, Mohny RP, MacGregor A, Steves CJ, Cassidy A, Spector TD, Menni C. Hippurate as a metabolomic marker of gut microbiome diversity: Modulation by diet and relationship to metabolic syndrome. *Sci Rep*. 2017 Oct 20;7(1):13670. doi: 10.1038/s41598-017-13722-4.
- Parikh A, Thevenin C. 2021. Physiology, gastrointestinal hormonal control. StatPearls Publishing. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30725969/>. [Consultada: 4 Mar 2022]. PMID: 30725969.

- Park JS, Woo MS, Kim DH, et al. Anti-inflammatory mechanisms of isoflavone metabolites in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320(3):1237-1245. doi:10.1124/jpet.106.114322
- Parkinson L, Cicerale S. The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds. *Molecules.* 2016;21(12):1734. doi: 10.3390/molecules21121734.
- Patzak A, Persson AE. Angiotensin II-nitric oxide interaction in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16(1):46-51. doi: 10.1097/MNH.0b013e328011a89b.
- Peluso I, Morabito G, Urban L, Ioannone F, Serafini M. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012;12(4):351-60. doi: 10.2174/187153012803832602.
- Pereira BP, do Vale GT, Ceron CS. The role of nitric oxide in renovascular hypertension: from the pathophysiology to the treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2022;395(2):121-131. doi: 10.1007/s00210-021-02186-z.
- Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruíz-Gutiérrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem.* 2006;17(7):429-45. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.11.007.
- Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P, McCullough ML. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr Rev.* 2010 Oct;68(10):571-603. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00319.x.
- Peyrol J, Riva C, Amiot MJ. Hydroxytyrosol in the prevention of the metabolic syndrome and related disorders. *Nutrients.* 2017 Mar 20;9(3):306. doi: 10.3390/nu9030306.
- Phipps AN, Stewart J, Wright B, Wilson ID. Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica.* 1998 May;28(5):527-37. doi: 10.1080/004982598239443.
- Piccinin E, Cariello M, De Santis S, Ducheix S, Sabbà C, Ntambi JM, Moschetta A. Role of oleic acid in the gut-liver axis: from diet to the regulation of its synthesis via stearoyl-coa desaturase 1 (SCD1). *Nutrients.* 2019;11(10):2283. doi: 10.3390/nu11102283.
- Pinto V, Pinho MJ, Soares-da-Silva P. Renal amino acid transport systems and essential hypertension. *FASEB J.* 2013;27(8):2927-2938. doi:10.1096/fj.12-224998
- Pirozzi C, Lama A, Simeoli R, Paciello O, Pagano TB, Mollica MP, Di Guida F, Russo R, Magliocca S, Canani RB, Raso GM, Calignano A, Meli R. Hydroxytyrosol prevents metabolic impairment reducing hepatic inflammation and restoring duodenal integrity in a rat model of NAFLD. *J Nutr Biochem.* 2016;30:108-15. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.12.004.
- Plotnikov MB, Aliev OI, Sidekhmenova AV, Shamanaev AY, Anishchenko AM, Fomina TI, Plotnikova TM, Arkhipov AM. Effect of p-tyrosol on hemorheological parameters and cerebral capillary network in young spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res.* 2018;119:91-97. doi: 10.1016/j.mvr.2018.04.005.
- Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr.* 2010;140(5):946-53. doi: 10.3945/jn.109.117812.

- Pozo OJ, Pujadas M, Gleeson SB, Mesa-García MD, Pastor A, Kotronoulas A, Fitó M, Covas MI, Navarro JRF, Espejo JA, Sánchez-Rodríguez E, Marchal R, Calleja MA, de la Torre R. Liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of triterpenes in human fluids: evaluation of markers of dietary intake of olive oil and metabolic disposition of oleanolic acid and maslinic acid in humans. *Anal Chim Acta*. 2017;990:84-95. doi: 10.1016/j.aca.2017.07.041.
- Qasim A, Rader DJ. Human genetics of variation in high-density lipoprotein cholesterol. *Curr Atheroscler Rep*. 2006;8(3):198-205. doi: 10.1007/s11883-006-0074-0.
- Qing X, Shi D, Lv X, Wang B, Chen S, Shao Z. Prognostic significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in solid tumors: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):997. doi: 10.1186/s12885-019-6189-9.
- Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014;384(9943):618-625. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61217-4.
- Rahman M, Siddik AB. 2021. Anatomy, Arterioles. StatPearls Publishing; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310381>. [Consultado: 11 Feb 2021]. PMID: 32310381.
- Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM, Prieto I, Alba F, Ramírez M. Angiotensinase activity in mice fed an olive oil-supplemented diet. *Peptides*. 2001 Jun;22(6):945-52. doi: 10.1016/s0196-9781(01)00406-5.
- Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Aguilera CM, Gil A. A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: phenolic compounds. *Nutrients*. 2015;7(7):5177-216. doi: 10.3390/nu7075177.
- Ray NB, Lam NT, Luc R, Bonvino NP, Karagiannis TC. 2015. Cellular and molecular effects of bioactive phenolic compounds. En: Olive and olive oil bioactive constituents. in olives and olive oil. AOCS Press, 53–91. doi:10.1016/B978-1-63067-041-2.50009-4
- Reckelhoff JF, Yanes Cardozo LL, Fortepiani MLA. 2018. Models of hypertension in aging Conn's *Handb. Model. Hum. Aging*. 2ª Edición. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811353-0.00052-X>.
- Remely M, Stefanska B, Lovrecic L, Magnet U, Haslberger AG. Nutriepigenomics: the role of nutrition in epigenetic control of human diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(4):328-33. doi: 10.1097/MCO.0000000000000180.
- Rietjens SJ, Bast A, Haenen GR. New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem*. 2007;55(18):7609-14. doi: 10.1021/jf0706934.
- Rodríguez-Morató J, Xicota L, Fitó M, Farré M, Dierssen M, de la Torre R. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2015;20(3):4655-80. doi: 10.3390/molecules20034655.
- Rodríguez-Rodríguez R, Herrera MD, de Sotomayor MA, Ruíz-Gutiérrez V. Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *Am. J. Hypertens*. 2007;20(7):728–34. doi:10.1016/j.amjhyper.2007.01.012

- Rodríguez-Rodríguez R, Herrera MD, de Sotomayor MA, Ruíz-Gutiérrez V. Effects of pomace olive oil-enriched diets on endothelial function of small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.* 2009;102(10):1435-44. doi: 10.1017/S0007114509990754.
- Romero M, Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M, Olivares M, Gálvez J, Duarte J. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* 2016;7(1):584-93. doi: 10.1039/c5fo01101a.
- Rong Y, Kiang TKL. Characterizations of Human UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes in the Conjugation of p-Cresol. *Toxicol Sci.* 2020 Aug 1;176(2):285-296. doi: 10.1093/toxsci/kfaa072. PMID: 32421801.
- Rossi GP, Bisogni V, Rossitto G, Maiolino G, Cesari M, Zhu R, Seccia TM. Practice recommendations for diagnosis and treatment of the most common forms of secondary hypertension. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2020;27(6):547-560. doi: 10.1007/s40292-020-00415-9.
- Rüfer CE, Kulling SE. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *J Agric Food Chem.* 2006;54(8):2926-2931. doi:10.1021/jf053112o
- Ruíz-Gutiérrez V, Muriana FJ, Guerrero A, Cert AM, Villar J. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *J Hypertens.* 1996;14(12):1483-90. doi: 10.1097/00004872-199612000-00016.
- Ryan D, Robards K. Metabolomics: The greatest omics of them all? *Anal Chem.* 2006;78(23):7954-8. doi: 10.1021/ac0614341.
- Sakavitsi, M.E.; Breynaert, A.; Nikou, T.; Lauwers, S.; Pieters, L.; Hermans, N.; Halabalaki, M. Availability and Metabolic Fate of Olive Phenolic Alcohols Hydroxytyrosol and Tyrosol in the Human GI Tract Simulated by the *In Vitro* GIDM-Colon Model. *Metabolites* **2022**, *12*, 391.
- Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, Ros E, Covas MI, Ibarrola-Jurado N, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruíz-Gutiérrez V, Romaguera D, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez-González MA. Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2014;160(1):1-10. doi: 10.7326/M13-1725.
- Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Paul D, Maulik N. Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity. *J Agric Food Chem.* 2008;56(20):9692-8. doi: 10.1021/jf802050h.
- Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Warleta F, Campos M, Beltrán G, Gaforio JJ. Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *J Agric Food Chem.* 2013;61(50):12173-82. doi: 10.1021/jf403154e.
- Sánchez-Rodríguez E, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Calleja MA, Espejo-Calvo JA, Gil-Extremera B, de la Torre R, Fito M, Covas MI, Vilchez P, Alche JD, Martínez de Victoria E, Gil A, Mesa MD. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on biomarkers of oxidative stress and inflammation in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients.* 2019 Mar 6;11(3):561. doi: 10.3390/nu11030561.

- Sánchez-Rodríguez E, Lima-Cabello E, Biel-Glesson S, Fernández-Navarro JR, Calleja MA, Roca M, Espejo-Calvo JA, Gil-Extremera B, Soria-Florido M, de la Torre R, Fitó M, Covas MI, Alche JD, Martínez de Victoria E, Gil A, Mesa MD. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on metabolic syndrome and endothelial functional risk biomarkers in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients*. 2018;10(5):626. doi: 10.3390/nu10050626.
- Sánchez-Rodríguez E, Mesa MD. Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. Revisión. *Nutr Clin Med*. 2018;12(2):80–94. doi:10.7400/NCM.2018.12.2.5064
- Santangelo C, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Filardi T, Fogliano V, D'Archivio M, Giovannini C, Lenzi A, Morano S, Masella R. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *J Endocrinol Invest*. 2016 Nov;39(11):1295-1301. doi: 10.1007/s40618-016-0506-9.
- Santos-Lozano JM, Rada M, Lapetra J, Guinda Á, Jiménez-Rodríguez MC, Cayuela JA, Ángel-Lugo A, Vilches-Arenas Á, Gómez-Martín AM, Ortega-Calvo M, Castellano JM. Prevention of type 2 diabetes in prediabetic patients by using functional olive oil enriched in oleanolic acid: The PREDIABOLE study, a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab*. 2019;21(11):2526-2534. doi: 10.1111/dom.13838.
- Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Jun;27(6):608-19. doi: 10.1080/15257770802138558.
- Scalbert A, Brennan L, Manach C, Andres-Lacueva C, Dragsted LO, Draper J, Rappaport SM, van der Hooft JJ, Wishart DS. The food metabolome: a window over dietary exposure. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(6):1286-308. doi: 10.3945/ajcn.113.076133.
- Schiffirin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*. 2005 Jun;43(1):19-29. doi: 10.1016/j.vph.2005.03.004.
- Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*. 2012;4(12):1989-2007.
- Schwingshackl L, Lampousi AM, Portillo MP, Romaguera D, Hoffmann G, Boeing H. Olive oil in the prevention and management of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies and intervention trials. *Nutr Diabetes*. 2017;7(4):e262. doi: 10.1038/nutd.2017.12.
- Scoditti E, Nestola A, Massaro M, Calabriso N, Storelli C, De Caterina R, Carluccio MA. Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKC $\alpha$  and PKC $\beta$ 1 inhibition. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):17-24. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.017.
- Seguí-Díaz M. Type 2 diabetes mellitus prevention using a Mediterranean diet and vegetable fats: The PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea) study]. *Semergen*. 2014;40(5):278-9. doi: 10.1016/j.semereg.2014.04.009.

- Seino Y, Fukushima M, Yabe D. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: similarities and differences. *J. Diabetes Investig.* 2010;1(1–2):8–23. doi:10.1111/j.2040-1124.2010.00022.x
- Sharma H, Kumar P, Deshmukh RR, Bishayee A, Kumar S. Pentacyclic triterpenes: new tools to fight metabolic syndrome. *Phytomedicine.* 2018;50:166-177. doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.011.
- Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(5):1189-96. doi: 10.3945/ajcn.2010.29673
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ.* 2008;337:a1344. doi: 10.1136/bmj.a1344.
- Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, et al. Application of biofluid 1H nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Anal Biochem.* 2003;323(2):197-204. doi:10.1016/j.ab.2003.08.028
- Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, et al. Biofluid 1H NMR-based metabonomic techniques in nutrition research - metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J Nutr Biochem.* 2005;16(4):236-244. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.12.005
- Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. 2003; 80(7):1013-1023. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7
- Somova LO, Nadar A, Rammanan P, Shode FO. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine.* 2003;10(2-3):115-21. doi: 10.1078/094471103321659807.
- Soriguer F, Esteva I, Rojo-Martínez G, Ruíz de Adana MS, Dobarganes MC, García-Almeida JM, Tinahones F, Beltrán M, González-Romero S, Oliveira G, Gómez-Zumaquero JM. Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). *Eur J Endocrinol.* 2004;150(1):33-9. doi: 10.1530/eje.0.1500033.
- Sowers JR, Standley PR, Ram JL, Jacober S, Simpson L, Rose K. Hyperinsulinemia, insulin resistance, and hyperglycemia: contributing factors in the pathogenesis of hypertension and atherosclerosis. *Am. J. Hypertens.* 1993;6(7):260S-270S. doi:10.1093/ajh/6.7.260S
- Sperling LS, Mechanick JI, Neeland IJ, Herrick CJ, Després JP, Ndumele CE, Vijayaraghavan K, Handelsman Y, Puckrein GA, Araneta MR, Blum QK, Collins KK, Cook S, Dhurandhar NV, Dixon DL, Egan BM, Ferdinand DP, Herman LM, Hessen SE, Jacobson TA, Pate RR, Ratner RE, Brinton EA, Forker AD, Ritzenthaler LL, Grundy SM. The cardiometabolic health alliance: working toward a new care model for the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(9):1050-67. doi: 10.1016/j.jacc.2015.06.1328.
- St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpré F, Ramassamy C. Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid- $\beta$ -induced toxicity. Involvement of the NF- $\kappa$ B signaling. *Curr Alzheimer Res.* 2011;8(5):543-51. doi: 10.2174/156720511796391845.

- Storniolo CE, Casillas R, Bulló M, Castañer O, Ros E, Sáez GT, Toledo E, Estruch R, Ruíz-Gutiérrez V, Fitó M, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Mitjavila MT, Moreno JJ. A Mediterranean diet supplemented with extra virgin olive oil or nuts improves endothelial markers involved in blood pressure control in hypertensive women. *Eur J Nutr.* 2017;56(1):89-97. doi: 10.1007/s00394-015-1060-5.
- Sung JH, Lee SJ, Park KH, Moon TW. Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68(2):428-432. doi:10.1271/bbb.68.428
- Surampudi P, Enkhmaa B, Anuurad E, Berglund L. Lipid lowering with soluble dietary fiber. *Curr Atheroscler Rep.* 2016;18(12):75. doi: 10.1007/s11883-016-0624-z.
- Sureda A, Bibiloni MD, Martorell M, Buil-Cosiales P, Marti A, Pons A, Tur JA, Martínez-González MÁ; PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diets supplemented with virgin olive oil and nuts enhance plasmatic antioxidant capabilities and decrease xanthine oxidase activity in people with metabolic syndrome: The PREDIMED study. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(12):2654-2664. doi: 10.1002/mnfr.201600450.
- Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension.* 1995 May;25(5):1083-9. doi: 10.1161/01.hyp.25.5.1083.
- Swarup S, Goyal A, Grigorova Y, Zeltser R. 2015. Metabolic syndrome. *European Respiratory Society Monogr* (9781849840606):221–37. [Consultada: 18 Nov 2020]. doi:10.1183/2312508X.10006014
- Tackling G, Borhade MB. 2021. Hypertensive Heart Disease. StatPearls Publishing; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30969622>. [Consultado: 7 Dic 2020]. PMID: 30969622.
- Tan ST, Ramesh T, Toh XR, Nguyen LN. Emerging roles of lysophospholipids in health and disease. *Prog Lipid Res.* 2020;80:101068. doi:10.1016/j.plipres.2020.101068
- Tenenbaum A, Klempfner R, Fisman EZ. Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:159. doi: 10.1186/s12933-014-0159-y.
- Toledo E, Hu FB, Estruch R, Buil-Cosiales P, Corella D, Salas-Salvadó J, Covas MI, Arós F, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Pinto X, Lamuela-Raventós RM, Sáez G, Bulló M, Ruíz-Gutiérrez V, Ros E, Sorli JV, Martínez-González MA. Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial. *BMC Med.* 2013;11:207. doi: 10.1186/1741-7015-11-207.
- Toledo E, Hu FB, Estruch R, Buil-Cosiales P, Corella D, Salas-Salvadó J, Covas MI, Arós F, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Pinto X, Lamuela-Raventós RM, Sáez G, Bulló M, Ruíz-Gutiérrez V, Ros E, Sorli JV, Martínez-González MA. Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial. *BMC Med.* 2013;11:207. doi: 10.1186/1741-7015-11-207.
- Track NS, McLeod RS, Mee AV. Human pancreatic polypeptide: studies of fasting and postprandial plasma concentrations. *Can J Physiol Pharmacol.* 1980;58(12):1484-9. doi: 10.1139/y80-223.



- Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, et al. Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:36204. doi:10.1155/2007/36204
- Tsartsou E, Proutsos N, Castanas E, Kampa M. Network meta-analysis of metabolic effects of olive-oil in humans shows the importance of olive oil consumption with moderate polyphenol levels as part of the Mediterranean diet. *Front Nutr.* 2019 Feb 12;6:6. doi: 10.3389/fnut.2019.00006.
- Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods.* 2015 Jun;12(6):523-6. doi: 10.1038/nmeth.3393.
- Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem.* 2002;13(11):636-644. doi: 10.1016/s0955-2863(02)00229-2.
- Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept.* 2008;145(1-3):12-6. doi: 10.1016/j.regpep.2007.09.011.
- Ulaszewska MM, Weinert CH, Trimigno A, Portmann R, Andres Lacueva C, Badertscher R, Brennan L, Brunius C, Bub A, Capozzi F, Cialiè Rosso M, Cordero CE, Daniel H, Durand S, Egert B, Ferrario PG, Feskens EJM, Franceschi P, Garcia-Aloy M, Giacomoni F, Giesbertz P, González-Domínguez R, Hanhineva K, Hemeryck LY, Kopka J, Kulling SE, Llorach R, Manach C, Mattivi F, Migné C, Münger LH, Ott B, Picone G, Pimentel G, Pujos-Guillot E, Riccadonna S, Rist MJ, Rombouts C, Rubert J, Skurk T, Sri Harsha PSC, Van Meulebroek L, Vanhaecke L, Vázquez-Fresno R, Wishart D, Vergères G. Nutrimetabolomics: An integrative action for metabolomic analyses in human nutritional studies. *Mol Nutr Food Res.* 2019 Jan;63(1):e1800384. doi: 10.1002/mnfr.201800384.
- Umemoto T, Han CY, Mitra P, Averill MM, Tang C, Goodspeed L, Omer M, Subramanian S, Wang S, Den Hartigh LJ, Wei H, Kim EJ, Kim J, O'Brien KD, Chait A. Apolipoprotein AI and high-density lipoprotein have anti-inflammatory effects on adipocytes via cholesterol transporters: ATP-binding cassette A-1, ATP-binding cassette G-1, and scavenger receptor B-1. *Circ Res.* 2013;112(10):1345-54. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300581.
- Uylaşer V, Yildiz G. The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54(8):1092-101. doi: 10.1080/10408398.2011.626874.
- Valero-Muñoz M, Martín-Fernández B, Ballesteros S, de la Fuente E, Quintela JC, Lahera V, de las Heras N. Protective effect of a pomace olive oil concentrated in triterpenic acids in alterations related to hypertension in rats: mechanisms involved. *Mol Nutr Food Res.* 2014 Feb;58(2):376-83. doi: 10.1002/mnfr.201300256.
- Valigora SD, Lib PK, Dunphy G, Turner M, Ely DL. Steroid sulfatase inhibitor alters blood pressure and steroid profiles in hypertensive rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;73(3-4):113-122. doi:10.1016/s0960-0760(00)00062-5
- Van Beusecum J, Inscho EW. Regulation of renal function and blood pressure control by P2 purinoceptors in the kidney. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;21:82-8. doi: 10.1016/j.coph.2015.01.003.

- Van den Munckhof ICL, Kurilshikov A, Ter Horst R, Riksen NP, Joosten LAB, Zhernakova A, Fu J, Keating ST, Netea MG, de Graaf J, Rutten JHW. Role of gut microbiota in chronic low-grade inflammation as potential driver for atherosclerotic cardiovascular disease: a systematic review of human studies. *Obes Rev.* 2018 Dec;19(12):1719-1734. doi: 10.1111/obr.12750.
- Vera R, Jiménez R, Lodi F, Sánchez M, Galisteo M, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Genistein restores caveolin-1 and AT-1 receptor expression and vascular function in large vessels of ovariectomized hypertensive rats. *Menopause.* 2007 Sep-Oct;14(5):933-40. doi: 10.1097/GME.0b013e31802d9785.
- Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Segarra AB, Martínez-Cañamero M, Prieto I. Influence of extra virgin olive oil on blood pressure and kidney angiotensinase activities in spontaneously hypertensive rats. *Planta Med.* 2015;81(8):664-9. doi: 10.1055/s-0034-1383263.
- Violi F, Loffredo L, Pignatelli P, Angelico F, Bartimoccia S, Nocella C, Cangemi R, Petruccioli A, Monticolo R, Pastori D, Carnevale R. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. *Nutr Diabetes.* 2015 Jul 20;5(7):e172. doi: 10.1038/nutd.2015.23.
- 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(3):797-9. doi: 10.1006/bbrc.2000.3879.
- Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, Caruso D. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J Nutr.* 2003;133(8):2612-5. doi: 10.1093/jn/133.8.2612.
- Visioli F, Galli C. Antiatherogenic components of olive oil. *Curr Atheroscler Rep.* 2001;3(1):64-7. doi: 10.1007/s11883-001-0012-0.
- Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev.* 2002;22(1):65-75. doi: 10.1002/med.1028.
- Vitale DC, Piazza C, Melilli B, Drago F, Salomone S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2013;38(1):15-25. doi:10.1007/s13318-012-0112-y
- Wajchenberg BL, Lé B, Wajchenberg O. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue. *Endocr. Rev.* 2000;21(6):697-738.
- Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21(6):697-738. doi: 10.1210/edrv.21.6.0415.
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1487-95. doi: 10.2337/diacare.27.6.1487.
- Walsh MC, Brennan L, Pujos-Guillot E, Sébédio JL, Scalbert A, Fagan A, Higgins DG, Gibney MJ. Influence of acute phytochemical intake on human urinary metabolomic profiles. *Am J Clin Nutr.* 2007 Dec;86(6):1687-93. doi: 10.1093/ajcn/86.5.1687.

- Wang M, Yang X, Wang F, Li R, Ning H, Na L, Huang Y, Song Y, Liu L, Pan H, Zhang Q, Fan L, Li Y, Sun C. Calcium-deficiency assessment and biomarker identification by an integrated urinary metabolomics analysis. *BMC Med.* 2013 Mar 28;11:86. doi: 10.1186/1741-7015-11-86.
- Wang N, Liu Y, Ma Y, Wen D. Hydroxytyrosol ameliorates insulin resistance by modulating endoplasmic reticulum stress and prevents hepatic steatosis in diet-induced obesity mice. *J Nutr Biochem.* 2018;57:180-188. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.018.
- Wang S, Zhou L, Wang Z, Shi X, Xu G. Simultaneous metabolomics and lipidomics analysis based on novel heart-cutting two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2017;966:34-40. doi: 10.1016/j.aca.2017.03.004.
- Wang ZB, Jiang SL, Liu SB, Peng JB, Hu S, Wang X, Zhuo W, Liu T, Guo JW, Zhou HH, Yang ZQ, Mao XY, Liu ZQ. Metabolomics of artichoke bud extract in spontaneously hypertensive rats. *ACS Omega.* 2021 Jul 12;6(29):18610-18622. doi: 10.1021/acsomega.1c01135.
- Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. 2014. Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. En: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hershman JM, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Sahay R, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencé DL, Wilson DP, editores. Endotext. MDText.com, Inc.
- Wen X, Sun H, Liu J, Cheng K, Zhang P, Zhang L, Hao J, Zhang L, Ni P, Zographos SE, Leonidas DD, Alexacou KM, Gimisis T, Hayes JM, Oikonomakos NG. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. *J Med Chem.* 2008;51(12):3540-54. doi: 10.1021/jm8000949.
- Wen X, Sun H, Liu J, Wu G, Zhang L, Wu X, Ni P. Pentacyclic triterpenes. Part 1: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005 Nov 15;15(22):4944-8. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.08.026.
- Willett WC. The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr.* 2006;9(1A):105-10. doi: 10.1079/phn2005931
- Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement D, Coca A, De Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen S, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder R, Shlyakhto E, Tsioufis K, Aboyans V, Desormais I. Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology: ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens.* 2018;36(12):2284-2309. doi: 10.1097/HJH.0000000000001961.
- Williams PT, Fortmann SP, Terry RB, Garay SC, Vranizan KM, Ellsworth N, Wood PD. Associations of dietary fat, regional adiposity, and blood pressure in men. *JAMA.* 1987 Jun 19;257(23):3251-6.

- Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AH, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Wingler K, Schmidt HH. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension*. 2010 Sep;56(3):490-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149187.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorn Dahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A. HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D801-7. doi: 10.1093/nar/gks1065.
- Wren AM, Bloom SR. Gut hormones and appetite control. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2116-30. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.048.
- Wu J, Saleh MA, Kirabo A, Itani HA, Montaniel KR, Xiao L, Chen W, Mernaugh RL, Cai H, Bernstein KE, Goronzy JJ, Weyand CM, Curci JA, Barbaro NR, Moreno H, Davies SS, Roberts LJ 2nd, Madhur MS, Harrison DG. Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension. *J Clin Invest*. 2016 Jan;126(1):50-67. doi: 10.1172/JCI80761.
- Wu X, Li C, Mariyam Z, Jiang P, Zhou M, Zeb F, Haq IU, Chen A, Feng Q. Acrolein-induced atherogenesis by stimulation of hepatic flavin containing monooxygenase 3 and a protection from hydroxytyrosol. *J Cell Physiol*. 2018;234(1):475-485. doi: 10.1002/jcp.26600.
- Xue C, Lv H, Li Y, Dong N, Wang Y, Zhou J, Shi B, Shan A. Oleonic acid reshapes the gut microbiota and alters immune-related gene expression of intestinal epithelial cells. *J Sci Food Agric*. 2022 Jan 30;102(2):764-773. doi: 10.1002/jsfa.11410.
- Yarla NS, Polito A, Peluso I. Effects of olive oil on tnf- $\alpha$  and il-6 in humans: implication in obesity and frailty. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(1):63-74. doi: 10.2174/1871530317666171120150329.
- Yubero-Serrano EM, Lopez-Moreno J, Gomez-Delgado F, Lopez-Miranda J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur J Clin Nutr*. 2019;72(Suppl 1):8-17. doi: 10.1038/s41430-018-0304-x.
- Zarzuelo A, Duarte J, Jiménez J, González M, Utrilla MP. Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med*. 1991;57(5):417-9. doi: 10.1055/s-2006-960138.
- Zazueta AR. Polipéptido insulínico dependiente de glucosa y péptido semejante al glucagón tipo 1: acciones fisiológicas e implicaciones en la diabetes tipo 2 y la obesidad. *Endocrinol. y Nutr*. 2007;15(3):156-64.
- Zhang B, Su JP, Bai Y, Li J, Liu YH. Inhibitory effects of O-methylated isoflavone glycitein on human breast cancer SKBR-3 cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(7):7809-7817. Published 2015 Jul 1.
- Zhang F, Jia Z, Gao P, et al. Metabonomics study of atherosclerosis rats by ultra fast liquid chromatography coupled with ion trap-time of flight mass spectrometry. *Talanta*. 2009;79(3):836-844. doi:10.1016/j.talanta.2009.05.010
- Zhang X, Choi FF, Zhou Y, Leung FP, Tan S, Lin S, Xu H, Jia W, Sung JJ, Cai Z, Bian Z. Metabolite profiling of plasma and urine from rats with TNBS-induced acute colitis using UPLC-ESI-

QTOF-MS-based metabonomics--a pilot study. *FEBS J.* 2012 Jul;279(13):2322-38. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08612.x.

Zhao H, Liu Y, Li Z, et al. Identification of essential hypertension biomarkers in human urine by non-targeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS. *Clin Chim Acta.* 2018;486:192-198. doi:10.1016/j.cca.2018.08.006

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(2):83-94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002.

Zhao Z, Shi A, Wang Q, Zhou J. High oleic acid peanut oil and extra virgin olive oil supplementation attenuate metabolic syndrome in rats by modulating the gut microbiota. *Nutrients.* 2019 Dec 7;11(12):3005. doi: 10.3390/nu11123005.

# ANEXOS









# *Anexos*

## *I. Consentimiento informado proyecto NUTRAOLEUM*

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

### **Estudio NUTRAOLEUM de Consumo Sostenido**

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

- *(Anotar nombre)*

Yo,.....

(nombre y apellidos)

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

He hablado con.....

(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

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

Doy mi conformidad para participar en el estudio

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del investigador



## INSTRUCCIONES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**GRACIAS POR SU COLABORACIÓN**

# *Cardioprotective Effect of a Virgin Olive Oil Enriched with Bioactive Compounds in Spontaneously Hypertensive Rats*

Alejandra Vazquez<sup>1</sup>, Estefania Sanchez-Rodriguez<sup>1</sup>, Félix Vargas<sup>2</sup>,  
Sebastián Montoro-Molina<sup>2</sup>, Miguel Romero<sup>3</sup>, Juan Antonio Espejo-Calvo<sup>4</sup>, Pedro  
Vilchez<sup>5</sup>, Sara Jaramillo<sup>6,7</sup>, Lucía Olmo-García<sup>8</sup>, Alegría Carrasco-Pancorbo<sup>8</sup>,  
Rafael de la Torre<sup>9</sup>, Montserrat Fito<sup>9,10</sup>, María-Isabel Covas<sup>11</sup>, Emilio Martínez de  
Victoria<sup>12</sup> and Maria Dolores Mesa<sup>1,13,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

<sup>2</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus Cartuja s/n, 180710 Armilla, Granada, Spain

<sup>4</sup> Instituto para la Calidad y Seguridad Alimentaria S.L. (ICSA)-TECNOFOOD I+D SOLUCIONES S.L., Avenida de la Hispanidad 17, 18320 Santa Fe, Granada, Spain

<sup>5</sup> Laboratorio CM Europa S.L., Polígono Industrial “Cañada de la Fuente”, Carretera Fuensanta, s/n, 23600 Martos, Jaén, Spain

<sup>6</sup> Vegetable By-Products of Mediterráneo, SL, CI Isla Menor CEP Jose Maria Blanco SN, 41010 Seville, Spain

<sup>7</sup> Fat Institute: Department of Food Phytochemistry Campus of the Pablo de Olavide University, Building 46 Ctra. De Utrera, km. 1, 41013 Seville, Spain

<sup>8</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, University of Granada, Ave. Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>9</sup> Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

<sup>10</sup> Spanish Biomedical Research Networking Centre, Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III. Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain

<sup>11</sup> NUPROAS Handelsbolag, Nackå, Sweden, NUPROAS HB, Spanish Office: Apartado de Correos 93, 17242 Girona, Spain

<sup>12</sup> Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Health Technology Park, Avd of Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

<sup>13</sup> Biosanitary Research Institute of Granada, 18014 Granada, Spain

\* Correspondence: mdmesa@ugr.es; Tel.: +34-958-246187

**Abstract:** Olive oil and its derivatives have been described to exert beneficial effects on hypertensive states and cardiovascular disease prevention. We studied the effects of chronic consumption of extra virgin olive oil (EVOO), enriched in bioactive compounds from olive fruit and leaves, on blood pressure, endothelial function, oxidative and inflammatory status, and circulating cholesterol levels, in spontaneously hypertensive rats (SHR). Thirty SHR were randomly assigned to three groups: a control untreated SHR group, an SHR group (1 mL/rat/day) of a control olive oil (17.6 mg/kg of phenolic compounds), and an SHR group (1 mL/rat/day) of the enriched EVOO (750 mg/kg of phenolic compounds) for eight weeks. Ten Wistar Kyoto rats (WKY) were included as healthy controls. Long-term administration of the enriched EVOO decreased systolic blood pressure and cardiac hypertrophy, and improved the ex vivo aortic endothelial dysfunction measured in SHR. Moreover, enriched oil supplementation reduced the plasma levels of Angiotensin II and total cholesterol, and the urinary levels of endothelin-1 and oxidative stress biomarkers, while pro-inflammatory cytokines were unaffected. In conclusion, sustained treatment with EVOO, enriched in bioactive compounds from the olive fruit and leaves, may be an effective tool for reducing blood pressure and cholesterol levels alone or in combination with pharmacological anti-hypertensive treatment.

**Keywords:** extra virgin olive oil; phenolic compounds; hypertension; endothelial function

### *Nutrients*

*Nutrients* 2019, 11, 1728; doi:10.3390/nu11081728

Received: 25 June 2019; Accepted: 24 July 2019; Published: 26 July 2019

---

## 1. Introduction

Hypertension is one of the most powerful risk factors for cardiovascular events, including myocardial infarction and stroke, and its effective treatment reduces cardiovascular morbidity and mortality [1]. However, the efficacy of anti-hypertensive drugs is still not entirely satisfactory, and new approaches should be considered [1]. Risks of adverse reaction and medication costs have focused attention on the use of alternative and complementary natural medicines. Among nutritional strategies, extra virgin olive oil (EVOO) has been proposed as a good cardioprotective tool. A systematic review and meta-analysis have evaluated the effect of high versus low polyphenol olive oil on cardiovascular disease risk factors in clinical trials. They found some evidence of the improvements in inflammatory markers and blood pressure, mainly high polyphenol oils conferring some cardiovascular benefits [2]. Yuvero et al. [3] reviewed findings about the effects of EVOO on cardiovascular risk factors, and the underlying mechanisms, encouraging future research in order to ascertain not only the effect, but also the real components responsible for the cardiovascular benefits.

*Olea europaea* L. leaves have been used to combat high blood pressure, atherosclerosis, and diabetes [4]. The anti-hypertensive and cholesterol-lowering effects of these leaves are observed in experimental and clinical studies [5–7]. A reduction of blood pressure has been observed in spontaneously hypertensive rats (SHR) fed a diet enriched with EVOO during 12 weeks compared with a standard diet [8]. Sustained administration of oleanolic acid-enriched pomace olive oil in SHR improved the endothelial function conductance [9] and resistance arteries [10], by increasing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein expression. Minor compounds from olive oil and olive leaves, such as oleuropein, have been recognized as responsible for acute endothelium-independent vasodilatory effects in isolated SHR aortae [11]. Moreover, it has been reported that sustained intake of an oleuropein-enriched olive leaf extract exerts anti-hypertensive effects on genetic hypertension by improving vascular function and reducing oxidative and inflammatory status in SHR [12]. These effects are associated with the inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). Therefore, olive oil minor compounds and olive derivatives may be responsible for the anti-hypertensive effects, and the enrichment of VOOs with these compounds may improve its protective properties.

The present study primarily evaluated the anti-hypertensive effect of an EVOO enriched in compounds obtained from olive fruits and leaves compared with a control olive oil in genetically hypertensive SHR. We also investigated the mechanisms involved in their anti-hypertensive effect, by evaluating vascular function *ex vivo*, as well as the antioxidant and anti-inflammatory status.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Oils

Olive oils were specially prepared for the study at the Cooperativa de San Francisco de Asís de Montefrío, Granada, Spain. An EVOO with high amounts of phenolic compounds was selected. Part of the EVOO was enriched selectively with three different extracts obtained from the olive oil and olive leaves, which contained mainly 200 mg/kg of hydroxytyrosol, 3,4-dihydroxyphenylglycol, and oleuropein, with a total amount of 750 mg/kg of phenolic compounds in the functional olive oil (FOO). Part of the selected EVOO was washed with alimentary ethanol to reduce the content of phenolic compounds to 17.6 mg/kg control oil (CO). Thus, the two experimental oils only differed in the content of phenolic compounds. Table 1 describes chemical characteristics of the experimental oils used in the study. Quantification of the individual phenolic compounds belonging to each chemical family is shown in Supplementary Table S1 [13]. The oils were prepared and frozen in daily aliquots in order to avoid oxidation

**Table 1.** Characteristics of the olive oils used in the study.

<b>Characteristics</b>	<b>CO</b>	<b>FOO</b>
Acidity (%)	0.14	0.14
Peroxide value (meq/Kg)	5.	9.5
	3	
K270	0.14	0.15
K232	1.79	1.85
DeltaK	<0.01	<0.01
<b>Main Fatty acids</b>		
Palmitic (C16) (%)	10.12	10.09
Stearic (C18) (%)	3.81	3.79
Oleic (C18:1) (%)	79.71	79.87
Linoleic (C18:2n6) (%)	3.95	3.91
Total ethyl esters (mg/Kg)	7	13
Total sterols (mg/Kg)	1316	1328
Total phenolic compounds (mg/Kg)	17.6	749.9

Individual phenolic compounds quantitative data obtained for the oils evaluated in this study by the LC-MS method described in Appendix A. Every result (expressed in mg/kg of olive oil) is the mean value of three independent replicates. RSD values were lower than 8.4% in every case. CO, control oil. FOO, functional oil. RSD, relative standard deviation.



## 2.2. Experimental Design

Animals were purchased from Janvier Labs, CEDEX, France. Thirty SHR of eight weeks of age were divided into three experimental groups ( $n = 10$ ). One group was daily supplemented with 1 mL of the experimental functional olive oil (FOO) that is the EVOO enriched in bioactive compounds (SHR-FOO), the second group of hypertensive rats was daily supplemented with a 1 mL of the control oil (CO) (SHR-CO), and a third group of hypertensive rats (SHR) was used as the control and received 1 mL of water daily. In addition, 10 Wistar Kyoto healthy (WKY-H) male rats with the same age were included as normotensive healthy controls and received 1 mL of water daily. Oils and water were administered by using a rigid orogastric tube that went from the mouth to the stomach directly.

All rats had *ad libitum* access to food and water. Animals were fed on a standard maintenance diet (Panlab), with 76.2% carbohydrates (fiber 3.9%), 3.1% lipids, 16.1% protein, and 4.6 mineral-ashes. The animals were treated for 8 weeks with the enriched, functional, or control olive oils (SHR-FOO or SHR-CO groups, respectively), or with water in both SHR and WKY-H groups. The experiment was performed in accordance with the guidelines set by the European Community Council Directives for the ethical care of animals (86/609/EEC) and were approved by the ethical committee of Laboratory Animals of the University of Granada (Spain, permit number 18/07/2017/099).

The systolic blood pressure (SBP) and body weight (BW) were measured weekly during the course of the experiment. At the beginning of the study, every two weeks, and at the end of the 8 weeks of intervention, rats were introduced in metabolic cages (Panlab, Barcelon, Spain). Food and water intake were monitored and urine was collected for 24 h.

The administration of the oils was stopped 24 h before the end of the experiment in order to study the long-term effects of the active phenolics without the involvement of the effects of acute administration. After the 8 weeks of intervention, fasting rats were anesthetized with 2.5 mL per kg equitensin (i.p.), and drawn by abdominal aortic puncture by a beveled, which permits a fractional extraction, to determine plasma variables. To start, 1 mL of blood was drawn for the measurement of the plasma levels of Angiotensin II. This procedure permits an accurate measurement of this peptide,

without the activation of the renin-angiotensin system due to the hemorrhage. The rest of the blood was used to measure the other plasma variables, which are not affected by hemorrhaging. The blood was centrifuged at  $1750\times g$  for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aliquots of plasma were frozen immediately at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Lastly, the rats were sacrificed by exsanguinations, and the kidneys, heart, and thoracic aorta were removed and weighed. The heart was divided into the right ventricle and the left ventricle plus septum. The length of the tibia was measured to normalize the morphological variables.

### *2.3. Blood Pressure Determination*

Tail SBP was measured weekly by tail-cuff plethysmography in conscious rats (LE 5001-PressureMeter, Letica SA, Barcelona, Spain). At least seven determinations were made at every session, and the mean of the lowest three values within a range of 5 mmHg was the final SBP value.

### *2.4. Plasma Biochemical Analysis*

Plasma electrolytes (sodium and potassium), low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, total cholesterol, urea, and creatinine were measured by the autoanalyzer (Hitachi-912, Roche, Granada, Spain). Plasma angiotensin II (CEA 005Ra), urinary endothelin-1 (CEA482Ra), plasma interleukin 6 (IL-6, SEA079Ra), the tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ; SEA133Mi), and the vascular endothelial growth factor (VEGF, SEA143Ra) were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits referred above to Cloud Clone Corp, Katy, TX, USA.

### *2.5. Urine Biochemical Analysis*

At the end of the experimental period, the 24-h urine volume was measured, electrolytes (sodium and potassium), urea, and creatinine were measured by the autoanalyzer (Hitachi-912, Roche, Granada, Spain), and proteinuria by using the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Madrid, Spain). Creatinine clearance, and the water and sodium balance were calculated in 24 h-urines as biomarkers of renal function. Total nitrate/nitrite in urine was measured by a colorimetric kit (Cayman Chemicals Company, Ann Arbor, MI, USA).

ELISA kits were used to measure 24 h urine oxidative stress biomarkers, F<sub>2</sub>-isoprostanes, and 8-hydroxy-2<sup>J</sup>-deoxyguanosine (8-OH-dG) (EA85, from Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, MI, USA, and JAI-KOG-200SE, from Bio-Connect B.V. The Netherlands, respectively), and endothelin-1 (CEA482RA, from Cloud Clone Corp, Katy, TX, USA).

### *2.6. Vascular Reactivity in Aortic Rings*

Segments of thoracic aortic rings were mounted in an organ chamber filled with a Krebs solution (NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, and glucose 11 mM) at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, and

maintained at a resting tension of 2 g. Isometric tension was determined using an isometric force-displacement transducer (Letigraph 2000, Madrid, Spain) connected to an acquisition system, as previously described [14].

The concentration-relaxation response curves to acetylcholine ( $10^{-9}$ – $10^{-4}$  M) were analyzed in rings pre-contracted to the same tension with phenylephrine ( $0.3 \times 10^{-6}$  and  $10^{-6}$  M, in WKY-H and SHR, respectively). The concentration–relaxation response curves to nitroprusside ( $10^{-10}$ – $10^{-6}$  M) were obtained at dark in rings without endothelium precontracted to the same tension with phenylephrine.

Endothelium-dependent contractions to acetylcholine were tested in aortic rings initially stimulated with 80 mM KCl. After washing in the Krebs solution, and incubating for 30 min with N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ( $10^{-4}$  M), increasing doses of acetylcholine were added ( $10^{-9}$ – $10^{-4}$  M). The contractile responses to acetylcholine were expressed as a percentage of the response to KCl.

### 2.7. Statistical Analysis

All variables data are presented as the mean values  $\pm$  standard error of the mean (SEMs). The normality of variables was evaluated with the Kolmogorov and Shapiro-Wilk tests. In all cases, more than 95% of the data were analyzed. One-factor ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used (depending on whether the normality assumption was met). To identify the difference between groups, the Bonferroni post hoc test was used. A  $p < 0.05$  value was considered significant. The Statistical Package for the Social Sciences version 20 software was used to perform the statistical analysis (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

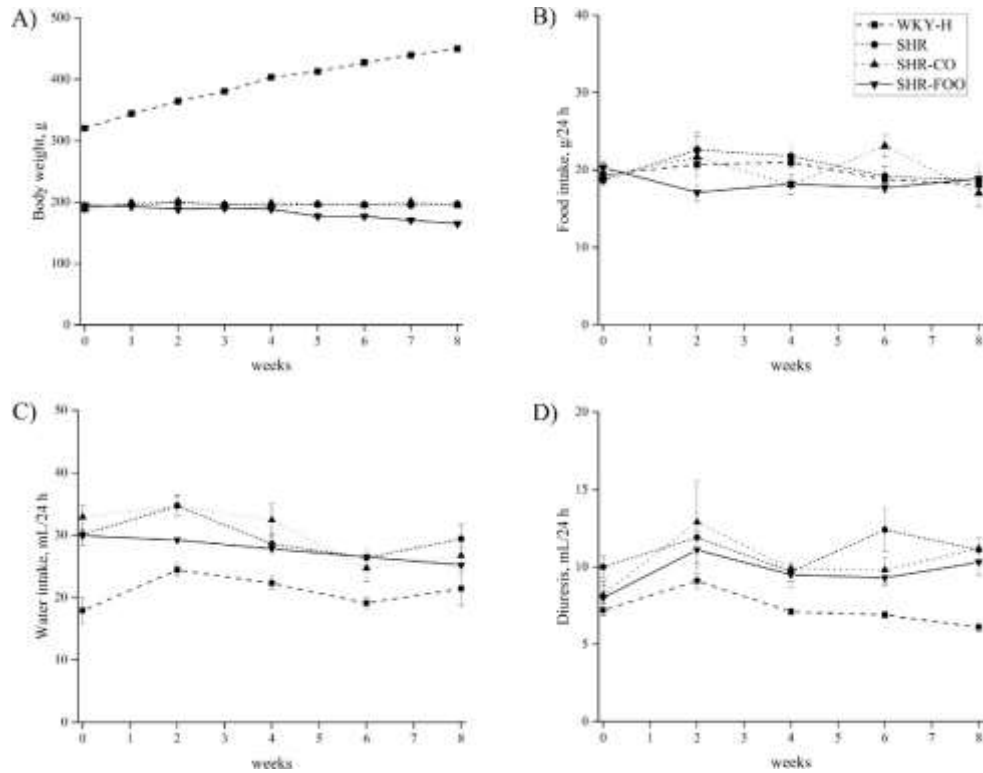
## 3. Results

### 3.1. Time-Course of Body Weight, Food Intake, Water Intake, and Diuresis

Body weight, food and water intake, and diuresis time-courses are shown in Figure 1. Body weight was lower in all SHR compared with the WKY-H rats, which is characteristic in these strains. No significant differences were found in treated and untreated SHR groups, which indicates that no toxic effects are associated with the enriched olive oil consumption, despite a slight decrease in body weight after the fourth week of the study. Food intake was around 20 g/day in all groups along the eight weeks of intervention, without significant differences among groups. Water intake was similar in the four experimental groups. Diuresis also increased in all SHR groups compared with the healthy WKY-H animals from the fourth

week of treatment.

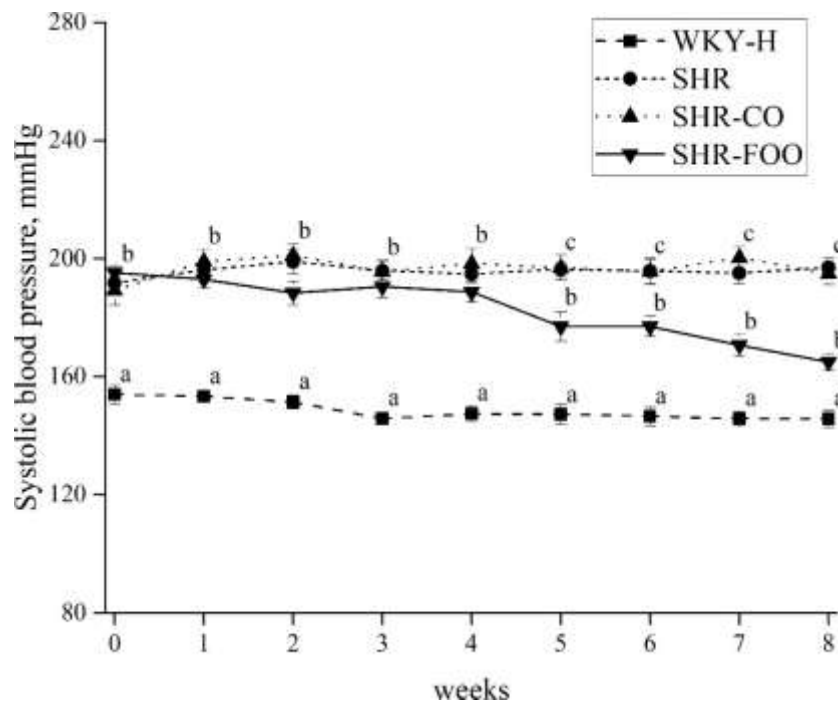
**Figure 1.** Time courses of BW (A), food intake (B), water intake (C), and diuresis (D)



in the experimental groups. Data are means  $\pm$  SEM. The ANOVA test was used to compare results among groups for normal distribution variables. The Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons among groups.  $p < 0.05$  was considered significant. BW, body weight. SHR, spontaneously hypertensive rats. SHR-CO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the control olive oil. SHR-FOO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the functional olive oil. WKY-H, Wistar Kyoto healthy rats.

### 3.2. Effects of Enriched Olive Oil on Blood Pressure in SHR

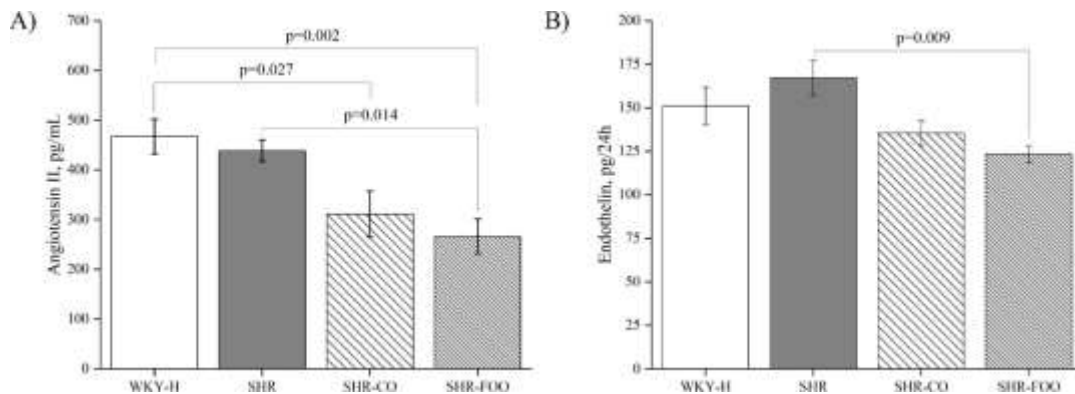
Figure 2 depicts the time course of the tail SBP in the groups. Tail SBP was around 40 mmHg higher in SHR untreated group with respect to the WKY-H one throughout the study. Progressive reduction in SBP was detected at the end of the fourth week of FOO administration, which became significant from the fifth week ( $p = 0.006$ ), and reached maximum at the eighth week of treatment ( $p = 0.001$ ) versus the control SHR group ( $-30.3 \pm 3.2$  mmHg, with respect to the SHR untreated group). This decrease did not reach the values of control WKY-H, remaining  $19.3 \pm 0.3$  mmHg higher than the healthy animals at that time. Supplementary Figure S1 shows SBP at the beginning and at the end of the intervention. A significant reduction of SBP is observed after the eight weeks of treatment with the FOO compared with the baseline ( $p = 0.001$ ).



**Figure 2.** Time course of tail SBP measured by tail-cuff plethysmography in the experimental groups. Data are mean  $\pm$  SEM. The ANOVA test was used to compare results among groups for normal distribution variables. The Bonferroni *post hoc* test was used for multiple comparisons among groups.  $p < 0.05$  was considered significant. Different superscript letters indicate significant differences between post-intervention results (a,b,c). SHR, spontaneously hypertensive rats. SHR-CO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the control olive oil. SHR-FOO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the functional olive oil. WKY-H, Wistar Kyoto healthy rats.

### 3.3. Vasoactive Peptides: Plasma Angiotensin II and Urinary Endothelin-1

Sustained administration of the enriched EVOO produced a significant decrease in plasma levels of angiotensin II in SHR-FOO when compared with SHR. In addition, plasma angiotensin II levels tended to be lower after administration of the control olive oil compared with the SHR control group ( $p = 0.125$ ). Differences were also found between the two supplemented groups of rats and the WKY-H animals (Figure 3A). Total urinary excretion of endothelin-1 showed a similar pattern to that observed for plasma angiotensin II. Thus, the SHR-FOO group had lower levels of urinary endothelin-1 compared with the SHR, while endothelin-1 levels tended to be lower after treatment with the control oil ( $p = 0.102$ ) (Figure 3B).



**Figure 3.** Vasoactive peptide concentrations after EIGHT weeks of intervention: plasma angiotensin II (A), urinary endothelin-1 (B), and data are mean  $\pm$  SEM. The ANOVA test and the Bonferroni post hoc were used to compare results among groups.  $p < 0.05$  was considered significant. SHR: spontaneously hypertensive rats. SHR-CO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the control olive oil. SHR-FOO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the functional olive oil. WKY-H, Wistar Kyoto healthy rats.

### 3.4. Morphological Variables

At the end of the study period, the SHR groups had significantly higher heart and left ventricular weight in absolute values (HW and LVW, respectively) compared with the WKY-H group, as well as the indices relative to body weight (HW/BW and LVW/BW, respectively). These variables were significantly lower in SHR-FOO when compared with the SHR control group. The kidney weight in absolute values (KW) or the indices relative to body weight (KW/BW) were similar in the four groups of rats (Table 2).

**Table 2.** Morphological variables in the experimental groups.

	<b>WKY-H</b>	<b>SHR</b>	<b>SHR-CO</b>	<b>SHR-FOO</b>	<b>p</b>
FBW(g)	444.9 ± 4.0 <sup>a</sup>	403.4 ± 9.7 <sup>ab</sup>	394.9 ± 8.0 <sup>ab</sup>	390.5 ± 10.8 <sup>ab</sup>	0.001
KW (g)	1.3 ± 0.02	1.2 ± 0.04 <sup>ab</sup>	1.2 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.020
HW (g)	1.0 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.3 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.2 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.001
LVW (mg)	0.86 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.02 <sup>ab</sup>	1.2 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.0 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.001
KW/BW (mg/g)	2.9 ± 0.05	3.1 ± 0.09	3.0 ± 0.06	3.1 ± 0.08	0.147
KW/LT (mg/mm)	26.1 ± 0.5	25.2 ± 0.8	23.8 ± 0.6	24.2 ± 0.5	0.050
HW/BW (mg/g)	2.4 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.08 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.001
LVW/BW (mg/g)	1.9 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.08 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.001
LVW/LT (mg/mm)	17.4 ± 0.31 <sup>a</sup>	22.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	23.7 ± 0.70 <sup>b</sup>	20.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.001

Data are means ± SEM. ANOVA test were used to compare results between groups for normal distribution variables, and the Kruskal Wallis test for non-normal distribution variables. The Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons among groups.  $P < 0.05$  was considered significant. Different superscript letters indicate significant differences between post-intervention results <sup>(a,b)</sup>. FBW, final body weight; CO, olive oil; FOO, functional olive oil; HW, heart weight; KW, kidney weight; LVW, left ventricular weight; SEM, standard error of the mean; SHR, spontaneously hypertensive rats; WKY-H, Wistar Kyoto healthy rats.

### 3.5. Plasma Urine Biochemical Variables

Table 3 shows plasma and urine biochemical variables. There were no significant differences in plasma sodium, urea, HDL cholesterol, and LDL cholesterol among groups. Total cholesterol was lower in the SHR-FOO than in the WKY-H group ( $p = 0.03$ ), and tended to be lower compared with the SHR group ( $p = 0.106$ ). Plasma creatinine was higher in the SHR control group when compared with the olive oil treated groups and the WKY-H animals.

Diuresis and urine creatinine excretion were higher in all hypertensive rats after eight weeks of treatment compared with healthy WKY. However, creatinine clearance was significantly lower after the treatment with both the CO and the FOO compared with the control SHR and WKY-H animals.

Natriuresis was higher in the animals treated with the CO compared with the healthy WKY. Urinary nitrite levels were significantly higher in the FOO group compared with the SHR and WKY control groups ( $p = 0.004$  and  $p = 0.04$ , respectively), and in the SHR-CO group compared to the SHR group ( $p = 0.028$ ). No differences were observed between groups in kaliuresis, proteinuria, and water and sodium balances among groups (Table 3).

**Table 3.** Plasma urine biochemical variables in the experimental groups after 8 week-intervention.

	WKY-H	SHR	SHR-CO	SHR-FOO	p
<b>Plasma</b>					
Sodium (mEq/L)	144.1 ± 0.7	143.9 ± 1.2	144.7 ± 0.9	144.1 ± 0.8	0.940
Potassium (mEq/L)	4.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	4.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.040
Creatinine (mg/dL)	0.4 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.004
Urea (mg/dL)	37.5 ± 1.4	41.2 ± 2.8	41.9 ± 1.9	40.0 ± 1.43	0.400
Total Cholesterol (mg/dL)	79.9 ± 3.3 <sup>a</sup>	77.9 ± 5.9 <sup>ab</sup>	74.3 ± 2.2 <sup>ab</sup>	65.2 ± 1.87 <sup>b</sup>	0.020
HDL Cholesterol (mg/dL)	63.2 ± 2.6	63.6 ± 5.0	59.4 ± 2.0	63.2 ± 2.7	0.770
LDL Cholesterol (mg/dL)	9.2 ± 0.7	10.8 ± 1.1	10.0 ± 0.7	9.2 ± 0.74	0.500
<b>Urine</b>					
Diuresis (mL/100gr/24h)	1.3 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.001
Natriuresis (μEq/100gr/24h)	243.7 ± 31.1 <sup>b</sup>	285.8 ± 27.0 <sup>ab</sup>	336.7 ± 20.9 <sup>a</sup>	248.4 ± 18.1 <sup>ab</sup>	0.040
Kaliuresis (μEq/100gr/24h)	520.5 ± 50.8	609.4 ± 40.9	617.7 ± 37.9	531.5 ± 50.0	0.320
Creatinine (mL/min/kg)	1.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.001
Clearance/Creatinine (mL/min/kg)	0.64 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.91 ± .08 <sup>a</sup>	0.001
Proteinuria (g/dL)	2.8 ± 2.3	2.9 ± 2.1	2.6 ± 1.0	2.3 ± 2.1	0.200
Nitrites μM	208.1 ± 43.9 <sup>b</sup>	144.8 ± 50.1 <sup>b</sup>	344.4 ± 41.5 <sup>a</sup>	393.3 ± 48.7 <sup>a</sup>	0.002
Water balance (mL/100g/24h)	3.4 ± 0.6	4.6 ± 0.7	3.9 ± 0.3	3.6 ± 0.2	0.510
Sodium balance (μEq/100g/d)	462.9 ± 38.7	528.4 ± 45.7	415.4 ± 82.1	587.4 ± 61.7	0.210

Data are means ± SEM. ANOVA test were used to compare results between groups for normal distribution variables, and the Kruskal Wallis test for non-normal distribution variables. The Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons among groups.  $p < 0.05$  was considered significant. Different superscript letters indicate significant differences between post-intervention results <sup>(a,b)</sup>. CO, control olive oil; FOO, functional olive oil; SEM, standard error of the mean; SHR: spontaneously hypertensive rats; WKY, Wistar Kyoto healthy rats.

### 3.6. Oxidative and Inflammatory Biomarkers

Table 4 shows the urinary oxidative and plasma inflammatory biomarkers after eight weeks of treatment. Both urinary 8-OH-dG and F<sub>2</sub>-isoprostanes excretion was lower in all SHR animals when compared with healthy WKY. In addition, after the treatment with the FOO, 8-OH-dG was lower than in the SHR and SHR-CO groups. No effect of the olive oil treatment was observed with regard to urinary F<sub>2</sub>-isoprostanes levels when compared with the SHR group. Plasma TNF-α was lower after the treatment with the FOO when compared with the healthy animals. No difference was observed between groups in plasma interleukin IL-6 and VEGF (Table 4).



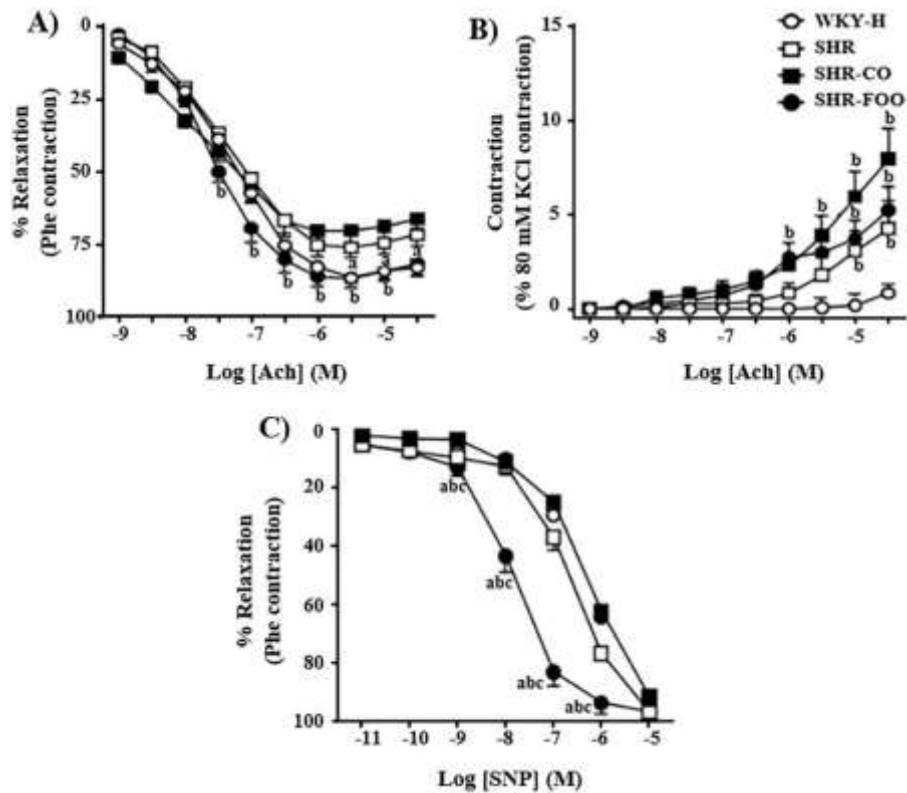
**Table 4.** Oxidative stress and inflammatory biomarkers after 8 week-intervention.

	WKY-H	SHR	SHR-CO	SHR-FOO	P
<b>Urine</b>					
8-OH-DG (ng/mL)	53.2 ± 5.0 <sup>b</sup>	26.7 ± 4.2 <sup>a</sup>	24.5 ± 4.4 <sup>a</sup>	17.1 ± 4.4 <sup>a</sup>	0.001
F <sub>2</sub> -isoprostanes (ng/mL)	7.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.001
<b>Plasma</b>					
IL-6 (pg/mL)	3.6 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.2	0.280
TNFα (pg/mL)	45.9 ± 8.9 <sup>b</sup>	26.3 ± 2.7 <sup>ab</sup>	24.4 ± 3.2 <sup>ab</sup>	23.6 ± 3.2 <sup>a</sup>	0.021
VEGF-A (pg/mL)	12.9 ± 1.3	10.6 ± 0.7	9.6 ± 0.5	11.5 ± 0.7	0.060

Data are means ± SEM. ANOVA test were used to compare results between groups for normal distribution variables, and the Kruskal Wallis test for non-normal distribution variables. The Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons among groups. P<0.05 was considered significant. Different superscript letters indicate significant differences between post-intervention results <sup>(a,b)</sup>. CO, control olive oil; FOO, functional olive oil; IL-6, interleukin 6; SEM, standard error of the mean; SHR: spontaneously hypertensive rats; WKY-H, Wistar Kyoto healthy rats; TNFα, tumor necrosis factor alpha; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A.

### 3.7. Ex-Vivo Effects on Vascular Function

Aortae endothelium-dependent vasodilator responses to acetylcholine were higher in healthy WKY and in FOO-supplemented animals, at the higher concentrations in arteries stimulated with phenylephrine, when compared to aortae from control SHR (Figure 4A). In the presence of L-NAME(10<sup>-4</sup> M), aortae from the three groups of SHR showed an increased endothelium-dependent vasoconstrictor response to acetylcholine than those obtained from WKY rats. Supplementation with the two olive oils did not significantly modify the endothelium-dependent vasoconstriction with respect to untreated SHR (Figure 4B). To analyze whether the changes in the responsiveness to acetylcholine are due to a fault in NO signaling in the vascular smooth muscle, we evaluated the effect of nitroprusside, which is a molecule that activates soluble guanylyl cyclase in vascular smooth muscle, mimicking the effects of endogenous NO. The concentration-response curves to the endothelium-independent vasodilator nitroprusside were similar in WKY, SHR, and SHR-CO animals, but were markedly increased in aortae from FOO-treated rats when compared with the rest of the experimental groups (Figure 4C).



**Figure 4.** Ex vivo endothelium-dependent vasodilator responses to acetylcholine (A), endothelium-dependent vasoconstrictor responses to acetylcholine in the presence of L-NAME ( $10^{-4}$  M) (B), and endothelium-dependent vasodilator responses to nitroprusside (C) in aortic rings. Data are means  $\pm$  SEM. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  compared with SHR control rats; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  compared with the WKY healthy group. <sup>c</sup>  $p < 0.05$  compared with SHR-CO rats. SHR, spontaneously hypertensive rats. SHR-CO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the control olive oil. SHR-FOO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the functional olive oil. WKY-H, Wistar Kyoto healthy rats.

#### 4. Discussion

Olive oil is the main lipid source of the Mediterranean diet. Adherence to this diet could contribute to the prevention of age-related hypertension [15]. The Mediterranean diet prevention study (PREDIMED) reported lower values of diastolic BP (DBP) in individuals consuming a Mediterranean diet with EVOO when compared with subjects consuming a low-fat one [16]. The main finding of the current study is that the daily treatment with 1 mL of an EVOO, enriched with bioactive compounds, obtained from the olive fruits and leaves (750 mg/kg), reduced SBP and vasoactive peptides: angiotensin II and endothelin-1, and increased urinary NO, after eight weeks of treatment in an experimental model of genetically hypertensive rats. The beneficial effect on these biomarkers was also found after the treatment with a control EVOO containing only 17.6 mg/kg of phenolic compounds, but not reflected in an SBP change. Our data also show additional health benefits, such as the improvement of cardiac hypertrophy, 8-OH-dG, and ex-vivo endothelial dysfunction in the group treated during eight weeks with the enriched EVOO when compared with the control hypertensive rats.

The progressive anti-hypertensive effect of the enriched EVOO was observed from the fifth week of intervention, and was accompanied by a decreased cardiac hypertrophy (reflected in the lower left ventricular weight) after eight weeks of treatment. Sustained consumption, during at least two weeks of a diet enriched with EVOO, prevented the increase of SBP in younger SHR rats, without cardiac hypertrophy reduction [8]. In our study, the anti-hypertensive effect was not confirmed after treatment with CO. This indicates that the effect may be related to the presence of phenolic compounds in the EVOO. A previous study has reported that blood pressure decreased after two weeks of oral administration of an oleuropein-enriched olive leaf extract (15%), and, subsequently, cardiac hypertrophy also decreased after five weeks of its administration [12]. In addition, healthy subjects who consumed an oleuropein extract showed a decrease in SBP and DBP after six weeks of treatment [17]. These results support clinical data proposing that VOO is more efficient than any other type of dietary oil at reducing blood pressure. Moreover, this effect is not only mediated through the VOO MUFA content, but also through its bioactive minor components, mainly polyphenols [18,19]. However, the knowledge concerning the mechanisms underlying the antihypertensive effect of olive oil components is still lacking.

Endothelial dysfunction, which is a critical event in the development of hypertension, is controlled by several vasoactive peptides. Among them, angiotensin II and endothelin-1 actively contribute to the pathogenesis of hypertension and its complications [20]. The sustained presence of angiotensin II type 1 receptor antagonists prevents and attenuates the development of hypertension, cardiac hypertrophy, oxidative stress, and renal injury in SHR [21]. In addition, hypertension is associated with impaired NO production and bioavailability [22]. Our results show

that VOO, independently of the polyphenol content, produced a decrease in plasma angiotensin II and urinary endothelin-1 concentrations, and, in parallel, an increase of NO. These effects may contribute to a decrease in the SBP after treatment with FOO, but their change was not enough to decrease SBP after the intake of the control oil, which indicates that other mechanisms might be implicated in the anti-hypertensive effect of the enriched oil. Previous authors have reported that olive oil intake induces changes in serum angiotensinase activity in animals [23] and humans [24]. In addition, the aqueous extract of *Olea europaea* leaves has been associated with the inhibition of ACE in vitro [25]. Storniolo et al. [26] demonstrated that hydroxytyrosol and a polyphenol-enriched EVOO extract reduced in vitro endothelin-1 secretion in experimental conditions. They simulated hyperglycemia and high free fatty acid levels observed in diabetes, which suggests that VOO polyphenols are involved in endothelial protection [26]. The present data are in accordance with previous reports concerning the fact that human consumption of olive oil rich in polyphenols decreases endothelin-1 both in vivo and ex vivo [27]. The lower angiotensin II plasma levels observed after the administration of the two EVOO may influence endothelin-1 modification. This could be a similar process since it occurs with angiotensin II inhibitors, such as losartan, which reduce urinary endothelin in the renal cortex of SHR [21], or enalapril, which decreases plasma endothelin levels in SHR [28]. Martin-Pelaez et al. [29] reported that supplementation with 25 mL/day of VOO containing 366 mg/kg of phenolic compounds modulates the expression of some of the genes related to the renin-angiotensin-aldosterone system, which proposed a possible mechanism underlying the reported decrease of SBP. In addition, it is possible that the endothelin-1 modification is involved in the increase of creatinine clearance produced by enriched EVOO, since several authors have suggested that kidney-derived endothelin exerts considerable renal effects, i.e.; decreasing the glomerular filtration rate and renal blood flow [30,31].

Other mechanisms may underlie differences observed between the two treatments. Enriched EVOO improved the ex-vivo acetylcholine-altered responses observed in aortae from SHR, which indicates a protective role in agonist-induced NO bioactivity. These results are in agreement with previous data showing that sustained oleuropein treatment ameliorated endothelium-dependent acetylcholine-induced vasodilation [12]. SHR showed an increased endothelium-dependent vasoconstriction induced by acetylcholine, which could be attributed to an increased endothelial release of vasoconstrictor prostanoids [32]. Acetylcholine-induced vasoconstriction was not affected by enriched EVOO, which suggests that the reduction in the release of endothelium dependent constrictor factors, such as TXB<sub>2</sub> or TXA<sub>2</sub>, could not participate in the blood pressure lowering effect induced in this model. In the present study, the relaxing response to nitroprusside was augmented in the aortae from the enriched-oil treated group. This mechanism is not usually observed with antihypertensive agents, which suggests that an increased sensitivity to NO might improve endothelial dysfunction and blood pressure. Thus, and in accordance with the in vivo

data, the differential functional changes observed in endothelium-dependent relaxation induced by the enriched EVOO could be attributed to the modulation of NO sensitivity.

Anti-hypertensive treatments are usually accompanied by a reduction in oxidative stress in SHR [12,21,28]. The antioxidant properties of olive oil polyphenols have been demonstrated in vitro [33], in experimental models [34], and in clinical trials [3,35]. A recent meta-analysis has suggested that a moderate polyphenol contain 56 mg polyphenols/L may be sufficient to maintain 8-OH-dG production [36]. Our results show that the urinary excretion of oxidative stress biomarkers was lower after supplementations with the enriched EVOO but not after the intake of the control VOO containing 17.6 mg/kg of phenolic compounds. These data concur with the reduced oxidative stress produced by an oleuropein-rich olive leaf extract in hypertensive/diabetic rats [37], and in rats fed a carbohydrate-high fat diet [38]. It has been suggested that different minor components of EVOO, such as hydroxytyrosol and/or oleuropein, probably mediated the antioxidant effect of EVOO [8,39]. In addition, the antioxidant effects of the enriched EVOO might be influenced by the anti-hypertensive effect, directly or mediated by the reduction of plasma levels of angiotensin II, since this molecule induces nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH) activation [40,41], and its blockade reduces oxidative stress [21]. In accordance with previous studies [35], we did not find effects of VOO treatments on F2-isoprostanes as biomarkers of lipid oxidation. Anti-inflammatory effects of EVOO have been previously described [36,42]. A systematic review has concluded that the sustained consumption of VOO may reduce the plasma levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  when associated with the Mediterranean diet and healthy lifestyle [43]. However, in the present work, we did not observe any effect of VOO treatments on plasma inflammatory biomarkers, probably because it is not associated to a Mediterranean pattern.

We observed higher levels of oxidative and inflammatory biomarkers in healthy animals. Since the link between oxidative stress and a systemic inflammation is well described [44], our results are consistent since both oxidative and inflammatory biomarkers are lower in SHR than in WKR. To our best knowledge, no previous studies have compared oxidative and inflammatory biomarkers in healthy WKR versus this model of genetic hypertension. Thus, more studies are needed to clarify the antioxidant and anti-inflammatory effects of enriched-VOOs in other experimental animal models and in human trials.

Lastly, there is no consensus about the effect of VOO on plasma cholesterol levels. Our data show that total cholesterol was reduced in SHR after the enriched EVOO treatment, which indicates a possible hypo-cholesterolemic effect. This decrease is not associated with any particular lipoprotein. Tsartsou et al. [36] has revealed that a decrease of total cholesterol is related to the polyphenol contains [44], what is in accordance with the present results.

## 5. Limitations and Strengths

Although the results obtained in animal model are promising, clinical trials are needed to confirm these results, particularly in pre-hypertensive and hypertensive humans. Assuming that the rats consume approximately 70 kcal/day and the average balanced diet in humans is 2000 kcal/day, the dose of olive oil administered in rats (1 mL/day) is comparable to an intake of olive oil in a human diet of 26 mL/day [45].

Knowledge on the molecular mechanisms responsible for benefits of VOO on hypertension could elucidate potential new pharmacological treatments and functional food, all of which would lead to better cardiovascular prevention.

## 6. Conclusions

In conclusion, these results demonstrate that sustained treatment with EVOO containing at least 17.6 mg/kg of phenolic compounds may decrease vasoconstrictor biomarkers and increase vasodilatory NO. In addition, enrichment with bioactive compounds (750 mg/kg of phenolic compounds, mainly hydroxytyrosol, 3,4-dihydroxyphenylglycol, and oleuropein) from the olive fruit and leaves may also lead to: (1) a reduction in hypertension and cardiac hypertrophy, (2) improved endothelial dysfunction,

(3) a decreased oxidative status and (4) a reduced plasma total cholesterol levels in SHR. Therefore, the addition of an enriched EVOO to the diet may be a useful tool against high blood pressure and plasma cholesterol levels, which are two risk factors for cardiovascular diseases.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/8/1728/s1>, Table S1: Detailed composition of the olive oils used in the study. Figure S1: Systolic blood pressure at the beginning and end of the intervention. The data are means  $\pm$  SEM. The ANOVA test were used to compare results between groups for a normal distribution variable, and for multiple comparisons among groups. The Bonferroni post hoc test was used.  $p < 0.05$  was considered significant. SHR, spontaneously hypertensive rats. SHR-CO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the control olive oil. SHR-FOO, spontaneously hypertensive rats supplemented with the functional olive oil. WKY-H, Wistar Kyoto healthy rats.

**Author Contributions:** J.A.E.-C., M.F., R.d.l.T., M.-I.C., E.M.d.V., and M.D.M. designed the research. F.V. designed and supervised the in vivo experiment. S.M.-M., and A.V. carried out the sample and tissue processing and biochemical analysis. M.R. carried out the ex vivo vascular reactivity experiment. P.V., S.J., L.O.-G. and A.C.-P. carried out different aspect of the olive oil

analyses. F.V., A.V., E.S.-R., and M.D.M. analyzed the data and performed the statistical analysis. F.V., A.V., E.S.-R., and M.D.M. wrote the paper. M.D.M. had a primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript. This paper contains results included in the doctoral thesis of Laura Alejandra Vazquez Aguilar, which was written within the context of Nutrition and Food Sciences at the University of Granada.

**Funding:** This research was funded by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness of Spain, and to the Junta and Andalucía, through the FEDER INNTERCONECTA Program of the Center for Industrial Technological Development (CDTI), CARDIOLIVE Study Project No. ITC-20151142 ((EXP 00083147).

**Acknowledgments:** The authors thank M.C.R.P. who carried out the technical work. P.V. carried out animal manipulation, and I.R.V. and R.W. helped in the sacrifice of the animals and Promotion and the European Regional Development Fund (FEDER). CIBERObn is an initiative of ISCIII. Promotion and the European Regional Development Fund (FEDER). CIBERObn is an initiative of ISCIII and Development Network, SAMID Network, Ref. RD16/0022/0015, funded by the PN 2018–2021 (Spain), ISCIII-Sub-Directorate General for Research Assessment. In addition, we thank the co-financing of the European Regional Development Fund (FEDER), and

that corresponding to the companies SAN FRANCISCO DE ASIS DE MONTEFRÍO S. Coop.; AGROINSUR S.L.; AGROÍSA S.L.; CANO MARCHAL EUROPA S.L. and GEA WESTFALIA SEPARATOR IBERICA S.A.

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

## Appendix A

Quantitative determination of phenolic compounds in the used EVOOs. The quantitative characterization of the oils that were administered to the rats was carried out by applying a slightly modified liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) multi-class methodology previously reported elsewhere [13]. In short, 1 ( $\pm$  0.01) g of EVOO was subjected to a three steps liquid-liquid extraction protocol with ethanol/water mixtures in different proportions. Then, the supernatants were collected together, evaporated to dryness and re-dissolved in 1 mL of ethanol/water (80:20, v/v). After filtering them through a 0.22- $\mu$ m nylon syringe filter, the prepared extracts were injected into the LC-MS system consisting of an Agilent 1260 LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a Bruker Daltonics Esquire 2000<sup>TM</sup> ion trap MS (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) by means of an electrospray interface. Chromatographic separation was carried out at 40 °C in a Zorbax Extend C18 column (4.6 x 100 mm, 1.8  $\mu$ m particle

size) (Agilent Technologies) by applying a 30-minute mobile phase gradient program using acidified water and acetonitrile at a flow rate of 1 mL/min. Full scan MS spectra (50-1000 m/z) were acquired in negative polarity with a capillary voltage of + 3200 V from the beginning to 17 minutes and + 3500 V from that time to the end of the run. Source parameters were set as follows: 30 psi of nebulizer pressure, 9 L/min of drying gas flow, and 300 °C of drying gas temperature.

Compounds lacking commercially available standards were quantified in terms of a compound presenting a related chemical structure. Hydroxytyrosol calibration curve was used to quantify 3,4-dihydroxyphenylglycol and chlorogenic acid. Secoiridoids (in glycosylated and aglycone forms) were quantified in terms of oleuropein. Flavonoid glucoside isomers were quantified considering the corresponding 7-O-isomer. Luteolin was used for diosmetin quantification and syringaresinol and acetoxypinoresinol concentrations were calculated by comparison with the pinoresinol MS response.



## References

1. Cogolludo, A.; Pérez-Vizcaino, F.; Tamargo, J. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2005**, *14*, 423–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. George, E.S.; Marshall, S.; Mayr, H.L.; Trakman, G.L.; Tatuco-Babet, O.A.; Lassemillante, A.M.; Bramley, A.; Reddy, A.J.; Forsyth, A.; Tierney, A.C.; et al. The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *30*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yubero-Serrano, E.M.; Lopez-Moreno, J.; Gomez-Delgado, F.; Lopez-Miranda, J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2018**, *28*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jänicke, C.; Grünwald, J.; Brendler, T. *Handbuch Phytotherapie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, Germany, 2003.
5. Cherif, S.; Rahal, N.; Haouala, M.; Hizaoui, B.; Dargouth, F.; Gueddiche, M.; Kallel, Z.; Balansard, G.; Boukef, K. A clinical trial of a titrated Olea extract in the treatment of essential arterial hypertension. *J. Pharm. Belg.* **1996**, *51*, 69–71. [[PubMed](#)]
6. Bennani-Kabchi, N.; Fdhil, H.; Cherrah, Y.; Kehel, L.; Bouayadi, F.; Amarti, A.; Saïdi, M.; Marquié, G. Effects of *Olea europea* var. oleaster leaves in hypercholesterolemic insulin-resistant sand rats. *Thérapie* **1999**, *54*, 717–723. [[PubMed](#)]
7. Susalit, E.; Agus, N.; Effendi, I.; Tjandrawinata, R.R.; Nofiarny, D.; Perrinjaquet-Mocetti, T.; Verbruggen, M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Villarejo, A.B.; Ramírez-Sánchez, M.; Segarra, A.B.; Martínez-Cañamero, M.; Prieto, I. Influence of extra virgin olive oil on blood pressure and kidney angiotensinase activities in spontaneously hypertensive rats. *Planta Med.* **2015**, *81*, 664–669. [[CrossRef](#)]
9. Rodriguez-Rodriguez, R.; Herrera, M.D.; de Sotomayor, M.A.; Ruiz-Gutierrez, V. Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *Am. J. Hypertens.* **2007**, *20*, 728–734. [[CrossRef](#)]
10. Rodriguez-Rodriguez, R.; Herrera, M.D.; de Sotomayor, M.A.; Ruiz-Gutierrez, V. Effects of pomace olive oil-enriched diets on endothelial function of small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102*, 1435–1444. [[CrossRef](#)]
11. Zarzuelo, A.; Duarte, J.; Jiménez, J.; Gonzalez, M.; Utrilla, M.P. Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med.* **1991**, *57*, 417–419. [[CrossRef](#)]

12. Romero, M.; Toral, M.; Gómez-Guzmán, M.; Jimenez, R.; Galindo, P.; Sanchez, M.; Olivares, M.; Gálvez, J.; Duarte, J. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* **2016**, *7*, 584–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Olmo-García, L.; Polari, J.J.; Li, X.; Bajoub, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Wang, S.C.; Carrasco-Pancorbo, A. Deep insight into the minor fraction of virgin olive oil by using LC-MS and GC-MS multi-class methodologies. *Food Chem.* **2018**, *261*, 184–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Vera, R.; Jiménez, R.; Lodi, F.; Sánchez, M.; Galisteo, M.; Zarzuelo, A.; Pérez-Vizcaíno, F.; Duarte, J. Genistein restores caveolin-1 and AT-1 receptor expression and vascular function in large vessels of ovariectomized hypertensive rats. *Menopause* **2007**, *14*, 933–940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Núñez-Córdoba, J.M.; Valencia-Serrano, F.; Toledo, E.; Alonso, A.; Martínez-González, M.A. The Mediterranean diet and incidence of hypertension: The seguimiento universidad de navarra (SUN) study. *Am. J. Epidemiol.* **2009**, *169*, 339–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Toledo, E.; Hu, F.B.; Estruch, R.; Buil-Cosiales, P.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.I.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Fiol, M.; et al. Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: Results from a randomized controlled trial. *BMC Med.* **2013**, *11*, 207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lockyer, S.; Rowland, I.; Rowland, I.; Spencer, J.P.E.; Yaqoob, P.; Stonehouse, W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: A randomised controlled trial. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 1421–1432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lopez, S.; Bermudez, B.; Montserrat de la Paz, S.; Jaramillo, S.; Abia, R.; Muriana, F.J. Virgin olive oil and hypertension. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2016**, *14*, 323–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Peyrol, J.; Riva, C.; Amiot, M.J. Hydroxytyrosol in the prevention of the metabolic syndrome and related disorders. *Nutrients* **2017**, *9*, 306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Schiffrin, E.L. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc. Pharmacol.* **2005**, *43*, 19–29. [[CrossRef](#)]
21. Chamorro, V.; Wangensteen, R.; Sainz, J.; Duarte, J.; O'Valle, F.; Osuna, A.; Vargas, F. Protective effects of the angiotensin II type 1(AT1) receptor blockade in low-renin deoxycorticosterone acetate (DOCA)-treated spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* **2004**, *106*, 251–259. [[CrossRef](#)]
22. Oliveira-Paula, G.H.; Pinheiro, L.C.; Tanus-Santos, J.E. Mechanisms impairing blood pressure responses to nitrite and nitrate. *Nitric Oxide* **2019**, *85*, 35–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ramírez-Expósito, M.J.; Martínez-Martos, J.M.; Prieto, I.; Alba, F.; Ramírez, M. Angiotensinase activity in mice fed an olive oil-supplemented diet. *Peptides* **2001**, *22*, 945–952. [[CrossRef](#)]
24. Williams, P.T.; Fortmann, S.P.; Terry, R.B.; Garay, S.C.; Vranizan, K.M.; Ellsworth, N.; Wood, P.D. Associations of dietary fat, regional adiposity and blood pressure in men. *JAMA* **1987**, *257*, 3251–3256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hansen, K.; Adersen, A.; Christensen, S.B.; Jensen, S.R.; Nyman, U.; Smitt, U.W. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine* **1996**, *2*, 319–325. [[CrossRef](#)]
26. Stornio, C.E.; Casillas, R.; Bullo, M.; Castañer, O.; Ros, E.; Saez, G.T.; Toledo, E.; Estruch, R.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fito, M.; et al. A Mediterranean diet supplemented with extra virgin

- olive oil or nuts improves endothelial markers involved in blood pressure control in hypertensive women. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 89–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sanchez-Rodriguez, E.; Lima-Cabello, E.; Biel-Glesson, S.; Fernandez-Navarro, J.R.; Calleja, M.A.; Roca, M.; Espejo-Calvo, J.A.; Gil-Extremuera, B.; Soria-Florido, M.; de la Torre, R.; et al. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on metabolic syndrome and endothelial functional risk biomarkers in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients* **2018**, *10*, 626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  28. Duarte, J.; Jiménez, R.; O’Valle, F.; Galisteo, M.; Pérez-Palencia, R.; Vargas, F.; Pérez-Vizcaíno, F.; Zarzuelo, A.; Tamargo, J. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J. Hypertens.* **2002**, *20*, 1843–1854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  29. Martín-Peláez, S.; Castañer, O.; Konstantinidou, V.; Subirana, I.; Muñoz-Aguayo, D.; Blanchart, G.; Gaixas, S.; de la Torre, R.; Farré, M.; Sáez, G.T.; et al. Effect of olive oil phenolic compounds on the expression of blood pressure-related genes in healthy individuals. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 663–670. [[CrossRef](#)]
  30. Trippodo, N.; Frolich, E. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: Man and rat. *Circ. Res.* **1981**, *48*, 309–319. [[CrossRef](#)]
  31. Karam, H.; Heudes, D.; Bruneval, P.; Gonzales, M.F.; Löffler, B.M.; Clozel, M.; Clozel, J.P. Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension* **1996**, *28*, 379–385. [[CrossRef](#)]
  32. Simonson, M.S. Endothelins: Multifunctional renal peptides. *Physiol. Rev.* **1993**, *73*, 375–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  33. Franco, M.N.; Galeano-Díaz, T.; López, O.; Fernández-Bolaños, J.G.; Sánchez, J.; De Miguel, C.; Gil, M.V.; Martín-Vertedor, D. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chem.* **2014**, *163*, 289–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  34. Gorzynik-Debicka, M.; Przychodzen, P.; Cappello, F.; Kuban-Jankowska, A.; Marino Gammazza, A.; Knap, N.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  35. Sanchez-Rodriguez, E.; Biel-Glesson, S.; Fernandez-Navarro, J.R.; Calleja, M.A.; Espejo-Calvo, J.A.; Gil-Extremuera, B.; de la Torre, R.; Fito, M.; Covas, M.I.; Vilchez, P.; et al. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on biomarkers of oxidative stress and inflammation in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients* **2019**, *11*, 561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  36. Tsartsou, E.; Proutsos, N.; Castanas, E.; Kampa, M. Network meta-analysis of metabolic effects of olive-oil in humans shows the importance of olive oil consumption with moderate polyphenol levels as part of the mediterranean diet. *Front. Nutr.* **2019**, *6*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  37. Nekooeian, A.A.; Khalili, A.; Khosravi, M.B. Effects of oleuropein in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: A study of antihypertensive mechanisms. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2014**, *16*, 953–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  38. Poudyal, H.; Campbell, F.; Brown, L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 946–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  39. Raederstorff, D. Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: A review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2009**, *79*, 152–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  40. Oskarsson, H.J.; Heistad, D.D. Oxidative stress produced by Angiotensin II: Implications for hypertension and vascular injury. *Circulation* **1997**, *95*, 557–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Wind, S.; Beuerlein, K.; Armitage, M.E.; Taye, A.; Kumar, A.H.; Janowitz, D.; Neff, C.; Shah, A.M.; Wingler, K.; Schmidt, H.H. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension* **2010**, *56*, 490–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Casas, R.; Estruch, R.; Sacanella, E. The protective effects of extra virgin olive oil on immune-mediated inflammatory responses. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targ.* **2018**, *18*, 23–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yarla, N.S.; Polito, A.; Peluso, I. Effects of Olive Oil on TNF- $\alpha$  and IL-6 in Humans: Implication in obesity and frailty. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targ.* **2018**, *18*, 63–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wu, J.; Saleh, M.A.; Kirabo, A.; Itani, H.A.; Montaniel, K.R.; Xiao, L.; Chen, W.; Mernaugh, R.L.; Cai, H.; Bernstein, K.E.; et al. Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 50–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Guasch-Ferré, M.; Hu, F.B.; Martínez-González, M.A.; Fitó, M.; Bulló, M.; Estruch, R.; Fiol, M. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.* **2014**, *12*, 78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



***May bioactive compounds from the olive fruit improve the postprandial insulin response in healthy adults?***

**Estefania Sanchez-Rodriguez<sup>1</sup>, Laura Alejandra Vazquez-Aguilar<sup>1\*</sup>, Sara Biel-Glesson<sup>2</sup>, Jose Ramon Fernandez-Navarro<sup>2</sup>, Juan Antonio Espejo-Calvo<sup>3</sup>, Jose Maria Olmo-Peinado<sup>4</sup>, Rafael de la Torre<sup>5,6</sup>, Monserrat Fito-Colomer<sup>6,7</sup>, Maria Isabel Covas<sup>8</sup>, Concepcion Romero<sup>9</sup>, Manuel Brenes<sup>9</sup>, Emilio Martinez de Victoria<sup>10</sup>, Angel Gil<sup>1,6,11</sup>, Maria Dolores Mesa<sup>1,11</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.

<sup>2</sup>Andaluz Public Foundation for Biosanitary Research of Oriental Andalucía "Alejandro Otero" (FIBAO), Avenida de Madrid 15, 18001 Granada, Spain.

<sup>3</sup>Instituto para la Calidad y Seguridad Alimentaria (ICSA)-TECNOFOOD I+D SOLUCIONES. Granada, Spain.

<sup>4</sup>Acer Campestres S.L., Almendro 37, Poligono Industrial El Cerezo, 23670 Castillo de Locubin, Jaen, Spain.

<sup>5</sup>Integrative Pharmacology and Systems Neurosciences Research Group. Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain.

<sup>6</sup>Spanish Biomedical Research Networking Centre, Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Health institute Carlos III. Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain.

<sup>7</sup>Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group. Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain.

<sup>8</sup>NUPROAS (Nutritional Project Assessment), Handesbolag (NUPROAS HB), Nacka, Sweden.

<sup>9</sup>The Food Biotechnology Department, Instituto de la Grasa (IG-CSIC), University Campus Pablo de Olavide, Building 46, Ctra. Utrera km 1, 41013 Sevilla, Spain.

<sup>10</sup>Department of Physiology. Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.

<sup>11</sup>Ibs.GRANADA. Biosanitary Research Institute of Granada, 18014 Granada, Spain.

**\*Correspondence:** Laura Alejandra Vázquez Aguilar,

[alejandra.vazquez.aguilar@outlook.com](mailto:alejandra.vazquez.aguilar@outlook.com)

Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.

Tel: +34 958 241000 Ext. 48802 Fax: +34 958 24896

**Abstract:**

**Scope.** The postprandial effects of virgin olive oils (VOOs) enriched with phenolic compounds and triterpenes from the olive fruit on plasma glucose and insulin (primary outcomes), and gastrointestinal hormones responses were evaluated in healthy adults.

**Methods and results.** Single doses (30 mL) of three oils were evaluated: optimized polyphenols-rich VOO (OVOO); functional olive oil (FOO): OVOO enriched with triterpene acids; and VOO with low content of polyphenols. Postprandial plasma insulin release was lower after the intake of the FOO compared to VOO, while plasma glucose levels were lower after the intake of the VOO compared to OVOO. Matsuda's index of insulin sensitivity improved after the intake of FOO and OVOO, while the insulinogenic index and gastric inhibitory polypeptide (GIP) tended to improve after the intake of OVOO.

**Conclusion:** The enrichment of VOOs with bioactive compounds from the olive fruit increases its benefits, improving postprandial insulin release and peripheral tissue sensitivity.

**Keywords:** gastrointestinal hormones, insulin sensitivity, olive oil, phenolic compounds, triterpenic acids.

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of the variance; iAUC, incremental area under the curve; CVD, cardiovascular disease; FOO, functional olive oil; GIP, gastric inhibitory polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide 1; INSI, insulinogenic index; GLM, general linear model; LMM, linear mixed-effects model; MetS, metabolic syndrome; OVOO, optimized virgin olive oil; PP, pancreatic polypeptide; PYY, peptide YY; SPSS, statistical package for the social sciences; T2D, type-2 diabetes; VOO, virgin olive oil.

## INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetS) and diabetes are chronic metabolic diseases characterized by increased insulin resistance and decreased insulin sensitivity. Elevated postprandial glycemic has been associated with a higher incidence of cardiovascular events in patients with and without type-2 diabetes (T2D) (Mannucci et al., 2012; O'Keefe et al., 2008). The American Heart Association considers glycemia to be one of the major controllable risk factors for metabolic diseases (Association, 2020).

Virgin olive oil (VOO), the Mediterranean diet's main fat source, is considered one of the healthiest dietary fats, associated with a low MetS prevalence (Estruch et al., 2018). Indeed, VOO promotes cardiovascular benefits and improves glycemic control, and, consequently, MetS (Yubero-Serrano et al., 2019). In 2017, a systematic review and meta-analysis in healthy adults provided evidence that the intake of VOO could be beneficial for the prevention and management of T2D (Schwingshackl et al., 2017).

VOO contains bioactive compounds with recognized beneficial properties, such as polyphenols (Ditano-Vázquez et al., 2019; Peyrol et al., 2017), and triterpenic acids (Allouche et al., 2009; Guinda et al., 2010). Within them, hydroxytyrosol has demonstrated antioxidant, cardioprotective (Carluccio et al., 2003), anticancer (Fabiani, 2016) and neuroprotective (Rodríguez-Morató et al., 2015) properties. This compound also decreases the risk of MetS (Lemonakis et al., 2017). Triterpenic acids (oleanolic acids and maslinic acid) has demonstrated cardioprotective effects (de la Torre et al., 2020), and improve several factors related to MetS (Sharma et al., 2018). In humans, they exert beneficial effects against T2D and improve the response to insulin (Castellano et al., 2013), increasing glycogen synthesis and inhibiting gluconeogenesis and glycogenolysis in mice (Wen et al., 2005).

Insulin and gastrointestinal hormones, namely glucagon-like peptide 1 (GLP-1), gastric inhibitory polypeptide (GIP), ghrelin, pancreatic polypeptide (PP), and peptide YY (PYY), are secreted in response to eating to regulate the postprandial glucose response, among other physiological functions. Thus, they contribute to gastric emptying, and satiety and satiation. Therefore, they are crucial in maintaining steady body weight and thus influence overweight, obesity, and associated high-prevalent metabolic and cardiovascular comorbidities. The gastric emptying determines the rate of blood glucose postprandial increase, causing the release of incretins that stimulate insulin secretion (Little et al., 2006). As far as we know, no studies have analyzed the effect of VOO or any of its components on postprandial release of insulin and gastrointestinal hormones in humans.

Therefore, the objective of the present study was to compare the postprandial effect of three olive oils with different bioactive compounds content: phenolics and triterpenic acids, on



plasma concentration of glucose, insulin, and gastrointestinal hormones, insulinogenic index and insulin sensitivity in healthy adults.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Studied olive oils**

The present study is part of the NUTRAOLEUM trial (ClinicalTrials.gov ID: NCT02520739). Three olive oils with a different concentration in bioactive compounds and the same fatty acid profile were evaluated: 1) an optimized VOO (OVOO), high in phenolic compounds (490 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenic acids); 2) a functional olive oil (FOO), a VOO high in phenolic compounds and additionally enriched with triterpenic acids, that was prepared by adding maslinic and oleanolic acids to the OVOO (487 ppm of phenolic compounds and 389 ppm of triterpenic acids respectively); and 3) a standard VOO obtained after cold washing of the OVOO to decrease the amount of polyphenols (124 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenic acids). The characteristics and the nutritional composition of experimental oils have been described in detail elsewhere (Biel et al., 2016).

### **2.2 Study design**

The NUTRAOLEUM trial is a randomized, double-blind, crossover and controlled trial conducted in Virgen de las Nieves and San Cecilio General Hospitals of Granada, Spain. The study design, the characteristics of the healthy adults, aspects of their diet, and intervention have been described in detail previously (Biel et al., 2016). In brief, the subjects were randomly assigned to three olive oils administration sequences (sequence 1: OVOO, VOO, and FOO olive oil; sequence 2: VOO, FOO, and OVOO olive oil; and sequence 3: FOO, OVOO, and VOO), paired by gender and age. Olive oils were sequentially administered over three periods of three weeks of intervention, preceded by two weeks of washout periods in which participants were requested to avoid olives and olive oil consumption. A subsample of 18 participants was chosen for a postprandial study, which was carried out the first day of each period of intervention, as specify below (de la Torre et al., 2020).

### **2.3 Postprandial intervention**

Before the postprandial intervention, 10 h-fasting venous blood samples were collected. Then, 30 mL of the corresponding olive oil (VOO, OVOO, or FOO) were administered as a single dose with a piece of bread (80 g) and a glass of water (200 mL) (de la Torre et al., 2020). Blood samples were taken at 30, 45, 60, 120 and 240 min by using EDTA-coated tubes. For the

determination of plasma gastrointestinal hormones, Pefabloc SC (AEBSF) (Roche), which is needed for ghrelin determination (1 mg/mL), and dipeptidyl-dipeptidase IV inhibitor (Linco), which is needed for the determination of GLP-1 (50  $\mu$ M), were added to the whole blood. Blood samples were centrifuged at 1750  $\times$  g, 4  $^{\circ}$ C, during 15 min, and aliquots of plasma were immediately frozen and stored at -80  $^{\circ}$ C until analysis.

## 2.5 Analytical methods

Plasma glucose was analyzed using a colorimetric kit (ref. BSIS46-E, Spinreact, Spain) (coefficient of variation (CV): 4.79%). Plasma concentrations of insulin and gastrointestinal hormones were determined using a *MILLIplex<sup>TM</sup>* kit, with the Luminex 200 multiplex assay system built on xMAP technology with the Human Gut Hormone Panel (Millipore Iberica S.A., Madrid, Spain) as previously described (Gonzalez-Anton et al., 2015) (CV: 6.17% for insulin and 5.97, 8.61, 5.93, 8.38 and 9.85 %, respectively for GIP, GLP-1, ghrelin, PP and PYY). The incremental areas under the curves (iAUCs) of postprandial glucose, insulin and gastrointestinal hormones were calculated using a trapezoidal method (Brouns et al., 2005) from baseline to 240 min.

## 2.6 Pancreas functionality and insulin resistance and sensitivity indices

To describe the metabolic state of volunteers at baseline, pancreatic  $\beta$ -cell function was estimated as the homeostatic model assessment of  $\beta$ -cell functionality index (HOMA- $\beta$ ) as described by Ahren et al. (Ahren et al., 2008) at fasting time:  $\text{HOMA-}\beta = (20 \times \text{plasma insulin (mUI/L)}) / (\text{plasma glucose (mmol/L)} - 3.5)$ . Fasting peripheral tissue insulin resistance was estimated using the homeostatic model assessment index of insulin resistance (HOMA-IR) that was calculated following the equation  $\text{HOMA-IR} = (\text{plasma insulin (mUI/L)} \times \text{plasma glucose (mmol/L)}) / 22.5$  (Matthews et al., 1985) at fasting time. Fasting peripheral tissue insulin sensitivity was also estimated using the Quantitative Insulin-Sensitivity Check Index (QUICKI), by using the inverse of the sum of the logarithms of the fasting insulin ( $\mu$ U/mL) and fasting glucose (mg/dL) (Katz et al., 2000).

Postprandial peripheral tissue insulin sensitivity was assessed based on the Matsuda index, calculated as  $(10,000/\text{square root of } [\text{fasting glucose} \times \text{fasting insulin}] \times [\text{mean glucose} \times \text{mean insulin during postprandial time}]$  (Matsuda & DeFronzo, 1999). The insulinogenic index (INSI) was calculated as  $(\text{Insulin (mU/L)} \text{ at } 30 \text{ minutes} - \text{fasting insulin (mU/L)}) / (\text{Glucose (mg/dL)} \text{ at } 30 \text{ minutes} - \text{fasting glucose (mg/dL)})$  as previously described (Aono et al., 2018).

## 2.7 Statistical analysis

Sample size estimation (n=18) was carried out considering the specific variance of the main

outcome of the postprandial study with a type I error  $\alpha=0.005$  (2-sided), a type II error  $\beta=0.2$  (80% power), and assuming a 10% of dropout rate (de la Torre et al., 2020).

Baseline clinical and biochemical characteristics of the subjects and intervention data are presented as adjusted mean values  $\pm$  standard error of the mean (SEMs). The normality of variables was assessed using Q-Q graphs. Missing data were imputed using appropriate methods. The outliers for each intervention were removed if kurtosis  $>1$  and asymmetry  $>1$  in the distribution of the responses. Variables were analyzed using a linear mixed-effects model (LMM). Post-hoc multiple comparison were analyzed by Sidak test. This statistical model considers the relationship of the responses within the participants to determine differences between interventions (iAUC and at each postprandial time point). In addition, it takes into account all the possible confounders (covariates) which are included on it: age, gender, intervention and period as fixed effects, and for subjects and hospital as random effects, providing an advantage vs. ANOVA in these types of studies and giving a more precise estimation of covariances without mathematical assumptions, unlike the ANOVA (Brady T. West, Kathleen B. Welch, 2015). All analyses were carried out on an intention-to-treat basis. A p-value of  $<0.05$  was considered significant. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20 software was used to perform the statistical analysis (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

### 3. RESULTS

Table 1 describes the clinical and biochemical characteristics of the 18 subjects selected for the postprandial study at baseline. This data confirm that selected subjects were healthy, as all values were within the range of normality. There were no differences in nutritional intakes of all volunteers from the study (data not shown). Table 2 shows the postprandial iAUC (from baseline to 240 min) of glucose, insulin and gastrointestinal hormones, Matsuda index of insulin sensitivity, and INSI after consuming a single dose of the three olive oils. Glucose iAUC was higher after the intake of the OVOO compared with the control VOO ( $p=0.035$ ). Insulin iAUC was lower after the intake of the FOO compared with VOO ( $p=0.049$ ). Matsuda index was higher after the intake of the FOO ( $p=0.009$ ) and tended to be higher after the intake of OVOO ( $p=0.093$ ) compared with the intake of the standard VOO, while INSI index tended to be higher and the postprandial GIP iAUC tended to be lower, and after the intake of the OVOO compared with the intake of the standard VOO ( $p=0.096$  and  $p=0.083$ , respectively).-

**Table 1. Baseline clinical and biochemical characteristics of subjects (n=18) included in the postprandial study.**

Age, years	29 ± 1
Gender, (male/female)	9/9
BMI, (kg/m <sup>2</sup> )	23.7 ± 0.5
Waist circumference, (cm)	77 ± 2
HDLc, (mg/dL)	62 ± 2
LDLc, (mg/dL)	101 ± 3
Total cholesterol, (mg/dL)	179 ± 4
Triacylglycerides, (mg/dL)	78 ± 5
SBP, (mmHg)	115 ± 2
DBP, (mmHg)	72 ± 1
Total cholesterol/HDL	3 ± 0
LDL/HDL	2 ± 0
Glucose, (mg/dL)	90 ± 1
Insulin, (mUI/L)	6.7 ± 0.3
GIP, (pg/mL)	53.5 ± 3.1
GLP-1, (pg/mL)	4.3 ± 0.4
Ghrelin, (pg/mL)	110.9 ± 10.3
PP, (pg/mL)	29.4 ± 3.0
PYY, (pg/mL)	50.5 ± 3.9
HOMA-β	95.9 ± 6.2
HOMA-IR	1.5 ± 0.8
QUICKI	0.364 ± 0.003

Values are expressed as the means ± SEMs, n=18 subjects. BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; FOO functional olive oil, GIP, gastric inhibitory polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide 1; HOMA-β homeostatic model assessment of beta cell functionality; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; n, number of participants; OVOO optimized virgin olive oil; PP, pancreatic polypeptide; PYY, peptide YY; QUICKI, quantitative insulin-sensitivity check index; SBP, systolic blood pressure; SEM, standard error of the mean; VOO virgin olive oil.

**Table 2. Postprandial glucose, insulin and gastrointestinal hormones plasma levels (iAUC from baseline to 240 min), Matsuda index of insulin sensitivity and INSI after the intake of a single dose of three VOO differing on their bioactive compounds.**

	VOO		OVOO		FOO	
Glucose, (mg/dL·min)	2213	± 1069 <sup>a</sup>	3213	± 1068 <sup>b</sup>	2605	± 1071 <sup>ab</sup>
Insulin, (mUI/L·min)	3546	± 564 <sup>a</sup>	3191	± 572 <sup>ab</sup>	2837	± 578 <sup>b</sup>
GIP (pg/mL·min)	57371	± 5748	48625	± 5729	55689	± 6041
GLP-1, (pg/mL·min)	9062	± 2844	6864	± 2842	9672	± 2833
Ghrelin, (pg/mL·min)	8419	± 1967	10654	± 2082	9845	± 2150
PP, (pg/mL·min)	19971	± 3870	19443	± 3869	24045	± 4128
PYY, (pg/mL·min)	4606	± 1113	4215	± 1220	5933	± 1079
Matsuda index	9.12	± 1.25 <sup>a</sup>	10.64	± 1.31 <sup>ab</sup>	11.60	± 1.29 <sup>b</sup>
INSI	0.195	± 0.284	0.875	± 0.281	0.802	± 0.333

Values are expressed as the adjusted means ± SEMs, n=18 for VOO and OVOO and n=17 for FOO at fasting state, volunteers ingest 30 mL of the corresponding olive oil (VOO, OVOO, or FOO) as a single dose with a standard piece of bread (80 g) and a glass of water (200 mL). LMM was used to compare between groups of intervention. Different superscript letters indicate significant differences between post-interventions (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>). p<0.05 was considered significant. Abbreviations: iAUC, incremental area under curve; FOO, functional olive oil; GIP, gastric inhibitory polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide1; INSI, insulinogenic index; LMM, linear mixed model; OVOO optimized virgin olive oil; PP, pancreatic polypeptide; PYY, peptide YY; SEM, standard error of the mean; VOO virgin olive oil.

Figure 1 depicts the postprandial plasma levels of glucose and insulin. At baseline, plasma glucose level was lower before the intake of the OVOO group compared with the intake of VOO (p=0.017). At 30 min, the plasma glucose level was higher after consuming the OVOO compared with VOO (p=0.017). At 120 min, plasma glucose level was lower after the consumption of the FOO compared with OVOO (p=0.014) (Figure 1a). The plasma insulin level was higher 45 min after consumption of the OVOO compared with the FOO (p=0.023) (Figure 1b).

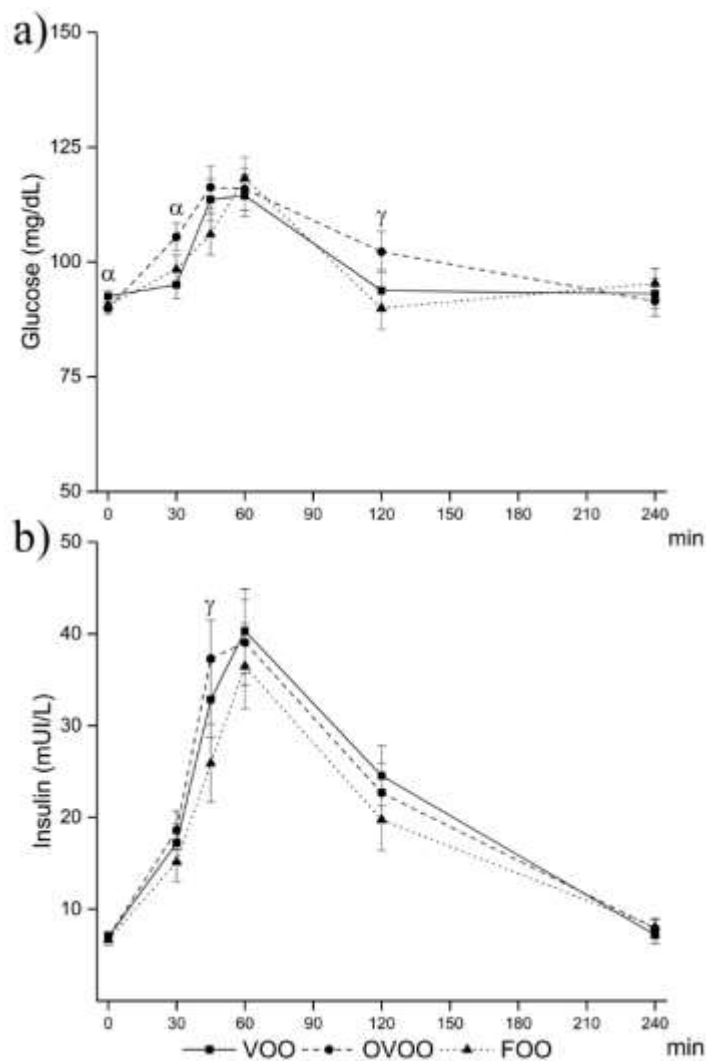
**Figure 1.**

Figure 1. Postprandial (from baseline to 240 min) plasma levels of insulin (a) and glucose (b) after ingestion of three VOO with different bioactive compounds content. Values are expressed as the adjusted means  $\pm$  SEM,  $n=18$  for VOO and OVOO and  $n=17$  for FOO. At fasting state, volunteers ingested 30 mL of the corresponding olive oil (VOO, OVOO, or FOO) as a single dose with a standard piece of bread (80 g) and a glass of water (200 mL). LMM was used to compare between groups of intervention.  $\alpha$  shows significant differences between VOO and OVOO interventions.  $\beta$  shows significant differences between VOO and FOO interventions and  $\gamma$  shows significant differences between OVOO and FOO interventions.  $p<0.05$  was considered significant. FOO, functional olive oil; OVOO, optimized virgin olive oil; VOO, virgin olive oil; SEM, standard error of the mean. Plasma GLP-1 was lower before the VOO intake compared with the OVOO ( $p=0.011$ ) (Figure 2a).

Figure 2 shows postprandial plasma levels of GLP-1, GIP, ghrelin, PP and PYY, after the intake of the three olive oils. GIP was higher 60 min after the intake of VOO compared with OVOO

and FOO ( $p=0.004$  and  $p=0.029$ , respectively) (Figure 2b). Plasma ghrelin level was higher 45 min after consumption of the FOO compared with VOO and OVOO ( $p=0.015$  and  $p=0.021$ , respectively), while at 120 min plasma ghrelin was higher after the intake of the OVOO compared with VOO and FOO ( $p=0.026$  and  $p=0.025$ , respectively) (Figure 2c). After consumption of the FOO, plasma PP level was higher compared with VOO at 60 min ( $p=0.032$ ), and compared with OVOO at 45 and 60 min ( $p=0.022$  and  $p=0.026$ , respectively) (Figure 2d). No significant differences were observed in plasma PYY concentrations after the consumption of the three olive oils (Figure 2e).

**Figure 2.**

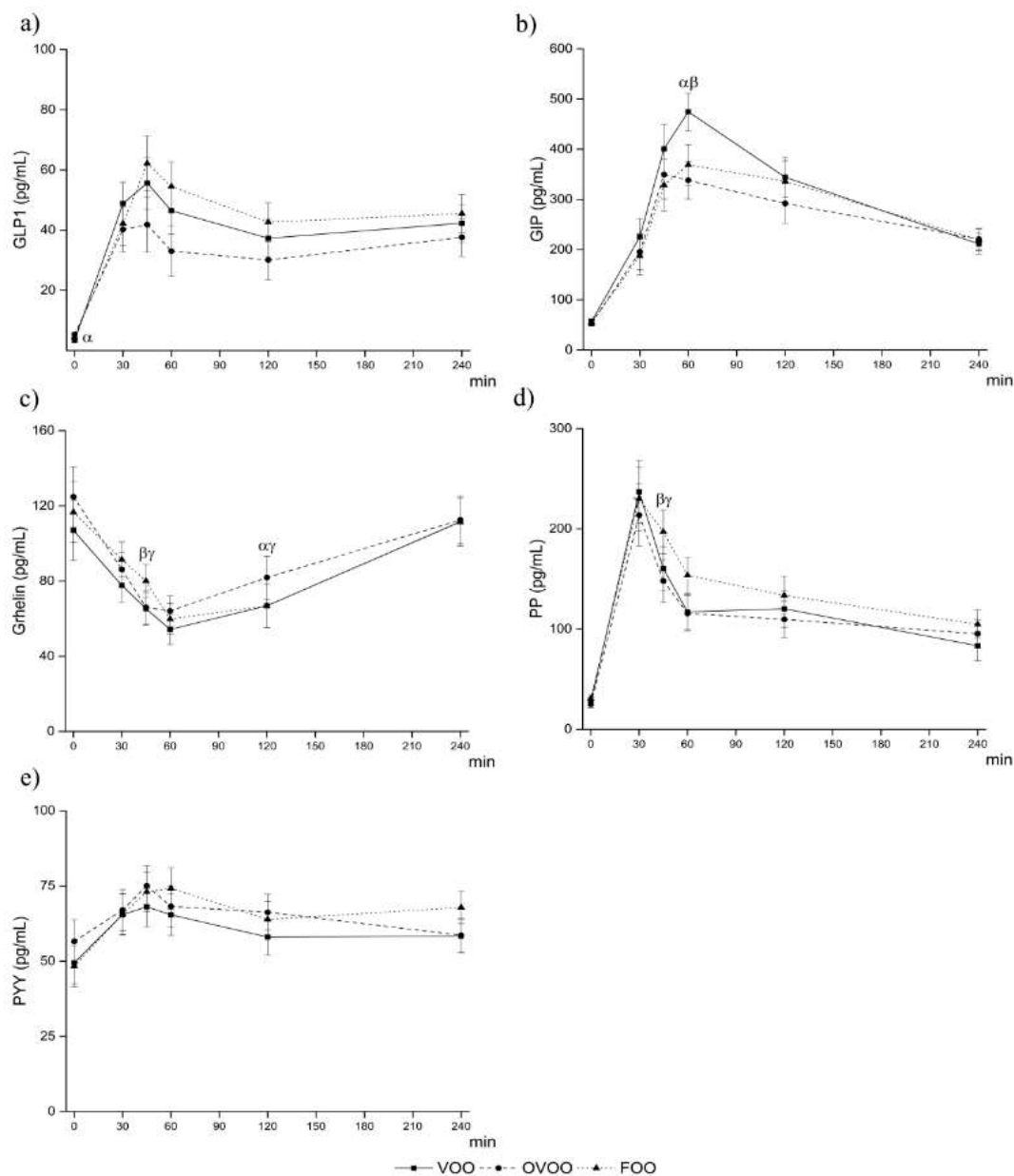


Figure 2. Postprandial (from baseline to 240 min) plasma levels of gastrointestinal hormones:

GIP (a); GLP-1 (b); ghrelin (c); PP (e) and PYY (f). Values are expressed as the adjusted means  $\pm$  SEM, n=18 for VOO and OVOO and n=17 for FOO. At fasting state, volunteers ingested 30 mL of the corresponding olive oil (VOO, OVOO, or FOO) as a single dose with a standard piece of bread (80 g) and a glass of water (200 mL). LMM was used to compare between groups of intervention.  $\alpha$  shows significant differences between VOO and OVOO interventions.  $\beta$  shows significant differences between VOO and FOO interventions and  $\gamma$  shows significant differences between OVOO and FOO interventions.  $p < 0.05$  was considered significant. FOO, functional virgin olive oil; GIP, gastric inhibitory polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide-1; OVOO optimized virgin olive oil; PP, pancreatic polypeptide; PYY peptide YY; SEM, standard error of the mean; VOO, virgin olive oil.

#### 4. DISCUSSION

The NUTRAOLEUM study was designed to assess whether the enrichment of VOO with polyphenol and triterpenic acids from the olive oil may increase the healthy benefits of a standard VOO. Specifically, the present postprandial sub-study aimed to evaluate the metabolic postprandial benefits derived from different amounts of olive oil bioactive compounds. As far as we know, no human randomized controlled trial has previously compared the *in vivo* benefits of VOOs with different content of bioactive compounds, polyphenols and triterpenic acids, on the postprandial glucose, insulin (secretion and sensitivity), and gastrointestinal hormones responses. The most relevant finding of this study was that olive oil enriched with bioactive compounds from the olive fruit improve insulin functionality by increasing insulin sensitivity and insulin secretion, considered as two independent glucose tolerance risk factor (Häring, 2016). Further studies are needed to evaluate the synergic effect of polyphenols and triterpenes present in EVOO.

Glycemic regulation is mediated in part by incretins, GLP-1 and GIP, that stimulate insulin secretion in response to food intake (Diakogiannaki et al., 2012). If the pancreas can react with compensatory hypersecretion of insulin, in response to food intake, it will maintain plasma glucose and contribute to an adequate metabolic state (Häring, 2016). Our results show that postprandial insulin secretion, as measured as INSI, was enhanced similarly after the intake of the polyphenol-enriched olive oils. In addition, insulin sensitivity, measured as Matsuda index was also higher after the intake of the enriched olive oils. These data indicate a better postprandial metabolic behavior favored by the presence of phenolic compounds in the olive oil. Matsuda index indicates that the presence of phenolic compounds may improve the postprandial insulin response of tissues and contribute to the metabolic control. In addition,



increased GIP may explain the higher insulin secretion after polyphenol-rich olive oils intakes. A sub-study of the PREDIMED confirmed a decrease in fasting plasma glucose after the long-term consumption of VOO in T2D subjects (Basterra-Gortari et al., 2019). An interventional study with extra-VOO rich in phenolic compounds (577 mg/kg) during 4 weeks provides evidence of the beneficial effects on the metabolic control in T2D patients that may be mediated by adipokines as visfatin and apelin (Santangelo et al., 2016). In addition, a postprandial study in healthy subjects has shown the beneficial effect after VOO consumption on postprandial glycemia compared with the intake of corn oil or a Mediterranean-type lunch without VOO (Violi et al., 2015). In accordance with our results, those authors found that GIP, but also GLP-1, and subsequently insulin secretions increased more after the intake of the VOO compared with the corn oil, contributing to the decrease of plasma glucose levels (Violi et al., 2015). We did not observed differences in GLP-1 secretion beside other studies have reported an improvement in metabolic conditions regulated by GLP-1 after VOO consumption compared to butter or a low fat diet, in subjects with metabolic diseases (Bozzetto et al., 2019), or when consumed chocolate enriched with 40 g of oleuropein that induced an increase of GLP-1 compare with the same chocolate without the bioactive compound in healthy subjects (Del Ben et al., 2020). These data indicate that the food matrix may interfere and modulate the effect of these bioactive compounds.

Our data suggest a synergist effect of polyphenol and triterpenic acids, since differenced observed were more pronounced after the intake of the FOO. Triterpenic acids (oleanolic acids and maslinic acids) have demonstrated a beneficial effect for the prevention of diabetes and MetS has been reported in an intervention study in pre-diabetic patients (PREDIABOLE: Prevention of Diabetes with Oleanolic Acid) supplemented with an oleanolic acid-enriched olive oil (Santos-Lozano et al., 2019) and in obese mice supplemented with pomace oil (Claro-Cala et al., 2020). In addition, a recent work has demonstrated that the oleanane skeletons of oleanolic and maslinic acid are optimum for the  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities, while the hydroxytyrosol moiety may contribute weakly to these activities (Mwakalukwa et al., 2020). Those data are in accordance with the improvement of insulin sensitivity observed after the intake of FOO in our study. Evidence has suggested that triterpenic acids would offer interesting alternatives for managing insulin resistance (Castellano et al., 2013). Furthermore, the described bioavailability of triterpenic acids from VOO (de la Torre et al., 2020) confirms that these molecules may be involved in the postprandial response observed after the consumption of the enriched oils compared to the standard VOO. Indeed, triterpenic acids may increase glycogen synthesis and simultaneously

inhibit gluconeogenesis and glycogenolysis thus reducing hepatic glucose production that influences insulin release (Wen et al., 2005). We have to stand out that, as expected, all volunteers behave properly since all were metabolically healthy. Nevertheless, the small but significant differences found after the ingestion of the bioactive compounds-rich olive oils lead to the hypothesis that these effects may be more prominent in people with metabolic alterations and after sustained supplementation with the oils. Therefore, more studies are needed in order to evaluate the postprandial response and the mechanisms after a sustained intake of enriched VOOs in subjects with insulin resistance or metabolic diseases.

One limitation of the present study is that we did not have a postprandial control group consuming a control oil without bioactive compounds or different vegetable oil. Thus, we cannot estimate the effect of the food matrix on glucose metabolism.

To our best knowledge, no studies have compared the effects of different types and amounts of bioactive VOO compounds on the postprandial gastrointestinal hormone responses. Ghrelin plays a key role in insulin secretion, a decrease of the ghrelin secretion leads to an improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity suggesting a strategy for glucose homeostasis (Alamri et al., 2016). Consumption of oleanolic acid during 12 weeks has shown a lower ghrelin secretion (orexigenic hormone) in pre-diabetic animals (Gamede et al., 2018). It has been described that triterpenes may decrease ghrelin secretion and consequently decrease caloric intake (Luvuno et al., 2016). However, we did not observe similar results in the postprandial response after consumption of a single dose of triterpenic-enriched FOO, probably due to the postprandial study design.

Other important polypeptides involved in the regulation of energy homeostasis are PP and PYY. They are released in response to a meal, according to the caloric load. They inhibit appetite and modulate the gastric emptying rate (Katsuura et al., 2002; Wren & Bloom, 2007). As expected, the iAUCs for PP and PYY secretions did not show differences between the groups since the three breakfasts contained the same amount of olive oils, bread, and water and provided the same amounts of energy and macronutrients.

In conclusion, our results show the ingestion of a single dose of extra virgin olive oil enriched with bioactive compounds from the olive fruit (487 ppm of phenolic compounds and 389 ppm of triterpenic acids respectively) improves postprandial insulin release and sensitivity in healthy adults, suggesting that sustained consumption of the enriched VOO may be recommended for subjects with metabolic diseases.

### **Author contributions**

ESR participated in the study intervention and biochemical analyses; JMOP produced the triterpenic-enriched olive extracts; CR and MB participated in the olive oils analysis; ESR and AVA carried out the statistical analysis and wrote the manuscript; ESR, AVA, MDM and AGH analyzed the data; MDM, AG, EMDV, SBG, JRFN, JAEC, RT, MFC and MIC contributed to the study design and data interpretation; MDM had primary responsibility for study supervision and final content of the work; all authors have revised the manuscript.

### **Acknowledgements**

We are grateful for the support of participating volunteers, the personal of Virgen de las Nieves and San Cecilio general hospitals of Granada: Laura Campaña Martín, M<sup>a</sup> Victoria Martín Laguna and M<sup>a</sup> Cruz Rico Prados who carried out technical work and sample preparation and Llenalia García Fernández who supervised the statistical analysis. The “NUTRAOLEUM Study” has been supported by the grant ITC-20131031 from the I+D FEDER-INTERCONNECTA (CDTI) and Junta de Andalucía, Spain”. We thank ACER CAMPESTRES S.L., SAN FRANCISCO DE ASIS Coop and AGROINSUR S.L., for the funding financing provided for the development conduct of the clinical trial.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare no conflict of interest. Jose Maria Olmo Peinado, is the owner of the company that finances the project “ACER CAMPESTRES S.L.” and is a producer of technological extracts from the olive tree. Any funding sponsor had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results. This paper will be part of the Laura Alejandra Vázquez’s doctorate that it is being carried out within the context of “Nutrition and Food Sciences Program” at the University of Granada.

## **5. REFERENCES**

- Ahren, B., Pratley, R., Soubt, M., Dunning, B., & Foley, J. (2008). Clinical Measures of Islet Function: Usefulness to Characterize Defects in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 4(2), 129–145. <https://doi.org/10.2174/157339908784220714>
- Alamri, B. N., Shin, K., Chappe, V., & Anini, Y. (2016). The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 26(1), 3–11. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0018>
- Allouche, Y., Jiménez, A., Uceda, M., Aguilera, M. P., Gaforio, J. J., & Beltrán, G. (2009). Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive

- cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3604–3610.  
<https://doi.org/10.1021/jf803237z>
- Aono, D., Oka, R., Kometani, M., Takeda, Y., Karashima, S., Yoshimura, K., Takeda, Y., & Yoneda, T. (2018). Insulin secretion and risk for future diabetes in subjects with a nonpositive insulinogenic index. *Journal of Diabetes Research*, 2018.  
<https://doi.org/10.1155/2018/5107589>
- Association, A. H. (2020). *Cardiovascular Disease and Diabetes | American Heart Association*. <https://www.heart.org/en/health-topics/diabetes/why-diabetes-matters/cardiovascular-disease--diabetes>
- Biel, S., Mesa, M. D., de la Torre, R., Espejo, J. A., Fernández-Navarro, J. R., Fitó, M., Sánchez-Rodríguez, E., Rosa, C., Marchal, R., Alche, J. de D., Expósito, M., Brenes, M., Gandul, B., Calleja, M. A., & Covas, M. I. (2016). The NUTRAOLEOUM Study, a randomized controlled trial, for achieving nutritional added value for olive oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1376-6>
- Bozzetto, L., Alderisio, A., Clemente, G., Giorgini, M., Barone, F., Griffo, E., Costabile, G., Vetrani, C., Cipriano, P., Giacco, A., Riccardi, G., Rivellese, A. A., & Annuzzi, G. (2019). Gastrointestinal effects of extra-virgin olive oil associated with lower postprandial glycemia in type 1 diabetes. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2645–2651.  
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.11.015>
- Brady T. West, Kathleen B. Welch, A. T. G. (2015). *Linear Mixed Models: A Practical Guide Using Statistical Software, Second*. 2015.  
[https://books.google.es/books?id=DFPSBQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=A+Practical+Guide+Using+Statistical+Software,+Second&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwj5xtvTo8nsAhXl1uAKHZEbAGMQ6AEwAHoECAAQAQ#v=onepage&q=A Practical Guide Using Statistical Software%2C Second&f=f](https://books.google.es/books?id=DFPSBQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=A+Practical+Guide+Using+Statistical+Software,+Second&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwj5xtvTo8nsAhXl1uAKHZEbAGMQ6AEwAHoECAAQAQ#v=onepage&q=A%20Practical%20Guide%20Using%20Statistical%20Software%2C%20Second&f=false)
- Brouns, F., Bjorck, I., Frayn, K. N., Gibbs, A. L., Lang, V., Slama, G., & Wolever, T. M. S. (2005). Glycaemic index methodology. *Nutrition Research Reviews*, 18(1), 145–171.  
<https://doi.org/10.1079/nrr2005100>
- Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distanto, A., & De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), 622–629. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000062884.69432.A0>
- Castellano, J. M., Guinda, A., Delgado, T., Rada, M., & Cayuela, J. A. (2013). Biochemical

- basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*, 62(6), 1791–1799. <https://doi.org/10.2337/db12-1215>
- Claro-Cala, C. M., Quintela, J. C., Pérez-Montero, M., Miñano, J., de Sotomayor, M. A., Herrera, M. D., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2020). Pomace olive oil concentrated in triterpenic acids restores vascular function, glucose tolerance and obesity progression in mice. *Nutrients*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/nu12020323>
- de la Torre, R., Carbó, M., Pujadas, M., Biel, S., Mesa, M. D., Covas, M. I., Expósito, M., Espejo, J. A., Sanchez-Rodriguez, E., Díaz-Pellicer, P., Jimenez-Valladares, F., Rosa, C., Pozo, O., & Fitó, M. (2020). Pharmacokinetics of maslinic and oleanolic acids from olive oil – Effects on endothelial function in healthy adults. A randomized, controlled, dose–response study. *Food Chemistry*, 322(September 2018), 126676. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126676>
- Del Ben, M., Nocella, C., Loffredo, L., Bartimoccia, S., Cammisotto, V., Mancinella, M., Angelico, F., Valenti, V., Cavarretta, E., Carnevale, R., & Violi, F. (2020). Oleuropein-enriched chocolate by extra virgin olive oil blunts hyperglycaemia in diabetic patients: Results from a one-time 2-hour post-prandial cross over study. *Clinical Nutrition*, 39(7), 2187–2191. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.09.006>
- Diakogiannaki, E., Gribble, F. M., & Reimann, F. (2012). Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. *Physiology and Behavior*, 106(3), 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.001>
- Ditano-Vázquez, P., Torres-Peña, J. D., Galeano-Valle, F., Pérez-Caballero, A. I., Demelo-Rodríguez, P., Lopez-Miranda, J., Katsiki, N., Delgado-Lista, J., & Alvarez-Sala-Walther, L. A. (2019). The fluid aspect of the mediterranean diet in the prevention and management of cardiovascular disease and diabetes: The role of polyphenol content in moderate consumption of wine and olive oil. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112833>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorli, J. V., Martínez, J. A., Fitó, M., Gea, A., ... Martínez-Gonzalez, M. A. (2018). Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *New England Journal of Medicine*, 378(25), 1–14. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>
- Fabiani, R. (2016). Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: A systematic review of: In vivo studies. *Food and Function*, 7(10), 4145–4159. <https://doi.org/10.1039/c6fo00958a>

- Gamede, M., Mabuza, L., Ngubane, P., & Khathi, A. (2018). The effects of plant-derived oleanolic acid on selected parameters of glucose homeostasis in a diet-induced pre-diabetic rat model. *Molecules*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040794>
- Gonzalez-Anton, C., Rico, M. C., Sanchez-Rodriguez, E., Ruiz-Lopez, M. D., Gil, A., & Mesa, M. D. (2015). Glycemic responses, appetite ratings and gastrointestinal hormone responses of most common breads consumed in Spain. A randomized control trial in healthy humans. *Nutrients*, 7(6), 4033–4053. <https://doi.org/10.3390/nu7064033>
- Guinda, Á., Rada, M., Delgado, T., Gutiérrez-Adán, P., & Castellano, J. M. (2010). Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9685–9691. <https://doi.org/10.1021/jf102039t>
- Häring, H. U. (2016). Novel phenotypes of prediabetes? *Diabetologia*, 59(9), 1806–1818. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4015-3>
- Basterra-Gortari J, F., Ruiz-Canela, M., Martínez-González, M. A., Babio, N., Sorlí, J. V., Fito, M., Ros, E., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., Lapetra, J., Estruch, R., Serra-Majem, L., Pinto, X., González, J. I., Bulló, M., Castañer, O., Alonso-Gómez, Á., Forga, L., & Arós, F. (2019). Effects of a Mediterranean eating plan on the need for glucose-lowering medications in participants with type 2 diabetes: A subgroup analysis of the PREDIMED trial. *Diabetes Care*, 42(8), 1390–1397. <https://doi.org/10.2337/dc18-2475>
- Katsuura, G., Asakawa, A., & Inui, A. (2002). Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides*, 23(2), 323–329. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00604-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00604-0)
- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., & Quon, M. J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(7), 2402–2410. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.7.6661>
- Lemonakis, N., Poudyal, H., Halabalaki, M., Brown, L., Tsiropoulos, A., Skaltsounis, A. L., & Gikas, E. (2017). The LC–MS-based metabolomics of hydroxytyrosol administration in rats reveals amelioration of the metabolic syndrome. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1041–1042, 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.020>
- Little, T. J., Pilichiewicz, A. N., Russo, A., Phillips, L., Jones, K. L., Nauck, M. A., Wishart, J., Horowitz, M., & Feinle-Bisset, C. (2006). Effects of intravenous glucagon-like peptide-1 on gastric emptying and intragastric distribution in healthy subjects: Relationships with postprandial glycemic and insulinemic responses. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(5), 1916–1923. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2220>

- Luvuno, M., Mbongwa, H. P., & Khathi, A. (2016). The effects of *Syzygium aromaticum*-derived triterpenes on gastrointestinal ghrelin expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *13*(4), 8–14. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i4.2>
- Mannucci, E., Monami, M., Lamanna, C., & Adalsteinsson, J. E. (2012). Post-prandial glucose and diabetic complications: Systematic review of observational studies. *Acta Diabetologica*, *49*(4), 307–314. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0355-0>
- Matsuda, M., & DeFronzo, R. A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*, *22*(9), 1462–1470. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.9.1462>
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, *28*(7), 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- Mwakalukwa, R., Amen, Y., Nagata, M., & Shimizu, K. (2020). Postprandial hyperglycemia lowering effect of the isolated compounds from olive mill wastes - An inhibitory activity and kinetics studies on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes. *ACS Omega*, *5*(32), 20070–20079. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01622>
- O’Keefe, J. H., Gheewala, N. M., & O’Keefe, J. O. (2008). Dietary Strategies for Improving Post-Prandial Glucose, Lipids, Inflammation, and Cardiovascular Health. *Journal of the American College of Cardiology*, *51*(3), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.10.016>
- Peyrol, J., Riva, C., & Amiot, M. J. (2017). Hydroxytyrosol in the prevention of the metabolic syndrome and related disorders. *Nutrients*, *9*(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu9030306>
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., & De La Torre, R. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, *20*(3), 4655–4680. <https://doi.org/10.3390/molecules20034655>
- Rubinshtein, R., Kuvin, J. T., Soffler, M., Lennon, R. J., Lavi, S., Nelson, R. E., Pumper, G. M., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2010). Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *European Heart Journal*, *31*(9), 1142–1148. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq010>
- Santangelo, C., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Filardi, T., Fogliano, V., D’Archivio, M., Giovannini, C., Lenzi, A., Morano, S., & Masella, R. (2016). Consumption of extra-

- virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(11), 1295–1301.  
<https://doi.org/10.1007/s40618-016-0506-9>
- Santos-Lozano, J. M., Rada, M., Lapetra, J., Guinda, Á., Jiménez-Rodríguez, M. C., Cayuela, J. A., Ángel-Lugo, A., Vilches-Arenas, Á., Gómez-Martín, A. M., Ortega-Calvo, M., & Castellano, J. M. (2019). Prevention of type 2 diabetes in prediabetic patients by using functional olive oil enriched in oleanolic acid: The PREDIABOLE study, a randomized controlled trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 21(11), 2526–2534.  
<https://doi.org/10.1111/dom.13838>
- Schwingshackl, L., Lampousi, A. M., Portillo, M. P., Romaguera, D., Hoffmann, G., & Boeing, H. (2017). Olive oil in the prevention and management of type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of cohort studies and intervention trials. *Nutrition and Diabetes*, 7(4), e262-6. <https://doi.org/10.1038/nutd.2017.12>
- Sharma, H., Kumar, P., Deshmukh, R. R., Bishayee, A., & Kumar, S. (2018). Pentacyclic triterpenes: New tools to fight metabolic syndrome. *Phytomedicine*, 50(May), 166–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.011>
- Violi, F., Loffredo, L., Pignatelli, P., Angelico, F., Bartimoccia, S., Nocella, C., Cangemi, R., Petruccioli, A., Monticolo, R., Pastori, D., & Carnevale, R. (2015). Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. *Nutrition and Diabetes*, 5(7), e172-7.  
<https://doi.org/10.1038/nutd.2015.23>
- Wen, X., Sun, H., Liu, J., Wu, G., Zhang, L., Wu, X., & Ni, P. (2005). Pentacyclic triterpenes. Part 1: The first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15(22), 4944–4948. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.08.026>
- Wren, A. M., & Bloom, S. R. (2007). Gut Hormones and Appetite Control. *Gastroenterology*, 132(6), 2116–2130. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.048>
- Yubero-Serrano, E. M., Lopez-Moreno, J., Gomez-Delgado, F., & Lopez-Miranda, J. (2019). Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72(Table 1), 8–17. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0304-x>