



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUROPROTECTORA DE
EXTRACTOS PROCEDENTES DEL OLIVAR EN UN MODELO DE
NEURODEGENERACIÓN EN RATÓN**

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas.

Memoria presentada para optar al grado de Dra. por: ELIA ANA SIRVENT SEGURA

Director: Prof. Dr. Ernesto Cortés Castell

Enero 2021

Esta tesis se presenta en formato convencional y como indicio de calidad se presenta el siguiente artículo:

Cortés-Castell E, Veciana-Galindo C, Torró-Montell L, Palazón-Bru A, Sirvent-Segura E, Gil-Guillén V, Rizo-Baeza M. Protection by polyphenol extract from olive stones against apoptosis produced by oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Nutr Hosp.* 2016;33:118-22. doi: 10.20960/nh.39.

Indicios de calidad:

Índice de impacto 0.747.

Posición: año 2016 posición 68/81 Q4 Nutrition & Dietetics y 107/337 Q2 Agricultural Sciences.



D. Vicente Francisco Gil Guillén, Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

La presentación y defensa como tesis doctoral del trabajo “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUROPROTECTORA DE EXTRACTOS PROCEDENTES DEL OLIVAR EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN EN RATÓN” realizado por Dña. Elia Ana Sirvent Segura bajo la dirección del Dr. D. Ernesto Cortés Castell. De acuerdo a la información recibida sobre las evaluaciones previas realizadas en cumplimiento de la normativa general vigente y la propia de la Universidad Miguel Hernández y según lo certificado por las personas que han realizado la tutoría y dirección, la tesis cumple los requisitos para proceder a su defensa pública.

En Sant Joan d' Alacant, a diez de diciembre de 2020

Firmado: Prof. Vicente Francisco Gil Guillén
Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas





UNIVERSITAT
Miguel Hernández

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

D. Ernesto Cortés Castell, director de la tesis doctoral titulada “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUROPROTECTORA DE EXTRACTOS PROCEDENTES DEL OLIVAR EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN EN RATÓN”

CERTIFICAN:

Que Dña. Elia Ana Sirvent Segura, ha realizado bajo mi supervisión el trabajo titulado “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUROPROTECTORA DE EXTRACTOS PROCEDENTES DEL OLIVAR EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN EN RATÓN” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo en Sant Joan d’Alacant, a 10 de diciembre de dos mil veinte.

Fdo. D. Ernesto Cortés Castell
Director de tesis



PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS
Campus de Sant Joan d’Alacant, Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 - 03550 Sant Joan d’Alacant
Telf.: 96 5233755 c.electrónico: pa.medicina@umh.es

A mi padre.

Contenido

1. RESUMEN	15
2. INTRODUCCIÓN	19
2.1. Nutraceuticos	19
2.2. Antioxidantes naturales	21
2.3. Polifenoles del olivo	22
2.4. Enfermedades y polifenoles del olivo	25
2.5. Efectos de extractos del olivo estudiados por nuestro equipo	33
2.5.1. Estudio de la actividad antiinflamatoria de extractos del olivo ricos en polifenoles.	33
2.5.2. Efecto protector de un extracto polifenólico del olivo sobre sistema nervioso en pez cebra	34
2.5.3. Estudio del efecto protector de los polifenoles del olivo sobre la apoptosis en neuroblastoma humano inducido por daño oxidativo	35
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	39
3.1. Objetivo general	39
3.2. Objetivos específicos	39
3.3. Hipótesis	40
4. MATERIAL Y MÉTODOS	43
4.1. Población de estudio	43
4.2. Muestra	43
4.3. Variables analizadas	44
4.4. Metodología	44
4.5. Análisis estadístico	50
4.6. Consideraciones éticas	50
5. RESULTADOS	55
5.1. Estudio de la ingesta y variación del peso	55
5.2. Síntomas epilépticos tras la administración de ácido kaínico	55
5.3. Muerte después de suministrar ácido kaínico	58
5.4. Daño epiléptico general después de la administración de ácido kaínico	59
5.5. Daño histológico producido por ácido kaínico	61
5.6. Neuroinflamación producida por ácido kaínico	63

6. DISCUSIÓN	68
6.1. Resumen	68
6.2. Fortalezas y limitaciones	69
6.3. Comparación con la literatura.	69
6.4. Implicaciones para la investigación y la práctica clínica.	71
7. CONCLUSIONES	75
8. ANEXO	79
9. BIBLIOGRAFÍA	83
AGRADECIMIENTOS	99

1. RESUMEN

1. RESUMEN

El objetivo de este estudio es analizar el posible efecto neuroprotector y antiinflamatorio de dos extractos procedentes del olivo y ricos en polifenoles. El estudio se realiza en ratones. Se ha utilizado el ácido kaínico para generar daño epiléptico y neuroinflamación. Se estudian dos posibles efectos, por un lado el efecto neuroprotector que se analiza midiendo la inducción del daño epiléptico y muerte celular neuronal. Y por otro el efecto antiinflamatorio observando neuroinflamación mediante astrogliosis reactiva.

Se ha utilizado el modelo de excitotoxicidad inducida por ácido kaínico y se ha estudiado el posible efecto neuroprotector de dos extractos de oliva ricos en polifenoles administrados por vía oral a ratones machos sanos durante 30 días frente a un control (10 ratones por grupo: Control, Extracto 1 y Extracto 2). El daño neuronal producido por el ácido kaínico al final del tratamiento se analizó según los cambios en la escala de Racine, el momento de aparición de la primera crisis y el porcentaje de animales que experimentaron convulsiones, estado epiléptico o muerte. Más tarde los cerebros fueron procesados para los siguientes estudios histopatológicos: Primero: determinar el efecto neuroprotector por tinción H&E para la posible presencia de células picnóticas / apoptóticas (marcador de muerte neuronal), y segundo: determinar la presencia de inflamación/astrogliosis por tinción inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrilar glial en astrocitos.

Una vez que se produjo el daño neurológico con ácido kaínico, los tres grupos mostraron una progresión similar en la aparición de los síntomas epilépticos durante los primeros 50 minutos. Después, los síntomas epilépticos disminuyeron significativamente en los dos grupos tratados, observando estado epiléptico en solo seis ratones, en comparación con el grupo de control en el que los 10 ratones tenían estado epiléptico. El efecto protector fue evidente en la puntuación de daño neurológico, con las diferencias entre los ratones control y tratados aumentando significativamente durante los cuatro días de evolución, mayor con el Extracto 1 que con el Extracto 2.

La supervivencia al cuarto día también fue mayor con el Extracto 1, seguido por el Extracto 2, que el control. El tratamiento de ratones con los Extractos 1 y 2 disminuyó la astrogliosis observada en todas las regiones.

En conclusión, los extractos de aceituna ricos en polifenoles en estudio son biológicamente seguros y tienen un efecto preventivo sobre el daño neurológico inducido por ácido kaínico en ratones, reduciendo todos los síntomas epilépticos y el daño neurológico y en la neuroinflamación cerebral inducida por ácido kaínico.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Nutraceuticos

Hace tiempo que se conoce que la ingesta de determinados nutrientes puede influir sobre determinadas funciones cerebrales, de forma decisiva durante el desarrollo perinatal, pero también en otras etapas de la vida, como en la etapa adulta y la tercera edad. Entre estos nutrientes están los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (DHA) y compuestos antioxidantes naturales como los polifenoles, siendo importantes para la formación y desarrollo de las neuronas y otras células del SNC, pero también son claves en los adultos para la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Diversos estudios realizados *in vitro*, en modelos animales y en humanos han demostrado que la suplementación con estos nutrientes se asocia a una mejora de la función cognitiva, que se refleja en una mejora del proceso de aprendizaje o la memoria en niños o a una prevención del declive en personas de la tercera edad.

Estos conocimientos han despertado un creciente interés por nuevos alimentos ricos en sustancias con capacidad neuroprotectora, que puedan contribuir a prevenir la incidencia de factores degenerativos desde la infancia y mitigar el impacto de enfermedades de carácter neurodegenerativo, que presentan un creciente índice de prevalencia en la edad madura.

Diversos mecanismos de acción se han propuesto para explicar la capacidad neuroprotectora de estas sustancias, entre ellos la acción antiinflamatoria, la modulación de vías de señalización intracelular, la modulación de la expresión de proteínas, la inhibición de las vías apoptóticas o la acción antioxidante (de la Puerta et al., 2001).

Existe un creciente interés por sustancias con capacidad neuroprotectora, proponiéndose en la bibliografía distintos mecanismos de acción para explicar dicha capacidad (Jordan et al., 2006).

Se está produciendo también una tendencia hacia alimentación funcional, con el consiguiente desarrollo de alimentos innovadores capaces de influir sobre la salud (Hao et al., 2010; Jacomelli et al., 2010). En este sentido, en los últimos años se han lanzado numerosos productos al mercado con un menor contenido en grasa total o en grasas perjudiciales, un enriquecimiento en compuestos que contribuyen a mejorar la salud cardiovascular (fitoesteroles, DHA, ácidos grasos poliinsaturados, etc.) o bien productos dietéticos con alto contenido en fibras con efecto saciante que permitan una disminución de la ingesta y un control del apetito.

Entre los compuestos bioactivos, es patente que los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células (Sies, 1997) y que las poblaciones que siguen una dieta de frutas y vegetales ricos en polifenoles y antocianinas tienen menor riesgo de contraer cáncer, enfermedades cardíacas y algunas enfermedades neurológicas (Bartlett and Eperjesi, 2003). Sugiriéndose que los compuestos antioxidantes pueden prevenir la degeneración macular (Wintergerst et al., 2006), inmunidad suprimida debido a una nutrición pobre (Wang et al., 2006), y prevenir también la neurodegeneración causada por el estrés oxidativo (Bleys et al., 2006). Sin embargo, a pesar del papel claro del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares, el uso de vitaminas antioxidantes no han mostrado ninguna reducción clara en el progreso o riesgo de contraer enfermedades cardíacas (Cherubini et al., 2005), sugiriéndose que la combinación con otras sustancias en las frutas y vegetales (posiblemente los flavonoides) puedan explicar la mejor salud cardiovascular de quienes consumen más frutas y vegetales (Rimmeet al., 1993).

La producción de antioxidantes naturales y los antioxidantes que se obtienen con la alimentación, muchas veces no es suficiente para la mayoría de las personas, por esa razón muchas compañías alimentarias y de nutracéuticos venden formulaciones de

antioxidantes como suplementos dietéticos y estos son ampliamente consumidos en los países industrializados (Radimer et al., 2004). Estos suplementos pueden incluir químicos específicos antioxidantes, como el resveratrol (de las semillas de uva), hidroxitirosol procedente de la oliva, combinaciones de antioxidantes, como el “ACES” productos que contienen beta-caroteno (provitamina A), vitamina C, vitamina E y Selenio, o hierbas especiales que contienen antioxidantes, como el té verde y el jiaogulan. Aunque algunos de los niveles de vitaminas antioxidantes y minerales en la dieta son necesarios para la buena salud, hay considerables dudas sobre si los suplementos antioxidantes son beneficiosos y, en caso afirmativo, que antioxidantes lo son y en qué cantidades (Bartlett and Eperjesi, 2003; Hughes et al., 2004; Woodside et al., 2005; De Marco et al., 2007).

2.2. Antioxidantes naturales

La célula viva tiene varios mecanismos de defensa para competir con la exposición constante al estrés oxidativo. Las células cerebrales son particularmente susceptibles al daño oxidativo porque son grandes consumidores de oxígeno en comparación con otros órganos y, por lo tanto, contienen varios tipos de antioxidantes, algunos de los cuales son exclusivos del cerebro. Hay dos grupos principales de sistemas antioxidantes: enzimas y antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, el glutatión, la vitamina E, el ácido lipóico y la coenzima Q (Reiter, 1995). Entre los sistemas antioxidantes, el factor nuclear (Nrf2) es un factor de transcripción que regula la expresión de proteínas antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo causado por lesiones e inflamación (Goldet al., 2012).

El cerebro también contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados que son propensos a la peroxidación, es rico en hierro, que puede catalizar la formación de radicales hidroxilo y tiene una baja actividad de catalasa (Halliwell, 1999; Jellinger, 2003; Mariani et al., 2005). El estrés oxidativo produce disrupción funcional y daño, e incluso puede causar la muerte celular a través de la oxidación de biomoléculas como proteínas, lípidos y nucleótidos con cambios funcionales o desactivación de varias enzimas (Stadtman, 2001), alteraciones en la estructura de la membrana que afecta la fluidez, la permeabilidad y la actividad de las proteínas de membrana (Wong-Ekkabut et al., 2007). El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de radicales libres y su eliminación, lo que lleva a la generación anormal de especies reactivas de oxígeno y

al daño oxidativo. Se ha propuesto y demostrado que diferentes enfermedades neurodegenerativas comparten el estrés oxidativo como una característica común (Fahey et al., 2001; Manoharan et al., 2016)

A través de estos mecanismos, el estrés oxidativo está involucrado en la patogénesis de una variedad de afecciones neurológicas y trastornos neurodegenerativos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la epilepsia (Perry et al., 2002; Migliore et al., 2005; Ashrafi et al., 2007). La evidencia experimental en humanos y animales respalda la participación del estrés oxidativo antes y después de las crisis epilépticas (Racine, 1972; Carmona-Aparicio et al., 2015). El ácido kaínico (KA) es un análogo cíclico del neurotransmisor excitador principal, el glutamato. Es un agonista del receptor KA, que es una subfamilia de receptores de glutamato. Se cree que la excitotoxicidad mediada por el receptor de glutamato contribuye a la muerte celular neuronal en muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo traumatismo del SNC, hipoxia cerebral, isquemia y convulsiones (Choi y Rothman, 1990; Meldrum y Garthwaite, 1990).

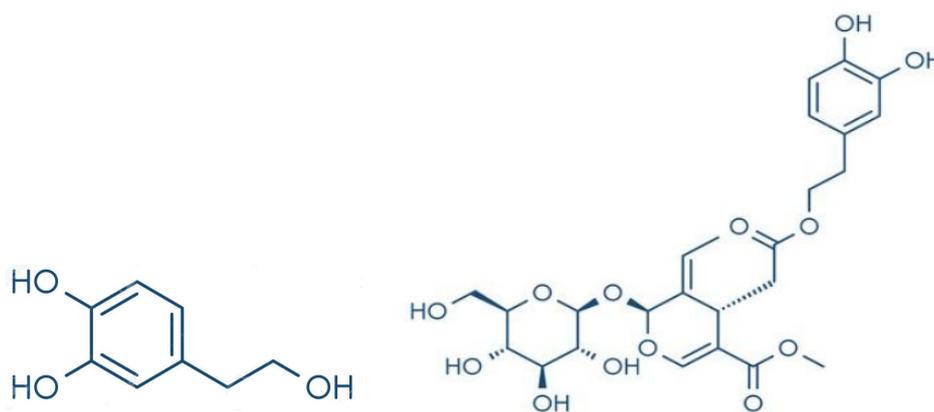
2.3. Polifenoles del olivo

El olivo (*Olea europaea*) constituyen una fuente natural de compuestos bioactivos. El procesamiento de las aceitunas conduce a diferentes tipos de matrices secundarias, que generalmente se consideran subproductos. Una característica que estos subproductos tienen en común con los desechos vegetales generados por la actividad agroalimentaria es su potencial como fuente de compuestos bioactivos. Por lo tanto, una forma de evaluar estos residuos es usarlos como materia prima para extraer compuestos con propiedades saciantes: fibra, ácidos grasos y proteínas, que tienen un alto valor económico y pueden usarse por sus propiedades saciantes y neuroprotectoras en la industria agroalimentaria y farmacéutica, o incluso como compuestos funcionales en alimentos.



Un área de enfoque con respecto a los olivos es obtener efluentes acuosos del proceso del aceite de oliva (De Marco et al., 2007).

En otros casos, la recuperación de sustancias de interés se centra en otros tipos de matrices como los desechos sólidos: pulpa, hojas o madera de olivo. El componente principal de la hoja de olivo es la oleuropeína, también es abundante en hidroxitirosol (HT) (Pereira-Caro et al., 2009), que es el principal compuesto derivado de la oleuropeína y tiene una alta capacidad antioxidante.



a) Hidroxitirosol

b) Oleuropeína

Figura 1. Estructura química del a) Hidroxitirosol y b) Oleuropeína

Sin embargo, la actividad general de estos extractos parece estar respaldada por los efectos sinérgicos entre las sustancias de las que están compuestos. Los polifenoles de los olivos se han convertido en el tema de muchos estudios debido a su potente actividad antioxidante y sus propiedades antiinflamatorias.

El olivo sintetiza diferentes fenoles, que se encuentran principalmente en las hojas y las drupas, que se utilizan como defensa contra la invasión de hongos y microbios, así como para dar a las hojas y las drupas un sabor desagradable que desalienta a los insectos que comen hojas (Casamenti y Stefani, 2017).



Se ha demostrado que los fenoles naturales tienen muchas actividades biológicas: son capaces de modular el estado redox celular (Shing et al., 2008) a través de la acción directa sobre enzimas, proteínas, receptores y diferentes vías de señalización (Kim et al., 2014; Goszca et al., 2017), además de interferir con la homeostasis bioquímica (Abuznait et al., 2013; Grossi et al., 2013; Angeloni et al., 2017). El HT es el principal polifenol presente en los productos de oliva (aceitunas, extractos, etc.), estimula la vía Nrf2, que reduce los indicadores de estrés oxidativo: dopamina, peroxidación lipídica y agotamiento de la glutatión deshidrogenasa. La activación de Nrf2 por HT podría ser una estrategia efectiva para proteger las células contra el posible daño causado por el estrés oxidativo. En este sentido, se han desarrollado varios estudios in vitro (Bigagli et al., 2017).

Se han realizado estudios para validar el uso de oleuropeína para proteger el núcleo paraventricular del hipotálamo del estrés oxidativo, mejorando la función mitocondrial activando la vía de señalización mediada por Nrf2 (Sun, 2017). También se sabe que este polifenol atraviesa la barrera hematoencefálica, incluso a concentraciones muy bajas, lo que le da una ventaja en la prevención del daño oxidativo neuronal (Serra et al., 2012). Estudios anteriores de nuestro equipo han demostrado un efecto neuroprotector de los extractos de aceitunas ricos en polifenoles en peces (Veciana-Galindo et al., 2015). Otros polifenoles, como el resveratrol, un antioxidante que se encuentra en las uvas, son neuroprotectores contra el daño cerebral, posiblemente al inhibir la peroxidación lipídica y minimizar otros daños oxidativos (Singleton et al., 2010).

En otros casos, la recuperación de sustancias de interés se centra en otros tipos de matrices como residuos sólidos (Aldini et al., 2006), pulpa (Soni et al., 2006), hojas (Jemai et al., 2008) o madera de olivo (Zbidi et al., 2009).

2.4. Enfermedades y polifenoles del olivo

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son un grupo de patologías crónicas largas y de progresión lenta (WHO, 2013). La World Health Organization (WHO) llegó a la conclusión de que las ENT son las mayores causantes de defunción y discapacidad en el mundo, independientemente de la edad, la región o el sexo (Reddy et al., 2016). Las ENT han sido analizadas y se han detectado algunas puntos clave comunes; como estrés oxidativo dentro de las células producido por una mayor síntesis de especies oxidativas reactivas (ROS), defensa antioxidante incorrecta y una vía autofágica anómala, responsable del mantenimiento de la proteostasis celular (Peña-Oyarzun et al., 2018).

También la inflamación forma parte en las ENT (Lavadero et al., 2015), ya que la inflamación en un ser vivo está muy conectado con el equilibrio redox celular y con la vía autofágica (Levine et al., 2011; El Assar et al., 2013).

Se ha demostrado ampliamente que la inoculación de agonistas de glutamato como KA en ratones induce procesos de excitotoxicidad que implican la aparición de ataques y convulsiones epilépticas (Kim et al., 2001; Penkowa et al., 2001; Yan et al., 2018), así como procesos neurodegenerativos, daño oxidativo y muerte celular en el

hipocampo, la corteza y otras estructuras cerebrales del sistema límbico (Matsuoka et al., 1998; Hopkins et al., 2000). Por lo tanto, los modelos de administración de KA en ratones se han utilizado para investigar los mecanismos de excitotoxicidad presentes en muchas enfermedades neurodegenerativas en humanos (Wang et al., 2005).

El estrés oxidativo inducido por KA está asociado con la muerte celular en el hipocampo (Shin et al., 2007). La sobreexcitación neuronal inducida por KA causa una degeneración neuronal irreversible en áreas selectivas del cerebro, particularmente en las estructuras límbicas en la capa piramidal (Cho et al., 2006) (es decir, en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y el hilo de la circunvolución dentada) que desencadena la muerte celular neuronal aguda en las estructuras límbicas, con una progresión insidiosa de la muerte celular que puede transcurrir durante varios días o semanas (Choi et al., 1990; Frederickson et al., 1989; Weise et al., 2005; MohdSairazi et al., 2015).

Durante las convulsiones inducidas por KA, las neuronas del hipocampo se degeneran, seguidas de la activación de la microglía y la astrogliosis reactiva (Jørgensen et al., 1993; Sperk, 1994). La activación de las células gliales en el hipocampo está estrechamente relacionada con la muerte neuronal inducida por la epilepsia (Meng et al., 2016). Los astrocitos son cruciales para mantener la arquitectura celular y la homeostasis en condiciones cerebrales normales. De hecho, algunos estudios han propuesto que la "astrocitos reactiva" implica cambios morfológicos y funcionales en los astrocitos en respuesta a una lesión cerebral (Burda y Sofroniew, 2014).

La expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) puede considerarse un marcador sensible y confiable que marca la mayoría, si no todos, los astrocitos reactivos que responden a las lesiones del sistema nervioso central (Sofroniew y Vinters, 2010).

Los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células (Sies, 1997), así una dieta abundante en frutas y vegetales ricos en polifenoles y antocianinas proporciona un riesgo más bajo de contraer cáncer, enfermedades cardíacas y algunas enfermedades neurológicas (Bartlett and Eperjesi, 2003). Sugiriéndose que los compuestos presentes en estos alimentos pueden prevenir la neurodegeneración causada por el estrés oxidativo (Bleys et al., 2006).

El cerebro también contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados que son propensos a la peroxidación, es rico en hierro, que puede catalizar la formación de radicales hidroxilos y tiene baja actividad de catalasa (Halliwell, 1999; Jellinger, 2003; Mariani et al., 2005). El estrés oxidativo produce disrupción funcional y daño, e incluso puede causar la muerte celular a través de la oxidación de biomoléculas como proteínas, lípidos y nucleótidos con cambios funcionales o desactivación de varias enzimas (Stadtman, 2001), alteraciones en la estructura de la membrana que afectan fluidez, permeabilidad y actividad de la proteína de membrana (Wong-Ekkabut et al., 2007). El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de radicales libres y su eliminación, lo que lleva a la generación anormal de especies reactivas de oxígeno y al daño oxidativo. Se ha propuesto y demostrado que diferentes enfermedades neurodegenerativas comparten el estrés oxidativo como una característica común (Fahey et al., 2001; Manoharan et al., 2016)

A través de estos mecanismos, el estrés oxidativo está involucrado en la patogénesis de una variedad de afecciones neurológicas y trastornos neurodegenerativos, incluida la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la epilepsia (Perry et al., 2002; Migliore et al., 2005; Ashrafi et al., 2007). La evidencia experimental en humanos y animales respalda la participación del estrés oxidativo antes y después de las crisis epilépticas (Racine, 1972; Carmona-Aparicio et al., 2015).

El ácido kaínico (KA) es un análogo cíclico del neurotransmisor excitador principal, el glutamato. Es un agonista del receptor KA, que es una subfamilia de receptores de glutamato. Se cree que la excitotoxicidad mediada por el receptor de glutamato contribuye a la muerte celular neuronal en muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo traumatismo del SNC, hipoxia cerebral, isquemia y convulsiones (Choi y Rothman, 1990; Meldrum y Garthwaite, 1990).

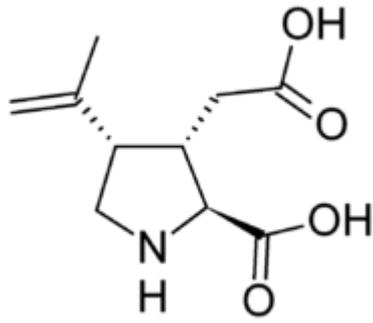


Figura 2. Estructura química del ácido kaínico.

Se ha demostrado ampliamente que la inoculación de agonistas de glutamato como KA en ratones induce procesos de excitotoxicidad que implican la aparición de convulsiones epilépticas (Kim et al., 2001; Penkowa et al., 2001; Yan et al., 2018), así como procesos neurodegenerativos, daño oxidativo y muerte celular en el hipocampo, la corteza y otras estructuras cerebrales del sistema límbico (Matsuoka et al., 1998; Hopkins et al., 2000). Por lo tanto, los modelos de administración de KA en ratones se han utilizado para investigar los mecanismos de excitotoxicidad presentes en muchas enfermedades neurodegenerativas en humanos (Wang et al., 2005).

El estrés oxidativo inducido por KA está asociado con la muerte celular en el hipocampo (Shin et al., 2007). La sobreexcitación neuronal inducida por KA causa una degeneración neuronal irreversible en áreas selectivas del cerebro, particularmente en las estructuras límbicas en la capa piramidal (Cho et al., 2006) (es decir, en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y el hilio de la circunvolución dentada) que desencadena la muerte celular neuronal aguda en las estructuras límbicas, con una progresión de muerte celular que puede transcurrir durante varios días o semanas (Frederickson et al., 1989; Choi et al., 1990; Weise, et al., 2005; Mohd Sairazi et al. ., 2015).

Durante las convulsiones inducidas por KA, las neuronas del hipocampo se degeneran, seguidas de la activación de la microglía y la astrogliosis reactiva (Jørgensen et al., 1993; Sperk, 1994). La activación de las células gliales en el hipocampo está estrechamente relacionada con la muerte neuronal inducida por la epilepsia (Meng et al., 2016). Los astrocitos son cruciales para mantener la arquitectura celular y la homeostasis en condiciones cerebrales normales. De hecho, algunos estudios han propuesto que la "astrocitos reactiva" implica cambios morfológicos y funcionales en los astrocitos en respuesta a una lesión cerebral (Burda y Sofroniew, 2014). La expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) puede considerarse un marcador sensible y confiable que

marca la mayoría, si no todos, los astrocitos reactivos que responden a las lesiones del sistema nervioso central (Sofroniew and Vinters, 2010).

Los antioxidantes pueden prevenir los efectos nocivos de los radicales libres en las células de la misma manera que una dieta rica en polifenoles puede disminuir el riesgo de cáncer (Tangney and Rasmussen, 2013), enfermedades cardíacas y algunas enfermedades neurológicas (Bartlett and Eperjesi, 2003), y prevenir la neurodegeneración causada por estrés oxidativo, entre otros (Bleys et al., 2006).

La importancia de los compuestos fenólicos en las dietas se debe principalmente a su capacidad antioxidante. Dichos compuestos bloquean los radicales libres y tienen la capacidad de quelar los iones de metales de transición, deteniendo así las reacciones de cadena oxidativa en las células (Halliwell et al., 2005). Todos los polifenoles estudiados muestran una alta actividad antioxidante (Obied et al., 2009).

El compuesto fenólico más abundante en los extractos de olivo es (3,4-dihidroxifenil etanol o hidroxitirosol: presenta actividad antioxidante frente al radical superóxido generado por el sistema hipoxantina-xantina oxidasa, y frente al peróxido de hidrógeno generado por la reacción del guayacol (de la Puerta et al., 2001); inhibe la oxidación del ácido salicílico por el radical -OH (Covas et al., 2000); reduce la inactivación de catalasa mediada por ácido hipocloroso; puede actuar sobre especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito (de la Puerta et al., 2001);

Estas propiedades antioxidantes sugieren que el hidroxitirosol y otros polifenoles (verbacosido, ácido elenólico, cicoolivil, ácido caféico, ácido gálico, etc.) que están presentes en el olivo podrían tener un papel protector contra la oxidación de las lipoproteínas y de esta manera pueden contribuir para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Covas et al., 2000). Sus propiedades anticancerígenas también son evidentes en el contexto de que la generación de radicales libres parece estar involucrada en la patología del cáncer, lo que sugiere que estos compuestos fenólicos pueden estar relacionados con la baja incidencia de diferentes tipos de cáncer asociados con dietas que son ricas en estos compuestos (Owen et al., 2004), al proteger el ADN de las células de la próstata del daño causado por los radicales libres, evitando así la actividad mutagénica causada por el estrés oxidativo (Quiles et al., 2003) y por la luz ultravioleta (D'Angelo et al., 2005).

Estos polifenoles también inhiben la agregación plaquetaria (Petroni et al., 1995) y presentan propiedades antimicrobianas in vitro contra varios agentes infecciosos del tracto gastrointestinal y respiratorio (Furneri et al., 2004). También se les ha atribuido una función neuroprotectora (de la Puerta et al., 2001; Vauzour et al., 2010), protección digestiva, así como un regulador antihipercolesterolémico y antihiper glucémico del tejido adiposo.

El efecto de la alimentación en la salud se atribuye a la presencia de ciertos compuestos que ejercen una acción beneficiosa, los compuestos bioactivos. Dada la importancia de los compuestos bioactivos en los sectores de la alimentación y farmacéutico, actualmente existe un gran interés en la identificación de nuevos compuestos bioactivos y/o en la identificación de nuevas propiedades de los mismos, siendo este el marco de actuación en el presente trabajo.

Los polifenoles contenidos en los extractos procedentes del olivo presentan propiedades antioxidantes que hacen que sean candidatos para la investigación de enfermedades neurodegenerativas (Sears and Ricordi, 2012)

Además tienen otras actividades biológicas que le confieren importancia dentro de la “Dieta mediterránea“(Visoli, 2001). Se ha demostrado, además de otros efectos beneficiosos, el poder protector de la ingesta de flavonoides, compuestas fenólicos contenidos en vinos, vegetales y frutas frente a la demencia (Commenges, 2000). También se ha encontrado evidencia de actividad anticancerígena de los polifenoles extraídos del aceite de olive (Fabiani et al., 2006), mediante la utilización de células de leucemia promielocítica humana, en las que se observa inhibición de su crecimiento con polifenoles del aceite de oliva virgen.

Otros autores encuentran efectos positivos también en el uso de polifenoles procedentes de las aguas del procesado de aceituna en la línea celular PC12, así, sometiendo a dichas células a estrés oxidativo y midiendo la citotoxicidad, se observa una cito-protección de las células cerebrales con los extractos (Schaffer et al., 2010). Y algunos autores encuentran que los extractos de los residuos del olivo presentan actividad antioxidante, mediante ensayos ORAC y DPPH en células umbilicales endoteliales humanas (Aldini et al., 2006).

Otros compuestos naturales tienen efectos antiinflamatorios como algunos ácidos grasos como el eicosapentanoico, docosahexanoico, linoleico conjugado y ácidos grasos

monoinsaturados, mediante diferentes mecanismos de actuación (Siriwardhana et al., 2013).

Hasta la fecha, las patologías neurodegenerativas de origen multifactorial presentan un escenario difícil para establecer estrategias terapéuticas. Sin embargo, los mecanismos neuroprotectores pueden tratarse a partir de modificaciones en la dieta. Los polifenoles contenidos en los extractos de olivo presentan propiedades antioxidantes que los hacen candidatos para la investigación de enfermedades neurodegenerativas (Sears and Ricordi, 2012).

La evaluación *in vitro* e *in vivo* de compuestos bioactivos se basa en modelos experimentales que reproducen el proceso biológico de interés a través de sistemas que son sensibles a factores externos y cuyas posibles fluctuaciones son medibles. El objetivo global de este trabajo fue el estudio de la capacidad neuroprotectora de un compuesto natural obtenido de las piedras de olivo aplicadas a modelos *in vitro* en líneas celulares. Para hacerlo, se usó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (94030304, ECCC) (Zhang et al., 2007; Cheung et al., 2009), cuya diferenciación conduce a células que son similares a las neuronas humanas.

El resultado muestra algunas células que presentan un fenotipo neuronal post-mitótico con una morfología y polaridad bien definidas, y la expresión de marcadores neuronales típicos (Gimenez-Cassina et al., 2006). Estas células SH-SY5Y constituyen un modelo homogéneo y altamente reproducible de células que son similares a las neuronas humanas en cultivo. Hoy en día, se utilizan una multitud de estimulantes apoptóticos para estudiar los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular, por ejemplo: la retirada de factores tróficos, la privación de oxígeno, el choque térmico o la administración de agentes tóxicos que selectivamente causan daño en el ADN o en ciertos órganos celulares (Lindahl and Oberg, 1961).

Para la evaluación del efecto del extracto sobre la apoptosis, se analizaron los marcadores genéticos: el gen Bax de la familia proapoptótica ("genes de células de la muerte") y el gen Bcl-2 de la familia antiapoptótica ("genes de supervivencia"), por lo tanto, el equilibrio entre ambos define el umbral de muerte celular programada (Oltavi et al., 1993; Adams and Cory, 1998). El efecto neuroprotector se considera como tal, si la relación entre ambas moléculas Bax/Bcl-2 disminuye (Gao et al., 2008). Este estudio ha

demostrado el efecto neuroprotector del extracto de huesos de oliva sobre la apoptosis inducida por el peróxido de hidrógeno.

Otros autores han encontrado efectos similares usando diferentes modelos, como Schaffer et al. (Schaffer et al., 2010) que usan la línea celular PC12 de las células cerebrales para estudiar los polifenoles de las aguas del proceso de oliva.

Sometieron las células al estrés oxidativo y midieron la citotoxicidad, observando una cito-protección de las células cerebrales con extractos. Otros autores han utilizado cultivos primarios de neuronas de ratón y sistemas de cultivo mixto de células cerebrales enriquecidas por neuronas de Purkinje (Agudo et al., 2002).

Estas neuronas, que constituyen la única proyección eferente del cerebelo, presentan una baja tasa de supervivencia en cultivo, pero constituyen un modelo muy interesante para el estudio de las interacciones neurona-glía (Morrison and Mason, 1998) y otras funciones neuronales (Bravin et al., 1999).

Un posible mecanismo de protección contra la apoptosis a describir es la inhibición de la enzima glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), que provoca un efecto protector contra los estimulantes pro-apoptóticos (Bijur and Jope, 2003; Linseman et al., 2004). Entonces, después de verificar que la inhibición de GSK-3 aumenta la ingesta anaeróbica de glucosa a través de la glucólisis, medida por la liberación extracelular de lactato, se analizó este cambio metabólico para ver si es al menos parcialmente responsable del efecto neuroprotector contra la muerte por disfunción mitocondrial.

Al inhibir la vía glucolítica con 2-desoxiglicerol (2-DGlc), se puede observar que neutraliza completamente el efecto neuroprotector de la inhibición crónica de GSK-3, apoyando la hipótesis de un cambio hacia el metabolismo glucolítico que es menos dependiente en la respiración mitocondrial. Además, otro posible mecanismo neuroprotector es la posible implicación de la neurotrofina BDNF (factor neurtrófico), dado su papel en la señalización anti-apoptótica, así como su efecto neuroprotector en algunos modelos de daño neuronal (Chao, 2003; Pérez-Navarro et al., 2005).

Estudios recientes sugieren que los extractos de olivo inhiben la inflamación y reducen el estrés oxidativo, que se ha observado en ratas con isquemia cerebral provocada (Mohagheghi et al., 2011). Por ejemplo, los efectos neuroprotectores del extracto seco de aceituna en la isquemia cerebral transitoria global en jerbos mongoles (Dekanski et

al.,2011), y la evaluación de diferentes parámetros de estrés oxidativo y daño neuronal en el hipocampo. Estos efectos se compararon con los de quercetina, que es un flavonoide conocido por ser un neuroprotector.

El tratamiento con este extracto inhibe significativamente la producción de superóxido y óxido nítrico, disminuye la peroxidación lipídica y aumenta la actividad de la superóxido dismutasa, los efectos son significativamente mayores que los de quercetina, lo que indica que ejerce una potente actividad neuroprotectora contra el daño neuronal. en el hipocampo después de una isquemia cerebral transitoria global, que puede atribuirse a sus propiedades antioxidantes. La mayoría de los estudios sobre los efectos de los polifenoles de los extractos de olivo indican que su acción neuroprotectora se debe a su capacidad antioxidante al eliminar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno involucradas en enfermedades humanas (De la Puerta et al., 2001).

La investigación hasta la fecha se ha centrado más en la reducción de daños que en la prevención (Omar et al., 2017).

En consecuencia, nuestro estudio aborda el daño cerebral mediante un enfoque preventivo mediante la adición previa de extractos de oliva biológicamente seguros, con el fin de evaluar la capacidad neuroprotectora de los polifenoles presentes en estos extractos, principalmente HT, y posteriormente utilizando un modelo de neurodegeneración inducida por KA en ratones. El objetivo ha sido estudiar la posible defensa antioxidante natural de los productos de oliva ricos en polifenoles. Por lo tanto, examinamos el posible efecto neuroprotector de la ingesta previa de extractos de oliva ricos en polifenoles en la inducción de daño epiléptico e histológico por KA.

2.5. Efectos de extractos del olivo estudiados por nuestro equipo

2.5.1. Estudio de la actividad antiinflamatoria de extractos del olivo ricos en polifenoles

En un primer artículo realizado por nuestro equipo hemos testado la actividad antiinflamatoria de un extracto de naturaleza polifenólica de huesos de oliva.

Se incubó la línea celular THP1- XBlue-CD14 (Invitrogen), 80.000 células/pocillo, provocando inflamación (activación de NF-kb) mediante 0.1 µg/ml LPS (lipopolisacárido de E. coli) durante 24 horas. Se evaluó la influencia de la presencia del extracto a dos concentraciones 10 y 50 mg/l (bioseguras) durante 2 horas a 37 °C, previa (efecto preventivo) y posterior a la activación proinflamatoria (efecto terapéutico) y se cuantificó colorimétricamente la actividad de fosfatasa alcalina, que se expresa bajo el control del promotor del factor transcripcional de NF-kb.

Se evalúa el % actividad de NF-kb en ambos efectos, preventivo y terapéutico, respecto a cultivos control de células con LPS y sin extracto añadido, que se consideran 100% de NF-kb.

Así hemos demostrado que la capacidad antiinflamatoria preventiva del extracto a 50 mg/l es del 25,5% (IC 95% 16,8-34,2) y el efecto terapéutico del 34,9% (IC 95% 25,3-44,4) para la misma concentración, no presentando actividad significativa a 10 mg/l. Pudiendo demostrar el efecto de los polifenoles extraídos de los huesos de aceitunas, en la eliminación de la inflamación a través de la inhibición del factor NF-kB previamente activado por LPS a concentraciones de 50 mg/l de polifenoles que previamente se mostraron seguras.

Como conclusión, se observa actividad protectora frente a la inflamación con efecto tanto preventivo como terapéutico (Anexo 1).

2.5.2. Efecto protector de un extracto polifenólico del olivo sobre sistema nervioso en pez cebra

Por otra parte, nuestro equipo estudió el efecto de un extracto polifenólico de hueso de oliva en el desarrollo del sistema nervioso y frente al daño inducido mediante la neurotoxina ácido kaínico, utilizando como modelo animal el pez cebra.

Hemos analizado el efecto del extracto a la máxima dosis tolerada (100 mg/ml de polifenoles) sobre la actividad colinérgica en larvas de pez cebra (72 horas post-fertilización).

Se utilizaron únicamente huevos fecundados sin anomalías. Se incuban 6 huevos/pocillo en microplaca de 24 pocillos en 2 ml de agua con DMSO (0,1%) a 26 ± 1° C, utilizando dos grupos de experimentos, uno para medir la influencia de los

polifenoles sobre el neurodesarrollo y otro para observar la influencia de neuroprotección: a) neurodesarrollo: agua (control) y con 100 mg/ml de extracto, como ensayo; b) neuroprotección: agua y ácido kaínico (100 μ M) (control) y con 100 mg/ml de extracto (ensayo). Todas las incubaciones se realizaron por triplicado. A las 72 h se examinaron y verificó la ausencia de anomalías. Las larvas se homogeneizaron en su mismo medio y en los sobrenadantes se cuantificó actividad acetilcolinesterasa y concentración de proteínas.

Como resultado obtuvimos que la cantidad de proteína y la apreciación morfológica es análoga en todos los ensayos, indicando un mismo desarrollo. En relación al neurodesarrollo, la acetilcolinesterasa en las larvas de pez, con el extracto polifenólico es del 162,2% (SD 44,2) respecto a controles (100% de actividad) ($p < 0,01$). Y en relación a la neuroprotección, las larvas de pez tratadas con ácido kaínico y extracto polifenólico presentan el 140,1% (SD 22,0) de actividad, respecto a las incubadas únicamente con la neurotoxina (100%) ($p < 0,05$).

De este modo se llegó a la conclusión que los polifenoles extraídos de los huesos de aceituna producen incremento de actividad colinérgica durante el neurodesarrollo larvario en el pez cebra y protección frente a la neurotoxina ácido kaínico (Anexo 2).

2.5.3. Estudio del efecto protector de los polifenoles del olivo sobre la apoptosis en neuroblastoma humano inducido por daño oxidativo

Se ha evaluado la actividad protectora del extracto de un subproducto del olivo, como son los huesos de aceitunas, mediante su capacidad de inhibir la apoptosis en la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y inducida con H₂O₂.

Se cultivaron 20.000 cel./pocillo, iniciando diferenciación con ácido retinoico y, una vez diferenciadas las células, se ha inducido la apoptosis con H₂O₂ con extracto y sin presencia del mismo. Finalmente se efectúa la obtención de cDNA y el análisis de los genes proapoptótico Bax y antiapoptótico Bcl-2. La cuantificación de la expresión génica se realiza frente al gen marcador GAPDH.

Se demostró que la viabilidad celular con el extracto es del 97,6% (SD 5,7) con 10 mg/l y 62,8% (SD 1,2) a 50 mg/l, utilizando 10 mg/l para el ensayo de biomarcadores. Las células de la línea SH-S diferenciadas con ácido retinoico (10 μ M), muestran una clara apoptosis al ser tratadas con H₂O₂ 150 μ M, con una relación Bax/Bcl2 de 3,75 (SD

0,80) frente a las células diferenciadas control y sometidas a H₂O₂ y con extracto que tienen la misma relación de 1,02 (SD 0,01-0,03).

Así pues, hemos podido afirmar que el extracto de huesos de aceitunas presenta una actividad antiapoptótica frente a la muerte celular por peróxido de hidrogeno, preservando las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en su estado de normalidad, al defenderlas del estrés oxidativo que produce un significativo aumento de la relación de genes apoptóticos frente a antiapoptóticos (Bax/Bcl2) (Anexo 3).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo general

Se plantea como objetivo general estudiar la posible defensa antioxidante de los productos del olivo ricos en polifenoles como candidatos a compuestos neuroprotectores y antiinflamatorios en un modelo de neurodegeneración en ratón por Acido kaínico (KA).

3.2. Objetivos específicos

Este objetivo general se abordó desde varias perspectivas que se plasman en los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el posible efecto neuroprotector de la ingesta previa de extractos de oliva ricos en polifenoles en la inducción de daño epiléptico por ácido kaínico.
- Determinar el posible efecto antiinflamatorio de la ingesta previa de extractos de oliva ricos en polifenoles en la inducción de daño histológico por ácido kaínico.

3.3. Hipótesis

Se plantea como hipótesis que los polifenoles del olivo presentes en extractos del mismo actúan como neuroprotectores y con efecto antiinflamatorio frente al daño inducido por el ácido kaínico en ratones.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Población de estudio

Para el estudio se utilizaron ratones machos sanos.

4.2. Muestra

Se utilizaron treinta y dos ratones machos (*Mus musculus*) de la cepa FVB / N (empresa Janvier), de aproximadamente dos meses de edad. Los ratones fueron alojados en un recinto con ciclo de luz / oscuridad de 12 horas, con humedad y temperatura controladas y disponibilidad de alimentos y agua *ad libitum*. Estos animales se aislaron y, después de un período de cuarentena de 20 días, se pesaron y distribuyeron de manera homogénea, de acuerdo con el peso, en tres grupos de 10 animales para los grupos Extracto 1 (E1) y Extracto 2 (E2) y 12 para el grupo control (C).

4.3. Variables analizadas

La variable principal fue el daño neuronal producido, medido utilizando los siguientes parámetros:

- progresión en la escala Racine durante los primeros 120 minutos,
- tiempo de inicio de la primera convulsión,
- porcentaje de animales con convulsiones,
- porcentaje de animales con estado epiléptico
- porcentaje de mortalidad.

Por otro lado, se ha estudiado la posible prevención del daño histológico en el cerebro.

Las variables secundarias fueron la ingesta de sólidos y líquidos, y el aumento de peso.

4.4. Metodología

Se utilizaron dos extractos de oliva (variedad Manzanilla sevillana):

- Extracto E1 con un contenido total de polifenoles de 1.12 mg/g de extracto y un poder antioxidante de 7.4 mg TPTZ/g de extracto.
- Extracto E2 con un contenido total de polifenoles totales de 83 mg/g de extracto y un poder antioxidante de 10 mg TPTZ/g de extracto.

Con el fin de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo por HPLC ambos extractos se disolvieron en metanol a una concentración de 10 mg/ml. Los extractos se filtraron con filtros de nylon de 0,45 micras y las muestras se transfirieron a viales de HPLC, realizando la cromatografía en un Cromatógrafo Agilent LC serie 1100 HPLC (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.) controlado por el software Chemstation y equipado con una bomba, inyector automático, horno de termostato y detector DE UV-vis DAD que se utilizó para detectar y cuantificar las muestras. SE utilizó la columna cromatográfica Agilent Poroshell 120 SB-C18 4.6x150mm 2.7m. Las muestras fueron analizadas de modo negativo (Ahmad et al., 2013).

Se muestran los cromatogramas obtenidos para cada muestra a una longitud de onda de 280 nm (Figura 3), indicando el número máximo que permite su identificación en la nota a pie de figura.

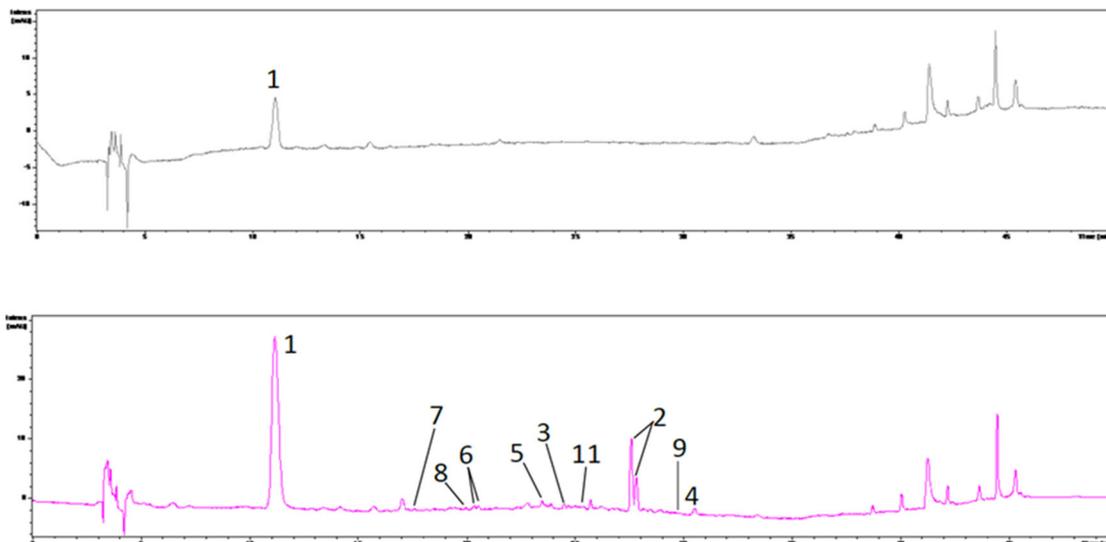


Figura 3. Cromatogramas del extracto E1 y E2 a 280 nm.

La lista numerada de compuestos identificados en los extractos es la siguiente: 1 hidroxitirosol; 2 oleuropeína; 3 derivados de lignotrosido; 4 derivados de lignotrosido; 5 verbacosido; 6 -hidroxi-verbacosido; 7 oleosido; 8 oleuropeinaaglicona; 9 n-z-metil-oleosido; 10 glucurónido de ligtrosido; 11 diglucósido de oleuropeína; 12 derivado de oleosido; y 13 formas de dialdehído de oleuropeinaglicona.

Una vez finalizado el análisis cualitativo, se cuantificó el contenido de los extractos en verbacosido, oleuropeína e hidroxitirosol. Para ellos, se utilizaron patrones de concentración conocida y se obtuvieron rectas estándar. Los patrones utilizados fueron los siguientes: Hidroxitirosol de la casa comercial Sigma-Aldrich, ref. H4291, Oleuropeina y Verbacosido de la empresa comercial Extrasynthese. Todas las rectas presentaban un ajuste óptimo con coeficientes de regresión superiores a 0,99. Utilizando estas rectas patrón, se cuantificó el contenido de estos tres compuestos en los extractos, obteniendo los resultados mostrados en Tabla1.

La cantidad de polifenoles totales presentes en los extractos en estudio se ha determinado utilizando el método Folin-Ciocalteu. Se basa en el hecho de que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul que se puede determinar espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato de sodio y molibdato de sodio en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibotungstico amarillo (formado por las dos sales en el medio ácido), cuando se reduce por los grupos fenólicos, da lugar a un complejo azul profundo, la intensidad de la cual medimos para evaluar el contenido de polifenoles (Tabla 1).

La actividad antioxidante presente en los extractos vegetales se ha analizado utilizando el método FRAP (antioxidante reduciendo el poder del hierro o la capacidad antioxidante para reducir los iones férricos). La actividad antioxidante se determina como aumento lineal de la absorbancia. Dicho ensayo mide la capacidad antioxidante para reducir el complejo de hierro Fe^{3+} - TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina o 2,4,6-tripiridyl-1,3,5-triazina) a un complejo ferroso con coloración azul intensa (Fe^{2+} - TPZT). El FRAP es $Fe^{3+}(FeCl_3)$ - TPTZ y la muestra (antioxidante) lo reduce a Fe^{2+} , cuanto más se reduce (más coloración azul), más antioxidante es. La línea de calibración se traza con concentraciones de $FeSO_4$ (Tabla 1).

Tabla1.Composición y características químicas de los dos extractos de aceituna utilizados.

	Extracto1	Extracto2
Oleuropeina (mg/ml)	<0.03	1.2
Verbacosido (mg/ml)	<0.01	<0.01
Hidroxitirosol (mg/ml)	<0.01	0.2
Total polifenoles (mg PFT/g)	1.7	2.8
Viscosidad (mpa)	1.5	2.7
pH	4.58	4.60
Grado de acidez/alcalinidad(%w/w)	0.46	0.93
Capacidad antioxidante (mM TPTZ/g)	2	10

Los extractos se administraron a los ratones diariamente por sonda oral a una dosis de 500 mg/kg para el E1 y 300 mg/kg para el E2, disueltos en 250 µl de tampón fosfato (PBS) durante 30 días consecutivos. Los animales se dividieron en tres grupos: 12 en el grupo control(C), 10 en el grupo extracto 1 (E1) y 10 en el grupo extracto 2 (E2). Los ratones en el grupo control recibieron un volumen equivalente de PBS. Un día antes de comenzar la administración de los compuestos, durante los días 10, 20 y 30 de tratamiento (antes del sondaje en los tres casos), y cuatro días después del KA, se pesaron los ratones y se determinó la ingesta aproximada de alimentos. El consumo promedio diario de agua también se determinó durante dos períodos de la administración: del día 1 al 10 y del día 24 al 29.

El día 30 de tratamiento (dos horas después de la sonda oral diaria), se administraron 23 mg/kg de KA por vía intraperitoneal a los ratones en los tres grupos.

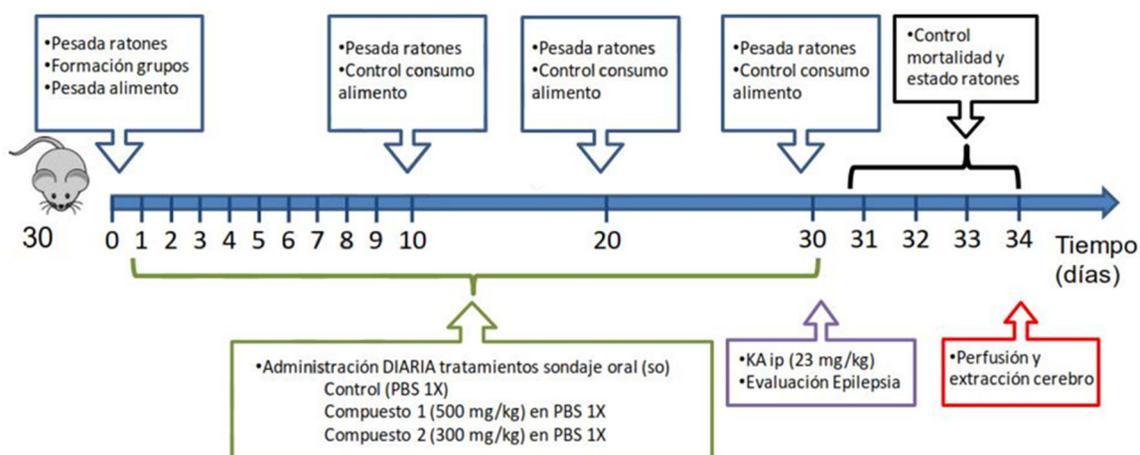


Figura 4. Cronograma de la metodología utilizada durante los experimentos.

Los síntomas epilépticos presentados por los ratones se registraron durante 120 minutos en incrementos de 10 minutos de acuerdo con la siguiente adaptación de la escala Racine:

- 0 = sin síntomas,
- 1 = inmovilidad,
- 2 = movimiento continuo de la cabeza (cabeceo);
- 3 = extensión de las patas delanteras y / o cola y agitación;
- 4 = convulsiones clónicas y agitación continua;
- 5 = ataques clónicos-tónicos y saltos incontrolados;
- 6 = muerte;

Además, la condición de los ratones se determinó asignando una puntuación de lesión:

- 0 = movilidad y comportamiento normales;
- 1 = movilidad normal / aparición de síntomas de dolor;
- 2 = movilidad solo en respuesta a estímulos / síntomas de dolor intenso;
- 3 = inmovilidad / síntomas de dolor intenso;
- 4 = muerte;

También se realizó un registro de la mortalidad de los ratones durante los cuatro días posteriores a la administración de KA (Racine et al., 1972).

Además, dos animales del grupo control se utilizaron como control absoluto de la normalidad en el estudio histológico.

Después de 4 días, se contó el número de ratones muertos. Con los sobrevivientes, se determinó a nivel neuropatológico el efecto neuroprotector del tratamiento con los extractos E1 (n = 8) y E2 (n = 7), comparándolo con los sobrevivientes del grupo control con KA (n = 4) y los ratones no tratados (n = 2). Los animales supervivientes se sacrificaron por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico y se realizó perfusión intracardíaca con PBS seguido de fijador GreenFix. Los cerebros se extrajeron inmediatamente, se perfundieron y se fijaron en 3,7% de formaldehído en tampón fosfato. Luego se incrustaron en parafina y se seccionaron usando un microtomo rotativo (Leica, modelo RM2125) con un espesor de 5 micras.

Se tomaron diez cortes coronales de 5 μ m de espesor del hipocampo ventral (intraneural: 3,34 mm y bregma: -0,46 mm). Se localizó a continuación la región conocida como hipocampo intermedio (intraneural: 1.98 mm y bregma: -1.82 mm) en el que se hicieron 10 nuevos cortes. Finalmente, el cerebro fue nuevamente seccionado hasta alcanzar la región conocida como hipocampo dorsal (Intraneural: 1.5 mm y bregma: -2.3 mm).

Los cortes incluidos en parafina se desparafinaron y deshidrataron para la tinción con hematoxilina eosina (H&E) para estudiar el daño morfológico (García-Moral, 1993). Las secciones se vieron bajo un microscopio vertical AxioImager Z1 con lentes objetivo 4x, 10x, 20x y 40x y se tomaron las fotos representativas correspondientes.

Primero, la tinción H&E se usó para buscar la posible presencia de células picnóticas/apoptóticas en las regiones del cerebro afectadas principalmente por KA, como el hipocampo (regiones CA1, CA3 y giro dentado), la corteza y la región amigdaloides. Posteriormente, se realizó un estudio cuantitativo del número de ratones en cada grupo.

4.5. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se describieron utilizando medias y desviaciones estándar, y las variables cualitativas utilizando frecuencias absolutas y relativas. Para evaluar la posible influencia del tratamiento, se hicieron comparaciones con el grupo de control utilizando la prueba t de student para las variables cuantitativas y la prueba de Chi-cuadrado para las variables cualitativas.

Para analizar las variables ordinales con medidas repetidas a lo largo del tiempo (escala de Racine y puntaje de lesiones), se estimaron modelos mixtos de enlaces acumulativos, que consideran la variabilidad del individuo, la del parámetro en sí, el tiempo transcurrido desde la administración de KA y el efecto de los diferentes compuestos.

A través de estos modelos, se calcularon las probabilidades de cada uno de los eventos en las dos escalas. Estas probabilidades se usaron para crear figuras que ayudaran a interpretar los resultados.

En estos modelos, el tiempo se usó como un efecto fijo. Dado que la posible magnitud del efecto no se conocía de antemano, no se realizó un estudio previo del tamaño de la muestra, considerándolo adecuado a posteriori si se cumplía el objetivo propuesto (para mostrar el efecto protector de los extractos sobre el estado epiléptico inducido).

4.6. Consideraciones éticas

La investigación cumplió con los procedimientos legales y éticos establecidos y se llevó a cabo bajo PG-NBP-13 incluido en el Sistema de Gestión de Calidad de I + D + i (ref. 166002) de la empresa NeuronBio, certificación ENAC. El procedimiento fue

aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Fundación de Investigación del Hospital Universitario y Policlínica La Fe (Valencia, España) (número de código: ES462500001013).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Estudio de la ingesta y variación del peso

No se encontró variación de peso durante el seguimiento de los ratones adultos en ninguno de los tres grupos estudiados. El peso medio de cada grupo antes del inicio del tratamiento fue de 26.7 ± 0.7 g ($p = 1.000$). La ingesta de alimentos fue idéntica en los tres grupos, aumentando de 3.4 ± 0.1 a 4.3 ± 0.1 g / día ($p = 0.457$). Del mismo modo, el consumo aproximado de agua fue idéntico en los tres grupos ($p = 0,656$), aumentando en la misma proporción que el consumo de sólidos y de la misma manera en los tres grupos.

5.2. Síntomas epilépticos tras la administración de ácido kaínico

Después de la administración de los extractos durante 30 días, se indujeron convulsiones con KA en los grupos de intervención y control y se registraron los síntomas epilépticos de los ratones durante los siguientes 120 minutos (Figura 4). Descriptivamente, los tres grupos de ratones mostraron una progresión similar en la aparición de síntomas epilépticos durante los primeros 50 minutos. Los animales comenzaron a mostrar movimiento de cabeza continua asintiendo y movimiento

incontrolado de la mandíbula. Entre 10 y 20 minutos después del KA, los ratones mostraron pequeños espasmos en los que se observaron fenómenos de cría (aumento de movimiento en sus patas traseras y pérdida de equilibrio, caída y recuperación de la verticalidad rápidamente), así como extensión de la cola y temblores (espasmos o sacudidas aisladas). Entre 30 y 50 minutos, mostraron las primeras convulsiones leves (convulsiones clónicas) que se generalizaron con el tiempo. Este síntoma incluyó la aparición de fenómenos de espasmos continuos a lo largo del tiempo y la pérdida de verticalidad en la que el ratón exhibía movimientos incontrolados de una extremidad o caminaba en círculos.

Entre 50 y 70 minutos, los síntomas epilépticos se acentuaron particularmente en el grupo control. Durante este tiempo, aparecieron convulsiones severas en las que el ratón saltó incontroladamente con pérdida de verticalidad (salto y alzamiento continuos). Después de 70 minutos, algunos ratones en los grupos tratados mostraron una disminución considerable de los síntomas epilépticos. Sólo cuatro ratones en el grupo de tratamiento E1 y seis ratones en el grupo de tratamiento E2 mostraron convulsiones leves al final de 120 minutos, mientras que los 10 animales en el grupo control tuvieron convulsiones leves.

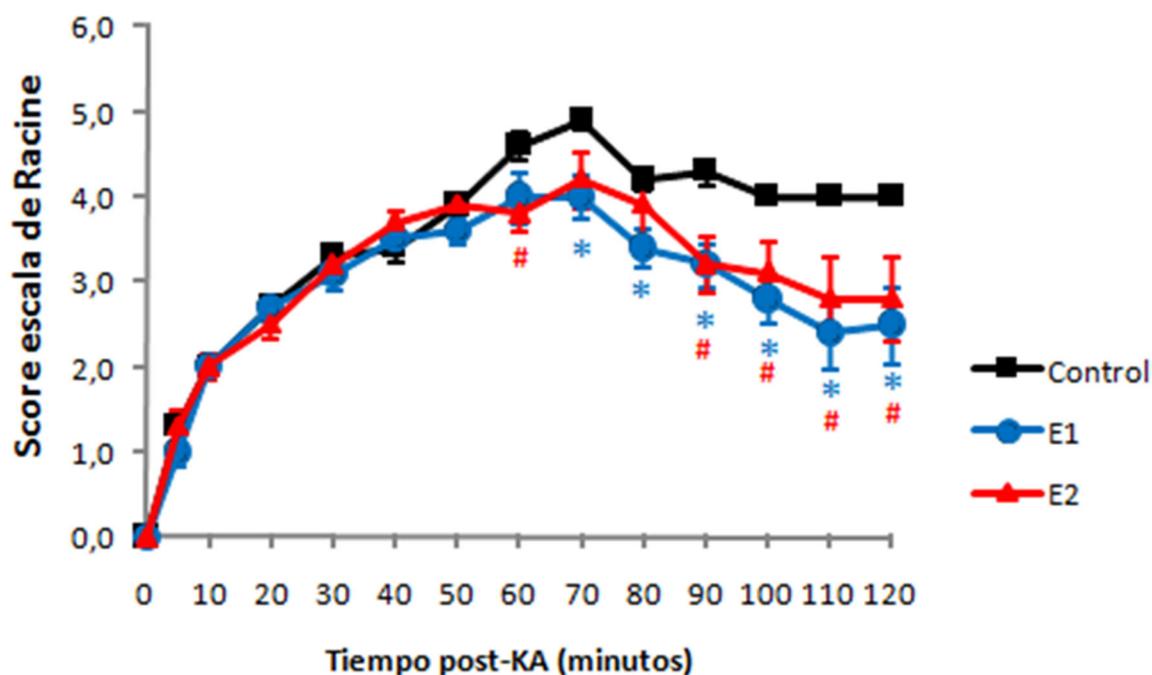


Figura 5. Evolución de los valores de la escala Racine en los minutos posteriores a la inyección de ácido kaínico (KA) en el grupo control y en los grupos tratados previamente con extractos E1 y E2.

Negro, control; Azul, Extracto 1; Rojo, Extracto 2.

* $p > 0.05$ control vs Extracto 1; # $p < 0.05$ control vs Extracto 2.

La Figura 5 muestra el valor de puntuación Racine del efecto antiepiléptico de los extractos versus el control. Teniendo en cuenta los datos de las mediciones repetidas de los diferentes ratones en un modelo matemático (análisis inferencial), encontramos que en todos los puntos de tiempo, el grupo de control tenía un mayor riesgo de sufrir un evento epiléptico en comparación con los grupos que recibieron el compuestos ($p < 0.001$ en general) y, entre estos, el primer extracto tuvo el mayor efecto protector (E1 vs Control, $p = 0.003$; E2 vs Control, $p = 0.051$).

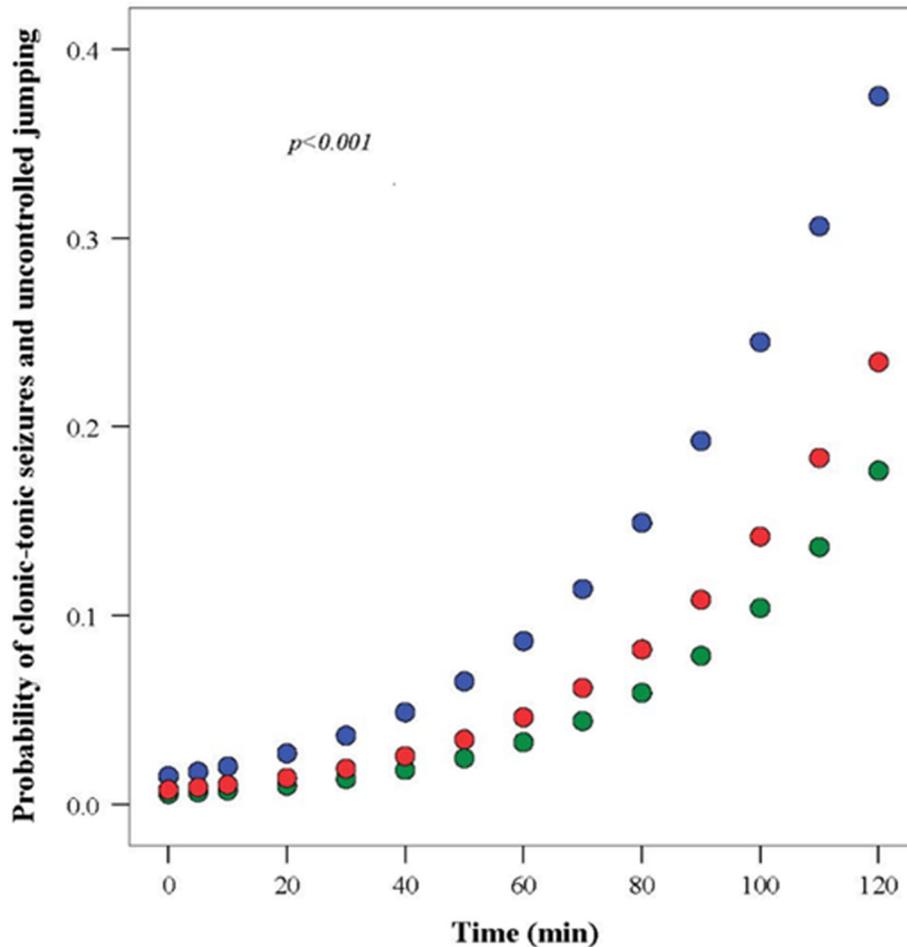


Figura 6.

Efecto antiepiléptico de la administración oral por sonda de los extractos estudiados, analizados utilizando datos de convulsiones y movimientos no controlados medidos de acuerdo con la escala Racine, en un modelo matemático (análisis inferencial). Azul, control; Verde, Extracto 1; Rojo, Extracto 2.

5.3. Muerte después de suministrar ácido kaínico

Al analizar la mortalidad en los ratones durante los primeros cuatro días después de la administración de KA, se observó un porcentaje más alto en el control que en los grupos tratados con los extractos, siendo E1 una vez más el más efectivo, como se muestra en la Figura 7.

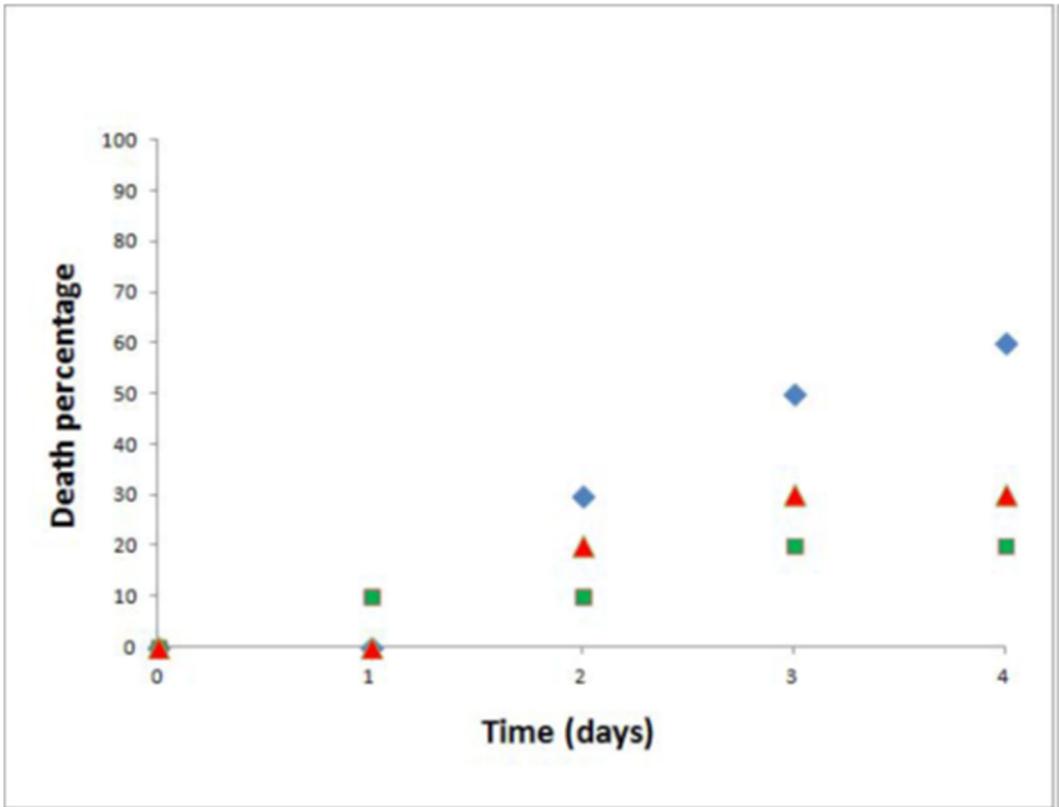


Figura 7. Porcentaje de muertes ocurridas durante los cuatro días posteriores a la administración de ácido kaínico (KA).

Azul, control; Verde, extracto 1; Rojo, extracto 2.

5.4. Daño epiléptico general después de la administración de ácido kaínico

En los tres parámetros analizados, hubo menos daño epiléptico (puntaje de lesión) en los ratones con extractos, lo que se volvió significativo en el estudio del estado epiléptico ($p < 0.001$, en general). El efecto protector se analizó evaluando la puntuación neurológica del daño inducido en los tres grupos durante los cuatro días posteriores a la administración de KA. Los datos se muestran en la Figura 8. Aquí podemos ver cómo la administración previa de los extractos protegió contra lesiones en comparación con el control, y fue mayor en E1 que en E2 (E2 vs Control, $p = 0.053$; E1 vs Control, $p = 0.013$).

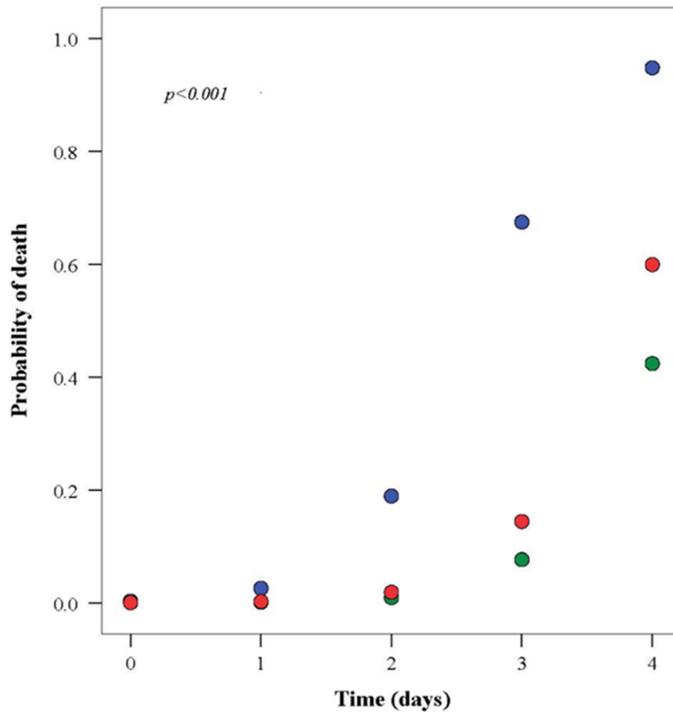


Figura 8. Efecto protector de la administración por sonda oral de extractos durante cuatro días después de la lesión inducida por KA en un modelo matemático (análisis inferencial). Azul, control; Verde, extracto 1; Rojo, extracto 2.

En general, todos los ratones del grupo de control experimentaron síntomas de dolor y movilidad reducida desde el día siguiente a la administración de KA. Además, estos síntomas de dolor empeoraron en el transcurso de los días en algunos animales mientras que otros murieron. Los ratones tratados con E1 y E2 generalmente mejoraron. En cuanto a la cantidad de ratones en cada grupo que mostraron daño por KA, la Tabla 2 muestra la cantidad de animales que murieron por el efecto de KA y aquellos que presentaron daño neuronal. De los ratones expuestos a KA, el 60% murió y el 40% tenía daño neuronal en el grupo control. Con la presencia previa de extractos, 50% para E1 y 40% para E2 mostraron protección total, 30% en ambos grupos de extractos mostraron daño neurológico y 20% y 30%, respectivamente, murieron.

Tabla 2. Número de ratones que murieron o presentaron daño neurológico con ácido kaínico (KA) y en presencia de extractos de aceituna.

	Control + KA	E1 + KA*	E2 + KA**
Sin daño neurológico	0	5	4
Daño neurológico	4	3	3
Muerte	6	2	3

* Control+KA vs E1+KA Chi square = 7.143; p=0.028.

** Control+KA vs E2+KA Chi square = 5.143; p=0.076.

5.5. Daño histológico producido por ácido kaínico

Los animales supervivientes a los 4 días tras la inoculación del KA fueron sacrificados y sus cerebros procesados para la realización de estudios histopatológicos de detección de muerte celular (H&E), y de inflamación/astrogliosis (GFAP).

Para determinar la posible presencia de células picnóticas/apoptóticas por tinción de H&E, se observó que las regiones del cerebro afectadas principalmente por KA eran el hipocampo (regiones CA1, CA3 y giro dentado), la corteza y la región amigdaloides. La Figura 9 muestra una prominente astrogliosis reactiva y microgliosis en el hipocampo de ratones normales inyectados con KA con signos claros de aumento del estrés oxidativo y cambios morfológicos neuronales (histopatogenia inducida por KA) (Columna 2), especialmente en CA1, CA3 y la circunvolución dentada, que en contraste, no se observan en presencia de ambos extractos (columnas 3 y 4) que se asemejan a las imágenes del grupo control sin inducción (columna 1).

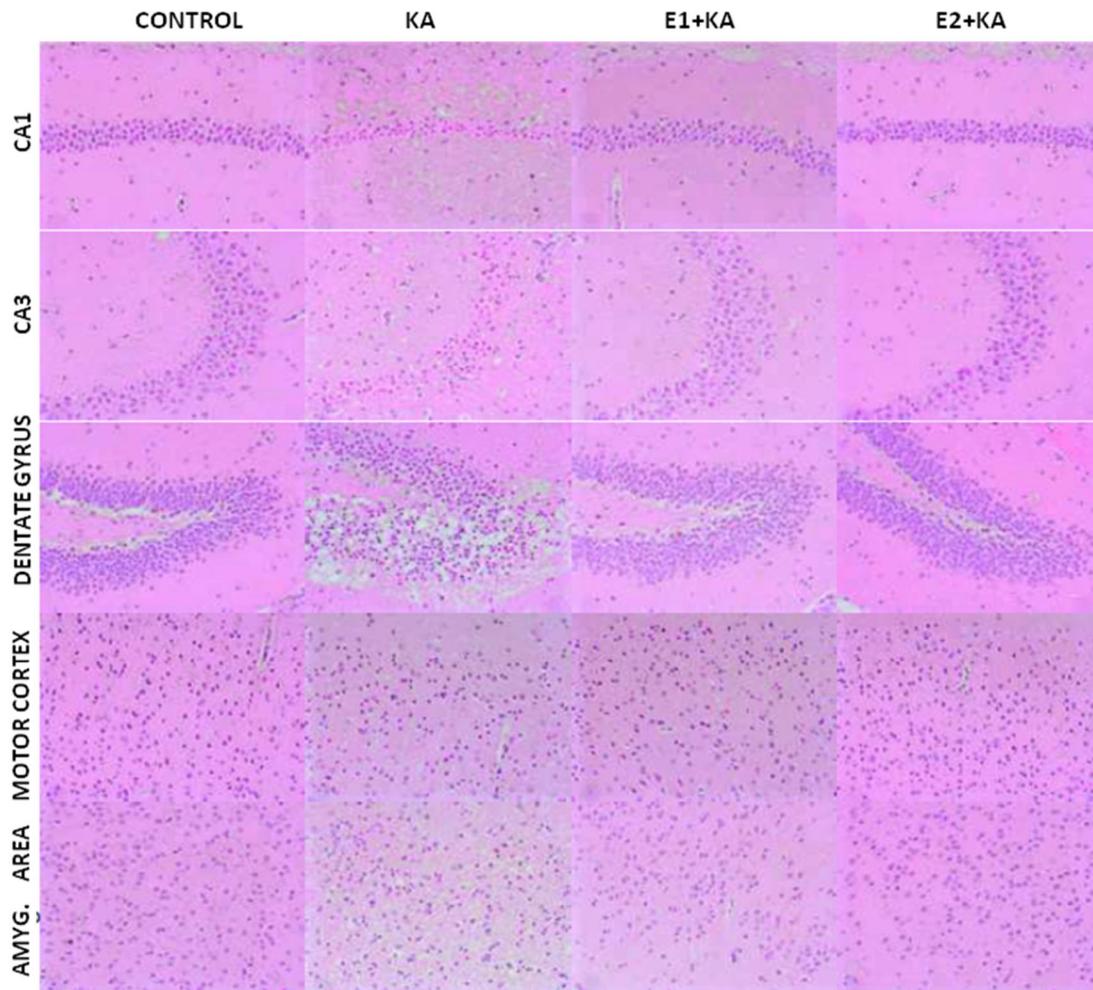


Figura 9. Imágenes representativas de las regiones CA1, CA3 y circunvolución dentada del hipocampo, la corteza motora y la región amigdaloides teñidas con H&E para cada uno de los grupos de ratones estudiados (Columna 1, Control; Columna 2, control con ácido kaínico; Columnas 3 y 4 ácido kaínico con extracto E1 y E2).

Se realizó un estudio cuantitativo del número de ratones de cada grupo que mostraron dicho daño tal y como muestra la figura 9.

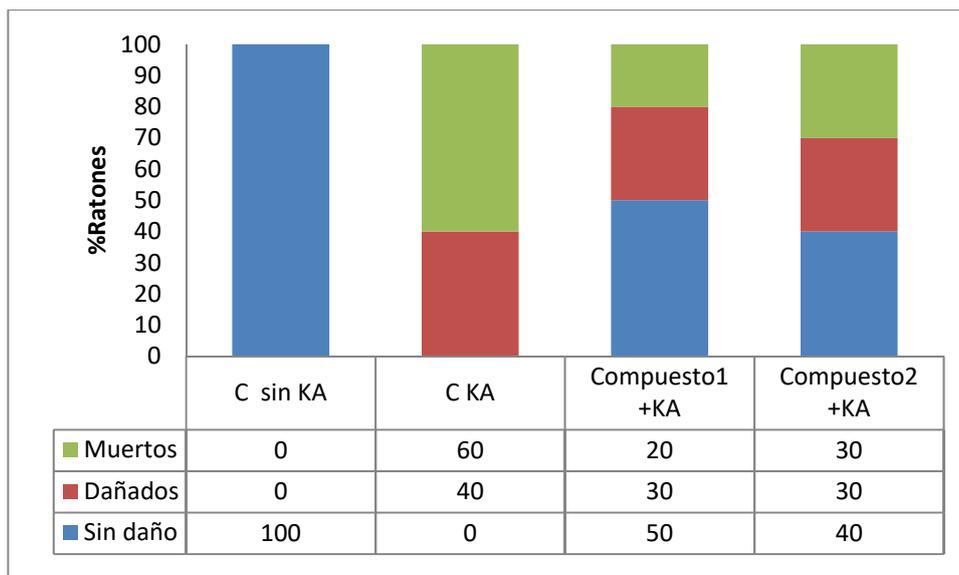


Figura 10.Efecto neuroprotector de los compuestos 1 y 2 en el modelo de KA mediante el estudio de los cerebros teñidos con H&E.

En ella, se muestra el porcentaje de animales de cada grupo que no presenta daño en el cerebro así como el porcentaje de animales de cada grupo con daño en el cerebro y el porcentaje de animales que murieron por efecto del KA. El número total de animales estudiados es: 2 ratones grupo control EDAD sin KA; 10 ratones grupo control + KA; 10 ratones grupo compuesto 1 + KA; 10 ratones grupo compuesto 2 + KA.

5.6. Neuroinflamación producida por ácido kaínico

Para estudiar el efecto de los extractos sobre la astrogliosis inducida por KA, se realizó una tinción inmunohistoquímica contra GFAP presente en los astrocitos. La Figura 11 muestra imágenes representativas de la tinción de GFAP en el hipocampo de cada uno de los grupos de ratones estudiados. En la Columna 2, se puede ver que los animales inoculados con KA mostraron un alto número de astrocitos activados en el hipocampo, la corteza motora y la región amigdaloides. Los animales del grupo control de la misma edad que no fueron inoculados con KA solo mostraron la presencia de astrocitos en el hipocampo, aunque en menor número y con menor intensidad de señal. Además, se verificó que la aparición de esta astrogliosis se concentró principalmente en las regiones en las que se detectó daño neuronal a través de la tinción H&E. Por el

contrario, los ratones tratados con E1 y E2 habían disminuido la astrogliosis en todas las regiones.

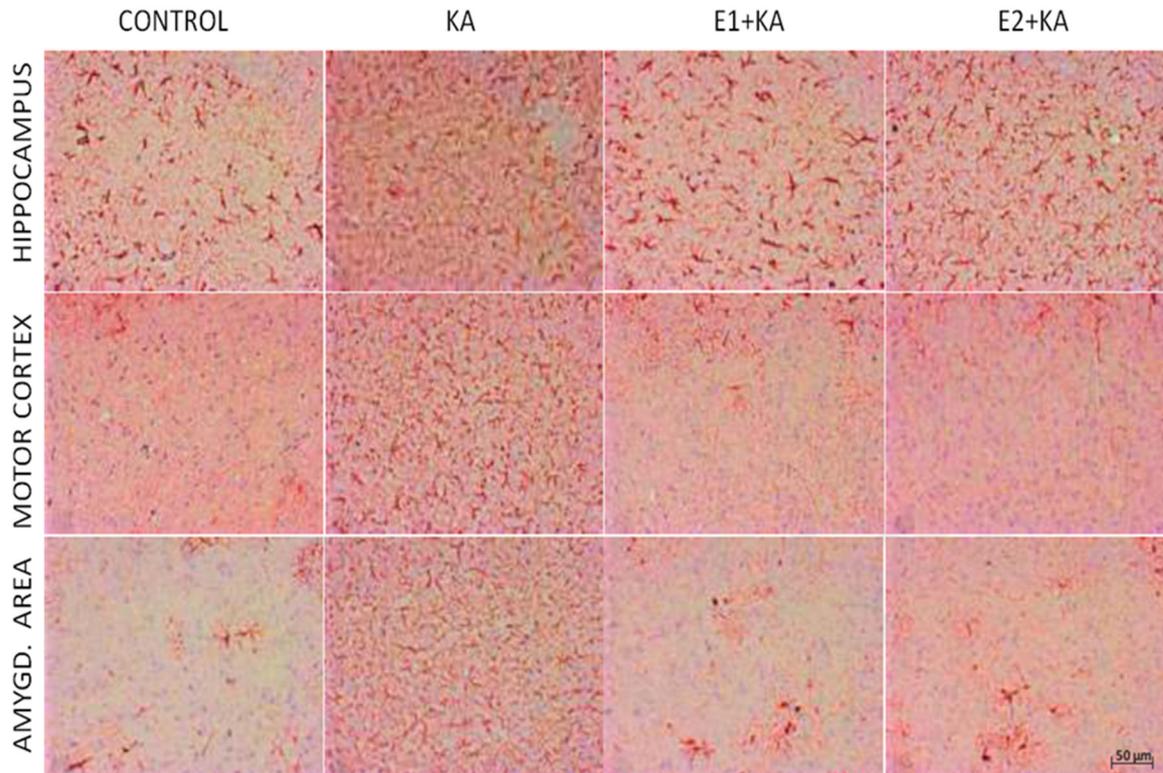


Figura 11. Tinción inmunohistoquímica de GFAP en los astrocitos del hipocampo, la corteza motora y la región amigdaloides, en ratones control, ratones tratados con ácido kaínico y ratones tratados con extractos E1 y E2 antes de la administración de ácido kaínico (Columna 1, Control; Columna 2, Control con ácido kaínico; columnas 3 y 4, grupos de ácido kaínico con extracto E1 y E2, respectivamente).

La administración de E1 y E2 redujo la neuroinflamación inducida por KA, como se muestra en la Figura 12, que presenta la cuantificación de la tinción inmunohistoquímica contra GFAP.

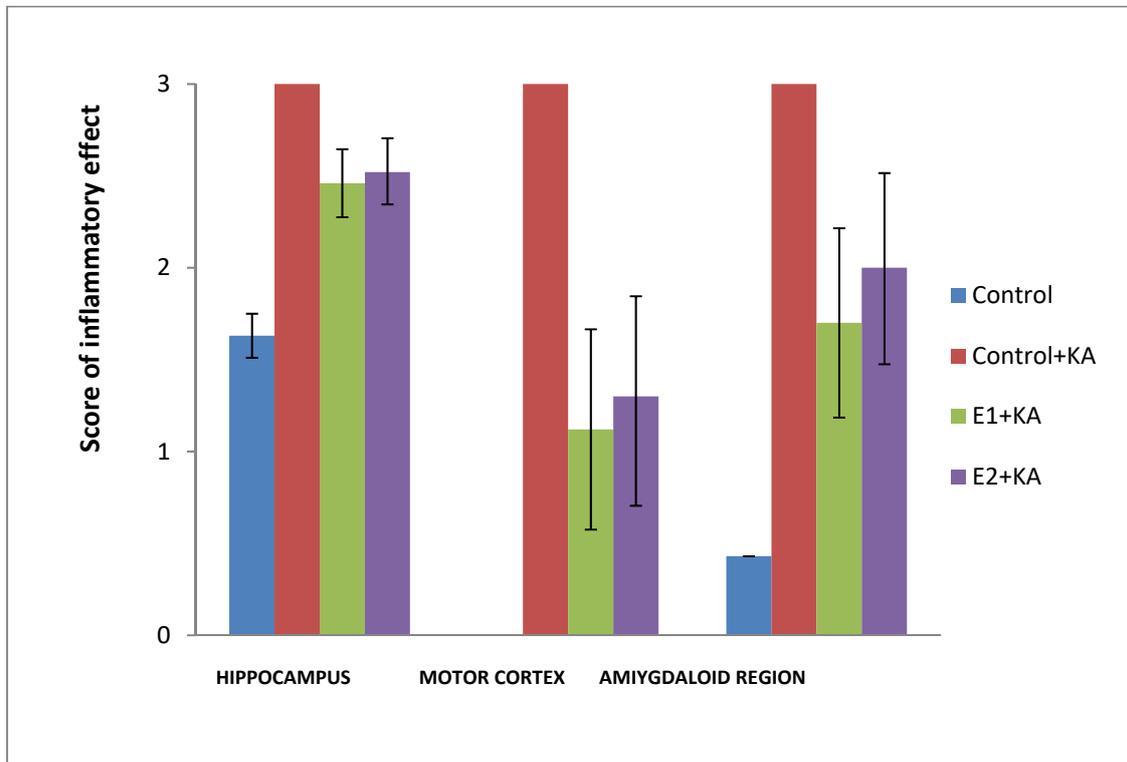


Figura 12. Cuantificación de la astrogliosis utilizando la escala numérica para la tinción inmunohistoquímica contra GFAP en el hipocampo, la corteza motora y la región amigdaloides en ratones control, ratones con ácido kaínico y ratones con extractos E1 y E2 antes del tratamiento con ácido kaínico.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. Resumen

Podemos afirmar que los dos extractos de aceitunas estudiados tienen actividad neuroprotectora contra la neurotoxicidad de KA en ratones, minimizando los síntomas epilépticos e incluso aumentando la supervivencia. El tratamiento con estos extractos durante un mes redujo significativamente la aparición de síntomas epilépticos y mortalidad asociados con el daño neuronal causado por KA, lo que induce la generación de especies reactivas de oxígeno asociadas con el daño neuronal (Ueda et al., 2002). Nuestros resultados sugieren que ambos extractos estudiados protegen al cerebro de la pérdida de neuronas características del tratamiento con KA en las regiones CA1, CA3 y giro dentado, lo que indica el posible efecto neuroprotector de los extractos observados histológicamente en la tinción H&E. Del mismo modo, en la tinción inmunohistoquímica contra la proteína GFAP, ambos extractos ricos en polifenoles presentaron un efecto antiinflamatorio que redujo la astrogliosis reactiva (un proceso de proliferación e hipertrofia de los astrocitos característicos del daño neuronal). Estos resultados sugieren un posible papel preventivo y / o terapéutico para los extractos ricos en polifenoles estudiados en procesos patológicos de daño oxidativo e inflamación.

6.2. Fortalezas y limitaciones

La principal fortaleza de este estudio es el concepto de investigación que incluyó el uso de extractos de oliva ricos en antioxidantes polifenólicos en la prevención del daño neurológico causado por KA. Hasta ahora, esta línea de investigación no se había utilizado en el estudio del posible efecto preventivo, solo en el tratamiento del daño existente; actualmente, el daño neuronal se trata una vez ha ocurrido ese deterioro.

Sin embargo, creemos que es de gran interés el estudio de un posible efecto preventivo contra un daño neurológico antes de que se produzca ese mal.

Como otras fortalezas, cabe señalar que, como en el presente estudio, los extractos utilizados previamente han demostrado ser biológicamente seguros (Veciana-Galindo et al., 2014).

También, hay que hacer constar que el análisis estadístico se realizó durante el seguimiento después de la inyección de KA.

Otra fortaleza de este estudio es el uso de medidas cuantificables y reproducibles de daño neuronal, como lo es la escala de daño neurológico utilizado y la observación directa por tinción histológica de cambios morfológicos en áreas del cerebro.

Como limitaciones, indicamos el pequeño tamaño de la muestra, que se resolvió con los buenos resultados obtenidos. En ese sentido debemos hacer constar la necesidad de llegar a un equilibrio entre los objetivos planteados y el número de animales a utilizar por razones éticas.

Además, estos ensayos deben repetirse en modelos animales superiores para extrapolar estos resultados a su posible aplicación clínica.

6.3. Comparación con la literatura.

La asociación entre polifenoles naturales y neuroprotección ya ha sido ampliamente estudiada en la literatura. En particular, los polifenoles naturales atenuaron significativamente el deterioro cognitivo y la carga de beta-amiloide (Ramassamy, 2006;

Wang et al., 2008). El ácido rosmarínico también ejerce un efecto neuroprotector en ratas en las cuales el estado epiléptico es inducido por KA.

Este efecto neuroprotector parece estar relacionado con sus propiedades de eliminación de radicales libres y su capacidad para modular algunos de los eventos en cascada intracelulares que conducen a la muerte neuronal (Khamse et al., 2015). En un estudio previo con extractos de aceituna, pero sin tratamiento preventivo, en un modelo de pez cebra en el que se indujo daño neuronal con KA, se demostró que los polifenoles extraídos de hueso de aceituna producían un aumento de la actividad colinérgica durante el desarrollo neurológico, actuando como neuroprotector (Cortés-Castell et al., 2014).

También se ha analizado el uso de sulforafano. Este antioxidante comprobado, derivado del brócoli y otras verduras crucíferas, induce genes sensibles al Nrf2 en el cerebro de la rata. Administrado en una dosis única 15 minutos después de la isquemia, inducida por daño oxidativo, el sulforafano reduce significativamente el volumen de infarto cerebro vascular en roedores (Zhao et al., 2006).

El papel de otro polifenol, la curcumina, se ha analizado en un modelo de epilepsia en ratones, y se ha observado que la curcumina atenúa las convulsiones inducidas por KA, el estrés oxidativo y la consiguiente muerte neuronal (Shin et al., 2007). Los ginsenósidos (saponinas terpenoides de *Panax ginseng*) se han estudiado ampliamente en modelos de epilepsia in vivo, lo que demuestra que atenúan la actividad de las convulsiones inducidas por KA (Lian et al., 2006; Shi et al., 2018).

La actividad de los ginsenósidos purificados individuales y las mezclas de estos ginsenósidos se examinó una hora antes del daño inducido por KA, pilocarpina o pentilenetrazol, y se encontró que el mayor efecto anticonvulsivo se obtuvo con una mezcla de ginsenósidos (Lian et al., 2006). Esto apoya la sinergia de los polifenoles y el uso de extractos complejos, en lugar de polifenoles purificados, como se ha realizado en el presente estudio. Se ha observado que el efecto de los ginsenósidos ocurre a través de la vía de señalización de Nrf2 / ARE, por incubación durante 10 minutos antes de la inducción del daño neural con pentilenetrazol (Shin et al., 2009).

El hidroxitirosol, uno de los principales polifenoles en las aceitunas, se ha utilizado con éxito en el tratamiento temprano de la enfermedad de Parkinson. La administración de hidroxitirosol produce sustancialmente efectos beneficiosos sobre rendimiento conductual y neuropatología, informados previamente en ratones TgCRND8

alimentados con oleuropeína aglicona, resultando una neuroprotección comparable (Nardiello et al., 2018). El hidroxitirosol sugiere posibles aplicaciones para la prevención o el tratamiento potencial de enfermedades amiloides, o como una estructura molecular modelo para el diseño de moduladores mejorados (Orsini et al., 2018).

También se ha demostrado la inhibición de las enzimas implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer por los biofenoles del olivo, incluidas la enzima productora beta amiloide primaria, la β -secretasa y las enzimas de progresión de la enfermedad, como acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, histona desacetilasa y tirosinasa junto con la catecolamina L-DOPA. Por lo tanto, los biofenoles de oliva podrían ser un inhibidor natural prometedor, que puede reducir la toxicidad inducida por enzimas asociada con el estrés oxidativo involucrado en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Omar et al., 2018).

Un reciente estudio in vivo en ratas macho Sprague-Dawley reveló el enorme efecto antioxidante del extracto de hoja de olivo que disminuye el estrés oxidativo y la lesión cardíaca, hepática y renal inducida por la doxorrubicina (Kumral et al., 2015). Actualmente existe una patente en la que se destaca la importancia de los polifenoles derivados de las aceitunas en las enfermedades neurodegenerativas (Crea, 2017).

6.4. Implicaciones para la investigación y la práctica clínica.

Dado el carácter antioxidante y neuroprotector de nuestros extractos pueden ser incluidos en la dieta de personas sanas como complemento nutricional, para junto con las medidas higiénico-dietéticas de vida sana, ayudar a prevenir el estrés oxidativo presente en la vida cotidiana.

Además nuestros resultados sugieren que dichos extractos pueden jugar un papel neuroprotector profiláctico en los procesos patológicos de daño oxidativo e inflamación, con perspectivas futuras para la prevención de enfermedades neurodegenerativas crónicas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Parkinson, que tienen en común la generación de estrés oxidativo (Choi et al., 2012), siendo candidatos para ser utilizados como complementos nutricionales y como coadyudantes de las terapias existentes.

Por otro lado en la lesión cerebral traumática, se está estudiando la terapia antioxidante en las 24 horas posteriores al trauma, específicamente con ácido lipofílico (Rocamonde et al., 2013). Como resultado de su alto poder antioxidante, otra opción podrían ser los extractos de oliva utilizados como terapia antioxidante durante las 24 horas posteriores a un trauma en la cabeza.

Claramente, es necesario realizar muchos ensayos en animales de experimentación antes de que su efectividad pueda validarse en humanos, siendo esta una línea de investigación que nos parece que puede ser de gran interés.

Otra posible aplicación sería como un nootrópico, dado el alto contenido de hidroxitirosol de nuestros extractos y el hecho de que cruzan la barrera hematoencefálica, ya que se observan diferencias histológicas en el cerebro. Es decir, podrían usarse como potenciadores de las funciones cerebrales: atención, rendimiento intelectual, memoria, etc...

Todos estos puntos, abren un amplio campo de investigación, y es esencial comprender los mecanismos de acción y la variedad de sustancias presentes en los extractos de oliva que tienen las actividades protectoras descritas anteriormente. Creemos que sería interesante determinar en qué rutas moleculares estarían implicados dichos compuestos en los cerebros de ratones tratados con KA y si estas rutas se modifican cuando los ratones han sido suplementados previamente con extractos del olivo.

Por último, y no por ello de menor interés o importancia, creemos que el problema se incrementa con el hecho ya demostrado por algunos investigadores del efecto sinérgico entre las diferentes biomoléculas presentes en los extractos, lo cual complica el estudio de los mecanismos de acción de cada uno de los componentes de los extractos.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

7.1. La administración de extractos de oliva no alteró la ingesta de alimentos y líquidos ni la evolución normal del peso de los ratones durante 30 días, lo que demostró que estos extractos no influyeron en el estado general de salud de los ratones.

7.2. Los extractos de oliva ricos en polifenoles, producen una disminución de los síntomas epilépticos inmediatamente después de la inducción por ácido kaínico.

7.3. Dichos extractos previenen la muerte en los ratones tratados en los días posteriores a la inducción con ácido kaínico.

7.4. Se constata una disminución del daño histopatológico producido por el ácido kaínico en los ratones tratados previamente con extractos del olivo.

7.5. Se puede afirmar que los extractos procedentes del olivo ricos en polifenoles muestran neuroprotección y una disminución en la neuroinflamación causada por ácido kaínico en un modelo de ratón, confirmándose la hipótesis del trabajo.

8. ANEXO

8. ANEXO

ANEXO 1

1. Cortés-Castell E, Veciana-Galindo C, Torró-Montell L, Palazón-Bru A, **Sirvent-Segura E**, Gil-Guillén V, Rizo-Baeza M. Protection by polyphenol extract from olive stones against apoptosis produced by oxidative stress in human neuroblastoma cells. *NutrHosp.* 2016; 33:118-22. doi: 10.20960/nh.39.

Indicios de calidad:

Índice de impacto: 0.747.

Posición: año 2016 posición 68/81 Q4 Nutrition&Dietetics y 107/337 Q2 Agricultural Sciences.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abuznait AH, Qosa H, Busnena BA, El Sayed KA, Kaddoumi A. Olive-oil-derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. ACS Chem Neurosci.2013;4:973-82. doi: 10.1021/cn400024q.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 1998; 281: 1322-6.
- Agudo M, Trejo JL, Lim F, Avila J, Torres-Alemán I, Diaz-Nido J, Wandosell F. Highly efficient and specific gene transfer to Purkinje cells in vivo using aherpes simplex virus I amplicon. Hum Gene Ther. 2002;13: 665-74.
- Ahmad-Qasem, M.H., Barraji3n-Catal3n, E., Micol, V., Mulet, A. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. Food research international, 2013.50(1): p. 189-196.
- Aldini G, Piccoli A, Beretta G, Morazzoni P, Riva A, Marinello C, Maffei Facino R. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. Fitoterapia2006; 77:121-8.

- Angeloni, C.; Malaguti, M.; Barbalace, M.C.; Hrelia, S. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2230-2236.

- Ashrafi, M. R. et al. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia.* 48,1750- 5 (2007).

- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S et al. The syn- temic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 2000; 10: 1351-8.

Bartlett H, Eperjesi F. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic PhysiolOpt*2003; 23:383-99.

- Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electro- graphic, clinical and pathological alterations following sys- temic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: Metabolic mapping using the deoxyglucose method with spe- cial reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1981; 6: 1361-91.

- Bigagli, E., Cinci, L., Paccosi, S., Parenti, A., D'Ambrosio, M. &Luceri, C. Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol.* 43,147-55 (2017).

- Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*2003; 14:2415-9.

- Bleys J, Miller E, Pastor-Barriuso R, Appel L, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006; 84 (4): 880-7.

- Bowman TV, Zon LI. Swimming into the future of drug discov- ery: in vivo chemical screens in zebrafish. *ACS Chem Biol* 2010; 5: 159-61.

- Bravin M, Morando L, Vercelli A, Rossi F, Strata P. Control of spine formation by electrical activity in the adult rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1704-9.

- Brorson JR, Manzolillo PA and Miller RJ. Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purk- inje cells. *J Neurosci* 1994; 14: 187-97.

- Brorson JR, Manzolillo PA, Gibbons SJ and Miller RJ. AMPA receptor desensitization predicts the selective vulnerability of cerebellar Purkinje cells to excitotoxicity. *J Neurosci* 1995; 15: 4515-24.
- Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014, 81, 229-238.
- Carmona-Aparicio, L. et al. Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy. *Int J Mol Sci*. 16,18348-67 (2015).
- Casamenti, F.; Stefani; M. Olive polyphenols: New promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. *Expert Rev. Neurother*. 2017, 17, 345–358.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:299-309.
- Cherubini A, Vigna G, Zuliani G, Ruggiero C, Senin U, Fellin R. «Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update». *Curr Pharm Des* 2005; 11 (16): 2017-32.
- Cheung YT, Lau WKW, Yu MS, Lai CSW, Yeung SC, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neuro Toxicol* 2009; 30:127-35.
- Cho, I.H.; Kim, S.W.; Kim, J.B.; Kim, T.K.; Lee, K.W.; Han, P.L.; Lee, J.K. Ethyl pyruvate attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *J. Neurosci. Res*. 2006, 84, 1505-1516.
- Choi, D.W.; Rothman, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci*. 1990, 13, 171-182.
- Choi, D.Y.; Lee, Y.J.; Hong, J.T.; Lee, H.J. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull*. 2012, 87, 144-153.
- Commenges D. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 357-63.

- Cortés E, Veciana C, Torro L, Sirvent E, Rizo MM et al. Actividad antiinflamatoria de un extracto polifenólico de hueso de olivas en la línea celular de monocitos humanos THP1-XBLUE-CD14. *NutrHosp*2014; 30:113-7.
- Cortés E, Veciana C, Torro L, Sirvent E, Rizo MM, et al. Efecto sobre el neurodesarrollo y neuroprotección en pez cebra de un extracto polifenólico de huesos de aceituna. *NutrHosp*2014; 30:338-42.
- Covas MI, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Sebastia N, De-la-Torre-Boronat C, et al. Virgin olive oil polyphenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation. *Int J Pharm Res* 2000;20:49-54.
- Crea, R. Treatment of early stage Parkinson's disease with hydroxytyrosol containing polyphenol formulation. Patent HT (Burlingame, CA, US), application Number: 15/394784, publication Date: 12/28/2017.
- D'Angelo S, Ingrosso D, Migiarrdi V, Sorrentino A, Donnarumma G, et al. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free RadicBiol Med* 2005; 38:908-19.
- de la Puerta R, Martinez Dominguez ME, Ruiz-Gutierrez V. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitergic neurotransmission. *Life Sci* 2001; 69 (10): 1213-22.
- De Marco E, Savarese M, Paduano A, Sacchi R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem* 2007; 104:858-67.
- Dekanski D, Selakovi V, Piperski V, Radulovi Z, Koreni A, Radenovi L. Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. *Phytomed* 2011; 18 (13): 1137-43.
- Ding, M.; Haglid, K.G.; Hamberger, A. Quantitative immunochemistry on neuronal loss, reactive gliosis and BBB damage in cortex/striatum and hippocampus/amygdala after systemic kainic acid administration. *Neurochem. Int.* 2000, 36, 313-318.
- El Assar, M.; Angulo, J.; Rodríguez-Mañas, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, 65, 380–401.

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
- Fabiani R, De Bartomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Disaverio C, Morozzi G. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr* 2006; Mar 136 (3): 614-9.
- Fahey, J.W.; Zalcmann, A.T.; Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 2001, 56, 51–55.
- Frederickson, C.J.; Hernandez, M.D.; McGinty, J-F. Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res.* 1989, 480, 317-338.
- Furneri PM, Piperno A, Sajia A, Bisignano G. Antimycoplasmas activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4892-4.
- Gao M, Zhang WC, Liu QS, Hu JJ, Liu GT, Du GH. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio. *Eur J Pharmacol* 2008; 591: 73-9.
- Garcia-Moral, R. Laboratorio de Anatomía Patológica, McGraw-Hill/Interamericana, 1993. Madrid.
- Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res* 2006; 84:755-67.
- Gold, R. et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 367,1098-107 (2012).
- Goszcz, K.; Duthie, G.G.; Stewart, D.; Leslie, S.J.; Megson, I.L. Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: Chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174, 1209–1234.
- Grossi, C.; Rigacci, S.; Ambrosini, S.; Dami, T.E.; Luccarini, I.; Traini, C.; Failli, P.; Berti, A.; Casamenti, F.; Stefani, M.; et al. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PloS One* 2013, 8, 702-710.

- Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 717-24.
- Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005; 81:268S–276S.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 31, 261-72 (1999).
- 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 NutrBiochem* 2010 Jul; 21 (7): 634-44.
- Hopkins, K.J.; Wang, G.; Schmued, L.C. Temporal progression of kainic acid induced neuronal and myelin degeneration in the rat forebrain. *Brain Res.* 2000, 864, 69-80.
- Hughes J, Kelly CN, Buttriss J. «A review of the epidemiological evidence for the ‘antioxidant hypothesis’». *Public Health Nutr* 2004; 7 (3): 407-22.
- Jacomelli M, Pitozzi V, Zaid M, Larrosa M, Tonini G, Martini A, Urbani S, Taticchi A, Servili M, Dolaro P, Giovannelli L. Dietary extra-virgin olive oil rich in phenolic antioxidants and the aging process: long-term effects in the rat. *J NutrBiochem* 2010 Apr; 21 (4): 290-6.
- Jaworska-Feil L, Jantas D, Leskiewicz M, Budziszewska B, Kubera M, et al. Protective effects of TRH and its analogues against various cytotoxic agents in retinoic acid (RA)-differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuropeptides* 2010; 44:495-508.
- Jellinger, K. A. General aspects of neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl.* 65, 101-44 (2003).
- 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; Apr 23; 56 (8): 2630-6.
- Jordan E, Lovett DK, Monahan FJ, Callan J, Flynn B, O’Mara FP. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J Anim Sci* 2006; 84 (1): 162-70.

- Jørgensen, M.B.; Finsen, B.R.; Jensen, M.B.; Castellano, B.; Diemer, N.H.; Zimmer, J. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 1993, 120, 70-88.
- Khamse, S.; Sadr, S.S.; Roghani, M.; Hasanzadeh, G.; Mohammadian, M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharm. Biol.* 2015, 53, 1818-1825.
- Kim HJ, Song JY, Park HJ, Park HK, Yun DH, et al. Naringin Protects against Rotenone-induced Apoptosis in Human Neuroblastoma SHSY5Y Cells. *Kor J PhysiolPharmacol*2009; 13:281-5.
- Kim, E.J.; Lee, J.E.; Kwon, K.J.; Lee, S.H.; Moon, C.H.; Baik, E.J. Differential roles of cyclooxygenase isoforms after kainic acid-induced prostaglandin E(2) production and neurodegeneration in cortical and hippocampal cell cultures. *Brain Res.* 2001, 908, 1-9.
- Kim, HS. ; Quon, M.J.; Kim, J.A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol.* 2014, 2, 187–195.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullman B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Deve- lop Dyn* 1995; 203: 255-310.
- Kumral, A.; Giriş, M.; Soluk-Tekkeşin, M.; Olgaç, V.; Doğru-Abbasoğlu, S.; Türkoğlu, Ü.; Uysal, M. Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. *Pathophysiology.* 2015, 22, 117-123.
- Lavandero, S.; Chiong, M.; Rothermel, B.A.; Hill, J.A. Autophagy in cardiovascular biology. *J. Clin. Investig.* 2015, 125, 55–64.
- Levine, B.; Mizushima, N.; Virgin, H.W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011, 469, 323–335.
- Lian, X.Y.; Zhang, Z.; Stringer, J.L. Anticonvulsant and neuroprotective effects of ginsenosides in rats. *Epilepsy Res.* 2006. 70, 244-256.
- Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 353-67.

- Lindahl PE, Oberg KE. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp Cell Res* 1961; 23:228-37.
- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, et al. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2004; 24:9993-10002.
- Lowenstein, J. Seizures and epilepsy. Longo, D.L.; Fauci, A.S.; Kasper, D.L.; Hauser, S.L.; Jameson, J.H.; Loscalzo, J (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, New York. 2008, pp: 2498-2512.
- Manoharan, S.; Guillemin, G.J; Abiramasundari, R.S; Essa, M.M.; Akbar, M.; Akbar, M.D. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016, 2016, 859-578.
- Mariani, E., Polidori, M. C., Cherubini, A. & Mecocci, P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 827, 65-75 (2005).
- Martinc, B.; Grabnar, I.; Vovk, T. The role of reactive species in epileptogenesis and influence of antiepileptic drug therapy on oxidative stress. *Curr. Neuropharmacol.* 2012, 10, 328-243.
- Matsuoka, Y.; Kitamura, Y.; Okazaki, M.; Kakimura, J.; Tooyama, I.; Kimura, H.; Taniguchi, T. Kainic acid induction of heme oxygenase in vivo and in vitro. *Neuroscience.* 1998, 85, 1223-1233.
- Matute, C.; Gutiérrez-Igarza, K.; Río, C.; Miledi, R. Glutamate receptors in astrocytic end-feet. *Neuroreport.* 1994, 5, 1205-1208.
- Meldrum, B.; Garthwaite, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990, 11, 379-387.
- Meng, D.W.; Liu, H.G.; Yang, A.C.; Zhang, K.; Zhang, J.G. Stimulation of Anterior Thalamus Nuclei Protects Against Seizures and Neuronal Apoptosis in Hippocampal CA3 Region of Kainic Acid-induced Epileptic Rats. *Chin. Med. J. (Engl).* 2016, 129, 960-966.

- Migliore, L., Fontana, I., Colognato, R., Coppedè, F., Siciliano, G. & Murri, L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging*. 26, 587–595 (2005).
- Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasouljan B, Hashemi P, Pour MR. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomed* 2011; 18: 170-5.
- MohdSairazi, N.S.; Sirajudeen, K.N.; Asari, M.A.; Muzaimi, M.; Mummedy, S.; Sulaiman, S.A. Kainic Acid-Induced Excitotoxicity Experimental Model: Protective Merits of Natural Products and Plant Extracts. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 972-995.
- Morrison ME, Mason CA. Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling. *J Neurosci* 1998; 18:3563-73.
- Nardiello, P.; Pantano, D.; Lapucci, A.; Stefani, M.; Casamenti, F. Diet Supplementation with Hydroxytyrosol Ameliorates Brain Pathology and Restores Cognitive Functions in a Mouse Model of Amyloid- β Deposition. *J. Alzheimers Dis.* 2018, 63, 1161-1172.
- Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat Genet* 2000; 26: 216-20.
- Newman M, Verdile G, Martins RN, Lardelli M. Zebrafish as a tool in Alzheimer’s disease research. *BiochimBiophys Acta* 2011; 1812: 346-52.
- Obied HK, Bedgood DR Jr, Prenzler PD, Robards K. Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive mill waste. *J Agric Food Chem* 2008; Jun 11; 56 (11): 3925-32.
- Obied HK, Prenzler PD, Konczak I, Rehman AU, Robards K. Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative in vitro bioassays. *Chem Res Toxicol* 2009; 22:227-34.
- Oltavi ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74:609-19.

- Omar, S. H., Scott, C. J., Hamlin, A. S. & Obied, H. K. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. *J NutrBiochem.* 47,1-20 (2017).
- Omar, S.H.; Scott, C.J.; Hamlin, A.S.; Obied, H.K. Biophenols: Enzymes (β -secretase, Cholinesterases, histone deacetylase and tyrosinase) inhibitors from olive (*Olea europaea* L.). *Fitoterapia.* 2018, 128, 118-129.
- Orsini, F.; Ami, D.; Lascialfari, A.; Natalello, A. Inhibition of lysozyme fibrillogenesis by hydroxytyrosol and dopamine: An Atomic Force Microscopy study. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 111, 1100-1105.
- Owen RW, Haubner R, Wurtele G, Hull E, Spiegelhader B, et al. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*2004;13:319-26.
- Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V et al. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* 2006; 3: 235-47.
- Penkowa, M.; Molinero, A.; Carrasco, J.; Hidalgo, J. Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience.* 2001, 102, 805-818.
- Pereira-Caro G, Madrona A, Mateos R, Rodríguez G, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, Espartero JL. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules* 2009 May 11; 14 (5): 1762-72.
- Perez-Navarro E, Gavalda N, Gratacos E, Alberch J. Brain-derived neuro- trophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum. *J Neurochem*2005; 92:678-91.
- Perry, G., Cash, A. D. & Smith, M. A. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J Biomed Biotechnol.* 2,120-123 (2002).
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, et al. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 1995; 78:151-60.
- Quiles JL, Huertas JR, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J, et al. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. *Nutr*2003; 19:363-8.

- Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32, 281-94 (1972).
- Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano M. Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Am J Epidemiol* 2004; 160 (4): 339-49.
- Ramassamy, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.* 2006, 545, 51-64.
- Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci* 2013; 14 (9): 18284-318.
- Reddy, K.S. Global Burden of Disease Study 2015 provides GPS for global health 2030. *Lancet* 2016, 388, 1448–1449.
- Reiter, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9, 526-33 (1995).
- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 608-17.
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328 (20): 1450-6.
- Rocamonde, B.; Paradells, S.; Barcia, C.; Garcia Esparza, A.; Soria, J.M. Lipoic acid treatment after brain injury: study of the glial reaction. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 2013, 521-539.
- Schaffer S, Müller WE, Eckert GP. Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res* 2010; 62:322-7.
- Sears B, Ricordi C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012;16: 1137-54.

- Serra, A., Rubió, L., Borràs, X., Macià, A., Romero, M. P. & Motilva, M. J. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res.* 56, 486-96 (2012).
- Shi, Y.; Miao, W.; Teng, J.; Zhang, L. Ginsenoside Rb1 Protects the Brain from Damage Induced by Epileptic Seizure via Nrf2/ARE Signaling. *Cell Physiol. Biochem.* 2018, 45, 212-225.
- Shin, E.J.; Jeong, J.H.; Chung, Y.H.; Kim, W.K.; Ko, K.H.; Bach, J.H.; Hong, J.S.; Yoneda, Y.; Kim, H.C. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem. Int.* 2011, 59, 122-137.
- Shin, E.J.; Jeong, J.H.; Kim, A.Y.; Koh, Y.H.; Nah, S.Y.; Kim, W.K.; Ko, K.H.; Kim, H.J.; Wie, M.B.; Kwon, Y.S.; Yoneda, Y.; Kim, H.C. Protection against kainate neurotoxicity by ginsenosides: attenuation of convulsive behavior, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* 2009, 87, 710-722.
- Shin, H.J.; Lee, J.Y.; Son, E.; Lee, D.H.; Kim, H.J.; Kang, S.S.; Cho, G.J.; Choi, W.S.; Roh, G.S. Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice. *Neurosci. Lett.* 2007, 416, 49-54.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; (2): 291-5.
- Singh, M.; Arseneault, M.; Sanderson, T.; Murthy, V.; Ramassamy, C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 4855-4873.
- Singh. N.; Vijayanti, S.; Saha, L.; Bhatia, A.; Banerjee, D.; Chakrabarti, A. Neuroprotective effect of Nrf2 activator dimethyl fumarate, on the hippocampal neurons in chemical kindling model in rat. *Epilepsy Res.* 2018, S0920-1211, 305-313.
- Singleton, R. H., Yan, H. Q., Fellows-Mayle, W. & Dixon, C. E. Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 27, 1091-9 (2010).
- Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, LeMieux M, Greer B, Moustaid-Moussa N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J NutrBiochem* 2013 Apr; 24 (4): 613-23.

- Sloviter, R.S.; Bumanglag, A.V. Defining "epileptogenesis" and identifying "antiepileptogenic targets" in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology*. 2013, 69, 3-15.
- Smith et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 765.
- Sofroniew, M.V.; Vinters, H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010, 119, 7-35.
- Soni MG, Burdock GA, Christian MS, Bitler CM, Crea R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem Toxicol* 2006 Jul; 44 (7): 903-15.
- Souza, M.A.; Oliveira, M.S.; Furian, A.F.; Rambo, L.M.; Ribeiro, L.R.; Lima, F.D.; Dalla Corte, L.C.; Silva, L.F.; Retamoso, L.T.; Dalla Corte, C.L.; Puntel, G.O.; de Avila, D.S.; Soares, F.A.; Figuera, M.R.; de Mello, C.F.; Royes, L.F. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia*. 2009, 50, 811-823.
- Sperk, G. Kainic acid seizures in the rat. *Prog. Neurobiol*. 1994, 42, 1-32.
- Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 928, 22-38 (2001).
- Sun, W. et al. Oleuropein improves mitochondrial function to attenuate oxidative stress by activating the Nrf2 pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology*. 113, 556-66 (2017).
- Peña-Oyarzun, D.; Bravo-Sagua, R.; Diaz-Vega, A.; Aleman, L.; Chiong, M.; Garcia, L.; Bambs, C.; Troncoso, R.; Cifuentes, M.; Morselli, E.; et al. Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: A matter of the inflammatory state? *Free Radic. Biol. Med*. 2018, 124, 61–78.
- Tangney CC, Rasmussen HE. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2013; 15:324.
- Ueda, Y., Yokoyama, H., Nakajima, A., Tokumaru, J., Doi, T. & Mitsuyama, Y. Glutamate excess and free radical formation during and following kainic acid-induced status epilepticus. *Exp Brain Res*. 147, 219-26 (2002).

- Vauzour D, Corona G, Spencer JP. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *ArchBiochemBiophys*2010; 501:106-11.
- Veciana C, Cortés E, Torro L, Sirvent E, Rizo M, Gil V. Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Nutr Hosp* 2014; 6: 1388-93.
- Veciana-Galindo, C. et al. Antiadipogenic activity of an olive seed extract in mouse fibroblasts. *Nutr Hosp.* 31, 2747-51 (2015).
- Velísková J, Velísek L, Mares P. Epileptic phenomena produced by kainic acid in laboratory rats during ontogenesis. *PhysiolBohemoslov* 1988; 37: 395-405.
- Visoli F. Antioxidant and aother biological activities of phenols from olives and olives oil. *Med Res Rev* 2001; 22: 65-75.
- Walz, W.; Lang, M.K. Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 1998, 257, 127-130.
- Wang J, Wen L, Huang Y, Chen Y, Ku M. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr Pharm Des* 2006; 12 (27): 3521-33.
- Wang, J.; Ho, L.; Zhao, W.; Ono, K.; Rosensweig, C.; Chen, L.; Humala, N.; Teplow, D.B.; Pasinetti, G.M. Grape-derived polyphenolics prevent A beta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 2008, 28, 6388-6392.
- Wang, Q.; Yu, S.; Simonyi, A.; Sun, G.Y.; Sun, A.Y. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 2005, 31, 3-16.
- Weise, J.; Engelhorn, T.; Dörfler, A.; Aker, S.; Bähr, M.; Hufnagel, A. Expression time course and spatial distribution of activated caspase-3 after experimental status epilepticus: contribution of delayed neuronal cell death to seizure-induced neuronal injury. *Neurobiol. Dis.* 2005, 18, 582-590.

- Wintergerst E, Maggini S, Hornig D. «Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions». *Ann Nu- tr Metab* 2006; 50 (2): 85-94.
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I. M., Tieleman, D. P. & Monticelli, L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J.* 93,4225-36 (2007).
- Woodside J, McCall D, McGartland C, Young I. Micronutrients: dietary intake v. supplement use. *Proc Nutr Soc* 2005; 64 (4): 543-53.
- World Health Organization. *Global Action Plan for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases: 2013–2020*; WHO: Geneva, Switzerland, 2013.
- Yan, B.C.; Xu, P.; Gao, M.; Wang, J.; Jiang, D.; Zhu, X.; Won, M.H.; Su, P.Q. Changes in the Blood-Brain Barrier Function Are Associated With Hippocampal Neuron Death in a Kainic Acid Mouse Model of Epilepsy. *Front. Neurol.* 2018, 9, 775.
- Zbidi H, Salido S, Altarejos J, Perez-Bonilla M, Bartegi A, Rosa- do JA, Salido GM. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood Cells Mol Dis* 2009; May-Jun; 42 (3): 279-85.
- Zhang L, Yu H, Sun Y, Lin X, Chen B, et al. Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol* 2007; 564:18-25.
- Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L. Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappaB activation in THP-1 cells. *Biol Pharm Bull* 2009; 32 (4): 578-82.
- Zhao, J.; Kobori, N.; Aronowski, J.; Dash, P.K. Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neurosci. Lett.* 2006, 393, 108-112.
- Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 35-44.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su amor, su cariño y por apoyarme incondicionalmente. A mi padre por su alegría y por creer en mí. A mi madre por su paz.

A mi hermano por sus charlas y su apoyo a lo largo de la vida.

A Borja por serlo todo...

A Eliana y a Sofia por su luz, son el mejor regalo.

A mis abuelos que desde el cielo estarán orgullosos de mí.

A mi toda mi familia, mis suegros, cuñados, sobrinos....por estar ahí.

A cada compañero de Biopartner..., en especial a Laura por su ayuda y sobretodo a Mamen por su apoyo laboral y personal.

A mis jefes: la familia Alberola por su implicación en la investigación y permitirme desarrollar esta tesis en su empresa.

A mi antiguo jefe Dr. Enrique Pérez-Payá, él quería que hiciera la tesis hace muchos años y donde ahora esté estará contento....

A Pino por enseñarme tanto y tan bien.

A mi antiguo grupo del CIPF (Centro Investigación Príncipe Felipe): Puig, Mar, Ally, Rodrigo, Inma, Mónica, Carmen y muchos más...porque trabajábamos mucho y nos divertíamos a la vez.

A mi director de tesis Dr.Ernesto Cortés Castell por tirar de mí y ayudarme en toda la tesis.

