



**EVALUACIÓN IN VITRO E IN VIVO DEL
POTENCIAL BIOACTIVO SOBRE
NEUROPROTECCION Y OBESIDAD DE UN
EXTRACTO DEL OLIVO.**



Memoria presentada para
optar al grado de Dra. por:

CARMEN VECIANA GALINDO

Director:
Prof. Dr. Ernesto Cortés Castell

DICIEMBRE 2013





Ernesto Cortés Castell, Profesor Titular y Secretario del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Universidad Miguel Hernández

CERTIFICA:

Que la memoria de tesis:

"Evaluación in vitro e in vivo del potencial bioactivo sobre neuroprotección y obesidad de un extracto de olivo",

ha sido realizada por:

D^a Carmen Veciana Galindo,

bajo mi dirección

San Juan 1 de Diciembre de 2013

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Ernesto Cortés Castell', is written over a diagonal line.

Fdo.: Ernesto Cortés Castell





A mi padre.



Agradecimientos

A Biopartner, por haberme dejado aprender todo esto y más. A Luis por no dejar de insistir y confiar en mi, a Eliana por ofrecerme su ayuda desde el principio y a Laura por ser mis manos, y mi cabeza a veces.

Al Dr. Ernesto Cortés, mi director de tesis, por haberme hecho las cosas tan sencillas, fáciles prácticas.

A todos los que han hecho posible este trabajo.

Por supuesto a mi padre por pedirme que lo hiciera.





Contenido

EVALUACIÓN IN VITRO E IN VIVO DEL POTENCIAL BIOACTIVO SOBRE NEUROPROTECCION Y OBESIDAD DE UN EXTRACTO DEL OLIVO.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES	14
1.1.1. Acción de alimentos sobre el sistema nervioso central	15
1.1.2. Prevención de enfermedades	16
1.1.3. Control del apetito	18
1.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL OLIVO.....	21
1.2.1. Polifenoles	25
1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	34
2. OBJETIVOS	41
2.1. OBJETIVO GENERAL	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
2.2.1. Relacionados con la neuroprotección	41
2.2.2. Relacionados con el estado nutricional	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1. MATERIALES.....	45
3.1.1. Aparatos.....	45
3.1.2. Material fungible	45
3.1.3. Reactivos y tampones	46
3.1.4. Líneas celulares y embriones.....	48
3.2. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA FRACCIÓN EXTRAÍDA DEL OLIVO	48
3.3. EVALUACIÓN DE LA BIOSEGURIDAD DEL EXTRACTO.	49
3.4. NEUROPROTECCIÓN.	51
3.4.1. Selección de modelos celulares y biomarcadores génicos.	51
3.4.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad neuroprotectora mediante cultivos celulares.	53
3.4.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad neuroprotectora mediante modelo de pez cebra.....	59
3.5. EVALUACIÓN REPERCUSIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL.....	63
3.5.1. Selección de modelos celulares y biomarcadores génicos	63
3.5.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad anti-obesidad mediante cultivos celulares.	64
3.5.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad mediante modelo de pez cebra.....	68

3.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO	76
4. RESULTADOS	79
4.1. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA FRACCIÓN EXTRAÍDA DEL OLIVO	79
4.2. EVALUACIÓN DE LA BIOSEGURIDAD DEL EXTRACTO	80
4.2.1. Mortalidad acumulativa a cada concentración y a 24, 48 y 72 horas	81
4.2.2. Efectos subletales del extracto de estudio a cada concentración y a 24, 48 y 72 horas	81
4.2.3. Efectos teratogénicos del extracto de estudio a cada concentración y a 24, 48 y 72 horas.	82
4.2.4. Porcentaje de eclosión de los embriones en función de la dosis y el tiempo.	82
4.2.5. Determinación de LC50, LOEC y NOEC.	82
4.3. NEUROPROTECCIÓN	84
4.3.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad neuroprotectora mediante cultivos celulares	84
4.3.2. Análisis de la expresión génica	88
4.3.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad neuroprotectora en embriones y alevines de pez cebra.	91
4.4. EVALUACION REPERCUSION DEL ESTADO NUTRICIONAL.....	99
4.4.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad anti-obesidad mediante cultivos celulares	99
4.4.2. Análisis de la expresión génica	102
4.4.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la influencia del extracto en obesidad mediante el modelo pez cebra.	105
5. DISCUSIÓN.....	113
5.1. DISCUSION MODELO EXPERIMENTAL	113
5.2. MODELO "IN VITRO"	114
5.2.1. MODELOS CELULARES NEUROPROTECCION.....	114
5.2.2. MODELOS CELULARES REGULACION OBESIDAD	117
5.3. MODELO "IN VIVO".....	120
5.3.1. MODELOS ANIMALES NEUROPROTECCION	121
5.3.2. MODELOS ANIMALES REGULACION OBESIDAD	125
7. BIBLIOGRAFÍA	135

1. INTRODUCCIÓN





1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los problemas de salud pública en los países desarrollados se centran principalmente en el envejecimiento de la población y en el aumento de la prevalencia de determinadas enfermedades crónicas. Esta situación afecta a la salud y a la calidad de vida de las personas, pero también tiene un importante coste socioeconómico que compromete el sistema sanitario global de los países. Entre las medidas preventivas a adoptar para hacer frente a estos desafíos se incluye la promoción de un estilo de vida y una alimentación saludable a lo largo de las distintas etapas de la vida. Y en este contexto, sin duda los alimentos con funcionalidad específica como parte de una dieta saludable también constituyen uno de los puntos de anclaje en la reducción del riesgo de patologías y el mantenimiento del buen estado de salud.

Los avances en investigación molecular permiten que cada vez se conozcan mejor los desórdenes celulares asociados al desarrollo y aparición de enfermedades. La integración de distintas disciplinas como la medicina, la bioquímica y la informática, entre otras, está facilitando el desarrollo de nuevas metodologías que permiten evaluar la eficacia terapéutica de ciertos compuestos y/o nutrientes. Determinando cómo estos compuestos son capaces de regular y controlar el transcurso de ciertas enfermedades (Grimble, 2001; Dutta, 2003). De ahí los estudios emergentes en el campo de nutrigenómica, ciencia que estudia la interacción de la dieta y los genes (Kussmann et al, 2006).

La obesidad y las enfermedades neurodegenerativas representan uno de los grandes retos sanitarios entre los países desarrollados. Esto en parte es debido a las graves consecuencias negativas en la salud y en la calidad de vida de los individuos que las padecen, así como las cargas socioeconómicas que significa. Entre otros factores, el desarrollo de estas enfermedades deriva en alteraciones en el metabolismo asociados a un estado de inflamación crónica y la muerte neuronal. Se trata de enfermedades complejas, no obstante se están identificando las rutas metabólicas implicadas, así como, las moléculas claves del proceso tales como la leptina ó los factores transcripcionales PPAR γ y SREBP-1c, en el caso de la obesidad, y las proteínas Bcl-2 y Bax, en el caso de la muerte neuronal (Zhang, 2001; Clark, 1999). Teniendo en cuenta

el impacto social de estas enfermedades, existe un gran interés por identificar sustancias que ejerzan una acción neuroprotectora y reguladora de la obesidad.

1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

A pesar de que el concepto de alimento funcional se conoce desde hace algunas décadas, y que cada año se lanzan al mercado numerosos productos que se enmarcan en esta categoría de alimentos, existen ciertas áreas con un gran potencial pero poco explotadas hasta el momento, como es el caso de alimentos destinados a mejorar funciones relacionadas con el sistema nervioso central (SNC) y con el control del apetito y prevención de la obesidad.

Las condiciones que debe cumplir un alimento para ser considerado funcional son (Diplock, 1999): Las propiedades sobre la salud deben estar demostradas mediante una sólida y verdadera base científica y el compuesto tendrá que haber sido evaluado en humanos en relación a su absorción, distribución, efectos metabólicos y excreción.

Entre los alimentos en los que se ha demostrado una característica adicional para la salud, con declaración de salud aprobadas (GRAS)(FAO, 1999) están: Fibra soluble en avena, fitoesteroles, dieta baja en grasa saturada y colesterol, proteína de soja y ácidos grasos n-3 en la prevención de enfermedad coronaria; el potasio en el control de la presión arterial; la fibra dietética y las vitaminas antioxidantes en la prevención de cáncer; y el folato en la prevención de los defectos del tubo neural.

El progresivo interés social por la salud ha incrementado a nivel mundial el consumo de productos (alimentarios, farmacéuticos, cosméticos...) con propiedades beneficiosas para el organismo, potenciándose el mercado mundial de extractos o materias primas. El desarrollo de este tipo de productos requiere que las propiedades beneficiosas de los compuestos bioactivos utilizados estén demostradas científicamente; requiriéndose cada vez una metodología más precisa para determinar el potencial bioactivo, y así incrementar el valor añadido de los productos.

Entre los compuestos que otorgan estas características funcionales a los alimentos se encuentran los compuestos fenólicos que han despertado gran interés

debido a su poder antioxidante, que les dota de un efecto quimioprotector en seres humanos y les hace tener gran influencia en la estabilidad a la oxidación que presentan los alimentos. Por ello, su identificación y cuantificación son una buena vía para la caracterización de los alimentos que la contienen.

Para poder definir un alimento como Alimento de uso específico para la salud (Foods of Specified Health Use o FOSHU) tienen que existir evidencias de que el alimento como tal, y no algún componente aislado del mismo, sea capaz de determinar un efecto positivo para la salud cuando se consume como parte normal de la dieta. Además la presentación de los productos FOSHU tiene que ser como la de un alimento convencional, sin modificar sus características. Nunca deben presentarse en forma de cápsulas o comprimidos. Esta última premisa fue modificada en 2001, aunque de todas formas los FOSHU siguen apareciendo mayoritariamente en forma de alimentos convencionales y no con forma de cápsulas y comprimidos (Ohama et al, 2006).

1.1.1. Acción de alimentos sobre el sistema nervioso central

Hace mucho 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. De hecho, recientemente se ha demostrado la existencia de una programación fetal o neonatal de la salud en la etapa adulta, lo que implica que nunca se deben considerar las distintas etapas fisiológicas de forma aislada, sino relacionadas.

En el presente estudio se contemplan dos funciones importantes del SNC: la función cognitiva y la regulación del apetito.

Existen distintos nutrientes de gran relevancia para el desarrollo y mantenimiento de la función cognitiva. En el estudio actual se evaluarán algunos de ellos, como los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (DHA) y compuestos antioxidantes presentes en el extracto. Estos nutrientes son 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.

Recientemente, se ha despertado un creciente interés por 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. En el estado actual de la ciencia y la tecnología, se proponen en la bibliografía distintos mecanismos de acción para explicar la capacidad neuroprotectora de estas sustancias, entre las que se pueden citar 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 (Jordán et al, 2006).

Existe también una tendencia de la alimentación funcional en el desarrollo de alimentos innovadores capaces de influir sobre la prevención de la obesidad y el riesgo cardiovascular (Hao et al., 2009; Jacomelli et al 2009). El control de la ingesta y el apetito es una de las líneas con mayor aceptación por parte del consumidor y por ello, con mayor éxito comercial. Así pues, 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.

En cualquier caso, para evaluar el potencial efecto neuroactivo, ya sea en uno u otro sentido de una fracción o sustancia en concreto, se hace necesario abordar una investigación específica para ese objetivo.

1.1.2. Prevención de enfermedades

Los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células (Sies, 1997) y la gente con una dieta de frutas y vegetales ricos en polifenoles y antocianinas tienen un riesgo más bajo de contraer cáncer, enfermedades

cardíacas y algunas enfermedades neurológicas (Bartlett y Eperjesi, 2003). Esta observación sugirió que estos compuestos pudieran prevenir enfermedades tales como degeneración macular (Wintergerst et al, 2006), inmunidad suprimida debido a una nutrición pobre (Wang et al, 2006), y neurodegeneración, que son causados por el estrés oxidativo (Bleys, 2006). Sin embargo, a pesar del papel claro del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares, estudios controlados usando vitaminas antioxidantes no han mostrado ninguna reducción clara en el progreso o riesgo de contraer enfermedades cardíacas (Cherubini et al, 2005). Esto sugiere que otras sustancias en las frutas y los vegetales (posiblemente los flavonoides) por lo menos expliquen parcialmente la mejor salud cardiovascular de quienes consumen más frutas y vegetales (Rimm et al, 1993).

Los antioxidantes han demostrado que pueden ser la protección efectiva y eficaz para prevenir el envejecimiento prematuro y enfermedades crónico degenerativas, como hipertensión, artritis reumatoide, lupus, diabetes mellitus, arteriosclerosis, entre otras. Se piensa que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad en la sangre contribuye a las enfermedades cardíacas y en estudios de observación iniciales se encontró que gente que tomaba suplementos de la vitamina E tenía riesgos más bajos de desarrollar enfermedades cardíacas (Vivekananthan et al, 2003). Por consiguiente se realizaron por lo menos siete grandes ensayos clínicos conducidos para probar los efectos del suplemento antioxidante con vitamina E, en dosis que se extendían desde los 50 a los 600 mg por día. Sin embargo, en ninguno de estos ensayos se encontró un efecto estadístico significativo de la vitamina E sobre el número total de muertes o en las muertes debido a enfermedades cardíacas (Hercberg et al, 2004).

La producción de antioxidantes naturales y los antioxidantes que se obtienen con la alimentación, no es suficiente para la mayoría de las personas, por esa razón muchas compañías alimentarias y de nutraceuticos 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 se sabe 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 y Eperjesi, 2003; Woodside et al, 2005; Hughes et al, 2004).

1.1.3. Control del apetito

La obesidad es el resultado de un desequilibrio entre la entrada de energía (absorción de los alimentos) y el gasto de energía. En la mayoría de los individuos, la obesidad aparece como una enfermedad genética y multifactorial, y las estimaciones indican que los determinantes genéticos explican por lo menos el 50% del fenotipo obeso, considerando que el resto es debido al entorno. La obesidad está relacionada a varias condiciones debilitantes y crónicas incluyendo enfermedad de la arteria coronaria, síndrome metabólico, hipertensión, ataque cerebral, hiperlipidemia, diabetes, osteoartritis, apnea del sueño, gota, enfermedad de la vesícula biliar, varios tipos de cáncer y enfermedades de las articulaciones.

Durante mucho tiempo se ha admitido que sistema fisiológico de regulación del apetito se encontraba en el hipotálamo. En efecto, los primeros investigadores observaron que las lesiones en diversas áreas del hipotálamo afectaban el comportamiento alimentario y la regulación del peso corporal. Sin embargo, recientes investigaciones señalan que existen otras zonas del cerebro implicadas en la regulación del apetito y que en la misma intervienen igualmente una variedad de neuropéptidos que se clasifican en neuropéptidos orexígenos y neuropéptidos anorexígenos. Adicionalmente a esta regulación central existen otras sustancias que se originan en la periferia, la mayoría constituidas por péptidos (insulina, péptido similar al glucagón (GLP), leptina, etc.), así como la glucosa y otras sustancias producidas por el metabolismo.

Péptidos orexígenos: los más conocidos son el neuropéptido Y (NPY) y la proteína r-Agouti (AgrP)

Péptidos anorexígenos: se conocen igualmente dos neuropéptidos anorexígenos o supresores del apetito: la pro-opiomelanocortina, y la transcriptasa relacionada con la cocaína-anfetamina (CArT)

Factores periféricos que intervienen en la regulación del apetito

Se conocen numerosas sustancias, producidas fuera del sistema nervioso central, que intervienen en la regulación del apetito. Casi todos son también péptidos, de los cuales los más estudiados son el péptido intestinal Y (PYY), el péptido similar al glucagón (GLP), la insulina, la colecistokinina, la leptina y la grelina. Estos factores, a excepción de la grelina, inhiben el apetito, mientras que la glucosa, un producto metabólico, aumenta o reduce el apetito en función de sus niveles en sangre. Estos factores periféricos actúan sobre los neuropéptidos del sistema nervioso central, directamente sobre las neuronas cerebrales que los producen, o a través de una estimulación del nervio vago.

Asimismo, resultan de gran importancia todos los mecanismos implicados en la regulación del apetito y la homeostasis energética, ya que constituyen uno de los factores más importantes en la prevención de la obesidad y otras enfermedades relacionadas, y que son cada vez más frecuentes en las sociedades industrializadas. El SNC juega un papel clave en la regulación del apetito y la saciedad, a través de los llamados núcleos hipotalámicos y extra-hipotalámicos. Se ha demostrado que estos núcleos presentes en el SNC reciben señales periféricas de tipo neuronal (a través del nervio vago) o humoral (a través de secreciones endocrinas que se vierten al torrente sanguíneo). Hoy día se conoce que a nivel del estómago y del intestino se liberan numerosos péptidos, como la colecistocinina (CCK), el péptido tirosina-tirosina (PYY), el polipéptido pancreático (PP), GLP-1 o grelina, cuya secreción puede ser modulada por nutrientes específicos.

El equilibrio entre el consumo de energía y el gasto es objetivo para reducir la epidemia de sobrepeso y obesidad. Este equilibrio es muy complejo y está influenciado por el estilo de vida, consumo de calorías y nutrientes, el metabolismo de la energía, la respuesta al estrés, el metabolismo inmunológico y la genética. El metabolismo de las

grasas es un indicador significativo de este equilibrio con la expresión de los genes de PPAR γ , leptina y adiponectina (Oben et al, 2008; Almarza-Pérez et al, 2008).

La obesidad está asociada con enfermedades inflamatorias crónicas debido a un almacenamiento excesivo de tejido graso. Los pacientes que la padecen tienen un perfil inflamatorio degenerativo que contribuye al desarrollo de complicaciones vasculares. El tejido adiposo es el responsable de controlar ambos procesos: equilibrio de energía (a través de PPAR γ y las condiciones inflamatorias a través de marcadores de inflamación. (Almarza-Pérez et al, 2010)

Aunque existen grandes huecos en nuestro entendimiento acerca de los polifenoles y su impacto sobre la obesidad y condiciones de salud relacionadas, el crecimiento de volumen de literatura sugiere que estas sustancias pueden conferir un beneficio saludable sustancial relacionado con la obesidad más allá de solo bajar la densidad energética de la dieta. Esto ha demostrado que los polifenoles pueden afectar favorablemente la ingesta y regulación de la glucosa, adipogénesis, lipólisis, metabolismo de los lípidos y el control del apetito.

La capacidad antioxidante de los polifenoles ha demostrado tener potencial para mejorar las alteraciones asociadas a la obesidad, debido a que ésta conduce a una inflamación crónica de bajo grado del tejido adiposo, lo cual altera la función endocrina conduciendo a trastornos metabólicos como la diabetes tipo 2. Se ha visto la capacidad de suprimir el factor nuclear kappa B (NF-kB) y proteína activada por mitógeno (MAP), mientras que se activa la vía de la 5-monofosfato proteinquinasa (AMPK) mediante la adenosina 5-monofosfato en el tejido adiposo. Ácidos grasos tales como ácido eicosapentanoico, ácido docosahexanoico, ácido linoleico conjugado y ácidos grasos monoinsaturados también tienen efectos antiinflamatorios a través de varios mecanismos. Estos incluyen la activación de la AMPK y el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- γ), así como la supresión de los receptores tipo TLRs y los NF-k β . (Siriwardhana et al, 2013)

Se ha visto que la administración de diferentes polifenoles protege contra el aumento de peso corporal y acumulación de grasa y mejora la tolerancia de la glucosa en ratas. Estudios recientes indican que estos efectos contra la obesidad se ejercen a

través de los genes implicados en la adipogénesis, la lipólisis y en la oxidación de ácidos grasos. (Boqué et al, 2013)

1.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL OLIVO

Desde tiempos prehistóricos el olivo (*Olea europaea*) ha sido una base fundamental de la alimentación y cultura del Mediterráneo, formando parte de la trilogía pan, vino, aceite de oliva, de la "Dieta mediterránea". Intuyendo su importancia, ya en 1770 uno de los primeros presidentes de los EEUU, Thomas Jefferson, afirmaba que “el olivo es un árbol poco conocido en América, y todavía el más digno de ser conocido”.



Figura 1

El olivo constituye una fuente natural de compuestos bioactivos. El procesado de la aceituna conduce a diversos tipos de matrices secundarias, que generalmente son consideradas como subproductos. Una característica común a los residuos vegetales generados de la actividad agroalimentaria es su potencial como fuente de compuestos bioactivos. Por lo tanto, una forma de valorización de estos residuos es utilizarlos como materia prima para la extracción de compuestos con propiedades saciantes: fibras, ácidos grasos y proteínas con un importante valor económico y que pueden utilizarse

por sus propiedades saciantes y neuroprotectoras en la industria agroalimentaria, farmacéutica o incluso como compuestos funcionales de alimentos. En el caso del olivo (uno de los cultivos más representativos a escala nacional con cerca de 2,5 millones de hectáreas), cada árbol da lugar a unos 7 kg de residuos durante la poda, compuestos de ramas y hojas. Las hojas de olivo se generan también durante la recogida y separación de la aceituna y se considera como una fuente natural de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, antipiréticas, antimicrobianas, etc. En las hojas se han aislado una serie de productos mediante la extracción con hexano (Guinda, 2002) (tabla 1), entre los que caben destacar los hidrocarburos saturados de alrededor de 30 carbonos; las ceras constituidas por los ácidos grasos palmítico, oleico y linolénico y alcoholes terpénicos y α y β -amirina; los triglicéridos trioleina y palmitodioleina (mayoritarios en la hoja del olivo), entre los tocoferoles y carotenos, los más abundantes α -tocoferol y β -caroteno; entre los esteroides el mayoritario β -sitosterol; los alcoholes heneicosanol, docosanol, tetracosanol, hexacosanol, octacosanol, triacontanol, germanicol, β -amirina, α -amirina y un isómero de los mismos; por último, entre los dialcoholes terpénicos encontrados en la hoja del olivo, están el eritrodiol y el mayoritario uvaol, al contrario que en el aceite de oliva que es siempre superior el eritrodiol.

Las materias primas del olivo han motivado investigaciones múltiples relacionadas con la recuperación de antioxidantes. Una parte de ellas se centran en la obtención de efluentes acuosos del proceso de obtención del aceite de oliva (De Marco, 2007; Obidied et al, 2008). 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). En general el componente mayoritario de los extractos de hoja de olivo es la oleuropeína, también son abundantes las referencias relacionadas con el hidroxitirosol (Pereira-Caro et al, 2009) que se considera el principal compuesto derivado de la oleuropeína con incluso una capacidad antioxidante superior (Obied et al, 2008), si bien la actividad general de los extracto parece apoyarse entre efectos sinérgicos entre las sustancias que lo componen.

Tabla 1. Composición (ppm) de los principales componentes del extracto de hexano de cinco variedades de hojas de olivo (Guinda, 2002).

MUESTRA	Ceras	Hidrocarburos	Escualeno	β -caroteno	TG	α -tocoferol	β -sitosterol	Alcoholes	Dialcoholes Triterpénicos
Picual	1874	3400	152	100	1396	117	2500	311	837
Arbequina	1200	2700	49	81	1215	125	1560	95	412
Hojiblanca	1415	2530	111	72	1108	89	1734	98	563
Empeltre	915	3050	38	28	934	62	614	213	630
Cornicabra	934	2057	46	45	832	41	714	110	342

Junto a las hojas, el procesado de la aceituna puede dar lugar a distintos tipos de subproductos de naturaleza diversa. Por ejemplo, no todas las aceitunas recogidas son destinadas a los mismos tipos de productos, existiendo fracciones de aceitunas verdes que quedan descartadas para su consumo como olivas por su tamaño o la presentación de manchas. Tampoco se destinan al consumo final algunas partidas de aceituna fermentadas, los huesos procedentes de la línea de deshuesado, las ramas obtenidas durante el desramado, etc. Además de residuos sólidos, el procesado de la aceituna puede dar lugar a materias primas secundarias de tipo líquido, especialmente en el caso del procesado de la aceituna para la obtención de aceite. Entre ellas se pueden citar efluentes de limpieza, alpechines, alpeorujos, etc. pudiendo variar la naturaleza según el tipo de proceso de obtención de aceite empleado. En este contexto, se ha interesado por la posibilidad de obtener sustancias con efecto neurobioactivo en facetas de regulación del SNC a partir de alguna de las materias primas de olivo de que dispone como antesala para la obtención de nuevos ingredientes alimentarios que puedan contribuir de forma positiva sobre la salud.

En este sentido cabe destacar, entre otros, el alto contenido en polifenoles de algunos de sus componentes como por ejemplo, la hoja, la aceituna o el hueso, o de residuos del procesado de la aceituna como la lejía de cocido y la salmuera. El contenido en compuestos fenólicos en olivo y aceitunas depende de los cultivos y de la madurez de la fruta en el momento de la cosecha. Los extractos hidroalcohólicos obtenidos del olivo y derivados son ricos en compuestos fenólicos. Entre ellos se encuentran: principalmente el hidroxitirosol, oleuropeina, tirosol, oleuropeina aglicona, ácido gálico, ácido eleonico, ácido cafeico

El hidroxitirosol es el componente principal de muchos de los extractos del olivo, puede estar presente como fenol simple o esterificado con el ácido elenólico para formar oleuropeína aglicona.

La oleuropeina es un glucósido amargo que constituye el componente fenólico más abundante en el fruto del olivo.

Debido a la potente actividad antioxidante y propiedades antiinflamatorias de los polifenoles procedentes del olivo, estos han sido objeto de numerosos estudios (Mana et al, 1999; 2000; 2002)

Asimismo, muy recientemente se ha relacionado la oliva y las fracciones derivadas de su procesado con efectos sobre mecanismos relacionados con la obesidad (Hao et al, 2009; Jacomelli et al, 2009). En cualquier caso, para evaluar el potencial efecto neuroactivo, ya sea en uno u otro sentido de una fracción o sustancia en concreto, se hace necesario abordar una investigación específica para ese objetivo.

1.2.1. Polifenoles

Los polifenoles son la fuente más importante de compuestos bioactivos de la dieta humana. Son fitoquímicos de bajo peso molecular. Estos constituyen uno de los metabolitos secundarios de las plantas y distribuidos por toda ella. En la actualidad se conocen más de 8000 estructuras (Orzechowski, 2002; Saura, 2006). Esta familia de compuestos puede definirse como aquella en la que sus componentes poseen al menos un anillo aromático unido al menos a un grupo hidroxilo (-OH), siendo los flavonoides el grupo mejor definido entre los polifenoles de la dieta humana (Duthie et al, 2003).

Los efectos biológicos de los polifenoles han sido relacionados con su capacidad antioxidante, sin embargo algunas investigaciones recientes han podido demostrar que los polifenoles podrían presentar otros mecanismos de acción. Estos mecanismos estarían relacionados con su capacidad para modular algunas rutas de señalización celular, la expresión de genes y, así el metabolismo celular.

Los polifenoles naturales pueden ir desde moléculas simples (ácido fenólico, hidroxitirosol, fenilpropanoides, flavonoides), hasta compuestos altamente polimerizados (ligninas, taninos).

La importancia de los compuestos fenólicos en la dieta se debe, según evidencias encontradas; a su capacidad antioxidante y al papel que juegan frente a la prevención de ciertas enfermedades (enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras) (Tangney et al, 2013). Estos pueden ayudar a limitar el daño producido por estas enfermedades actuando directamente sobre las especies reactivas de oxígeno estimulando sistemas de defensa endógenos. Los grupos fenólicos de estos compuestos son capaces de aceptar

un electrón para formara radicales fenoxilo relativamente estables, deteniendo reacciones oxidativas en cadena que se producen en las células (Kehere y Smith, 1994).

Los principales factores que van a condicionar sus propiedades biológicas, es decir su capacidad de acción frente a estas enfermedades, son su ingesta diaria y su biodisponibilidad.

No todos los compuestos fenólicos son iguales. Hoy en día, es todavía difícil discernir qué polifenol tiene mayor capacidad frente a determinadas enfermedades. Hay que tener en cuenta que las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos dependen en gran medida de su biodisponibilidad, ya que los compuestos fenólicos presentes en mayor proporción en la dieta no son necesariamente aquellos que presentan mayor actividad en el ser humano. Las causas de esta menor actividad pueden ser debidas a una menor absorción por parte del intestino o a que se metabolicen o eliminen con mucha rapidez por el organismo.

La estructura química de los compuestos fenólicos es un factor que determina el grado y la velocidad por la que estos van a ser capaces de ser absorbidos por el intestino, además de la naturaleza de los metabolitos que circulan en el plasma.

Las agliconas son fácilmente absorbibles por el intestino; sin embargo, la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentra en forma de esterés, glucósidos, u otro tipo de polímeros que no pueden ser absorbidos por el intestino en sus formas nativas. Para ello, estas sustancias deben sufrir una hidrólisis que se produce gracias a las enzimas que se encuentran en la mucosa del intestino o a la microflora presente en el colon (Manach et al, 2004). Una vez absorbidos, los compuestos fenólicos son metabolizados en el hígado, que los secreta a través de la bilis y dirigidos de nuevo al colon donde quedan expuestos a la acción de enzimas bacterianas (especialmente las β -glucuronidasa) que los hidrolizan y a continuación son reabsorbidos por la sangre. Esta recirculación enterohepática conduce a aumentar el tiempo de permanencia de los compuestos fenólicos en el organismo. (Scalbert et al, 2002).

Se puede decir que la eliminación de los compuestos fenólicos del organismo se produce principalmente a través de la orina y de la bilis. Para ello, los compuestos fenólicos, pasan a los tejidos, entre ellos los riñones, que los eliminan mediante la orina.

Hay estudios que demuestran que la cantidad de compuestos fenólicos que se encuentran intactos en la orina varía de unos compuestos a otros. El estudio del porcentaje eliminado por orina después de la ingestión de ciertas cantidades controladas de alimentos ricos en ellos, va a permitir la comparación de la diferente biodisponibilidad de cada uno de estos compuestos.

Los flavonoides representan el subgrupo de los polifenoles más común y ampliamente distribuido y entre ellos los flavonoles son los más ampliamente distribuidos. Al estar ampliamente distribuidos en el reino vegetal, constituyen parte integral de la dieta. Los polifenoles poseen una estructura química ideal para la actividad como consumidores de radicales libres. Su propiedad como antioxidante, proviene de su gran reactividad como donantes de electrones e hidrógenos y de la capacidad del radical formado para estabilizar y deslocalizar el electrón desapareado (termina la reacción en cadena) y de su habilidad para quelar iones de metales de transición (Vaya et al, 2001; Halliwell et al, 2005). Los polifenoles poseen una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica, por lo que pueden actuar en contra de radicales libres producidos tanto en medios hidrofóbicos como acuosos. Su capacidad antioxidante está directamente relacionada con el grado de hidroxilación del compuesto (Girgin et al, 2004). Los flavonoides tienen una poderosa acción antioxidante in vitro, siendo capaces de barrer un amplio rango de especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peróxido, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores.

Soobrattee et al (2005), evaluaron la capacidad antioxidante de diferentes polifenoles, encontrando que comparado con los antioxidantes fisiológicamente activos (glutatión, α -tocoferol, ergotioneína) y los sintéticos (trolox, BHT, BHA), estos compuestos exhibieron una eficacia mayor como antioxidantes. Roginsky (2003), midiendo la actividad antioxidante de varios polifenoles naturales, durante la oxidación del metil-linoleato, encontró que todos los polifenoles estudiados, mostraron una pronunciada actividad antioxidante, considerando que el mecanismo molecular subyacente a la actividad antioxidante de los polifenoles, es el de actuar rompiendo la reacción en cadena. Los polifenoles con dos grupos hidroxilos adyacentes o cualquier otra estructura quelante, pueden unir metales de transición. Los polifenoles actúan como

consumidores del radical hidroxilo, el peroxinitrito y el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores.

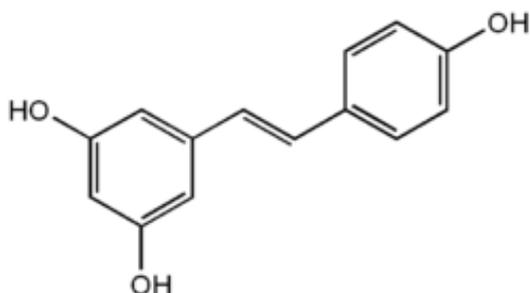


Figura 2. Estructura del polifenol resveratrol.

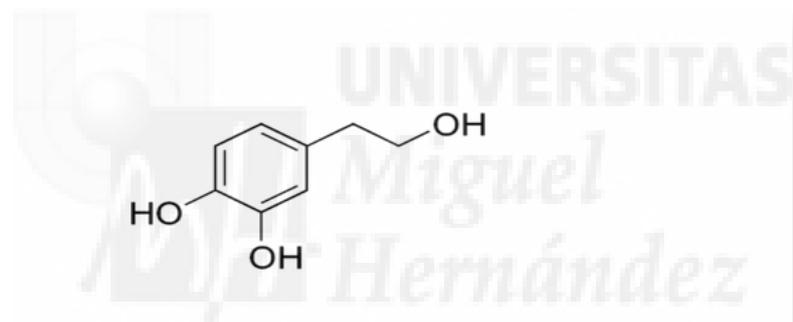


Figura 3. Estructura del hidroxitirosol.

En la siguiente tabla se pueden observar las cantidades de los 15 polifenoles seleccionados por su incidencia en las materias primas procedentes del olivo (aceitunas, hojas, huesos, lejías del procesado...):

Tabla 2. Caracterización inicial de diversas materias primas procedentes del olivo.

POLIFENOLES	Lejía de cocido	Hoja	Aceituna deshidratada
Ac. Gálico	0.1	0.0	25.0
Hidroxitirosol	47.4	223.8	1737.1
2,4-Hidroxifeniletanol	172.4	31.8	75.1
Ac. Clorogénico	2.6	3.8	33.8
Ac. Vanílico	5.6	32.9	127.5
Ac. Cafeico	3.0	5.5	19.1
Ac. p-Cumárico	87.5	9.8	6.3
Ac. Ferulico	0.9	5.3	0.2
Rutina	7.5	383.7	688.6
Verbacosido	1.7	418.1	1172.0
Floridzina	0.4	50.7	57.6
Oleuropeína	6.1	582.7	17105.8
Ac. Trans-cinámico	0.0	0.7	1.4
Quercetina	0.0	9.9	17.1
Luteolina	1.3	244.1	182.6

El compuesto fenólico más abundante en los extractos procedentes del olivo es el (3,4-dihidroxifenil) etanol más conocido como hidroxitirosol. Este compuesto procede de la hidrólisis de la oleuropeína, un glicósido amargo.

Debido a su carácter polar, la mayor parte de los compuestos fenólicos quedan en los residuos acuosos, pero también debido al carácter anfipático de algunos como el hidroxitirosol, también permanecen en los extractos grasos.

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

El hidroxitirosol muestra actividad captadora del radical superóxido generado por el sistema hipoxantina-xantina oxidasa y del peróxido de hidrógeno generado por la reacción del guayacol (De la Puerta et al, 1999). Además el hidroxitirosol inhibe la oxidación del ácido salicílico por el radical $\cdot\text{OH}$ (Owen et al, 2000), reduce la inactivación de la catalasa mediada por el ácido hipocloroso (Visoli et al, 1998) y puede actuar sobre especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrilo (Deiana et al, 1999; de la Puerta et al, 2001). Su actividad antioxidante también se pone de manifiesto en ambientes lipofílicos actuando frente a la autooxidación del ácido linoléico (Chimi et al, 1991).

Al parecer la estructura orto-difenólica del hidroxitirosol es fundamental para que pueda ejercer su actividad antioxidante. También se ha descrito que gracias a la estructura del anillo catecol, el hidroxitirosol puede actuar como quelante de metales (Ryan y Robards, 1998; Aeschbach et al, 1994). Los iones metálicos como el hierro y el cobre son esenciales para el organismo, pero pueden ser potencialmente peligrosos ya que son capaces de actuar como transferidores de electrones y actuar como catalizadores de reacciones de autooxidación (Halliwell y Gutteridge, 1999). Sin embargo otros modelos in vitro sugieren que concentraciones elevadas de hidroxitirosol pueden tener cierto carácter pro oxidante, si bien este efecto fue menor que el que produce el ácido ascórbico (vitamina C) que se administra en formas farmacéuticas a dosis de hasta 1g (Aeschbach et al, 1994).

Estas propiedades antioxidantes sugieren que el hidroxitirosol podría tener cierto papel protector frente a la oxidación de las lipoproteínas LDL y contribuir de esta forma a la prevención de la enfermedad cardiovascular (Visoli et al, 1995; Salami et al, 1995; Covas et al, 2000). Así como propiedades anticancerígenas debido a que el estrés oxidativo y la generación de radicales libres también parecen estar implicados en la patología del cáncer (Halliwell y Gutteridge, 1999) y se ha sugerido que los compuestos fenólicos procedentes de extractos del olivo también podrían tener relación con la baja incidencia de diversos tipos de cáncer (Owen et al, 2004). Estudios llevados a cabo en células cancerosas apoyan esta hipótesis. Así, el compuesto fenólico mayoritario de los extractos del olivo, el hidroxitirosol fue capaz de proteger el DNA celular de células prostáticas de los daños ocasionados por los radicales libres, por lo que podría prevenir la actividad mutagénica ocasionada por el estrés oxidativo (Deiana et al, 1999; Quiles et

al, 2002). También fue capaz de inhibir los daños ocasionados por la luz ultravioleta en una línea celular de melanoma (D'Angelo et al, 2005). Los compuestos fenólicos obtenidos de los extractos del olivo mostraron ser potentes inhibidores de la generación de radicales libres en la matriz fecal, sugiriendo que estos compuestos podrían actuar directamente en el colon al reducir el daño oxidativo (Owen et al, 2000).

Por otra parte, estos compuestos fenólicos también tienen efectos beneficiosos no producidos por su actividad antioxidante. Así, en estudios con cultivos celulares mostraron que son capaces de detener el ciclo celular, reduciendo el crecimiento y la proliferación de células cancerosas, e inducir la apoptosis de células HL60 (leucemia promielocítica) (DellaRagione et al, 2000) y células HT29 (adenocarcinoma de colon) sin afectar a otro tipo de células no cancerosas como linfocitos aislados y células polimorfonucleares (Fabiani et al, 2002).

También se han descrito efectos de estos compuestos fenólicos presentes en extractos derivados del olivo en la inflamación y la agregación plaquetaria. La preincubación de células del endotelio vascular con compuestos antioxidantes condujo a una disminución de la adhesión de monocitos al endotelio activado y a una menor producción de VCAM-1 (Carluccio et al, 2003). Otro estudio puso de manifiesto que el hidroxitirosol podría influir en la respuesta linfocitaria al inhibir su proliferación (Della Ragione et al, 2000). Por otra parte, el hidroxitirosol también inhibió la agregación plaquetaria inducida por colágeno y ADP in vitro, mostrando una actividad comparable a la del ácido acetilsalicílico, un potente inhibidor de la agregación plaquetaria (Petroni et al, 1995). Se ha sugerido que el mecanismo por el cual produce tales efectos podría ser a través de una inhibición selectiva en la síntesis de eicosanoides por parte de las enzimas 5-lipooxigenasa y 12-hidroxi-eicosatetraenoico por parte de las plaquetas activadas durante la coagulación (Petroni et al, 1995) y una reducción de la producción de LTB4 por leucocitos activados (De la Puerta et al, 1999). Sin embargo, el hidroxitirosol no afectó a la actividad de la ciclooxigenasa (Kohyama et al, 1997)

El hidroxitirosol también presenta propiedades antimicrobianas in vitro frente a varios agentes infecciosos del tracto gastrointestinal y respiratorio, tales como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, o *Mycoplasma pneumoniae*, a concentraciones mínimas inhibitorias, que en algunos casos fueron inferiores a la que

presentaron antibióticos como la ampicilina (Bisignano et al, 1999; Fueneri et al, 2004).

A la oleuropeína, otro de los polifenoles abundantes en los extractos procedentes del olivo, es un glucósido secoiridoide esterificado con un alcohol fenilpropanoide. Es el componente fenólico mayoritario de la pulpa de las aceitunas verdes (de la variedad *olea europaea* que da nombre al glucósido). También las hojas de olivo contienen oleuropeína como componente principal. Puede encontrarse en el aceite de oliva extra virgen al que le da su sabor amargo. También se le han atribuido funcionalidades del tipo neuroprotección (de la Puerta et al, 2001; Bazoti et al, 2006), así como regulador del tejido adiposo (Jemai et al, 2008), antihipercolesterolémico (Fki et al, 2005) y antihiperglicémico (Sato et al, 2007).

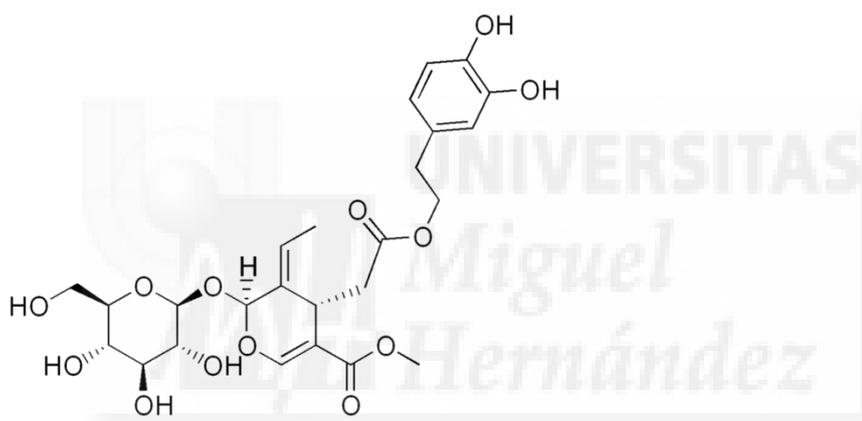


Figura 4. Estructura de la oleuropeína.

Otro polifenol el verbacosido, derivado osídico del ácido cafeico, también tiene atribuida actividad antioxidante (Obied et al, 2008; 2009) neuroprotectora (Sheng et al, 2002) y también efecto de protección digestiva (Singh et al, 2010).

También el ácido elenólico es otro polifenol presente en los extractos del olivo, aunque se presenta en mayor cantidad, al producirse a partir de oleuropeína, cuando las aceitunas crudas se meten en salmuera. Presenta actividad de protección celular (Fabiani et al, 2006).

Otros polifenoles presentes en los extractos procedentes del olivo pero en menor cantidad son:

- Acido cafeico al que también se le atribuyen actividad neuroprotectora (Vauzour et al, 2010; Yang JQ et al, 2008) y antioxidante, efectivo para la captura de iones peróxido (Aldini et al, 2006; Bouallaqui et al, 2008).
- Acido gálico: que presenta también funcionalidad neuroprotectora (Lu et al, 2006; Ban et al, 2008), así como actividad para la regulación del tejido adiposo (Hsu et al, 2007).
- Ligstrosido, otro polifenol presente en los extractos que tiene actividad antioxidante, lo que conlleva a una protección celular junto con el resto de antioxidantes presentes en extractos de aceituna contra el cáncer, estrés oxidativo y envejecimiento (Owen et al, 2000; Menedez et al, 2008).
- Cicoolivil, polifenol del grupo de los lignanos, cuya funcionalidad es la prevención de complicaciones trombóticas (Zbidi et al, 2009).

Existen también estudios que prueban el efecto de los polifenoles en la reducción de los depósitos de grasa en ratas. La hipoadiponectinemia contribuye al desarrollo de la obesidad y trastornos relacionados tales como la diabetes, la hiperlipidemia y las enfermedades cardiovasculares. Los efectos de diferentes polifenoles disminuyen la hipoadiponectinemia y los depósitos de grasa, mediante la vía del PPAR γ (Tian C et al, 2013).

Estudios recientes han demostrado que la combinación de polifenoles y lactobacillus como combinación de prebióticos y probióticos, ejercen efectos metabólicos beneficiosos. Mejoran la tolerancia a la glucosa, el metabolismo lipídico y reducen los marcadores de inflamación (Axling et al, 2012). Los extractos procedentes de los residuos del procesado de aceituna, además de tener alto contenido en polifenoles, contienen una gran concentración de *Lactobacillus plantarun* por ser una especie que predomina en la fermentación de las aceitunas.

Recientemente se ha demostrado que los polifenoles pueden conferir un beneficio saludable sustancial relacionado con la obesidad, más allá de solo bajar la densidad energética de la dieta, afectan favorablemente la ingesta y regulación de la glucosa, adipogénesis, lipólisis, metabolismo de los lípidos y control del apetito.

La obesidad tiene un fuerte componente inflamatorio que puede ser potencialmente afectado por la dieta, los polifenoles pueden ser parte de esta nutrición antiinflamatoria reduciendo la formación de eicosanoides que pueden alterar las cascadas de señalizaciones hormonales (Sears y Ricordi, 2012).

Los suplementos dietéticos con compuestos polifenólicos se asocian con una reducción de la obesidad inducida por la dieta. Basándose en que la ingesta de alimentos está sujeta a una regulación compleja por el hipotálamo y otros centros del cerebro. La red de interacciones de mecanismos de retroalimentación que involucran los centros neuronales junto con el estómago, el intestino, el hígado, el tiroides y el tejido adiposo influyen en el resultado de la ingesta y saciedad. Señales periféricas como la leptina, la insulina y la grelina, se relacionan con los sistemas de neuropéptidos del hipotálamo en la regulación de la energía (Panickar, 2013) y reducen la resistencia a la insulina, previniendo la hiperglucemia (Boque et al, 2013).

Numerosos estudios indican que las especies reactivas de oxígeno (ROS) afectan significativamente a la biología del tejido adiposo y conduce a un perfil inflamatorio y a la resistencia de la insulina, lo cual contribuyen a la diabetes asociada a la obesidad y las enfermedades cardiovasculares. Los polifenoles antioxidantes proporcionados por la dieta proporcionan un efecto biológico aumentando la capacidad antioxidante del cuerpo contra el estrés oxidativo inducido por la obesidad. Los polifenoles tienen capacidad para modular el impacto del estrés oxidativo en la mitocondria de los preadipocitos que rigen el desarrollo del tejido adiposo de la homeostasis energética (Baret et al, 2013).

1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En la actualidad ha aumentado el interés por la relación existente entre alimentación y salud. Hablando de conceptos tales como “nutrición óptima” o prevención de las enfermedades”, reconociendo a la nutrición como potencial promotora de la salud.

Para este fin surge el concepto de alimentación funcional. Los alimentos funcionales se definen como alimentos que además de la función de nutrir poseen una

función de influir positivamente sobre la salud o sobre una determinada función fisiológica que beneficia el estado de la salud. Un alimento convencional puede pasar a ser funcional a través de tres procesos: mediante eliminación de un componente conocido con efecto no beneficioso, aumentando la concentración de un componente presente de forma natural en un alimento o adición de un componente que se le ha descrito un efecto beneficioso.

Para que un ingrediente sea considerado como funcional tiene que haber demostrado de forma satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas del organismo y que puede ejercer sus actividades biológicas *in vivo* sin producir efectos adversos, toxicológicos o nutricionales.

La evaluación de la bioactividad de un compuesto puede abordarse en distintas etapas complementarias: actividad teórica mediante pruebas químicas (por ejemplo índice teórico de polifenoles totales), biológico *in vitro* sobre modelos biológicos y actividad *in vivo* en animales y humanos tras la ingesta de los mismos. Dado que la evaluación de la actividad biológica con modelos animales y estudios en humanos es costosa, se considera más conveniente para la caracterización inicial de la bioactividad de un compuesto y/o de un alimento el realizar estudios “*in vitro*”. Antes de llegar a los estudios *in vivo* es conveniente realizar una evaluación previa mediante estudios *in vitro* para acotar y definir los términos de estudios posteriores en animales y humanos.

En este sentido, los estudios *in vitro* con **cultivos celulares** son una herramienta de diagnóstico de gran utilidad ya que es posible reproducir estados fisiológicos a escala de laboratorio, facilitando la manipulación y condiciones de ensayo, y permiten elucidar el mecanismo de acción y el efecto beneficioso tanto de sustancias puras como de alimentos rico en compuestos bioactivos (O'Brien et al, 2000, Lee et al, 2002).

En cuanto a los estudios *in vivo* con **modelos animales** los laboratorios de investigación han tratado de reducir el número de animales de laboratorio usados en sus investigaciones; además se ha comenzado a usar especies animales alternativas al ratón con el objetivo de reducir el uso en mamíferos en las mismas.

Es por ello que las ventajas que ofrece el uso del pez cebra han cobrado importancia y han hecho de esta especie animal un modelo alternativo a la investigación en áreas como la agroalimentaria y farmacéutica.

El pez cebra es un modelo animal que se ha utilizado para investigar el efecto teratogénico, embriotóxico y genotóxico de muy diversas sustancias así como en estudios embriológicos y neurobiológicos entre otras áreas.

El pez cebra tiene un alto grado de similitud genética con los vertebrados superiores, compartiendo un 70% de genes con los humanos, además su facilidad de manejo y reproducción así como las grandes posibilidades que ofrece para la aplicación de las nuevas tecnologías de genómica y proteómica, han conformado a este animal como la herramienta óptima en estudios relacionados con la salud y desarrollo de nuevos ingredientes.

Este organismo acuático ofrece ventajas como: se trabaja con todo el genoma de un organismo completo, proporcionando por tanto mayor información que los modelos celulares. Por otro lado es más rápido y menos costoso, presenta una alta homología genética y proteómica con vertebrados superiores como los modelos de mamíferos (70% de genes humanos tienen un homólogo en pez cebra, 84% cuando se trata de genes asociados a enfermedad) facilidad para obtener gametos y observar el desarrollo embrionario durante las primeras 24 horas de desarrollo, los embriones son totalmente transparentes permitiendo observar el desarrollo de órganos internos a tiempo real, facilidad de manipulación en el empleo de técnicas genéticas y procedimientos moleculares bien establecidos (más del 75% de su genoma está ya secuenciado), tiene la habilidad de absorber compuestos directamente desde el agua, producen puestas de embriones numerosas lo que permite obtener un número elevado de datos en cada desarrollo experimental

Su abanico de ventajas experimentales lo han convertido en una herramienta biomédica y biotecnológica de gran valor añadido.

En el desarrollo de nuevos ingredientes los estudios a través del pez cebra se evalúan los efectos de nuevos compuestos o mezclas de ellos sobre el organismo de dicho animal. De este modo se estudia por ejemplo la influencia que un compuesto

tiene sobre el desarrollo del sistema nervioso de un individuo, estudiando la evolución desde las primeras etapas de gestación hasta las etapas de madurez y senectud. Este tipo de estudios son altamente demandados por empresas dedicadas a la nutrición infantil.

Del mismo modo se desarrollan estudios para evaluar el posible efecto saciante y modulador del colesterol de nuevos compuestos en desarrollo.

En paralelo se realizan estudios para evaluar el análisis de la bioseguridad de los compuestos.

Con todo, la llave de su éxito quizá se deba a la posibilidad de realizar experimentos a gran escala, ya que permite generar plataformas encaminadas al análisis sistemático de compuestos químicos con potencial terapéutico. Por este camino se han identificado nuevos genes y compuestos químicos que regulan la proliferación descontrolada de células (Martínez et al, 2006).

Lo que se pretende en el presente estudio es evaluar la bioactividad in vitro con cultivos celulares e in vivo con el modelo de pez cebra, de un extracto obtenido del hueso de aceituna que debido a su composición polifenólica mayoritaria en hidroxitirosol así como en otros polifenoles minoritarios tales como 2-(4-hidroxifenil)etanol, ácido vanílico, ácido p-cumárico, verbacósido y luteoína, que de forma sinérgica pueden contribuir a los efectos neuroprotectores y reguladores del tejido adiposo.



2. OBJETIVOS





2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto biológico in vivo e in vitro sobre neuroprotección (NP) y obesidad de un extracto de huesos de aceituna, dirigido al desarrollo de alimentos funcionales.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la citotoxicidad y la bioseguridad del extracto de olivo.
- Buscar su potencial bioactivo.

2.2.1. Relacionados con la neuroprotección

- Seleccionar los modelos celulares que puedan servir como representativos de los efectos sobre neuroprotección.
- Identificar y seleccionar posibles biomarcadores génicos asociados a la evaluación del efecto neuroprotector de dicho extracto.
- Evaluar in vitro la actividad neuroprotectora del extracto mediante cultivos celulares.
- Evaluar in vivo los efectos de la suplementación con el extracto de olivo sobre el desarrollo neuronal y su posible efecto neuroprotector.

2.2.2. Relacionados con el estado nutricional

- Identificar y seleccionar posibles biomarcadores génicos asociados a la evaluación del efecto del extracto de olivo sobre la obesidad.
- Seleccionar los modelos celulares que puedan servir como representativos de los efectos sobre la obesidad.
- Evaluar in vitro la capacidad de regulación de los extractos sobre el tejido adiposo mediante cultivos celulares.
- Evaluar in vivo los efectos de la suplementación con el extracto de olivo sobre el tejido adiposo y en concreto sobre la obesidad.



3. MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Aparatos

- ✓ Microscopio invertido.
- ✓ Cabina de seguridad biológica.
- ✓ Incubadora de CO₂.
- ✓ Espectro-fluorímetro (Optima).
- ✓ Lector de Placas (BIORAD).
- ✓ Termociclador Applied Biosystems 7300.
- ✓ Equipo de extracción de Material genético Maxwell (Promega).
- ✓ Microcentrífuga refrigerada (velocidad: hasta 13.000 rpm; volumen: 1.5 ml).
- ✓ Centrífuga con capacidad para tubos de 15-50 ml con capacidad para 10.000xg.
- ✓ Contador celular automático Countess (Invitrogen).
- ✓ Baño termostático con temperatura regulable.
- ✓ Agitador de tubos (vortex).
- ✓ Nevera.
- ✓ Congelador de -20°C.
- ✓ Congelador de -80°C.
- ✓ Tanque de Nitrógeno líquido (-196°C).
- ✓ Balanzas.
- ✓ Agitadores.
- ✓ Cromatógrafo de gases

3.1.2. Material fungible

- ✓ Frascos para cultivos celulares estériles (Corning).
- ✓ Placas estériles de 96 pocillos de fondo plano para cultivo celular (Corning).
- ✓ Placas estériles de 24 pocillos de fondo plano para cultivo celular (Corning).
- ✓ Placas estériles de 12 pocillos de fondo plano para cultivo celular (Corning).

- ✓ Placas de 96 pocillos fondo cónico para termociclador (Applied).
- ✓ Tubos tipo eppendorf (1.5 y 2 ml).
- ✓ Tubos estériles de 15 y 50 ml de capacidad aproximada (Corning).
- ✓ Pipetas con filtro de diferentes tamaños.
- ✓ Micropipetas de precisión que cubran el rango 0.5µl-1 ml.
- ✓ Micropipetas multicanal de precisión que cubran el rango 1ul-1ml.
- ✓ Puntas estériles con filtro para micropipetas entre 0,5-1 ml.
- ✓ Cámara desechable para recuento celular (Invitrogen).
- ✓ Filtros 0.2 µm.
- ✓ Guantes de látex.
- ✓ Gradilla para tubos de 1.5-2 ml.
- ✓ Placas petri.
- ✓ Pipetas pasteur (plástico/vidrio).
- ✓ Microplacas (24/96 pocillos).
- ✓ Vasos de precipitado.
- ✓ Matraces.
- ✓ Pipetas de 5 y 1 ml
- ✓ Pipetas Pasteur
- ✓ Tubos de rosca

3.1.3. Reactivos y tampones

- ✓ Tampón fosfato (PBS)1x (PBS PH7.4 10X. Invitrogen Gibco. Cód.70011036).
- ✓ 2 mM L-Glutamina (L-Glutamine 200mM (100x). Hyclone SH 30034.01.
- ✓ Penicilina 100 unidades de penicilina por ml /Estreptomicina 100 µg de estreptomicina por ml ((Penicillin/Sterptomycin solution (10.000 UI/ml Penicillin. 10.000 µg Strip)). (HyCLone SV 30010).
- ✓ Agua desionizada estéril (Hyclone Molecular SH 30538.03).
- ✓ DMSO (Sigma-Aldrich D2438).
- ✓ Alamar Blue (AlamarBlue reagent invitrogen cat. No. DAL1025).
- ✓ TripanBlue 0,4% (T10282 Invitrogen).
- ✓ Antibiótico ZEOCIN (Invivogen).
- ✓ Antibiótico G418 (Invivogen).
- ✓ Normocin™ 1 g (50 mg/ml) (Invivogen ant-nr-2).

- ✓ QUANTIBLUE (Invivogen).
- ✓ Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum) (Hyclone. SV30160.03).
- ✓ Suero bovino (bovine calf serum) (Hyclone SH30072.03).
- ✓ Medio de cultivo RMPI 1640 (RMPI con suplementos P04-18047 IBIAN Technologies).
- ✓ Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM High Glucose) (Hyclone SH30285.01).
- ✓ Medio de cultivo Ham's F12 (Hyclone 21765-029).
- ✓ Solución Earle's Balances Salt Solution 1x (EBSS) (Hyclone 24010-043).
- ✓ Non Essential Amino Acids 1x (NEAA) (Non Essential Amino Acids (100x) Hyclone 11140-035).
- ✓ Suplemento N2 1x (Suplemento N2 (100x) Invitrogen-Gibco: 17502048)
- ✓ Ácido retinoico 10 μ M (Sigma transretinoic acid (RA)).
- ✓ Agua oxigenada.
- ✓ Adipogenesis assay kit (Millipore).
- ✓ Dexamethasone (D 1756. Sigma).
- ✓ 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma I7018).
- ✓ Insulina (I0516 Sigma).
- ✓ Kit extracción ARN de tejidos. Maxwell 16 lev Simply RNA Tissue Kit (Promega).
- ✓ High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems 4368814).
- ✓ Master mix (TaqMan Universal PCR Master Mix. Applied biosystems) (Ref.: AB 4318157).
- ✓ ADN Exo (Applied Biosystems): ADN utilizado como control interno (Ref. AB 4308320).
- ✓ Mix Exo (Applied Biosystems): primers y sondas utilizados como control interno.
- ✓ Agua de PCR.
- ✓ Agua de embriones.
- ✓ DMSO.
- ✓ Agua.
- ✓ HCl.
- ✓ KCl.
- ✓ CaCl₂•2H₂O.

- ✓ MgSO₄·7H₂O, NaHCO₃.
- ✓ Agua Elix.
- ✓ Soluciones patrón para pH.
- ✓ Acido kainico, reactivos para la determinación de AchE (según el método Ellman).
- ✓ Reactivos para la determinación de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos (patrones puros de ácidos grasos, metanol, acetato de etilo, acetonitrilo, tolueno).
- ✓ Cloruro de acetilo
- ✓ Metanol
- ✓ Patrón interno

3.1.4. Líneas celulares y embriones

- ✓ THP1-XBlue-CD14 (Invivogen).
- ✓ 3T3-L1 (CL-173 (ATCC)).
- ✓ SH-SY5Y (94030304, ECCC).
- ✓ Pez cebra (*Danio rerio*).

3.2. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA FRACCIÓN EXTRAÍDA DEL OLIVO

La citotoxicidad se ha evaluado mediante un bioensayo con cultivo celular haciendo uso de la línea celular THP1-XBlue-CD14 (invivogen). Para la realización del mismo, las células se siembran en placas multipocillo de 96 pocillos a una concentración celular de 50.000 células/pocillo. Posteriormente, las células se incuban con distintas concentraciones del extracto de huesos de aceituna (2-400 ppm) durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Trascurrido el período de incubación se evalúa la viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo AlamarBlue (invitrogen) (Al-Nasiry et al, 2007). Se mide la absorbancia a 570nm.

El AlamarBlue® es un indicador de la viabilidad celular demostrado que utiliza el poder natural de la reducción de las células vivas para convertir resazurina a la molécula resorufin. El principio activo de AlamarBlue® (resazurina) es un compuesto

no tóxico, la célula es permeable al colorante de color azul y no fluorescente de forma virtual. Al entrar en las células, se reduce la resazurina a resorufin, que produce un compuesto de color rojo. Las células viables convierten continuamente la resazurina a resorufin, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad y citotoxicidad. Dada la relación directa entre unidades de absorbancia y la viabilidad celular, el cálculo de la viabilidad se realiza respecto a las células control (sin tratamiento) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} / \text{Absorbancia}_{\text{control}}) \times 100$$

Las muestras evaluadas corresponden a extractos procedentes de la aceituna mediante el disolvente de extracción, posteriormente liofilizadas. A partir de las muestras liofilizadas se prepararon las disoluciones en PBS a diferentes concentraciones.

3.3. EVALUACIÓN DE LA BIOSEGURIDAD DEL EXTRACTO.

El método de ensayo de toxicidad a corto plazo reproduce las directrices del documento DraF Guideline de la OECD para el estudio de sustancias químicas, Fish Embryo Toxicity (FET) Test (30 de Mayo, 2006).

Se determina la máxima dosis tolerada (MTD) del extracto mediante el uso del ensayo FET en embrión de pez cebra.

La especie elegida ha sido el pez cebra (Danio reiro), cepa silvestre Ab. La conservación de los peces reproductores se realiza según especificaciones definidas, así como la obtención y cultivo de huevos fecundados de pez cebra.

Se han testado 5 concentraciones de la solución de ensayo: 1, 3, 10, 30 y 100 mg/l en agua de dilución con DMSO al 0.1%, más un grupo control (vehículo: agua de dilución con DMSO al 0.1%). Se realizó una aproximación experimental hasta alcanzar una concentración de trabajo máxima de 100 mg/l del extracto de ensayo. Para ello, se realizó una solución madre de 100 mg/ml en DMSO, y posteriormente se hicieron diluciones seriadas en AD para obtener las concentraciones de ensayo en DMSO al 0.1% perfectamente disueltos.

Para la realización del ensayo, se utilizaron únicamente aquellos huevos fecundados que no presentaron ningún tipo de anomalía externa, separándose y rechazando aquellos huevos que presentaban anomalías de división celular (asimetrías, vesículas) o cuya membrana estuviera dañada.

Posteriormente mediante el uso de una pipeta Pasteur de plástico se transfirieron únicamente los huevos fecundados separadamente en cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos, de forma que los huevos no entraron en contacto con el aire y de modo que cada pocillo contuviera un único huevo en un volumen de 100 μ l de las concentraciones de ensayo y del vehículo.

Las placas fueron incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24, 48 y 72 h. Tras cada periodo de incubación, se examinaron los huevos/embriones/larvas y se anotaron los resultados obtenidos según los criterios especificados a continuación:

a) Parámetros letales:

- Número de huevos coagulados: los huevos coagulados son opacos y aparecen como si fueran oscuros cuando se observan a través de un estereomicroscopio.
- Desprendimiento de la cola: verificar si la cola del embrión se ha desprendido del saco vitelino (*yolk*) debido a su aumento en longitud.
- Ritmo cardíaco: se registra si se detecta o no ritmo cardíaco.
- Formación de somitas: se investiga la formación de somitas (series longitudinales del mesodermo que por delaminación, fusión y migración se

convierten en el esqueleto axial, la dermis y los músculos dorsales y la pared del cuerpo y las extremidades).

Después del tratamiento, se determina que un embrión está muerto si se detecta cualquiera de los parámetros letales descritos anteriormente.

b) Parámetros subletales:

- Movimientos espontáneos: se registra si se detecta o no movimientos espontáneos rotativos dentro del corion.
- Pigmentación: se registra si se detectan cambios en la pigmentación.
- Formación de edemas: se registra si se detectan edemas en órganos o estructuras.
- Formación de coágulos: se registra la formación de coágulos en órganos o estructuras.

c) Parámetros teratogénicos:

- Malformaciones en órganos y estructuras.
- Escoliosis.
- Raquitismo.
- Retardo generalizado del desarrollo.

3.4. NEUROPROTECCIÓN.

3.4.1. Selección de modelos celulares y biomarcadores génicos.

Para la evaluación del efecto citoprotector (protección frente apoptosis) se ha utilizado un sistema celular basado en la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y (94030304, ECCC) (Cheung et al, 2009; Zhang et al, 2007). Para ello, se induce *in vitro* la “muerte neuronal”, apoptosis, y se evalúa cómo la presencia del extracto afecta al proceso. El efecto del extracto sobre la apoptosis se evalúa analizando dos marcadores génicos: el gen Bax de la familia de genes proapoptóticos (“genes de la muerte celular”) y el gen Bcl2, de la familia de genes antiapoptóticos (“genes de la

supervivencia”) (Figura 5). Se considera efecto neuroprotector si se disminuye la relación entre ambas moléculas: Bax/Bcl2 (Gao et al, 2008).

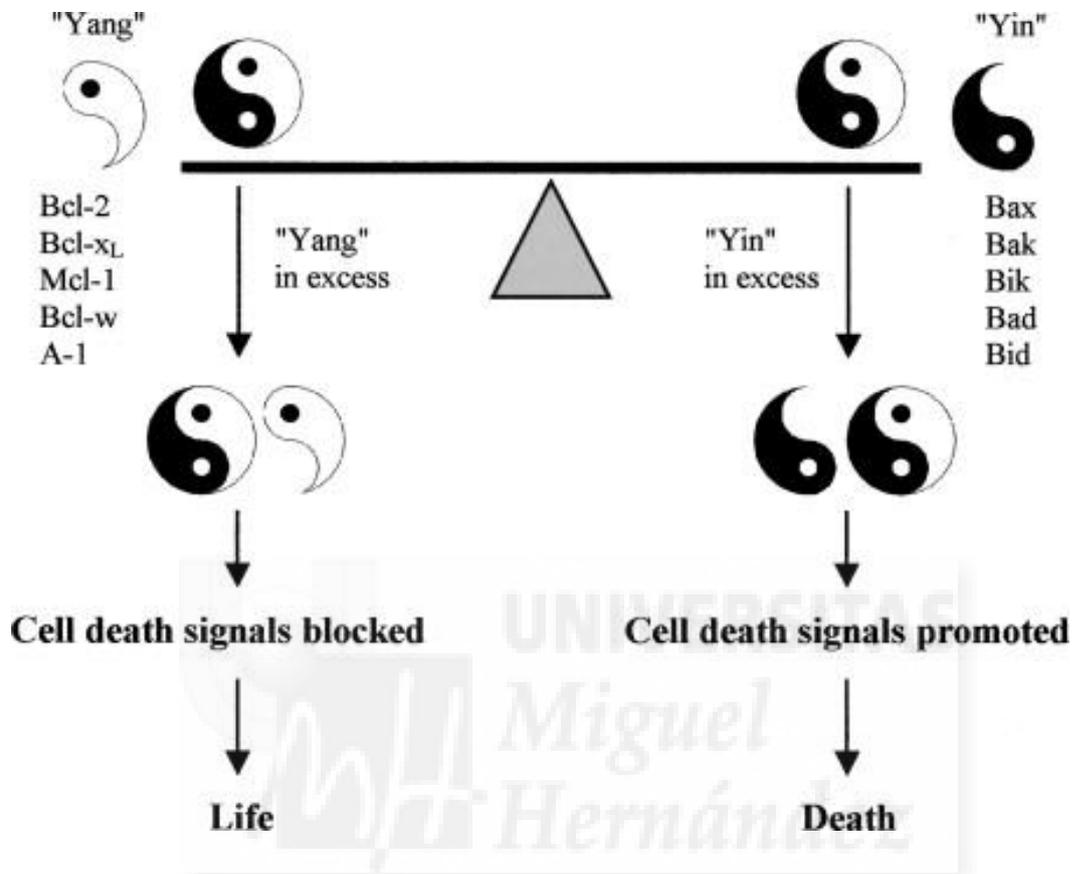


Figura 5. Relación entre la familia de moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas (Huang, 2002).

Para la realización del ensayo, se siembran las células en placas multipocillo de 24 pocillos a una concentración de 20.000 cel/ pocillo y se incuban a 37% y 5% de CO₂ en el medio recomendado por la ECACC (Ham's F12:EMEM (EBSS) (1:1) + 2mM L-Glutamina + 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 15% Foetal Bovine Serum (FBS)). Tras 24 horas de incubación se inicia la diferenciación con ácido retinoico 10 μM (Sigma transretinoic acid (RA)) en un medio con 1% de FCS durante 6 días, cambiando el medio cada tres. Un día antes del experimento se reemplaza el medio con medio específico sin suero y 1% de suplemento N2 (invitrogen). Después de 24 horas de incubación se inicia el tratamiento con el extracto a las concentraciones seleccionadas, de modo que se incuban durante 2 horas con las mismas, y posteriormente

se induce el daño celular con H₂O₂ 150 µM durante 5 horas (Kim et al, 2009; Jaworska-Feil et al, 2010). Una vez finalizado el tratamiento se recogen las células para el análisis molecular de rt-PCR a tiempo real.

3.4.2. Evaluación *in vitro* de la actividad neuroprotectora mediante cultivos celulares.

3.4.2.1. Análisis masivo de la actividad neuroprotectora.

Para la realización del bioensayo se ha utilizado un sistema de “screening high-throughput”. Este sistema se basa en el desarrollo de un modelo celular *in vitro* artificial que permite evaluar la respuesta de un biomarcador central de los procesos que causan daño celular, y entre ellos la degeneración neuronal, el factor transcripcional NF-kb. El factor NF-kb desarrolla un papel esencial en la transducción de la señal de estado celular alterado, de modo que en caso de daño celular el factor NF-kb se activa y transduce la señal provocando cambios a nivel celular y molecular (Zhang et al, 2010) (Figura 6).

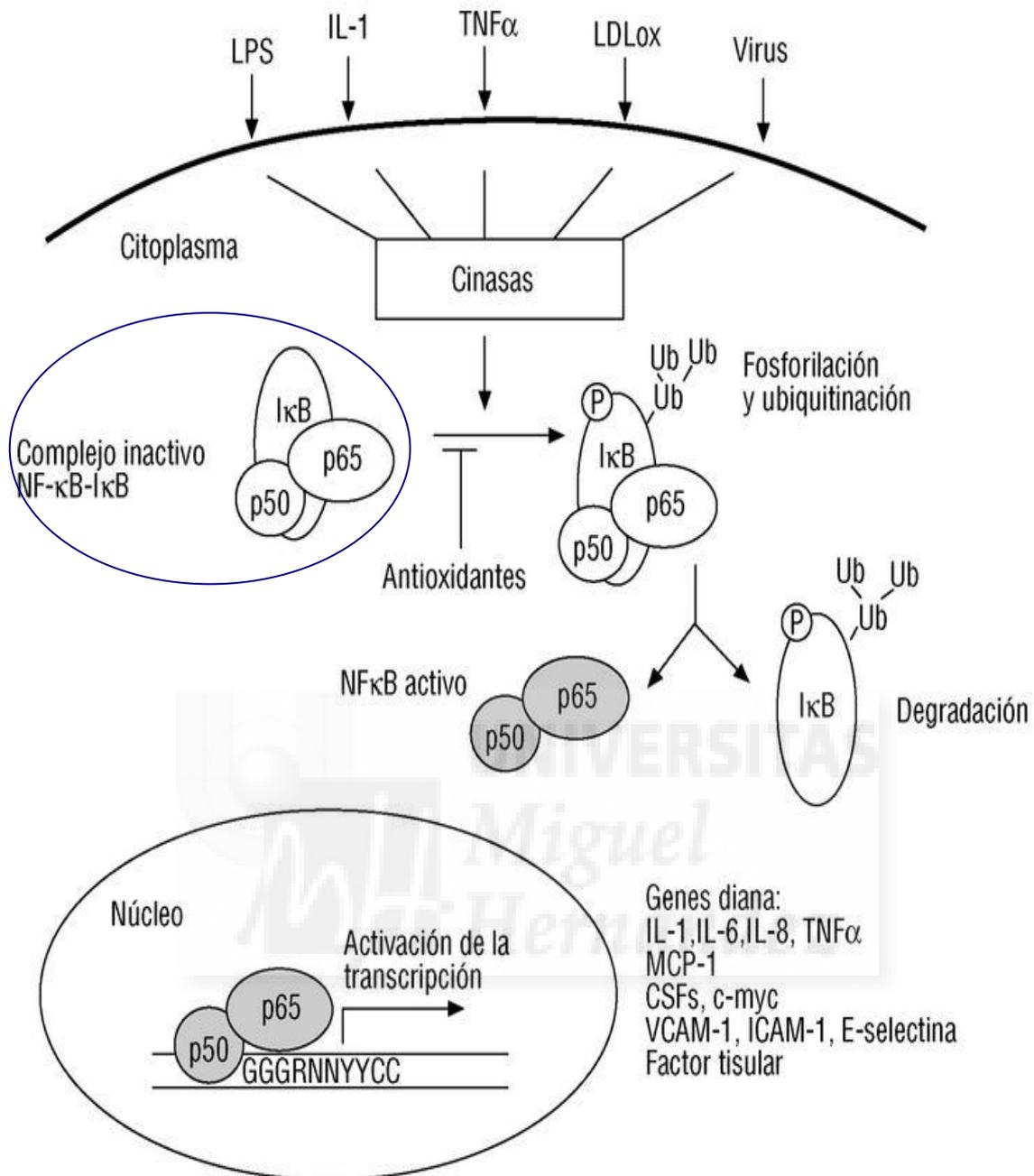


Figura 6. Mecanismo molecular de activación de NF- κ b. El factor transcripcional NF- κ b, está formado por dos unidades p50y p65. NF- κ b en estado inactivo se encuentra en el citoplasma formando un complejo con la molécula inhibidora (I κ b). Ante una señal de estrés (oxidación, infección bacteriana o vírica, citoquinas) se inactiva el inhibidor I κ b, liberándose y activándose por tanto NK- κ b. De modo que NF- κ b activo se internaliza al núcleo donde induce la activación de sus genes diana (<http://www.revespcardiol.org/en/node/2000510>).

Así pues, se ha procedido a reproducir a escala del laboratorio el proceso inflamatorio (activación de NF-kb) y se ha evaluado si la presencia del extracto revierte el proceso inflamatorio. Para ello, se ha empleado la línea celular THP1-XBlue-CD14 (invivogen). Esta línea celular contiene una construcción en el que la enzima fosfatasa alcalina se expresa bajo el control del promotor del factor transcripcional de NF-kb (Figura 7). La actividad de la fosfatasa alcalina puede medirse mediante una reacción enzimática con técnicas fluori-colorimétricas de modo que una mayor actividad de fosfatasa alcalina se relaciona directamente con mayor cantidad de NF-kb y por tanto menor efecto anti-inflamatorio.

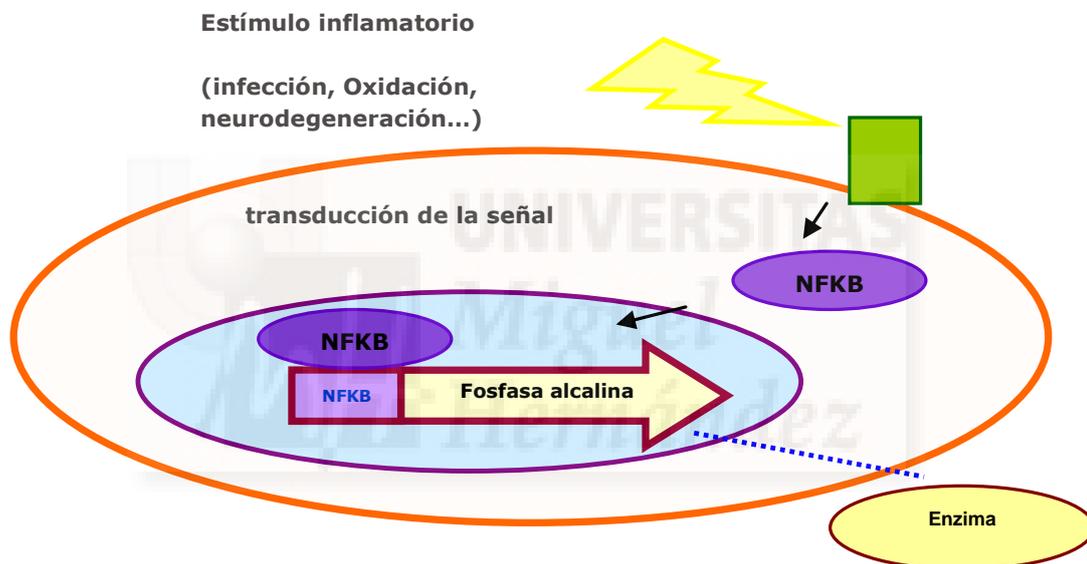


Figura 7. Construcción NF-Kb-Fosfatasa alcalina en las células THP1-XBlue-CD14. Las células THP1-XBlue-CD14 presentan el gen de la fosfatasa alcalina fusionado a regiones del promotor de NFkB que se activa a su vez por NF-kb. De ahí que en esta línea celular la actividad de la enzima es directamente proporcional a la actividad de NF-kb.

Para la realización del ensayo, se siembran las células en placas multipocillo de 96 pocillos a una concentración de 80.000 células por pocillo y se incuban con distintas concentraciones del extracto del olivo durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se añade un activador de NFkb, LPS 0.1µg/ml (lipopolisacárido de *E. coli*) que induce estrés celular, y se deja incubar durante 24 horas. Tras el período de

incubación se analiza la actividad de NF κ b. Paralelamente, el estudio también se ha realizado induciendo primero la inflamación con LPS (incubación 2 horas) y posteriormente añadiendo el extracto para observar si es capaz de revertir el efecto.

La actividad de NF- κ b se mide indirectamente mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo quanti-Blue (Invitrogen) (Figura 8). El reactivo quanti-Blue contiene el sustrato fosforilado que hidroliza la fosfatasa alcalina, la actividad de la fosfatasa libera un compuesto cromogénico que puede analizarse midiendo la lectura de la absorbancia a 655 nm. Como la expresión de la fosfatasa alcalina está dirigida por el promotor de NF- κ b, los resultados de actividad de NF- κ b son directamente proporcionales a la actividad de la fosfatasa alcalina, y la actividad de la fosfatasa es proporcional a la absorbancia. De modo que a mayor actividad de NF- κ b mayor absorbancia.

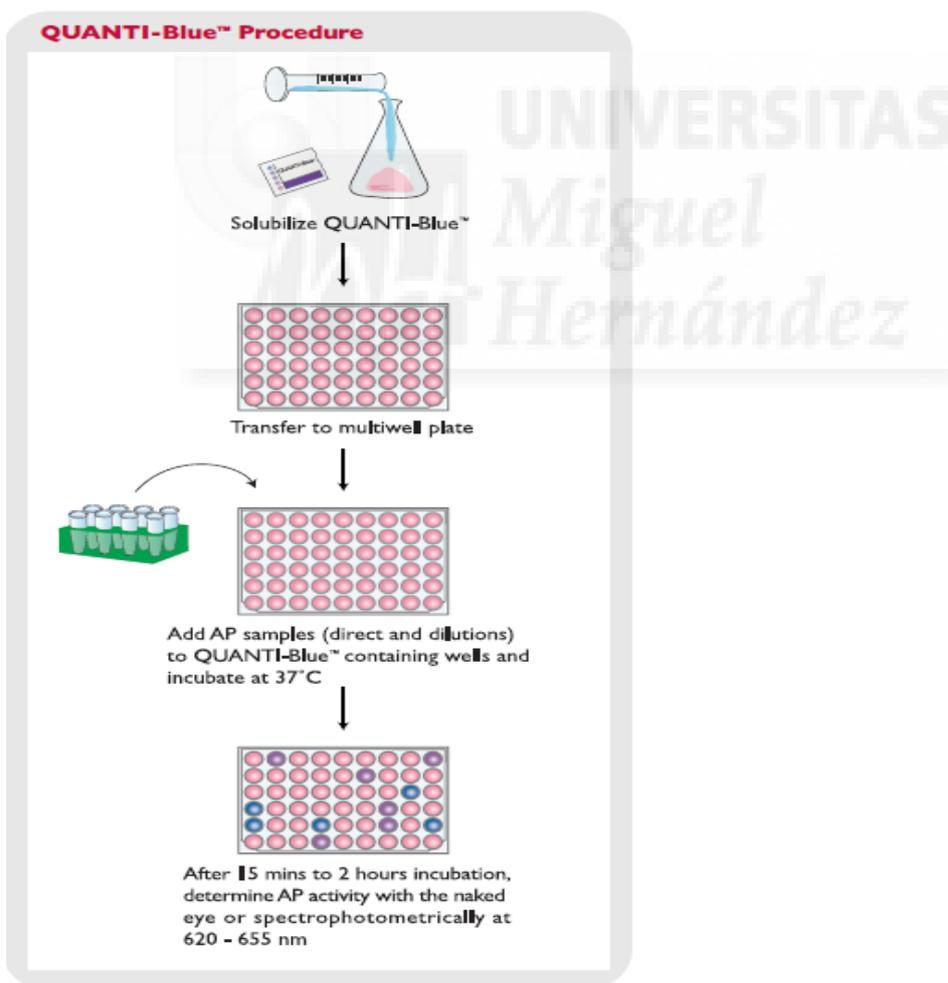


Figura 8. Esquema del ensayo de cuantificación de NF- κ b.

www.invivogen.com/reporter-detection

La expresión de resultados de actividad de NFκb se realiza respecto a las células control positivo (tratadas con LPS) haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad de NF}\kappa\text{b} = (\text{Abs}_{655 \text{ nm}} \text{ muestra} / \text{Abs}_{655 \text{ nm}} \text{ control LPS}) \times 100$$

3.4.2.2. Análisis expresión génica.

El análisis de la expresión génica se realiza a partir de las células mediante la extracción del ARN. La extracción se realizó de forma automática con el equipo MAXWELL (Maxwell® 16 LEV simple RNA Tissue Kit, Promega). A partir del ARN se obtuvo el c-DNA mediante la enzima transcriptasa (High Capacity cDNA reverse transcription kit (4368814) Applied Biosystems). A partir del cDNA se realizó la PCR en tiempo real utilizando los primers previamente diseñados de los biomarcadores seleccionados. En el caso de la actividad neuroprotectora, los genes **Bax** y **Bcl-2**, utilizando como gen control GAPDH (gen que codifica para la Gliceraldeído-3-deshidrogenasa). Las condiciones de reacción se describen en la siguiente tabla. Se utilizó un control interno de reacción de PCR, (ADN exo) para comprobar el funcionamiento de la reacción de amplificación. Este control interno está a concentraciones muy bajas y no interfiere en la reacción de amplificación de los genes de interés.

A continuación se muestra la composición de la mezcla de reactivos de amplificación y los primers utilizados:

Tabla 3. Reactivos utilizados en la amplificación de los genes Bax y Bcl-2.

Stock reactivos	Concentración y volumen (20.4 µl)
TaqMan Universal PCR Master Mix	10 µl (1X)
Cebadores	Foward gen 1 (3µM) 2 µl (0.3µM)
	Reverse gen 1 (3µM) 2 µl (0.3µM)
Sonda del gen marcador (1µM)	2 µl (0.1µM)
ADN Exo (50X)	0.4 µl
Mix EXO	2 µl
c-ADN (50 ng)	2 µl

Para **Bcl-2** las parejas de cebadores:

-Forward: CCTGTGGATGACTGAGTACCTGAA
- Reverse: ACCTACCCAGCCTCCGTTATC

Para el **Bax**:

-Forward: GGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTG
- Reverse: CAGTTCCGGCACCTTGGT

Las condiciones de amplificación en el termociclador (7300 AppliedBiosystem) fueron universales:

- ciclo 50°C durante 2 min,
- ciclo a 95°C durante 10 min,
- 40 ciclos de: 95°C-15 seg y 60°C-1 min

La cuantificación de la expresión génica se realiza de forma relativa, obteniéndose la magnitud de los cambios fisiológicos en el gen biomarcador en comparación con un gen de referencia. Para la cuantificación se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá. El sistema de PCR a tiempo real detecta la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y el software de análisis representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de RNA/DNA iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

. Para los cálculos se hizo uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Donde:

$\Delta Ct = (Ct \text{ gen biomarcador} - Ct \text{ gen control interno (GAPDH)})$.

$\Delta\Delta Ct (\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia})$.

Como gen control se utilizó el GAPDH.

Como muestras de referencia, fueron las células vivas (sin daño celular).

3.4.3. Evaluación *in vivo* de la actividad neuroprotectora mediante modelo de pez cebra

El objetivo es el análisis del efecto de la suplementación del extracto en fenómenos de neuroprotección frente a daño inducido mediante la neurotoxina ácido kaínico (KA), así como también se estudia su influencia en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC).

3.4.3.1 Efecto neuroprotector

Como modelo experimental se ha utilizado la larva de pez cebra (*Danio rerio*), analizando el efecto de la suplementación del extracto frente a daño neurotóxico en larvas de 72 horas post-fertilización (hpf).

Se ha utilizado la máxima dosis tolerada (MTD) del extracto determinada para el estudio de neuroprotección. El efecto neuroprotector del extracto se determina frente a una pérdida controlada de neuronas colinérgicas, la cual se utiliza como marcador del estado general del sistema nervioso central.

Para la realización del ensayo, fueron utilizados únicamente aquellos huevos fecundados que no presentaron ningún tipo de anomalía externa, por lo que se separaron y rechazaron aquéllos que presentaban anomalías de división celular (asimetrías, vesículas) o cuya membrana estaba dañada. Desde el momento de la fecundación, los embriones fueron transferidos a una microplaca de 24 pocillos, de modo que cada pocillo contuviera seis embriones en un volumen de 2 ml con los siguientes tratamientos: con KA, con el extracto de ensayo más KA y grupo vehículo, realizando tres réplicas por condición. Por último, las placas fueron incubadas a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 h. Transcurrido este tiempo de incubación, se examinaron las larvas y se determinó que el estado general de las mismas era correcto, sin ningún tipo de anomalías externas visibles. Finalmente, las larvas fueron procesadas para los estudios de neuroprotección. De manera paralela se utilizaron grupos control que fueron sembrados en medio de embriones sin tratamiento.

3.4.3.1.1. Determinación de los niveles de acetil colinesterasa (AChE)

Una vez finalizado el periodo experimental, se llevó a cabo el procesamiento de las larvas para la determinación de AchE mediante el método Ellman modificado (Ellman et al, 1961). Las larvas fueron homogenizadas mecánicamente y las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos para la obtención de los sobrenadantes, los cuales fueron utilizados para la determinación de los niveles de AChE en función de

los tratamientos administrados. Se basa en la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina ATCh por la enzima colinesterasa. La tiocolina liberada reacciona con un cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB), dando lugar como producto de reacción al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo cuyo máximo de absorbancia se encuentra entre 405 y 420 nm de longitud de onda. La tasa de aparición del producto de la reacción es mayor conforme aumenta la actividad enzimática existente en la muestra. La reacción se llevo a cabo en microplacas, en las cuales se colocaron por pocillo 280 µl de DTNB en buffer PBS 0.1M (pH 7.8) y 10 µl del extracto enzimático (homogeneizado). La reacción fue iniciada agregando 10 µl de cloruro de acetiltiocolina. Inmediatamente, en un lector de microplacas se hicieron las lecturas de absorbancia. Se realizaron tres replicados y como blancos se utilizaron 3 pozos por microplaca sustituyendo la muestra por buffer.

Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación de proteína total de cada grupo experimental mediante la cuantificación de proteína por BCA (Smith et al, 1985), como proceso de normalización del efecto de los niveles de AChE por los niveles de proteína. El método de BCA emplea el ácido bicinonínico capaz de formar un complejo púrpura intenso con los iones Cu^+ en medio alcalino que tiene lectura de absorbancia a 562 nm. Se añaden 100 µl de BCA a 10 µl de muestra, se incuban 10 minutos a 60°C y se lee la absorbancia a 562nm.

Finalmente, se tomaron como medida de referencia los niveles de AChE determinados en el grupo control, considerándolos como el 100%.

Muestras en estudio:

Tabla 4. Grupos de estudio de los niveles de acetilcolinesterasa.

Grupo	COMPUESTO
Vehículo	Agua de dilución (AD) con DMSO (0.1%)
Grupo 1 (neurotoxina)	KA (100 µM) en AD con DMSO (0.1%)
Grupo 2 (extracto + neurotoxina)	Muestras 1 (MTD) + KA (100 µM) en AD con DMSO (0.1%)

3.4.3.2. Influencia en el desarrollo del sistema nervioso central

En el modelo experimental de pez cebra se ha analizado el efecto de la suplementación sobre el desarrollo del SNC en larvas de 72 horas post fertilización (hpf).

Los estudios realizados sobre el desarrollo del SNC del pez cebra (Kimmel *et al*, 1995) indican que a las 24 horas ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (precursores de músculo y esqueleto). A los cinco días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Asimismo, ha aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales. En este momento el pez es capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento.

Se ha evaluado una única concentración correspondiente a la máxima dosis tolerada (MTD). La realización del ensayo se llevo a cabo de la misma manera que para el estudio del efecto neuroprotector descrito anteriormente (determinación de acetilcolinesterasa y su normalización a la concentración de proteínas, considerando como referencia los niveles de AChE determinados en el grupo control, considerándolos como el 100%) y finalmente las larvas fueron procesadas para los estudios de desarrollo del SNC. De manera paralela se utilizaron grupos control que fueron sembrados en medio de embriones sin tratamiento. Las muestras en estudio están representadas en la siguiente tabla:

Tabla 5. Muestras en estudio del desarrollo del sistema nervioso central en pez cebra.

Grupo	COMPUESTO
Control	Agua de dilución (AD) con DMSO (0.1%)
Tratamiento	Extracto en AD con DMSO (0.1%)

3.5. EVALUACIÓN REPERCUSIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL.

3.5.1. Selección de modelos celulares y biomarcadores génicos

La evaluación de la actividad reguladora del tejido adiposo se ha realizado con un modelo de línea celular de fibroblasto que puede diferenciarse en adipocito 3T3-L1 (CL-173 (ATCC)). Se ha evaluado el efecto del extracto en la adipogénesis, proceso de formación y maduración del adipocito, analizando dos genes que participan en el proceso, el gen PPAR γ (factor transcripcional que a su vez modula la expresión de más genes) y el gen de la leptina (molécula perteneciente a la familia de adipocinas). Ambos genes se expresan durante la adipogénesis. Se considera efecto regulador del tejido adiposo si modifica la expresión de los genes, mostrándose tendencia anti-obesidad si disminuye la expresión de los genes marcadores (Figura 9). Como gen control se ha utilizado el gen GAPDH, considerado un gen para el mantenimiento de la maquinaria celular (“housekeeping”) (Oben et al, 2008; Blancas-Flores et al, 2010; Suzuki et al, 2011).

Para la realización del ensayo se diferencian las células 3T3-L1 (CL-173 (ATCC)) en presencia del extracto de olivo a las concentraciones determinadas. Para ello se sigue el protocolo de diferenciación que se describe a continuación. En este caso, el ensayo se realizó en placas de 12 pocillos con una siembra inicial de 60.000 cel/pocillo. Una vez finalizado el tratamiento se recogen las células para el análisis molecular de RT-PCR a tiempo real.

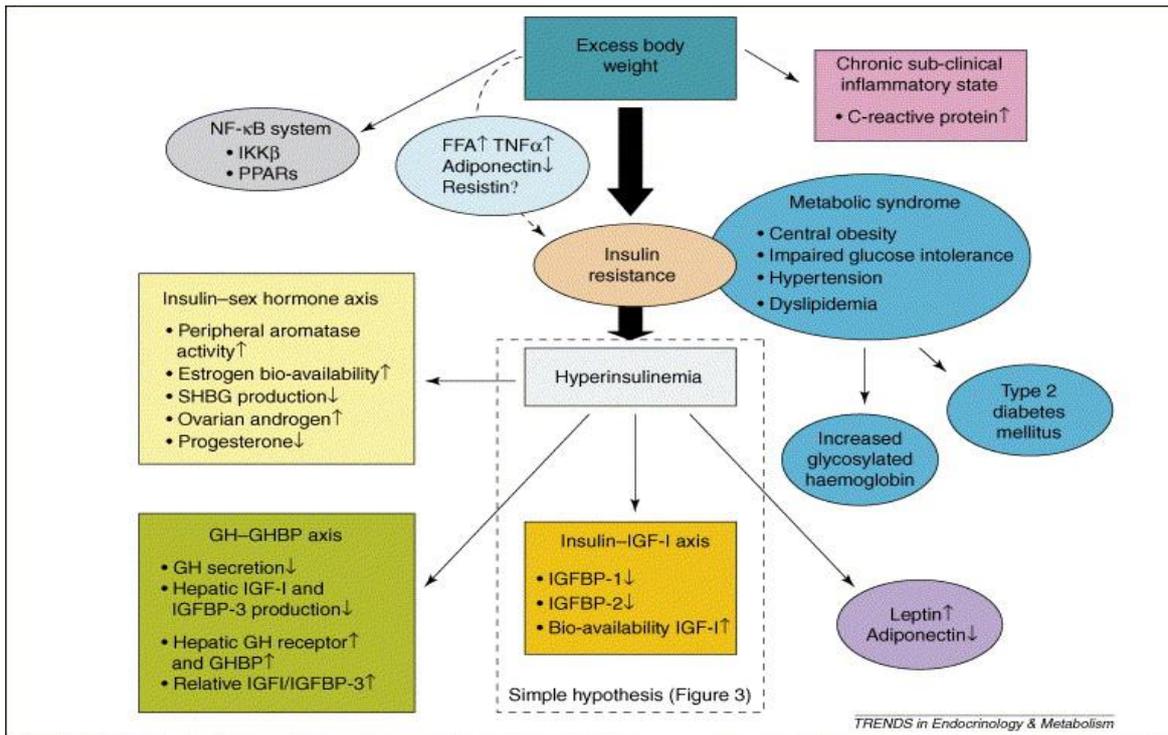


Figura 9. Efectos metabólicos de la obesidad.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.006>,

3.5.2. Evaluación *in vitro* de la actividad anti-obesidad mediante cultivos celulares.

3.5.2.1. Diferenciación de células de tejido adiposo (línea celular 3T3-L1)

Para ello se emplea un bioensayo celular con la línea celular 3T3-L1 (CL-173 (ATCC)). Esta línea de fibroblastos de ratón puede diferenciarse a adipocitos en condiciones específicas de incubación. Por ello es un buen modelo para los estudios relacionados con la obesidad (Poulos et al., 2010). Para la diferenciación se siembran las células de fibroblasto a 6.000 células por pocillo en una placa multipocillo de 96. Tras dos días de incubación a 37°C y 5% de CO₂ en el medio de crecimiento para fibroblastos (DMEM 4% glucosa, 10% CS, 2mM de L-glutamina y Penicilina (100 U/ml) - Streptomycin (10 µg/ml)). Dos días después se inicia la diferenciación substituyendo el medio de crecimiento por el medio de diferenciación 1 (DMEM/10% fetal calf serum/0.5 mM IBMX/1 µM dexametasona). A los dos días se cambia el medio por el medio de diferenciación 2 (DMEM+10% fetal calf serum+10 µg/ml insulina). A

los 3 días se cambia el medio por el medio de mantenimiento (DMEM/10% fetal calf serum). El adipocito maduro se considera a partir de los 5-7 días de diferenciación (Lee et al, 2010; Yao et al, 2010). La diferenciación implica cambios moleculares y metabólicos, así como cambios morfológicos. Las células de adipocitos presentan forma redondeada y acumulación de cuerpos grasos (Figura 10).

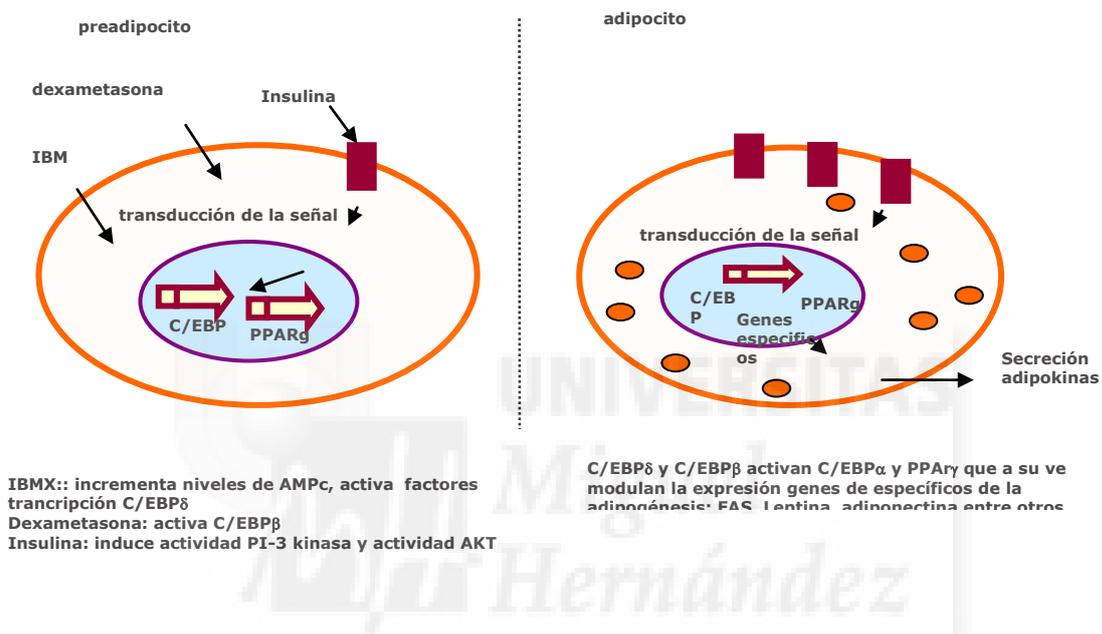


Figura 10. Cambios moleculares del proceso de diferenciación de células del tejido adiposo.

3.5.2.2. Análisis masivo de la actividad anti-obesidad: “screening high-throughput”

El cribado del extracto bioactivo modulador de la obesidad se ha realizado mediante un sistema de “screening high-throughput”. Este sistema se basa en evaluar la modulación de un biomarcador de obesidad en presencia del extracto de interés. Como biomarcador de obesidad se analiza la capacidad de inhibir la formación de cúmulos de grasa durante la adipogénesis (Suzuki et al, 2011; Roh et al, 2012).

Para ello se emplea un bioensayo celular con la línea celular 3T3-L1 (CL-173 (ATCC) como modelo in vitro del tejido adiposo según las condiciones experimentales

indicadas en el punto 4. Para el ensayo se inicia el proceso de diferenciación en presencia del extracto a ensayar. Una vez finalizada la diferenciación se analiza la formación de los cúmulos de grasa mediante una técnica colorimétrica con el reactivo Oil-Red (Chemico Internacional Cat. No. ECM950). Este compuesto tiñe los cúmulos de grasas. La lectura se realiza midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Los resultados de cúmulos de grasa son directamente proporcionales a la absorbancia a 490 nm, de modo que los cambios en absorbancia se relacionan con cambios en la concentración de lípidos. La expresión de resultados se realiza respecto a las células control positivo (células diferenciadas) haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = (\text{Abs}_{490 \text{ nm}} \text{ muestra} / \text{Abs}_{490 \text{ nm}} \text{ control cel. Diferenc.}) \times 100$$

3.5.2.3. Evaluación de la capacidad de regular el tejido adiposo. Análisis expresión génica

La evaluación de la actividad reguladora del tejido adiposo en la línea celular de fibroblasto diferenciado en adipocito ha permitido conocer el efecto del extracto en la adipogénesis, analizando dos genes que participan en el proceso, el gen PPAR γ y el gen de la leptina, ambos genes son expresados en la adipogénesis.

El análisis de la expresión génica indica la actividad de un gen, e implica analizar el material genético como ARN, molécula intermedia en el proceso de expresión de un gen, producto derivado de su actividad. Generalmente, la actividad de un gen varía en función de las necesidades celulares, excepto en los genes estructurales y genes de funcionamiento básico que presentan una expresión constante.

El análisis de la expresión génica se realiza a partir de las células, de las que se extrae el ARN. La extracción se realizó de forma automática con el equipo MAXWELL (Maxwell® 16 LEV simple RNA Tissue Kit, Promega). A partir del ARN se obtuvo el c-DNA mediante la enzima transcriptasa (High Capacity cDNA reverse transcription kit (4368814) Applied Biosystems). A partir del cDNA se realizó la PCR en tiempo

real utilizando los primers previamente diseñados de los biomarcadores seleccionados. En el caso del tejido adiposo **PPARg** y **Leptina**, utilizando como gen control GAPDH. Las condiciones de reacción se describen en la siguiente tabla. Se utilizó un control interno de reacción de PCR, (ADN exo) para comprobar el funcionamiento de la reacción de amplificación. Este control interno está a concentraciones muy bajas y no interfiere a la reacción de amplificación de los genes de interés.

A continuación se muestra la composición de la mezcla de reactivos de amplificación:

Tabla 6. Reactivos utilizados en la amplificación de los genes PPARg y de leptina.

Stock reactivos	Concentración y volumen (20.4 µl)
TaqMan Universal PCR Master Mix	10 µl (1X)
	Foward gen 1 (3µM) 2 µl (0.3µM)
Cebadores	Reverse gen 1 (3µM) 2 µl (0.3µM)
Sonda del gen marcador (1µM)	2 µl (0.1µM)
ADN Exo (50X)	0.4 µl
Mix EXO	2 µl
c-ADN (50 ng)	2 µl
Para PPARg las parejas de cebadores:	
-Forward:	GAGAAGCTGTTGGCGGAGAT
- Reverse:	CCAGGGCTCGCAGATCAG
Para el gen de leptina :	
-Forward:	CCAAAACCCTCATCAAGACCAT
- Reverse:	CCTCTGCTTGGCGGATAACC

Las condiciones de amplificación en el termociclador (7300 AppliedBiosystem) fueron universales:

- ciclo 50°C durante 2 min,
- ciclo a 95°C durante 10 min,
- 40 ciclos de: 95°C-15 seg y 60°C-1 min

La cuantificación de la expresión génica se realiza de forma relativa, de forma que se obtiene la magnitud de los cambios fisiológicos en el gen biomarcador en comparación con un gen de referencia. Para los cálculos se hizo uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Donde

$\Delta Ct = (Ct \text{ gen biomarcador} - Ct \text{ gen control interno (GAPDH)})$.

$\Delta\Delta Ct (\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia})$.

Como gen control se utilizó GAPDH

Como muestras de referencia, fueron las células diferenciadas.

3.5.3. Evaluación in vivo de la actividad mediante modelo de pez cebra

El estudio propuesto tiene como objetivo el análisis del efecto de la suplementación del extracto de olivo en fenómenos de obesidad. Como modelo experimental se ha utilizado la larva de pez cebra (*Danio rerio*), analizando el efecto de la suplementación de una muestra problema sobre varios factores relacionados con la obesidad en larvas de 72 horas post-fertilización (hpf).

Se ha evaluado una única concentración del extracto correspondiente a la máxima dosis tolerada (MTD), la cual ha sido determinada en ensayos previos.

Para la realización del ensayo, fueron utilizados únicamente aquellos huevos fecundados que no presentaron ningún tipo de anomalía externa, por lo que se separaron y rechazaron aquéllos que presentaban anomalías de división celular (asimetrías,

vesículas) o cuya membrana estaba dañada. Desde el momento de la fecundación, los embriones fueron transferidos a una microplaca de 24 pocillos, con las siguientes condiciones experimentales en función del ensayo a determinar:

- *Peso de larvas*: **10 embriones** en un volumen de 2 ml de la concentración de ensayo y del vehículo, realizando **4 réplicas** por condición.
- *Colesterol total*: **6 embriones** en un volumen de 2 ml de la concentración de ensayo y del vehículo, realizando **tres réplicas** por condición.
- *Triglicéridos*: **6 embriones** en un volumen de 2 ml de la concentración de ensayo y del vehículo, realizando **tres réplicas** por condición.
- *Ácidos grasos*: **10 embriones** en un volumen de 2 ml de las concentración de ensayo y del vehículo, realizando **dos réplicas** por condición.

Por último, las placas fueron incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 h. Transcurrido este tiempo de incubación, se examinaron todas las larvas y se determinó que el estado general de las mismas era totalmente correcto, sin ningún tipo de anomalías visibles o comportamiento anómalo. Finalmente, las larvas fueron procesadas para los estudios sobre obesidad. De manera paralela se utilizaron grupos control que fueron sembrados en medio de embriones sin tratamiento. Así, las muestras en estudio se colocaron según la tabla siguiente:

Tabla 7. Muestras en estudio de obesidad en pez cebra.

Grupo	CONDICIONES
Control	Agua de dilución (AD) con DMSO (0.1%)
Tratamiento	Extracto en AD con DMSO (0.1%)

3.5.3.1. Determinación de índice de masa corporal

Para llevar a cabo esta determinación, una vez terminado el periodo experimental (72 hpf), las larvas fueron procesadas de la siguiente manera:

1. Se pesan 2 tubos eppendorf y se identifican cada tubo con los tratamientos del experimento (1 extracto + 1 control).
2. Se transfieren todas las larvas del mismo tratamiento (10 larvas x 4 pocillos) a los tubos eppendorf prepesados, de modo que cada uno de ellos contenga 40 larvas totales.
3. Retirar el tratamiento o vehículo (en caso del grupo control) y añadir 1 ml de etanol absoluto. Fijar las larvas durante 30 minutos a temperatura ambiente (para evitar su degradación).
4. Retirar el etanol mediante aspiración y dejar los tubos eppendorf abiertos a temperatura ambiente durante 24 horas.
5. Pesar los eppendorf conteniendo las larvas en su interior. Para la obtención del peso de las larvas, se resta el peso de los eppendorf con las larvas menos el peso de los eppendorf vacíos (los prepesados). Posteriormente, se normaliza el peso de los grupos de tratamiento respecto a los controles, considerando a estos últimos como el 100%.

3.5.3.2. Determinación de colesterol total

Para llevar a cabo esta determinación, una vez terminado el periodo experimental (72 hpf), las larvas se procesan para la determinación de colesterol total (CT) siguiendo el método de Mizoguchi et al (2004), mediante técnicas fluorométricas. El método está basado en la oxidación del colesterol por colesterol oxidasa (CHOD) previa hidrólisis enzimática de los esteres mediante enzimas lipasas, el H₂O₂ generado en la reacción de oxidación permite que se una el fenol con la aminoantipirina por una reacción catalizada por peroxidasa (POD). El indicador final es la quinoneimina.

1. Se colocan 6 embriones en un volumen de 2 ml de la concentración de ensayo y del vehículo, realizando 3 replicas por condición.
2. Se añaden 300 µl de solución de fosfato sódico monobásico anhidro 0.1M pH 7.05% Tritón X-100.
3. Se congelan las muestras a -20°C hasta su posterior determinación.

4. Se descongelan los tubos que contienen a los embriones.
5. Se homogenizan las muestras en un molino vibratorio de laboratorio a una frecuencia de 30/s durante medio minuto.
6. Centrifugar las muestras a 10.000 rpm durante 5 minutos.
7. Una vez finalizada la centrifugación de las muestras se recogen 25 μ l del sobrenadante sin tocar el pellet formado en el fondo del tubo.
8. Se miden los niveles de colesterol añadiendo a 25 μ l del sobrenadante 2.5 ml del reactivo de trabajo que contiene: tampón PIPES 35mM, Naci 0.5 mM, fenol 2.8 mM, colesterol esterase 0.2 UI/ml, colesterol oxidasa 0.1 UI/ml, peroxidasa 0.8 UI/ml y 4 aminoantipirina 0.5 mM.
9. La mezcla resultante se agita con vortex y se incuba 5 min a 37 °C.
10. Se mide la absorbancia de la mezcla resultante a 500 nm.
11. Los valores de colesterol se obtienen por interpolación en una curva patrón elaborada con un estándar de colesterol acuoso de 200 mg/dl.

Para normalizar la medida de CT, se determina la cantidad de proteína de cada muestra, mediante el método previamente descrito.

3.5.3.3. Determinación de triglicéridos.

Para llevar a cabo esta determinación, una vez terminado el periodo experimental (72 hpf), las larvas se procesan de igual forma que la descrita para la determinación de colesterol, y se procede a la determinación de triglicéridos (TG) mediante el método de Nanjee y Miller (1996). Los triglicéridos son incubados con lipoprotein lipasa (LPL) liberando glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno. Éste reacciona con 4-aminoantipirina (4-AP) y p-clorofenol, catalizado por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja. La intensidad del color es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra. Cuya absorbancia se mide a 505nm

La curva patrón se realiza con una solución de triglicéridos de 200mg/dl.

Siguiendo el mismo procesado de larvas de la determinación anterior del colesterol:

1. Se toman 50 μ l del sobrenadante a los que se añaden 5 ml del reactivo que contiene:

PIPES	45Mm
LPL	100 U/ml
GK	1.5 U/ml
ATP	0.9mM
GPO	4 U/ml
4-AP	0.75mM
P-clorofenol	6 mM
MgCl	5mM

2. Se agita con vortex y se incuba 5 minutos a 37°C.
3. Leer absorbancia a 500nm.
4. Los valores de TG se obtuvieron por comparación de absorbancias con un patrón acuoso de glicerol equivalente a 200mg/dl de trioleína.

Para normalizar la medida de TG, se determina la cantidad de proteína de cada muestra.

3.5.3.4. Determinación del perfil de ácidos grasos.

Para llevar a cabo esta determinación, una vez terminado el periodo experimental (72 hpf), las larvas se procesan para la determinación de los esteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES), siguiendo el método publicado por Jiann-Tsyh Lin et al. (1995) basado en la extracción previa de los ácidos grasos a partir de las muestras de embriones de pez cebra con una metilación posterior, y su análisis mediante cromatografía de gases.

Se empleó 1 ml del sistema extractivo metanol/agua por cada 800 μ l del sobrenadante de las larvas procesadas. Se realiza la extracción a 60°C durante 10 min bajo agitación y atmosfera de nitrógeno. La mezcla obtenida se filtra mediante filtros de fibra de vidrio. El residuo se lava con la mezcla de metanol y agua, añadiéndolo al filtrado anterior. Las disoluciones lipídicas finales son evaporadas en corriente de nitrógeno y metiladas.

La metilación se realizó con cloruro de acetilo en presencia de metanol y a una temperatura de 100°C durante 1 hora en tubos herméticamente cerrados y con agitación cada 10 minutos. Se dejó enfriar y se llevó a sequedad con nitrógeno. A continuación, se resuspendió en 0.5 ml de n-hexano para inyectar al cromatógrafo de gases. El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases 7890 A Series GC (Agilent) acoplado con un detector de ionización de llama. La separación se realizó con una columna Supelco SP-2380 (60 m x 0.25 mm x 0.2 μ m film thickness).



Tabla 8. Condiciones de la cromatografía de gases para la determinación de AG.

Fase estacionaria	Supelco SP TM 2380 Fused Silica Capillary Column 60m.x0.25mm.x0.2µm
Fase Móvil (gas)	Nitrógeno Puro (0.99999)
V_{inyección} (µl)	1.0 µl
Horno	Tiempo de equilibrio: 0.2 minutos T ₀ = 60 °C (0.5 min) T ₁ = 150°C (10°C/min, 5 min) T ₂ = 220 °C (2°C/min, 1 min) Post-run: 60°C Duración 60.5 min
Inyector	T = 250 °C (60.5 min) P = 26.5 psi (74.4 ml/min) Jeringa 10 µl V inyección : 1.0 µl Solvent A (hexano): 3 Lavados pre y 3 Lavados postinyección. V máximo. Solvent B (tolueno): 3 Lavados pre y 3 Lavados postinyección. V máximo. 2 lavados con muestra 2 µl y 4 pistonazos.
Liner	Split/Splitless Purga de septum 3 ml/min
Split	50:1 (70 ml/min)
Flujo constante	1.4 ml/min. P= 24.8 psi. Velocidad = 26.9 cm/s
Detector FID	T = 280°C Make-up: Nitrógeno 30 ml/min
Gases combustión	Aire (400 L/h) e Hidrógeno (45 l/h)
Gas Saver	On 20 ml/min, tras 4 minutos
Modo de Medida	Áreas y % de Área

Se utilizaron como patrón interno el metil éster del ácido graso C17, una mezcla de estándares para la determinación de tiempos de elución y de la correspondencia entre el área y concentración.

En el ensayo se usó la mezcla patrón de 37 ácidos grasos Supelco[®]37 Component FAME Mix, 10mg/ml in methylene chloride (varied), analytical standard (Sigma-Aldrich), para este método se emplea una concentración de 1mg/ml.

Se realizaron las determinaciones de los siguientes ácidos grasos:

C4 Butírico,

C6 Valérico,

C8 Octanoico (Caprílico),

C7 Heptanoico, C9 Nonanoico,

C10 Decanoico (Cáprico),

C11 Undecanoico,

C12 Dodecanoico (Láurico),

4OC5 4-Oxopentanoico,

C13 Tridecanoico (Levulínico),

C14 Tetradecanoico (Mirístico),

C15 Pentadecanoico,

C16 Hexadecanoico (Palmítico),

C16:1n7 Cis-9-Hexadecenoico (Palmitoleico),

C17 heptadecanoico (Margárico),

C17:1 Cis-10-Heptadecenoico,

C16:3n4,

C18 Octadecanoico (Esteárico),

tC18:1n9 Trans-9-Octadecenoico (Elaídico),

C18:1n9 Cis-9-Octadecenoico (Oleico),

C18:1n7 Cis-9-Hexadecenoico (Palmitoleico),

tC18:2n6 Trans-9,12-Octadecadienoico (Linolelaídico),

C18:2n6 Cis-9,12-Octadecadienoico (Linoleico),

C20 Eicosanoico (Araquídico),

C18:3n6 Cis-6,9,12-Octadecatrienoico (γ Linolénico),

C20:1n9 Cis-11-Eicosenoico (Gondoico),

C21 Heneicosanoico,

C20:2 Cis-11,14-Eicosadienoico,
C22 Docosanoico (Behénico),
C20:3n6 Cis-8,11,14-Eicosatrienoico,
C20:3n3 Cis-11,14,17-Eicosatrienoico,
C20:4n6 Cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoico (Araquidónico),
C20:4n3 Eicosatetraenoico,
C23 Tricosanoico,
C22 Docosanoico,
C20:5n3 Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentanoico (Eicosapentanoico) (EPA),
C24Tetracosanoico (Lignocérico),
C24:1 Cis-15-Tetracosenoico (Nervónico),
C22:4n6 Cis-7,10,13,16-Docosatetraenoico,
C22:5n3 Cis-7,10,13,16,19-Docosapentaenoico, y
C22:6n3 Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico (Docosahexaenoico) (DHA).

Se han determinado las proporciones p/p de los ácidos grasos que se detectaron palmítico (C16:1n7), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9), linoléico (C18:2n6) y docosahexaenoico (C22:6n3).

3.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El método estadístico utilizado fue One-way ANOVA con un post test de comparación múltiple de Dunnett's, que compara cada grupo de tratamiento con el grupo control. Las rectas fueron ajustadas mediante el método de ajuste lineal de Ellman modificado.

Se utilizó el programa estadístico Graph Pad Prism versión 3.00 para Windows, GraphPad software, San Diego California USA.

Las diferencias entre grupos se consideraron significativas si $p < 0.05$.

4. RESULTADOS





4. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA FRACCIÓN EXTRAÍDA DEL OLIVO

El objetivo de esta tarea es determinar el grado citotóxico del extracto a fin de identificar que no presenta daño celular, y definir el rango de concentración para estudios posteriores de actividad neuroprotectora y reguladora de la obesidad. Para ello, se ha hecho uso de un sistema in vitro basado en líneas celulares. Se ha evaluado la viabilidad celular después de la incubación con el extracto a diferentes concentraciones.

Los ensayos se realizaron a partir del extracto liofilizado para minimizar la interferencia del disolvente de extracción. A partir del extracto liofilizado se han preparado las soluciones bien en PBS y/o DMSO (concentraciones inferiores al 1%). En la siguiente tabla se muestra los resultados de toxicidad en función de la concentración aplicada sobre el modelo celular.

Tabla 9. Absorbancias obtenidas a distintas concentraciones del extracto y porcentaje de viabilidad.

Concentraciones extracto	Abs muestra	Abs control	% Viabilidad
10	0.82	0.71	100 %
50	0.55	0.71	77%
200	0.49	0.71	69%

Tabla 10. Estudio de citotoxicidad del extracto a diversas concentraciones.

Concentración ensayada		
(PPM)		
200	50	10
Tóxico	Viable	Viable

Tóxico: Se considera efecto tóxico cuando la viabilidad celular es inferior al 75%

Viable: Se considera efecto viable cuando la viabilidad celular es superior al 75%.

Se observa que el extracto muestra efectos no tóxicos a concentraciones de 50 y 10 ppm (polifenoles totales).

A partir del estudio de citotoxicidad se ha seleccionado el rango de concentración del extracto para los ensayos de las bioactividades posteriores (neuroprotección y efecto del tejido adiposo). En la siguiente tabla se muestran los resultados junto con las dosis LD50 (dosis que presenta una letalidad del 50%), obtenida por interpolación de los datos de la tabla 9, indicando que los valores que presentan toxicidad son efectivamente superiores al rango de concentración seleccionado.

Tabla 11. Conclusiones del estudio de citotoxicidad.

LD₅₀* (ppm)	Rango Concentración estudios bioactividad
Concentración	(ppm)
> 800	50-10

LD₅₀*: Concentración que presenta una letalidad del 50%.

4.2. EVALUACIÓN DE LA BIOSEGURIDAD DEL EXTRACTO

El objetivo del estudio es analizar la bioseguridad y determinar la dosis máxima tolerada (MTD) del extracto mediante el uso del ensayo FET en embrión de pez cebra.

La supervivencia de los huevos fertilizados en el grupo vehículo fue superior al 90%, con lo que el ensayo se considera válido.

4.2.1. Mortalidad acumulativa a cada concentración y a 24, 48 y 72 horas

Los porcentajes de mortalidad observados en los embriones a las 24, 48 y 72 horas post-fertilización (hpf) son nulos para todos los casos. Los ensayos FET por norma se realizan hasta un tiempo de 48 hpf, sin embargo, se ha implementado el estudio llevándolo hasta el tiempo de 72 h, debido a que ese tiempo se produce el proceso denominado como decorionización del embrión, es decir, la ruptura del corion (membrana que rodea al embrión) para comenzar el proceso de estadio larvario, considerándose este parámetro como un marcador toxicológico adicional al estudio FET.

Los embriones fueron expuestos a 5 concentraciones diferentes del extracto (1, 3, 10, 30, 100 mg/l) y se testó la viabilidad a 24, 48 y 72 hpf.

No se observó mortalidad por debajo o igual a la dosis de 100 mg/l. Según el *Test Guideline* de la OECD 212 (1998), *Ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines*, no sería preciso someter a ensayo con concentraciones superiores a 100 mg/l, ya que según la teoría binomial, cuando se usan 10 animales expuestos a esta concentración y no presentan mortalidad, existe un 99.9% de confianza de que la LC50 sea mayor de 100 mg/l, siendo esta dosis considerada como la concentración límite o umbral para ensayos de toxicidad en peces. No obstante, el estudio presente pretende determinar la máxima dosis tolerada, con el objetivo de alcanzar la mejor dosis de estudio para las siguientes aproximaciones experimentales.

4.2.2. Efectos subletales del extracto de estudio a cada concentración y a 24, 48 y 72 horas

Además de la mortalidad acumulativa, también se determinaron los efectos subletales que indujo el extracto con cada una de las concentraciones testadas a los 3 tiempos estudiados.

No se apareció ningún porcentaje de embriones que sufriera efectos subletales, como ausencia de movimiento espontaneo, despigmentación, formación de edemas, formación de coagulo, es decir no se observaron efectos tóxicos.

4.2.3. Efectos teratogénicos del extracto de estudio a cada concentración y a 24, 48 y 72 horas.

También fueron determinados los efectos teratogénicos que indujo el extracto con cada una de las concentraciones testadas a los 3 tiempos estudiados.

Al igual que lo que ocurre con los fenómenos subletales, no se registró ningún porcentaje de embriones que sufriera efectos teratogénicos (malformación de órganos y estructuras, escoliosis, raquitismo, retardo generalizado del crecimiento).

4.2.4. Porcentaje de eclosión de los embriones en función de la dosis y el tiempo.

Como se comentó al comienzo, un fenómeno importante para el estudio de toxicidad en el modelo del pez cebra es la capacidad que tiene un compuesto de acelerar o retrasar el proceso denominado como eclosión, es decir, la salida del embrión al exterior para convertirse en estadio larvario.

No se registró ningún retraso o adelanto en el tiempo post-fertilización para la eclosión con la concentración del extracto.

4.2.5. Determinación de LC50, LOEC y NOEC.

Finalmente, se muestra una tabla de los parámetros de concentración letal 50 (LC50), concentración mínima con efecto observado (LOEC) y concentración máxima sin efecto observado (NOEC), también denominada como máxima dosis tolerada (MTD).

Tabla 12. Valores de LC50, LOEC y NOEC.

mg/L	24	48	72
LC50	>100		
LOEC	>100		
NOEC	100		

Con el método de estudio realizado, se considera que el extracto es altamente bioseguro.

Al igual que lo indicado en el apartado 4.2.1. y según el *Test Guideline* de la OECD 212 (1998), *Ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines*, no sería preciso someter a ensayo con concentraciones superiores a 100 mg/l, ya que según la teoría binomial, cuando se usan 10 animales expuestos a esta concentración y no presentan mortalidad, existe un 99.9% de confianza de que la LC50 sea mayor de 100 mg/l, siendo esta dosis considerada como la concentración límite o umbral para ensayos de toxicidad en peces.

Teniendo en cuenta todos los factores estudiados se sabe que la máxima dosis tolerada es de 100 mg/l y será utilizada para los posteriores estudios en este modelo animal.

Alcanzar concentraciones de trabajo de más de 100 mg/l del extracto producía problemas con la disolución del mismo en agua de dilución por lo que se trabajó con la dosis más alta para evaluar la toxicidad, la cual alcanzaba un equilibrio entre la capacidad de disolución del extracto y la concentración final de uso. Ya que según el TG 203 de la OECD(1998), las sustancias no deben someterse a ensayo a concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el agua de ensayo.

4.3. NEUROPROTECCIÓN

4.3.1. Evaluación *in vitro* de la actividad neuroprotectora mediante cultivos celulares

En esta tarea se procedió a evaluar la actividad neuroprotectora del extracto, para ello, se utilizaron dos modelos experimentales *in vitro* basados en líneas celulares complementarios entre sí: análisis masivo con un biomarcador general y ensayo con biomarcadores específicos.

A partir del estudio de citotoxicidad, con el extracto de olivo y el rango de concentración no tóxica se realizó un estudio exploratorio del potencial neuroprotector con el fin de identificar si presentan efecto biológico. Posteriormente este extracto se validó mediante un modelo celular más específico en la siguiente subtarea.

Para la realización del bioensayo se hizo uso de un sistema de “screening high-throughput”. Este sistema se basa en el desarrollo de un modelo celular *in vitro* artificial que permite evaluar la respuesta de un biomarcador central de los procesos que causan daño celular, y entre ellos la degeneración neuronal, el factor transcripcional NFkb (para mayor detalles ver métodos). De modo que se evaluó cómo el extracto afecta a la actividad de NFkb, relacionando una disminución de la actividad de NFkb con una potencial actividad antiinflamatoria. Para ello se ha empleado la línea celular THP1-Xblue-CD14.

El diseño experimental se realizó considerando dos opciones: la incubación con el extracto primero, y posteriormente la inducción de la estimulación del biomarcador (NFkb) con el tratamiento con LPS. Y la otra opción, estimulación primero del biomarcador (NFkb) y la incubación con el extracto después. Paralelamente a la evaluación del efecto sobre la actividad de NFkb se analizó la viabilidad celular para comprobar el estado de las células después del tratamiento con el extracto.

Los resultados mostrados corresponden a la media resultante entre dos estudios independientes, y con tres réplicas por cada muestra en cada estudio. A continuación se muestran los resultados de las lecturas de absorbancias resultantes:

Tabla 13. Simulación del efecto preventivo. Absorbancias de la muestra y control a 50 y 10 ppm de polifenoles del extracto y porcentaje de viabilidad.

Extracto (ppm)	Abs muestra	% actividad NFκB
50	0.459	74.5±8.3
10	0.673	109.4±23.6
Cels+LPS	0.62	100.0±8.0
Cels	0.17	33.2±3.0

Tabla 14. Simulación del efecto terapéutico. Absorbancias de la muestra y control a 50 y 10 ppm del extracto y porcentaje de viabilidad.

Extracto(ppm)	Abs muestra	% actividad NFκB
50	0.414	65.1±9.1
10	0.56	91.0 ±1.6
Cels+LPS	0.64	100.0±8.0
Cels	0.17	33.2±3.0

En las siguientes figuras aparecen los resultados de la simulación del efecto preventivo, o sea los resultados de la actividad antiinflamatoria sobre células dañadas con posterioridad al tratamiento con extracto. Así, en la figura 11 se representa la actividad de NFκB en las células THP1 tratadas en primer lugar con el extracto y posteriormente con LPS para inducir estrés inflamatorio. La cuantificación de actividad de NFκB está referida al tratamiento con LPS. De modo que las células tratadas con LPS se consideran que activan a NFκB al 100% y respecto a este valor se expresa la actividad de NFκB de las células tratadas con la muestra. Cabe mencionar que todas las muestras analizadas presentaron viabilidad celular, y por tanto se valoraron los efectos sobre la actividad de NFκB

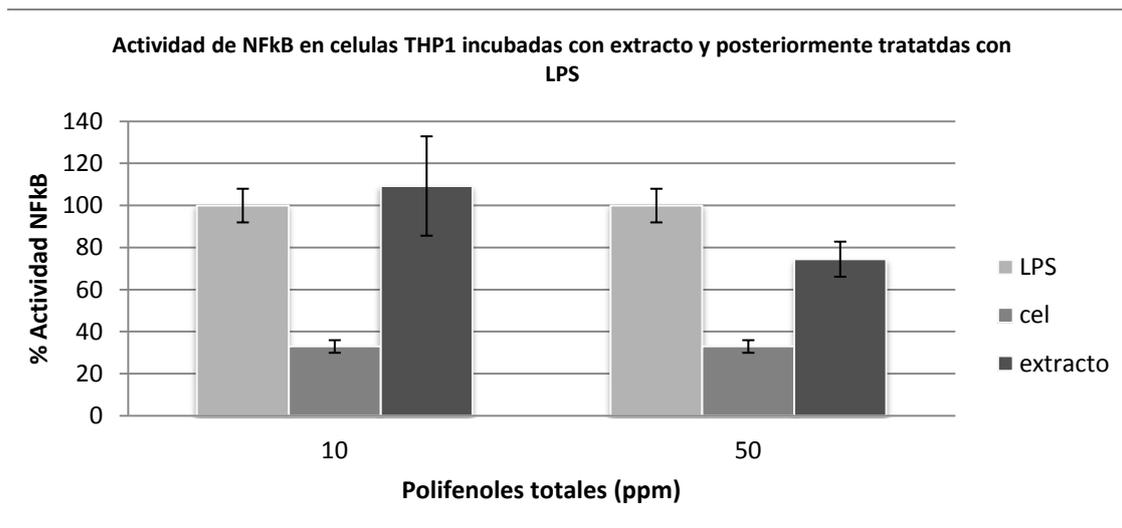


Figura 11. Actividad de NFkB en células THP1 incubadas con el extracto y posteriormente tratadas con LPS.

La capacidad antiinflamatoria del extracto se determinó a partir del efecto evaluado sobre la actividad de NFkB considerando la disminución de la actividad de NFkB como potencial actividad antiinflamatoria. Así pues, el poder antiinflamatorio se estableció de forma relativa teniendo como referencia de no actividad antiinflamatoria el tratamiento con LPS. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 12, en el eje X se representa la capacidad antiinflamatoria (unidades arbitrarias) y en el eje Y las distintas concentraciones aplicadas.

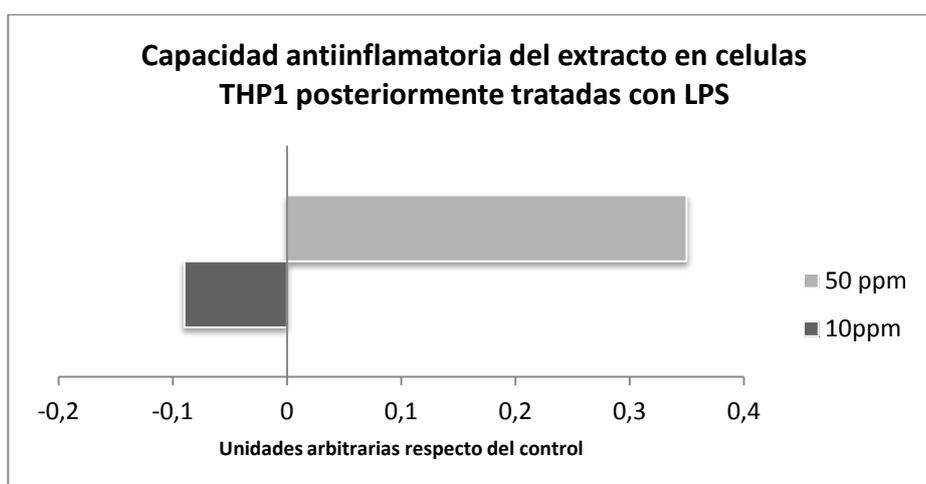


Figura 12. Capacidad antiinflamatoria del extracto, en células THP1 tratadas con el extracto y posteriormente estimuladas con LPS.

A partir de la figura se observa que el extracto presenta actividad antiinflamatoria a 50 ppm. Con una reducción de la actividad de NFκB del 26%.

Y en las siguientes figuras se presentan los datos de la simulación del efecto terapéutico, o se los resultados de la actividad antiinflamatoria sobre células dañadas previamente al tratamiento con el extracto. Así, en la figura 13, se presentan los resultados de actividad de NFκB en células THP1 obtenidos al inducir primero inflamación con LPS, y posteriormente tratar con el extracto. Al igual que en el diseño experimental anterior, la cuantificación de actividad de NFκB está referida al tratamiento con LPS. De modo que las células tratadas con LPS se consideran que activan a NFκB al 100% y respecto a este valor se expresa la actividad de NFκB de las células tratadas con las muestras. Todas muestras analizadas presentaron viabilidad celular, y por tanto se valoraron los efectos sobre la actividad de NFκB.

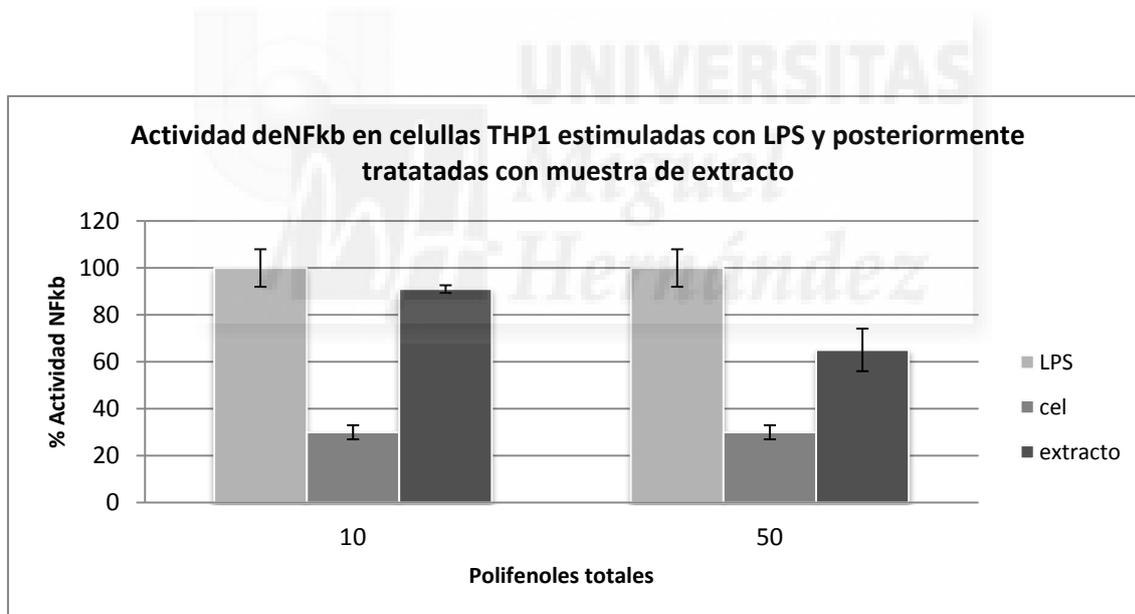


Figura 13. Actividad de NFκB en células THP1 estimuladas con LPS y posteriormente incubadas con el extracto.

La capacidad antiinflamatoria del extracto se determinó a partir del efecto evaluado sobre la actividad de NFκB considerando la disminución de la actividad de NFκB como potencial actividad antiinflamatoria. Así pues, el poder antiinflamatorio se

estableció de forma relativa teniendo como referencia de no actividad antiinflamatoria el tratamiento con LPS. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 14.

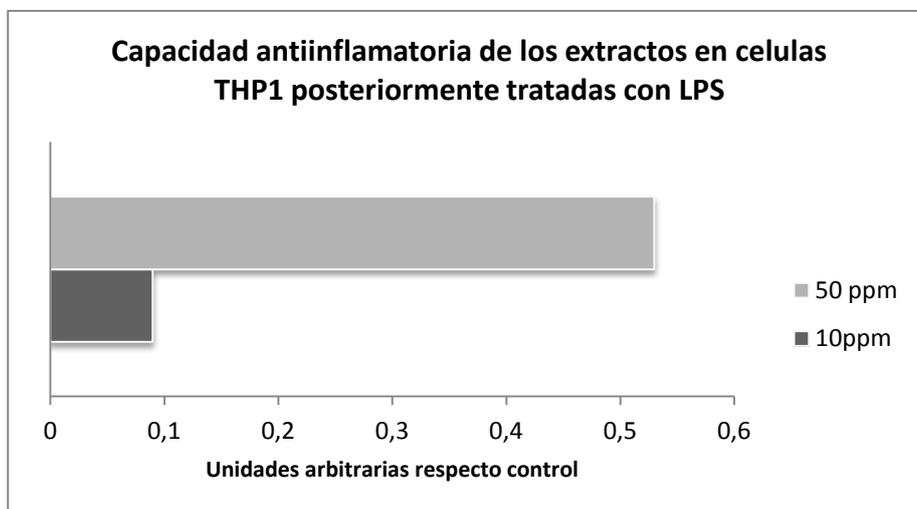


Figura 14. Capacidad antiinflamatoria del extracto, en células THP1 previamente estimuladas con LPS.

En la figura 10 se observa que la muestra presenta actividad antiinflamatoria a ambas concentraciones pero de manera significativa a la concentración de 50 ppm. Reduciendo la actividad del NFKb un 35%.

La comparación entre las dos experiencias, simulación efecto preventivo y terapéutico, muestra la misma tendencia en el extracto analizado. Es decir, en ambos casos el extracto presentó capacidad antiinflamatoria y a la misma concentración de 50 ppml.

4.3.2. Análisis de la expresión génica

El objetivo es evaluar la actividad neuroprotectora analizando la capacidad del extracto derivado del olivo para inhibir una de las principales causas de la degeneración neuronal: la inducción de la apoptosis (la activación no controlada de este mecanismo deriva en ciertas patologías neurodegenerativas como el Alzheimer ó Parkinson).

Para la evaluación del efecto citoprotector (protección frente apoptosis) se hizo uso de un sistema celular basado en una línea celular humana proveniente del sistema nervioso, la línea de neuroblastoma SH-SY5Y (94030304, ECCC). En presencia del extracto se reprodujo la “muerte neuronal”, apoptosis, con agua oxigenada (150 μ M) y se evaluó cómo la presencia del extracto afecta al proceso. Se utilizaron 2 marcadores génicos: el **gen Bax** de la familia de genes proapoptóticos (“genes de la muerte celular”) y el **gen Bcl2**, de la familia de genes antiapoptóticos (“genes de la supervivencia”). Se considera efecto neuroprotector si se disminuye la relación Bax/Bcl2 (Gao et al, 2008).

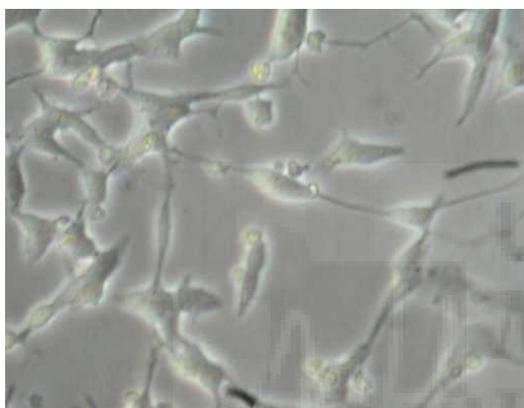


Figura A. Línea SH-SY5Y diferenciada con Ácido retinoico 10 μ M.



Figura B. Línea SH-SY5Y diferenciada con Ácido retinoico 10 μ M y tratada con H₂O₂ 150 μ M.

Figura 15. Efecto del daño neuronal con agua oxigenada en la línea SH-SY5Y.

Paralelamente a la evaluación de los biomarcadores génicos se comprobó la viabilidad de las células después del tratamiento. Este análisis permitió comprobar que el extracto a las concentraciones seleccionadas anteriormente no resultó ser tóxicos en el modelo neuronal (SH-SY5Y). Por lo que se pudo valorar el efecto del extracto sobre los biomarcadores génicos. A continuación se muestra una tabla con los resultados obtenidos, éstos están referidos respecto a las células control (células no tratadas con agua oxigenada). Los resultados corresponden a la media de al menos dos ensayos independientes con dos replicas de cada muestra por ensayo.

Tabla 15. Resultados de viabilidad de las células SH-SY5H incubadas con el extracto derivados del olivo y con H₂O₂ 150 μM.

Polifenoles totales (ppm)	50	10
% Viabilidad	63±1	98±6

Al tener la concentración de 50 ppm una viabilidad inferior al 80% se descartó para la evaluación de los biomarcadores génicos. Se analizaron los biomarcadores génicos a 10 ppm. A continuación se muestra en la tabla el resultado sobre la relación de la expresión de los genes, Bax y Bcl2 como relación entre los Ct. El dato está referido respecto a las células control (sin tratamiento con agua oxigenada). Los resultados corresponden a la media de al menos dos ensayos independientes con dos replicas de cada muestra por ensayo.

Tabla 16. Resultados de la relación de la expresión del gen Bax y Bcl2 en células SH-SY5H incubadas con el extracto derivado del olivo a una concentración total de polifenoles de 10 ppm y con H₂O₂ 150 μM.

Relación de la expresión de Bax/Bcl2	
Extracto	1.02±0.01
H ₂ O ₂	3.75±0.80
PBS	1.02±0.03

Los valores se han calculado aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada uno de los genes y posteriormente la relación entre los valores

En condiciones de daño celular se incrementa la relación de la expresión de Bax y Bcl2, indicando mayor relación de gen pro-apoptótico (Bax) frente a gen anti-apoptótico (Bcl2), y por tanto mostrando una tendencia hacia la muerte celular temprana (apoptosis). En condiciones de viabilidad celular se observa una relación de expresión de genes más equilibrada. Como se aprecia en la tabla el extracto reduce la relación de Bax/Bcl2 en presencia de un agente inductor de muerte celular como es H₂O₂.

En la figura 16 se representa la capacidad neuroprotectora del extracto. Ésta se determina estimando la porcentaje de expresión Bax/Bcl2 de la muestra ensayada respecto a las células control (sin daño celular). De modo que en condiciones normales se considera que existe un 100% de neuroprotección y a partir de este valor se referencia el efecto de las muestras. Como se aprecia en la figura el extracto presenta un efecto citoprotector al 100%.

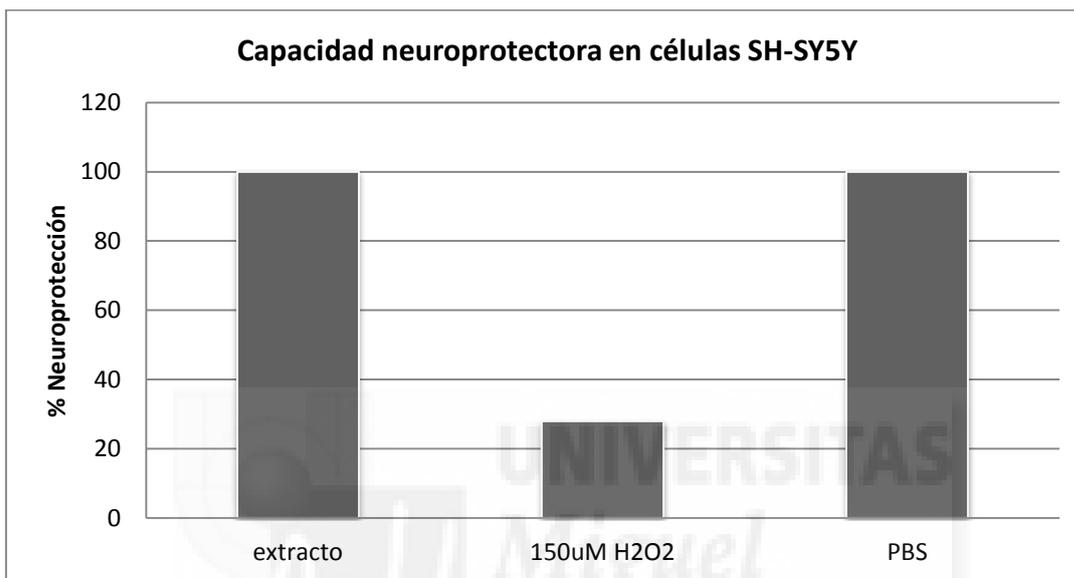


Figura 16. Relación de la capacidad neuroprotectora del extracto en células SH-SY5Y tratada con extracto del olivo y con H₂O₂ 150 µM.

4.3.3. Evaluación in vivo de la actividad neuroprotectora en embriones y alevines de pez cebra.

Se analiza el efecto de la suplementación del extracto en fenómenos de neuroprotección frente a daño inducido mediante la neurotoxina ácido kainico (KA), así como también se estudia su influencia en el desarrollo del sistema nervioso central.

4.3.3.1. Determinación del efecto neuroprotector frente a la pérdida controlada de neuronas colinérgicas.

Previamente a la determinación de los niveles AChE en las larvas, se realizó la recta patrón de la AChE respecto a la medida de absorbancia mediante el método de Ellman modificado.

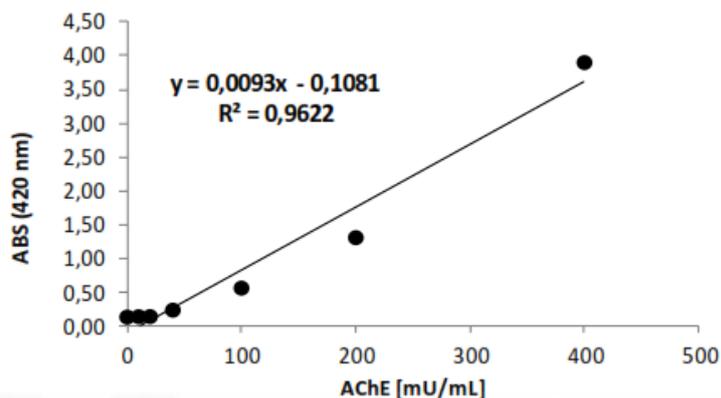


Figura 17. Recta patrón representativa de la concentración de AChE respecto a la medida de absorbancia (420 nm) tomada a 30 segundos del inicio de la reacción bioquímica. La recta resultante entre la concentración de la enzima y la absorbancia presentó una muy buena correlación ($r^2=0.962$).

Una vez determinada la curva patrón de AChE, se realizaron los estudios de influencia de las diferentes condiciones experimentales en los niveles de proteína de las larvas. De esta forma se pretende normalizar el efecto de los niveles de AChE por los niveles de proteína.

Al igual que en el caso de la medición de los niveles de AChE, previamente a la determinación de la cantidad de proteína en larvas tras la administración de los compuestos a estudio, se realizó la recta patrón de la concentración de proteína respecto a la medida de absorbancia mediante el método de BCA

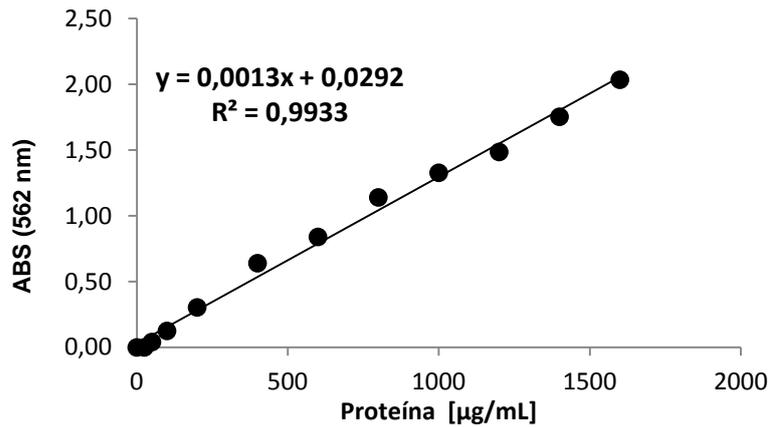


Figura 18. Recta patrón representativa de la determinación de la proteína respecto a la medida de absorbancia (562 nm). La recta resultante entre la concentración de la proteína y la absorbancia presentó una correlación muy elevada ($r^2=0.993$).

A continuación, se muestran los datos obtenidos de la determinación de la cantidad de proteína en función de la muestra estudiada y referida frente al control (considerado como 100%).

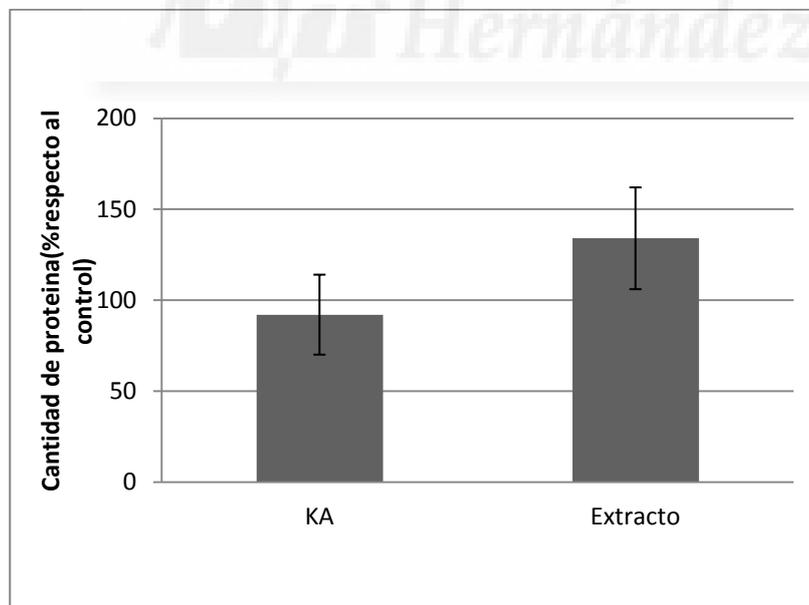


Figura 19. Cantidad de proteína en % respecto al control (media y SD) determinada en el grupo experimental.

Como muestran los resultados estadísticos, no hay un incremento significativo de la cantidad de proteína en los animales,

Por último, se estudió la influencia de la administración del compuesto mediante el análisis de los niveles de AChE de las larvas de pez cebra. Para ello se administraron los distintos compuestos al medio junto con la neurotoxina de KA, determinando los niveles del marcador a 72 hpf. En la Figura 20 se muestran los niveles de AChE de las larvas tratadas con el extracto de estudio (junto con el KA) respecto al grupo de animales tratados sólo con KA. En este caso, el nivel detectado en los controles fue considerado como del 100%. A continuación, se muestran los datos obtenidos de la determinación de los niveles de AChE en función de las muestras estudiadas.

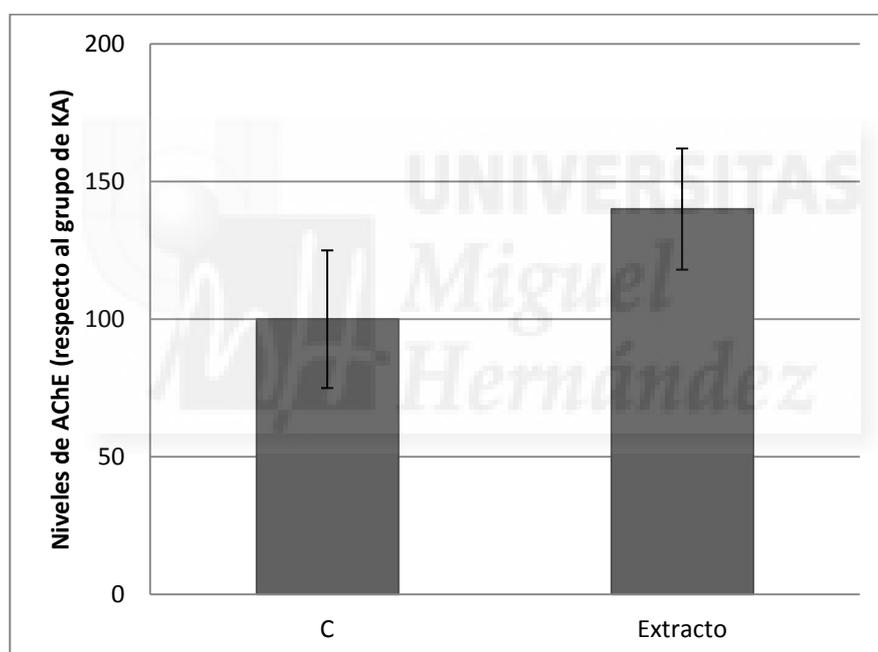


Figura 20. Niveles de AChE (media y SD) después de la exposición al extracto frente al grupo tratado con neurotoxina KA, considerado como el 100% .

Los datos obtenidos muestran que el extracto incrementa significativamente los niveles de AChE de las larvas de pez cebra comparados con el grupo tratado con la neurotoxina KA, indicando un posible efecto neuroprotector. El compuesto alcanza un incremento del 40% respecto a los niveles observados en el grupo de tratamiento con KA. Los resultados que indujeron cambios significativos se muestran a continuación en la tabla:

Tabla 17. Comparación estadística de los niveles de AChE entre las muestras tratadas con neurotoxina KA y con extracto de olivo frente al control.

	Niveles de AChE (neuroprotección)			VARIACION	Estadística (Dunnett)
	MEDIA	SD	SEM		
EXTRACTO	140.1	22.0	2.1	40.1	p<0.05

Las columnas muestran la media desviación estándar, desviación estándar de la media, y porcentaje de variación.

4.3.3.2. Desarrollo neuronal del embrión mediante determinación de marcadores bioquímicos.

Previamente a la determinación de los niveles AChE en las larvas, se realizó la recta patrón de la AChE respecto a la medida de absorbancia mediante el método de Ellman modificado

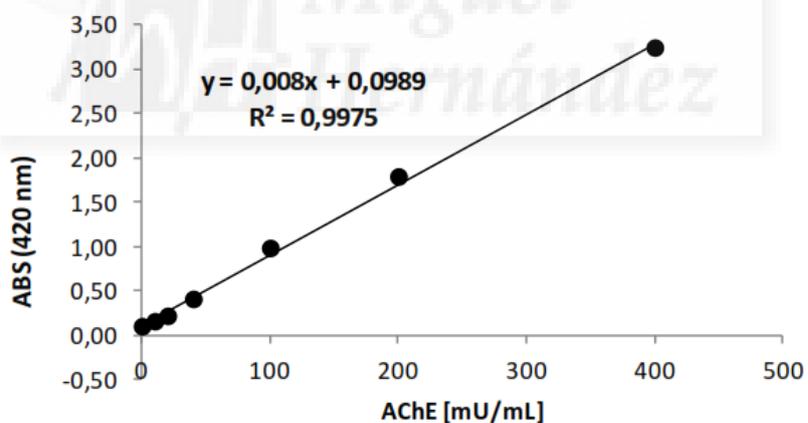


Figura 21. Recta patrón representativa de la concentración de AChE respecto a la medida de absorbancia (a 420 nm) tomada a 30 segundos del inicio de la reacción bioquímica. La recta resultante entre la concentración de la enzima y la absorbancia presentó una correlación muy elevada ($r^2 = 0.998$).

Una vez determinada la curva patrón de AChE, se realizaron los estudios de influencia de los compuestos en los niveles de proteína de las larvas. De esta forma se pretende normalizar el efecto de los niveles de AChE por los niveles de proteína.

Al igual que en el caso de la medición de los niveles de AChE, previamente a la determinación de la cantidad de proteína en larvas tras la administración de los compuestos a estudio, se realizó la recta patrón de la concentración de proteína respecto a la medida de absorbancia mediante el método de BCA.

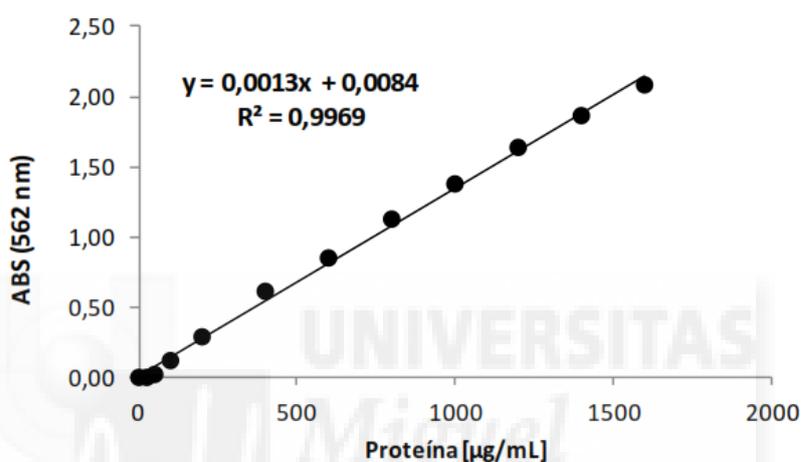


Figura 22. Recta patrón representativa de la determinación de la proteína respecto a la medida de absorbancia (a 562 nm). La recta resultante entre la concentración de la proteína y la absorbancia presentó una correlación muy elevada ($r^2 = 0.997$).

A continuación, se muestran los datos obtenidos de la determinación de la cantidad de proteína en función de la muestra estudiada y referida frente al control (considerado como 100%).

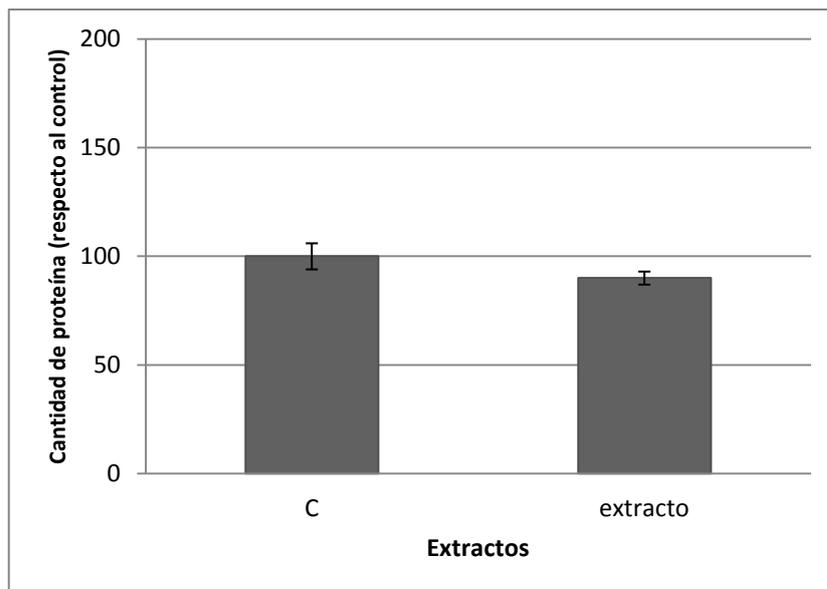


Figura 23. Porcentaje de proteínas del grupo con extracto frente al control (media \pm SEM).

Como muestran los resultados estadísticos, no hay incremento significativo de la cantidad de proteína en los animales, indicando que, el extracto no influye en el tamaño del animal.

Por último, se estudió la influencia de la administración del compuesto mediante el análisis de los niveles de AChE de las larvas de pez cebra. Para ello se administró el compuesto al medio, determinando los niveles del marcador a 72 hpf. En la Figura 24 se muestran los niveles de AChE de las larvas tratadas respecto a los controles (sin tratar). En este caso, el nivel detectado en los controles fue considerado como del 100%.

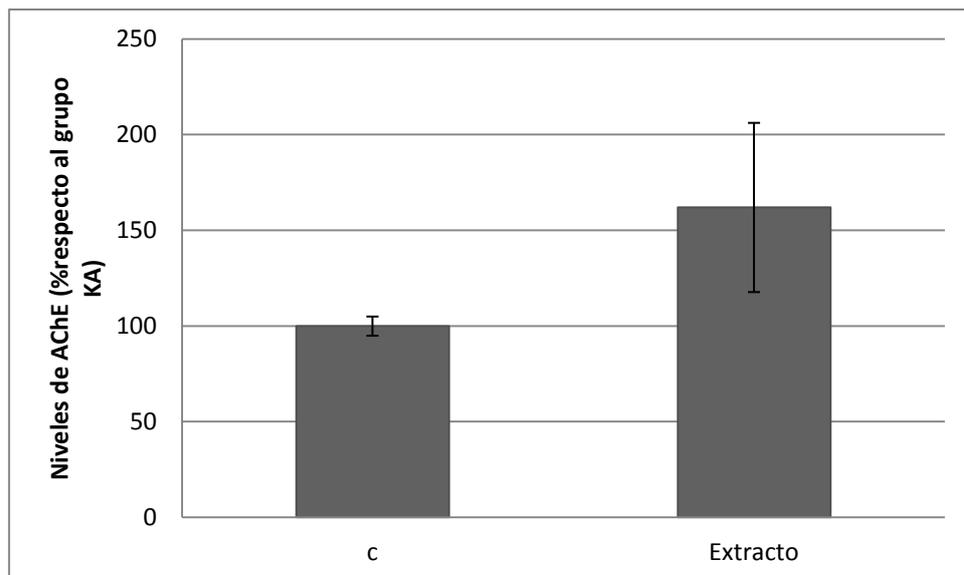


Figura 24. Niveles de AChE en el grupo experimental (media \pm SEM) frente al control, considerado como el 100%.

Los datos obtenidos muestran que el extracto incrementó significativamente ($p < 0,01$) los niveles de AChE de las larvas de pez cebra comparados con el grupo control, indicando un posible efecto beneficioso en el desarrollo del SNC del animal. El compuesto indujo un aumento en los niveles de la enzima, alcanzando un incremento del 62.2% respecto a los niveles observados en los controles.

Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 18. Comparación estadística de los niveles de AChE entre las muestras tratadas con extracto de olivo y el control.

	Niveles de AChE (neuroprotección)			VARIACION	Estadística(Dunnett)
	MEDIA	SD	SEM		
EXTRACTO	162.2	44.2	25.5	62.2	$p < 0.01$

Las columnas muestran la media, desviación estándar, desviación estándar de la media, y el porcentaje de variación.

4.4. EVALUACION REPERCUSION DEL ESTADO NUTRICIONAL.

4.4.1. Evaluación *in vitro* de la actividad anti-obesidad mediante cultivos celulares

El objetivo de esta tarea es identificar si el extracto proveniente de las materias primas del olivo tiene capacidad para modular la obesidad. Para ello, se evalúa experimentalmente la actividad del extracto para regular moléculas clave en el desarrollo y diferenciación del tejido adiposo, cuya alteración es una de las causas de la obesidad. Se ha definido un sistema experimental *in vitro* mediante cultivos celulares en 2 etapas. Una primera etapa de análisis masivo tipo “high-throughput” para confirmar el potencial. Una segunda etapa de validación de la bioactividad en un sistema celular específico del tejido adiposo (Suzuki et al, 2011).

El objetivo de esta tarea es comprobar que el extracto tiene potencial actividad anti-obesidad. Para ello, se empleó el modelo celular basado en la línea 3T3-L1 que con los inductores adecuados (Insulina, dexometasona y IBMX) pueden diferenciarse a adipocito (ver apartado de métodos) y como biomarcador del ensayo se ha utilizado un aspecto característico de la adipogénesis como es la formación de cuerpos grasos. Los cuerpos grasos pueden teñirse y medirse indirectamente a través de la absorbancia (ver métodos).

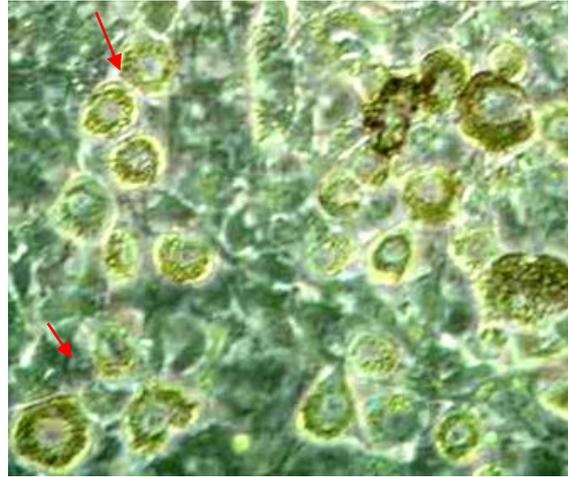
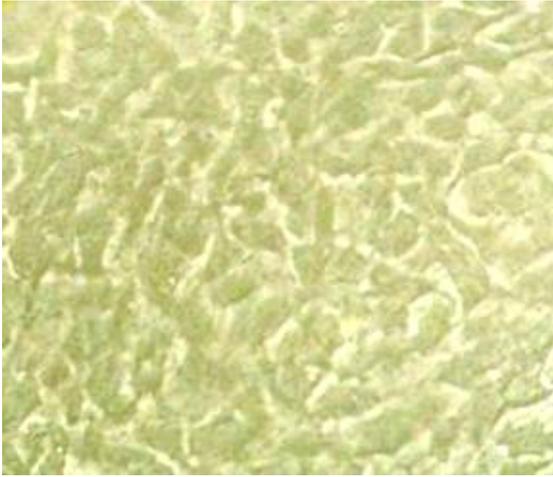


Figura A. Línea 3T3-L1 en estado preadipocito (sin diferenciar), que presenta morfología de fibroblasto en cultivo (célula estriada y alargada).

Figura B. Línea 3T3-L1 después del proceso de adipogénesis (diferenciada), presenta una forma redondeada y la acumulación de cuerpos grasos en su interior.

Figura 25. Efecto de la adipogénesis en la línea 3T3-L1.

Las concentraciones de polifenoles totales utilizadas fueron las de 50 y 10 ppm.

La cuantificación de los cuerpos grasos en las células 3T3-L1 diferenciadas en presencia de la muestra se presenta en la figura 26

. Se realizó un estudio comparativo, y por tanto los datos están referidos respecto a las células diferenciadas control (sin extracto). De modo que se considera que estas células diferenciadas presentan cúmulos de grasas al 100%, y respecto a este valor se expresa la presencia de lípidos en las células tratadas con las muestras.

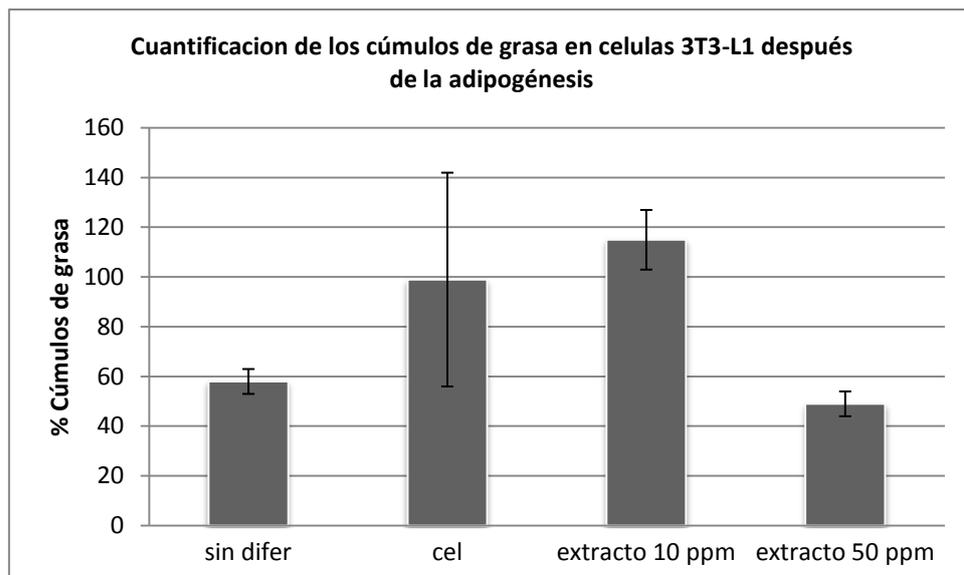


Figura 26. Evaluación de los cúmulos de grasa en células 3T3-L1 después del proceso de adipogénesis (diferenciación a adipocito) en presencia del extracto derivado del olivo.

El criterio de selección con potencial actividad anti-obesidad se basó en la capacidad de inhibir la formación de cuerpos grasos. Por lo que a partir de la cantidad analizada de cúmulos de grasa se estimó la capacidad inhibitoria de las muestras. Esta se determinó de forma relativa frente a un control de capacidad inhibitoria nula. Para ello, se consideró a las células diferenciadas con un poder inhibitorio nulo (figura 27).

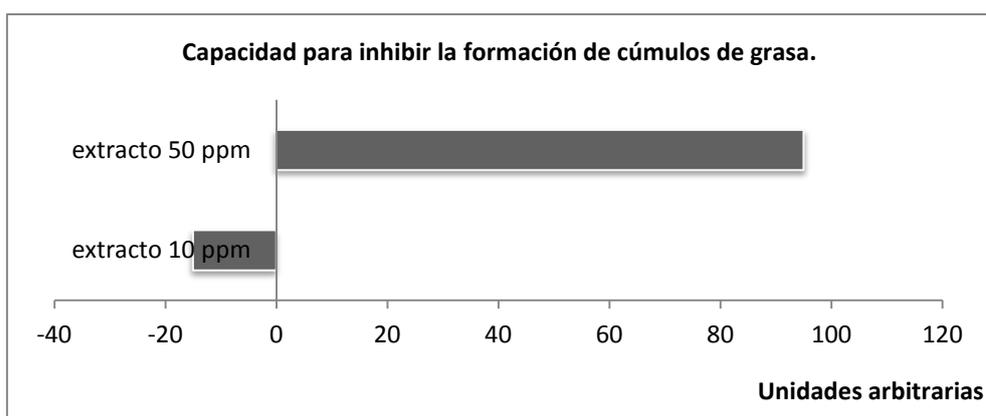


Figura 27. Capacidad del extracto derivado del olivo para inhibir la formación de cuerpos grasos durante la adipogénesis de las células 3T3-L1.

A partir de los resultados obtenidos y representados se observó que la muestra presentó capacidad para inhibir la formación de cuerpos grasos durante la adipogénesis y que dicha capacidad se presentó a 50 ppm

4.4.2. Análisis de la expresión génica

El objetivo es validar la bioactividad frente a obesidad del extracto seleccionado tras el cribado anterior. Para ello, se estudió el efecto del extracto sobre la adipogénesis evaluando biomarcadores génicos claves del proceso. Se utilizó como modelo celular la línea celular 3T3-L1 que puede diferenciarse en adipocitos, y se estudió la expresión génica del **gen PPAR α** , factor transcripcional que a su vez modula la expresión de varios genes (por ejemplo genes implicados en el metabolismo de los triacilgliceroles), y del **gen de la leptina**, perteneciente a la familia de adipokinas, moléculas señalizadoras de naturaleza proteica secretada por los adipocitos, y que, entre otros, tiene efectos a nivel del hipotálamo. Ambos genes favorecen la adipogénesis. Por lo que se considera efecto regulador del tejido adiposo con tendencia anti-obesidad si disminuye la expresión de los genes marcadores.

Paralelamente a la evaluación de los biomarcadores génicos se determinó la viabilidad de las células 3T3-L1 después de la adipogénesis en presencia de la muestra. A partir de este análisis se comprobó que fueron viables. El resumen del análisis de la viabilidad se muestra en la tabla 21, los datos corresponden a la media resultante de al menos dos ensayos independientes y dos réplicas por muestra en cada ensayo.

Tabla 19. Viabilidad celular de la línea 3T3-L1 después del proceso de adipogénesis en presencia de las muestras

% Viabilidad celular
Concentración de polifenoles totales en el extracto 50 ppm
100.4 \pm 2.3%

A 10 ppm el ensayo no se realizó porque la concentración no mostró efecto positivo en el ensayo anterior.

A continuación se muestran los resultados de la expresión génica del gen de la leptina y gen de PPARg en las células 3T3-L1 después del proceso de adipogénesis en presencia de la muestra. Se presentan los valores normalizados a las células sin diferenciar haciendo uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (como gen de control interno se utilizó GAPDH).

Tabla 20. Resultados de la expresión génica del gen de la leptina y gen de PPARg en las células 3T3-L1 después del proceso de adipogénesis en presencia de las muestras.

	Expresión de leptina	Expresión de PPARg
Células diferenciadas	1.1±0.4	1.5 ±0.5
Células sin diferenciar	0.1±0.0	0.5 ±0.1
Concentración en polifenoles totales 50 ppm	0.2±0.1	1.0±0.3

Para evaluar el efecto sobre la expresión de los genes biomarcadores respecto a las células diferenciadas en adipocitos maduros, en las figuras 28 y 29 se representa la capacidad de reducir los niveles de expresión. De modo que en condiciones de adipocito maduro (células diferenciadas), en la que los genes se expresan, se considera que tienen un bajo índice de reducción de la expresión y a partir de este valor se referencia el efecto de la muestra.

Las figuras 28 y 29 representan gráficamente la reducción de la expresión de los genes, a partir de los valores de expresión y considerando como referencia las células sin diferenciar:

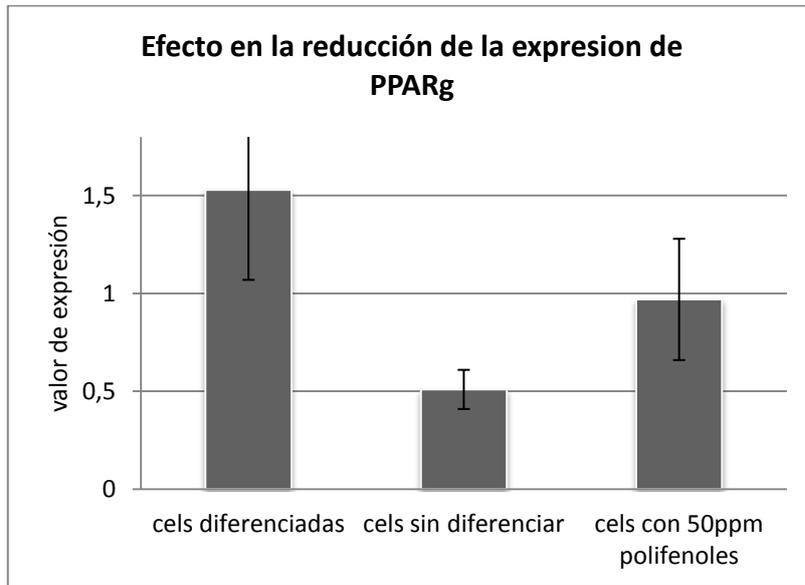


Figura 28. Capacidad de reducir la expresión de PPARg en células 3T3-L1 después de la adipogénesis en presencia de las muestras derivadas del olivo.

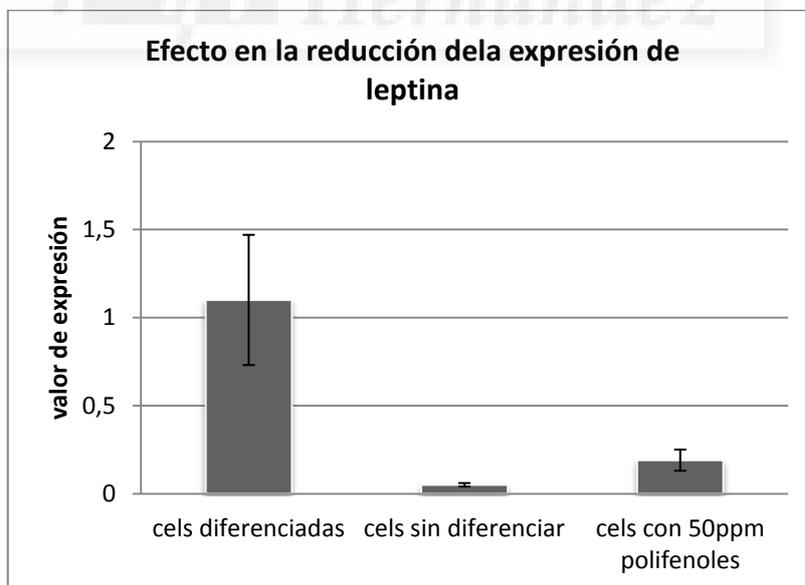


Figura 29. Capacidad de reducir la expresión de Leptina en células 3T3-L1 después de la adipogénesis en presencia de las muestras derivadas del olivo.

Como se aprecia en la figura 28 el extracto disminuyó los niveles de expresión de PPAR γ . En la figura 29 se observa que el extracto también redujo de forma significativa la expresión de leptina.

A partir del efecto sobre la expresión de los biomarcadores se considera que la muestra presenta un efecto sobre la adipogénesis con carácter anti-obesidad por disminuir la expresión de los dos biomarcadores.

4.4.3. Evaluación *in vivo* de la influencia del extracto en obesidad mediante el modelo pez cebra.

Se analiza el efecto de la suplementación de un conjunto de muestras problema sobre varios factores relacionados con la obesidad en larvas de 72 horas post-fertilización (hpf).

4.4.3.1 Determinación del índice de masa corporal.

Previo a la determinación de la variación del peso del animal en función de la administración de extracto de olivo se realizó una curva de pesos para determinar el límite de cuantificación de la balanza a la hora de discriminar el peso total de las larvas. Así, se prepesaron los recipientes de pesada (eppendorfs) y se pesaron finalmente con un número diferente de larvas en su interior, las cuales no habían sufrido ningún tipo de tratamiento. La siguiente gráfica muestra los resultados obtenidos.

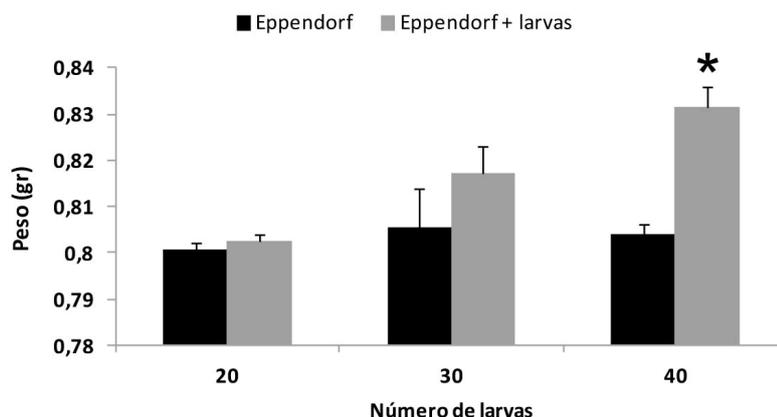


Figura 30. Peso medio de los recipientes de pesada (eppendorf) (media \pm SEM) y de los recipientes de pesada más un número determinado de larvas (peso seco) en su interior (* $p < 0.05$ test T de Student).

Como muestra la gráfica, se necesita un mínimo de 40 larvas por condición para poder discernir entre el peso del recipiente y el peso de las larvas de una manera estadísticamente significativa. Una vez determinado este parámetro, se llevo a cabo la administración del extracto a los animales (10 larvas por pocillo, en 4 pocillos independientes) y transcurridas 72 hpf, las larvas se agruparon en un mismo recipiente y fueron procesadas para su pesada. A continuación, se muestran los pesos determinados de las larvas en función del tratamiento respecto al grupo control, considerándolo como el 100%.

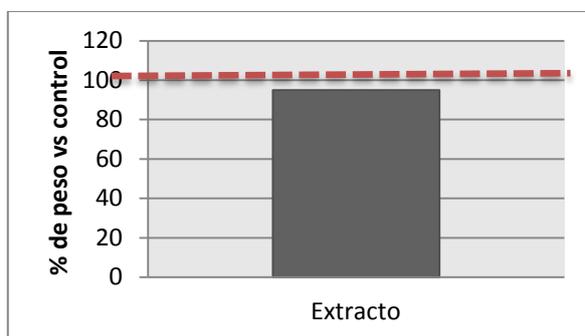


Figura 31. Peso medio de los recipientes de pesada con 40 larvas en su interior del grupo de tratamiento frente al grupo control, que se considera como el 100%.

Como muestra la gráfica, el extracto no incrementó o disminuyó claramente el peso de las larvas. El extracto no varió el peso de los animales en $\pm 10\%$.

4.4.3.2 Determinación de colesterol total (CT).

Para la determinación de colesterol total, se llevo a cabo la administración del extracto a estudio al medio de embriones y pasadas 72 horas, los animales fueron procesados para la determinación del nivel de colesterol total. La medida fue normalizada por la proteína y se consideró el 100% la medida determinada en los controles. A continuación, se muestra la gráfica de determinación de CT de las larvas en función de los tratamientos administrados.

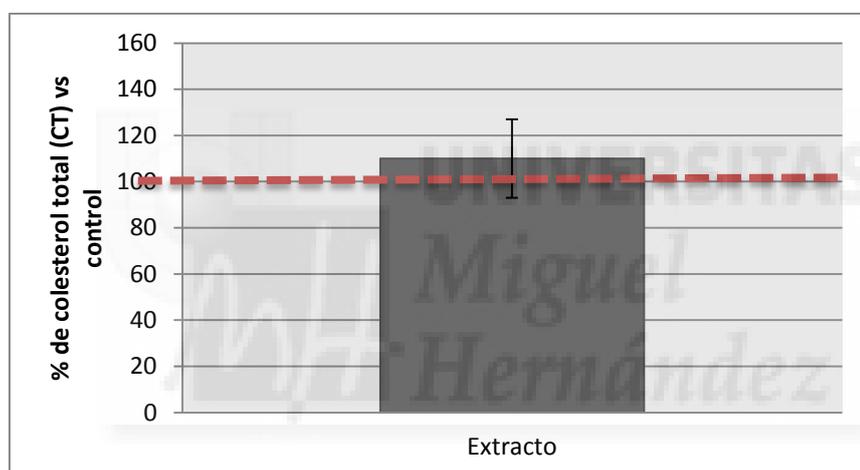


Figura 32. Porcentaje de colesterol total (CT) (media \pm SEM) del grupo de tratamiento respecto al grupo control, considerado como el 100% (ns test t de Student).

Como muestra la gráfica, el extracto no alteró significativamente el porcentaje de colesterol total de las larvas respecto al grupo control.

4.4.3.3 Determinación de triglicéridos (TG).

Al igual que el caso anterior, se llevo a cabo la administración del extracto a estudio al medio de embriones y pasadas 72 horas, los animales fueron procesados para la determinación del nivel de triglicéridos (TG). La medida fue normalizada por la

proteína y se consideró el 100% la medida determinada en los controles. A continuación, se muestra la gráfica de determinación de TG de las larvas en función del tratamiento administrado.

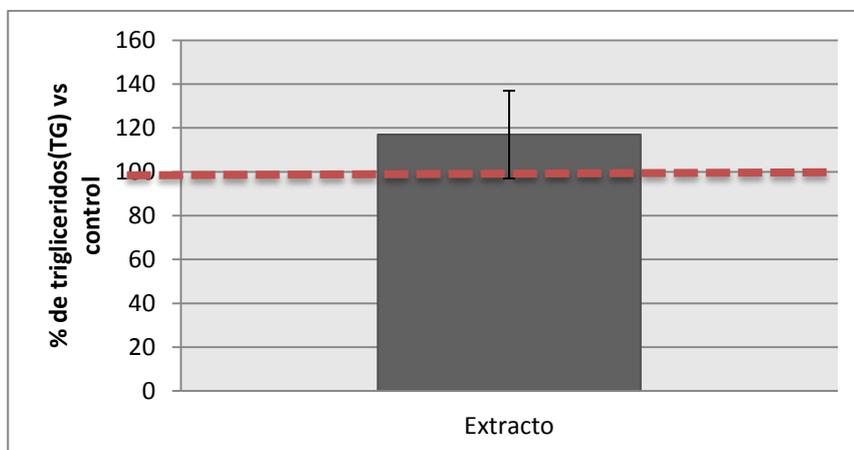


Figura 33. Porcentaje de triglicéridos (TG) (media \pm SEM) del grupo de tratamiento respecto al grupo control, considerado como el 100% (ns test t de Student).

Como muestra la gráfica, el extracto no alteró significativamente la reducción del porcentaje de triglicéridos en las larvas respecto al grupo control.

4.4.3.4 Determinación del perfil de ácidos grasos (FAMES)

Para la determinación del perfil de ácidos grasos, se llevó a cabo la administración del extracto a estudio al medio de embriones y pasadas 72 horas, los animales fueron procesados para la determinación de FAMES. A continuación, se muestra una tabla donde se muestra el perfil de ácidos grasos de los animales junto con el porcentaje de detección de cada uno de ellos.

Tabla 21. Porcentajes de los ácidos grasos en los embriones 72 h pf control y con extracto de olivo.

	Palmítico C16:1n7	Esteárico C18:0	Oleico C18:1n9	Linoléico C18:2n6	DHA C22:6n3
CONTROL	32,8	13,2	20,9	9,9	23,2
Extracto	33,1	12,8	22,5	10,6	21,1

Los valores en porcentaje de los ácidos grasos no variaron prácticamente. El extracto en estudio indujo un ligero aumento del oleico y del linoléico a expensas del docosahexanoico.





5. DISCUSION





5. DISCUSIÓN

5.1. DISCUSION MODELO EXPERIMENTAL

La relación entre alimentación y salud se conoce desde la antigüedad: *“Permite a tu alimentación ser tu medicina y permite a tu medicina ser tu alimentación” Hipócrates*. Gracias a los avances en investigación biomédica ha sido posible determinar los efectos de la nutrición en salud ya intuitos y apuntados por Hipócrates.

Las patologías neurodegenerativas de origen multifactorial plantean hasta la fecha, un escenario difícil a la hora de establecer estrategias terapéuticas. Los mecanismos de neuroprotección y obesidad pueden ser afrontados desde modificaciones dietarias.

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.

Las propiedades bioactivas se analizan mediante la realización de ensayos específicos en función del efecto biológico de interés. Para ello, se dan varios niveles en la experimentación de dichos efectos biológicos, que en orden cronológico deben de efectuarse: *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos.

Los polifenoles contenidos en los extractos procedentes del olivo presentan propiedades antioxidantes que hacen que sean candidatos para la investigación de enfermedades neurodegenerativas y reguladoras de la obesidad (Sears y 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).

La evaluación *in vitro* e *in vivo* de compuestos bioactivos se basa en modelos experimentales que reproducen el proceso biológico de interés, mediante sistemas sensibles a factores externos y cuyas posibles fluctuaciones sean medibles. La herramienta esencial para el diagnóstico de la bioactividad es la selección del biomarcador adecuado.

El objetivo global de este trabajo ha sido el estudio de la capacidad de neuroprotección y regulación de la obesidad de un compuesto natural obtenido del olivo aplicado en modelos *in vitro* en líneas celulares e *in vivo* la larva de pez cebra.

5.2. MODELO "IN VITRO"

5.2.1. MODELOS CELULARES NEUROPROTECCION

En primer lugar se ha desarrollado y caracterizado un **sistema celular** para llevar a cabo el experimento. El modelo es el de la línea celular de neuroblastoma humano **SH-SY5Y** (94030304, eccc) (Cheung et al, 2009; Zhang et al, 2007) cuya diferenciación da lugar a células similares a neuronas humanas. El resultado es el de unas células que presentan un fenotipo neuronal postmitótico, con una morfología y polaridad bien definida 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 similares a neuronas humanas en cultivo. Este sistema se puede así considerar como una herramienta versátil en el que se pueden llevar a cabo distintos tipos de análisis, entre los que se incluyen estudios bioquímicos, inmunocitoquímicos o transcriptómicos.

Schaffer S et al (2010) emplearon para el estudio de polifenoles procedentes de las aguas del procesado de aceituna la línea celular PC12. Sometiendo a dichas células a estrés oxidativo y midiendo la citotoxicidad, observando una citoprotección de las células cerebrales con los extractos.

Algunos autores realizan los trabajos con el empleo de cultivos primarios de neuronas de ratón de distintas regiones del sistema nervioso, escogiendo cultivos de poblaciones neuronales de la región espinocerebelar, concretamente cultivos de neuronas de bulbo raquídeo y cultivos mixtos de células de cerebelo enriquecidos en neuronas de Purkinje (Agudo et al, 2002). También se desarrollan sistemas de cultivo mixto de células de cerebelo enriquecido en neuronas de Purkinje. Estas neuronas, que constituyen la única proyección eferente del cerebelo, presentan una muy baja tasa de supervivencia en cultivo, pero constituyen un modelo muy interesante para el estudio de interacciones neurona-glía (Baptista et a., 1994; Morrison y Mason, 1998) y otras funciones neuronales (Brorson et al, 1994; Brorson et al, 1995; Bravin et al, 1999).

Aldini et al (2006) realizaron estudios de la actividad antioxidantes de los extractos de residuos del olivo mediante ensayos ORAC y DPPH y realizaron la confirmación de esa actividad antioxidante en células umbilicales endoteliales humanas.

Fabiani et al (2002) emplearon células de leucemia promielocítica humana para observar la inhibición de su crecimiento con polifenoles del aceite de oliva virgen, demostrando así el papel tan importante que juegan estos extractos en la actividad anticancerígena.

Para valorar la actividad del extracto en este estudio se ha realizado en primer lugar una evaluación de la respuesta de un marcador molecular central de los procesos que causan daño celular, el factor NF-kb (Zhang et al, 2010) induciendo un **estrés celular** con un lipopolisacárido de E. coli (**LPS**).

Para el modelo de muerte celular actualmente se emplean multitud de estímulos apoptóticos para estudiar los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular, como la retirada de factores tróficos, la privación de oxígeno, el choque térmico o la administración de agentes tóxicos que produzcan selectivamente daños en el DNA o en determinados orgánulos celulares (Lindahl y Oberg 1961).

Para la evaluación del efecto del extracto sobre la apoptosis se analizaron dos marcadores génicos: el **gen Bax** de la familia de genes proapoptóticos (“genes de la

muerte celular”) y el **gen Bcl 2** de la familia de genes antiapoptóticos (“genes de supervivencia”), de manera que el balance entre ambos define el umbral de la muerte celular programada (Oltavi et al, 1993; Adams y Cori, 1998). Considerando efecto neuroprotector si disminuye la relación entre ambas moléculas: Bax/Bcl2 (Gao et al, 2008).

Diversos estudios demuestran también que la inhibición de la enzima glucógeno sintasa quinasa-3(GSK-3) tiene un efecto protector, frente a estímulos proapoptóticos (Bijur y Jope, 2003; Linseman et al, 2004, Maurer et al, 2006).

Otras hipótesis, comprueban si efectivamente el consumo de glucosa a través de la glucolisis está incrementado tras la inhibición crónica de GSK-3. Esta comprobación la llevan a cabo midiendo la liberación al medio extracelular del producto final del metabolismo glucolítico de la glucosa, el lactato (Merlo-Pich et al, 2004). La producción de lactato como consecuencia del metabolismo glucolítico aparece notablemente incrementada tras la inhibición crónica de GSK-3. A fin de comprobar si este cambio metabólico es, al menos en parte, responsable del efecto neuroprotector frente a la muerte por disfunción mitocondrial, se llevan a cabo un ensayos en los que se inhibe la vía glucolítica con 2-desoxiglucosa (2-DGlc). La inhibición de la glucolisis neutraliza completamente el efecto neuroprotector de la inhibición crónica de la GSK-3, apoyando la hipótesis de un cambio hacia un metabolismo glucolítico menos dependiente de la respiración mitocondrial.

Como posible mecanismo neuroprotector también se plantea la posibilidad de la implicación de la neurotrofina BDNF (Factor neurotrófico), dado su papel en la señalización anti-apoptótica, así como su efecto neuroprotector en algunos modelos de daño neuronal (Tong y Pérez-Polo, 1998; Hammond et al, 1999; Hetman et al, 1999; Chao, 2003; Pérez-Navarro et al, 2005).

En el presente trabajo, se ha evaluado la citotoxicidad del extracto procedente del olivo, demostrando que no presentaba daño celular y se ha definido el rango de concentraciones para los estudios posteriores de neuroprotección y regulación del tejido adiposo. Considerando citotóxico el efecto de este extracto a partir de 200 mg/l.

El rango de concentración para el estudio se ha marcado en 10 y 50 mg/l, muy por debajo de la concentración de seguridad citotóxica.

En la evaluación in vitro del efecto neuroprotector de manera preventiva se observó que la inducción del biomarcador NFkb como biomarcador de actividad antiinflamatoria se reduce un 27% con una concentración del extracto de 50 mg/l. En la evaluación de manera terapéutica se observó que el extracto reduce la inflamación a las dos concentraciones 10 y 50 mg/l, pero su efecto terapéutico es mayor a 50 mg/l llegando a reducir la inflamación en un 35% respecto de la inflamación con el tratamiento con LPS.

Tras el estudio de la capacidad antiinflamatoria se analizó la expresión de dos genes específicos proapoptóticos (gen Bax) y antiapoptóticos (gen Bcl2) cuya relación indica el efecto neuroprotector, mayor cuanto menor es la relación entre gen Bax/genBcl2, en este caso, el extracto ejerce un efecto neuroprotector del 100%.

5.2.2. MODELOS CELULARES REGULACION OBESIDAD

La disfunción del adipocito está fuertemente asociada con el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina. Los adipocitos sintetizan y secretan unas moléculas activas llamadas adipoquinas (p.e. leptina), la cual reduce la absorción de los alimentos y incrementa el gasto de energía.

En este proyecto se utilizó la línea celular de fibroblastos (preadipocitos) de ratón 3T3L1 proveniente de la colección de cultivo tipo americano (ATCC), obtenida a partir de un extracto continuo de 3T3, caracterizada por ser células unipotentes y que tienen la capacidad de expresar receptores de insulina y que han sido ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de la adipogénesis (Student, 1980).

El proceso de lipogénesis en los adipocitos fue valorado mediante la cantidad de triglicéridos presentes en las células grasas por un método cualitativo que consiste en la tinción de las células con rojo aceite que colorea los triglicéridos (Fu et al, 2005).

Otros estudios realizan también análisis cuantitativo (Xiang-hui et al, 2005) mediante extracción de lípidos con 5 ml de isopropanol, leyendo posteriormente la absorbancia del extracto a 510 nm en un fotómetro Eppendorf. También se utiliza la medida del glicerol para indicar si se induce la activación de la lipólisis

Los estudios sobre los efectos de los flavonoides en los adipocitos son mucho menos frecuentes que en cualquier otro tipo de células, pero algunos resultados interesantes se están dando a conocer. La quercetina y fisetina han mostrado potencializar la lipólisis inducida por epinefrina en adipocitos aislados de ratas y parece incrementar la metilación de fosfolípidos de la membrana que se correlaciona con la acumulación celular del AMP cíclico. Así, Shisheva y Shechter (1993) encontraron que la quercetina bloquea la lipogénesis insulino dependiente, impidiendo la actividad del receptor de insulina tirosina quinasa desde la fosforilación del sustrato.

Estos efectos lipolíticos y antipoligénicos en adipocitos de ratas están acoplados con la actividad antiproliferativa en un tipo de células, lo que sugiere que los flavonoides pueden reducir la masa del tejido adiposo inhibiendo las señales que promueven la adipogénesis. Recientemente, Harmon et al (2002) usando las células 3T3-L1 muestran que la genisteína y naringenina inhiben la proliferación de células preadipocitarias preconfluentes, pero solo la genisteína fue capaz de inhibir la proliferación posconfluente en la inducción de la diferenciación y la subsecuente diferenciación en adipocitos maduros. En los adipocitos maduros, mostró tener un fuerte efecto para inducir la lipólisis, tanto sola y en combinación con epinefrina. Estos descubrimientos en cultivos de células adiposas sugieren que los flavonoides en la dieta, en particular la genisteína puede tener efectos inhibitorios del crecimiento del tejido adiposo.

La genisteína presenta buenas perspectivas en la regulación de la grasa corporal mediada por nutrientes a través de sus efectos en la replicación, diferenciación y lipólisis preadipocitaria. Los estudios de expresión genética, particularmente usando “microarrays” de RNA de adipocitos, se han revelado algunos efectos adicionales interesantes de los polifenoles.

En adipocitos aislados de rata las antocianinas han mostrado aumentar la expresión genética específica de la adipoquina y la secreción sin activación de los PPAR-gama. En estudios recientes, las antocianinas han mostrado incrementar los genes involucrados en metabolismo de lípidos y transducción de señal, el incremento de lipasa sensible a hormonas y mejoramiento de la actividad lipolítica.

Moreno et al mostraron (2003) que el extracto de semilla de uva es rico en compuestos polifenoles, y que estos inhiben las enzimas que metabolizan la grasa, lipasa pancreática, lipoproteína lipasa y hormonas sensibles a la lipasa, y consecuentemente los autores describieron este efecto como un posible tratamiento para el control de peso seguro, natural y con un costo efectivo.

Las catequinas del té verde tienen efectos hipocolesterolémicos y suprimen la absorción del colesterol intestinal.

También se ha demostrado que polifenoles del tipo flavonoide inhiben el transporte de glucosa. La regulación de la absorción de la glucosa, bajo el control de la insulina, es importante para mantener los niveles adecuados de glucosa en sangre durante la alimentación y el ayuno.

Gaya et al (2010), evaluaron en la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 mediante la capacidad de los polifenoles del *Rosmarinus officinalis* (romero) para inhibir la acumulación de triglicéridos por tinción con Oil Red y su efecto sobre la viabilidad celular utilizando el reactivo de MTS. El extracto inhibió la diferenciación adipocítica a concentraciones que no afectaron la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento con 30 µg/ml. Los eventos moleculares que tienen lugar durante el proceso de adipogénesis involucran factores de transcripción de la expresión temprana (C/EBPbeta) y tardía (PPARgama), los resultados demuestran que los polifenoles y componentes del extracto de romero ejercen su efecto antiadipogénico interfiriendo en la expresión de factores de transcripción cruciales en la adquisición del fenotipo adipocítico, resultando beneficioso en el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas.

En el presente trabajo, y en el apartado de la evaluación in vitro del efecto regulador del tejido adiposo se estudió la inhibición de la formación de los cuerpos grasos característicos de la adipogénesis y su medición tras la tinción, observándose la capacidad de inhibir la formación completa de cúmulos de grasa en la aplicación de concentraciones del extracto de 50 ppm. Para la validación de la bioactividad frente a la obesidad se evaluaron los biomarcadores génicos claves del proceso, como el gen PPAR γ y el gen de la leptina, considerando que las células diferenciadas en adipocitos tienen un bajo índice de reducción de la expresión, las células tratadas con el extracto a 50 mg/l redujeron de manera significativa la expresión de los genes específicos en un 37% en el caso de la expresión de PPAR γ y en un 82% en el caso de la leptina.

5.3. MODELO "IN VIVO"

Los modelos de roedor han contribuido considerablemente al entendimiento de los procesos que dan lugar a la obesidad humana (Powell, 2006) y a la neuroprotección. Sin embargo, este tipo de experimentos requiere una infraestructura y personal considerables, siendo por tanto de un elevado coste y tiempo. Por lo tanto, se necesitan nuevos modelos animales más simples y menos costosos para el desarrollo de estudios de obesidad y de neuroprotección. En este sentido, estudios recientes han demostrado que el pez cebra puede ser usado como organismo modelo para revelar los procesos subyacentes a los fenómenos de obesidad humana (Tingaud-Sequeira et al, 2011) y para el efecto neuroprotector (Kimmel et al, 1995). Las mayores ventajas se resumen en que los estudios son más baratos y más cortos que con mamíferos, y en modelos para estudios de alimentación se pueden hacer pruebas con multitud de extractos, que no podrían hacerse con ratones, puesto que serían excesivamente caros y necesitarían tiempos muy largos para conocer las repercusiones, además se pueden hacer combinaciones entre compuestos/extractos que elevarían en el caso de mamíferos el número de individuos a testar.

En los ensayos *in vivo* con el modelo de larva de pez cebra del presente estudio se han realizado los análisis de bioseguridad del extracto no observándose mortalidad por debajo o igual a la dosis de 100mg/l. No aparecieron efectos subletales ni efectos teratogénico, así como tampoco se observó alterado el proceso de eclosión de los

embriones de pez cebra. Se determino de la misma manera la concentración letal 50 siendo ésta superior a 100mg/l así como la concentración mínima sin efecto observado (LOEC) que fue superior a 100mg/l. También se identifico que la máxima dosis tolerada era superior a 100mg/l.

5.3.1. MODELOS ANIMALES NEUROPROTECCION

Históricamente los modelos de ratones han sido los más utilizados para los estudios de las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo el estudio de las causas y las acciones de las drogas empleadas son desconocidos y se hace necesaria la innovación en modelos experimentales de neurodegeneración, que presenten ventajas complementarias para evaluar los efectos de los fármacos nuevos, como paso previo a la realización de ensayos en roedores. A este respecto, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido recientemente en un foco de estudios neuroconductuales, ya que muestra neuropatologías y fenotipos conductuales que son cuantificables (Bowman y Zon, 2010; Rico et al, 2011) y ha sido recientemente propuesto como un paradigma experimental válido para estudio de la enfermedad de Alzheimer (Newman et al, 2011).

El pez cebra es un modelo ideal para la el estudio de enfermedades humanas debido a que presentan una serie de características que lo hacen único como modelo animal. Por esta razón, ha experimentado un espectacular aumento de la popularidad como organismo experimental. El pez cebra ofrece un compromiso razonable entre complejidad fisiológica y el rendimiento al tener un genoma caracterizado completamente, y mostrar homología fisiológica significativa a los mamíferos, incluyendo los seres humanos (Barbazuk et al, 2000). Por otra parte, presenta una ventaja en comparación con otros modelos animales, su dualidad larva-adulto. La disponibilidad de ambas formas es beneficiosa y permite la investigación de un espectro más amplio de fenómenos neurodegenerativos relacionados en la ontogénesis. El desarrollo más rápido del pez cebra, en comparación con ratones, hace de ellos la elección ideal para modelar el desarrollo de fenómenos de neurodegeneración. Por otra parte, los modelos de roedores son caros de mantener y más difíciles de modificar genéticamente.

El pez cebra es un vertebrado más estrechamente relacionado con los seres humanos que otros modelos de invertebrados, tales como levaduras, gusanos o moscas, ya que el diseño y la conectividad en el centro de su sistema nervioso central (SNC) se correlaciona con la humana (Gao et al, 2004).

Además, el pez cebra tiene un corto tiempo de desarrollo hasta la madurez sexual (3 meses) y una alta tasa de reproducción (cientos de embriones por hembra en cada gestación y por semana).

Los embriones son transparentes y desarrollados externamente, hechos que permiten la observación directa de la embriogénesis y el desarrollo del sistema nervioso central. Los embriones son también fácilmente susceptibles a métodos para manipular los genes y la actividad de la proteína tales como la inyección de oligonucleótidos (Nasevicius et al, 2000), ARNm o cADN (transgenes), y para el cribado de bibliotecas de drogas están dispuestos en placas de microtitulación (Zon y Peterson, 2005).

Por otra parte, el desarrollo temprano del pez cebra tiene etapas importantes para analizar procesos y anomalías del sistema nervioso central, y ya en peces adultos, con toda la gama de funciones del cerebro adulto, tienen una ventaja significativa en el análisis de las funciones cerebrales complejas características de los vertebrados (Panula et al, 2006), y en los estudios de fenotipo conductual.

En efecto, el pez cebra expone muchos de los comportamientos de orden superior, incluyendo la memoria, respuestas condicionadas y comportamientos sociales como el aprender conductas (Liescke et al, 2007). Todas estas propiedades hacen del pez cebra un modelo ideal para el estudio de enfermedades humanas, incluyendo trastornos del SNC (Grunwald y Eisen, 2002) y modelo para el estudio de efectos de agentes bioactivos.

El síndrome excitotóxico se ha descrito como una importante causa de daño y muerte neuronal en enfermedades neuropatológicas como la hipoxia, isquemia, epilepsia y la enfermedad de Alzheimer. Este fenómeno ha sido inducido en experimentos con roedores mediante la inyección de agonistas de glutamato como es

el caso del ácido kaínico (KA), el cual causa *status epilepticus* junto con neurodegeneración posterior en la corteza y el hipocampo (Reddy et al, 2013; Ben Ary et al, 1981; Veliskova et al, 1981).

En modelo de pez cebra, utilizando el pez adulto, hay desarrollado un modelo similar de excitotoxicidad (Kimmel et al, 1995), observándose el mismo fenómeno que el descrito en el modelo murínico.

Por lo tanto, en este estudio se ha utilizado el ácido kaínico como neurotoxina inductora de daño neuronal en larvas de pez cebra, con el objetivo de estudiar las propiedades neuroprotectoras del extracto a estudio mediante la determinación de los niveles de acetilcolinesterasa (AChE) como marcador del estado general del sistema nervioso central. Para ello se ha analizado el efecto de la suplementación del extracto frente al daño neurotóxico en larvas de 72 horas post-fertilización (hpf) utilizando la máxima dosis tolerada del extracto determinada en este mismo estudio. El efecto neuroprotector se determinó frente a la pérdida controlada de neuronas colinérgicas, utilizado como marcador del estado general del sistema nervioso central.

También ha sido objeto del estudio el análisis del efecto de la suplementación de extractos en el desarrollo del sistema nervioso central del embrión mediante la determinación de marcadores bioquímicos. El desarrollo del sistema nervioso central del pez cebra (Kimmel et al, 1995) indica que a las 24 horas ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (precursores de musculo y esqueleto). A los cinco días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Así mismo, ha aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales. En este momento el pez es capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento.

En el experimento se evaluó una única concentración correspondiente a la máxima dosis tolerada (MTD) sobre los huevos fecundados y tras las 72 horas de incubación se determinó que el estado de las larvas era totalmente correcto y se

midieron los niveles de acetilcolinesterasa de las larvas indicando un posible efecto beneficioso en el desarrollo del SNC.

En cuanto al efecto neuroprotector de la pérdida controlada de neuronas se observó un aumento en los niveles de acetilcolinesterasa del 37%, indicando un efecto neuroprotector. En cuanto al desarrollo neuronal del embrión, aumentan los niveles de acetilcolinesterasa en un 62%, indicando un efecto beneficioso en el desarrollo del SNC del animal.

Recientes estudios sugieren que los extractos del olivo inhiben la inflamación y reducen el estrés oxidativo, observado en ratas con una isquemia cerebral provocada (Mohagheghi et al, 2011). El estudio se realizó con 4 grupos de ratas: un control y tres grupos de tratamiento por vía oral de extracto procedente de la hoja de olivo a 50, 75 y 100 mg/kg/día, durante 30 días. Se determinó en sangre el perfil de lípidos antes de un período de 60 minutos de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Después de 24 horas de reperfusión, los resultados neurológicos deficitarios fueron evaluados en cada uno de los subgrupos, el volumen del infarto, edema cerebral y la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica. Se ha observado que la administración oral de extracto de hoja de olivo reduce el volumen de infarto, edema cerebral, la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro, y mejora las puntuaciones de déficit neurológico después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas.

En otros estudios, se evaluó el posible efecto neuroprotector de extracto de hoja de olivo seco en la isquemia cerebral global transitoria en gerbos de Mongolia (Dekanski et al, 2011), valorando diferentes parámetros de estrés oxidativo y daño neuronal en el hipocampo. Las mediciones bioquímicas tuvieron lugar a diferentes tiempos (80 minutos, 2, 4 y 24 horas) después de la reperfusión. Los efectos del extracto se compararon con los efectos de la quercetina, un flavonoide conocido como neuroprotector. El pretratamiento con extracto (100mg/kg de peso del animal) inhibió significativamente la producción de superóxido y de óxido nítrico, disminuyó la peroxidación lipídica y aumento de actividad de la superóxido dismutasa, en todos los tiempos examinados. Además, ofreció mejoría histológica, observada por la disminución de daño neuronal en la región CA1 del hipocampo. Los efectos del extracto fueron significativamente mayores que los efectos de la quercetina (100mg/kg

peso del gerbo), indicando que ejerce una potente actividad neuroprotectora contra el daño neuronal en el hipocampo después de isquemia cerebral global transitoria, que puede atribuirse a sus propiedades antioxidantes.

La mayoría de los estudios sobre los efectos de los polifenoles procedentes de extractos del olivo apuntan que su acción neuroprotectora se debe a su capacidad antioxidante, causada por la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno implicadas en las enfermedades humanas (de la Puerta et al, 2001).

5.3.2. MODELOS ANIMALES REGULACION OBESIDAD

Como vertebrado, el pez cebra posee estructuras similares a las humanas. Por ejemplo, los órganos digestivos, el tejido adiposo y el músculo esquelético tienen estructuras similares a sus homólogos en el humano. Por otro lado, las señales endocrinas y neurales que regulan la ingesta de comida están conservadas en el pez cebra, incluyendo a las hormonas leptina y la adiponectina. Por último destacar que algunos estudios recientes han revelado que la obesidad inducida por la dieta en pez cebra comparte rutas patofisiológicas comunes con los mamíferos, en términos de la absorción intestinal con la ayuda de la bilis producida en el hígado (Henderson et al, 1987), el transporte de la grasa y el colesterol en lipoproteínas (Hölttä et al, 2010), β -oxidación (Morais et al, 2007), y el almacenamiento de triacilglicérols en forma visceral, subcutánea, intramuscular y depósitos de adipocitos (Song et al, 2007), sugiriendo que el pez cebra puede ser usado como un modelo alternativo para estudios de obesidad (Oka et al, 2010).

Debido a estas similitudes y ventajas, el pez cebra se utiliza en la investigación del metabolismo de los lípidos como un modelo para las enfermedades relacionadas con los lípidos, incluyendo la aterosclerosis inducida por la dieta alta en colesterol (Stoletov et al, 2009) y la obesidad inducida por la sobreexpresión de la proteína endógena antagonista de melanocortina (AgRP) (Song et al, 2007).

La elección de este modelo de larva de 72 horas de post-fertilización de pez cebra en el presente estudio fue para realizar el estudio completo de pruebas de desarrollo cognitivo y de la regulación del tejido adiposo.

En este estudio se analizó el efecto de la suplementación con el extracto sobre varios factores relacionados con la obesidad en larvas de 72 horas post-fertilización. Se determinaron el índice de masa corporal, colesterol total, triglicéridos y el perfil de ácidos grasos, indicando que la influencia del extracto no produjo alteraciones significativas respecto al grupo control. El extracto redujo el peso de las larvas en un 2,4%, el colesterol lo aumento en un 7,2%, los triglicéridos aumentaron un 20% con unas diferencias entre los grupos significativas $p > 0.05$. La diferencia de la medida de ácidos grasos frente al control no fue significativa para ninguno de ellos: palmítico aumentó un 0.7%, el esteárico se redujo un 0.4%, el oleico aumentó un 1.6%, linoléico aumentó un 0.7% y DHA se redujo un 2.1%

Estos resultados no se consideran concluyentes ya que a posteriori, tras la finalización del trabajo experimental se ha sabido que el tejido adiposo aparece a las 120 horas postfertilización (Flynn et al, 2009; Imrie y Sadler, 2010), lo que abre una perspectiva de trabajo en dicha línea.

Otros autores han realizado los estudios en modelo de pez cebra adulto induciendo una obesidad a través de la dieta (Hasumura et al, 2012), de esta forma, se investigaron los efectos del extracto de té verde (con alto contenido en polifenoles) sobre el peso corporal, visceral y acumulación de grasa subcutánea, y la expresión de genes del metabolismo de lípidos en el hígado y la grasa visceral en pez cebra con obesidad inducida. La administración del extracto se hizo durante 40 días. Se demostró que el extracto con elevado contenido en polifenoles inhibe significativamente la ganancia de peso y la acumulación de grasa corporal y altera la expresión de los genes del catabolismo de lípidos hepáticos en pez cebra con obesidad inducida. Además sugieren que dicho extracto con polifenoles ejerce efectos beneficiosos en la adiposidad, posiblemente mediante la alteración de la expresión de los genes del catabolismo de lípidos y SOCS3.

Jemai et al (2008) estudiaron los efectos de extractos de olivo, que contienen numerosos polifenoles, en ratas con hipercolesterolemia inducida por la dieta, observando los resultados hipolipidémicos de los mismos. Dando lugar a una disminución de los valores séricos del colesterol total, los triglicéridos y la del HDL-C, así como su poder antioxidante previene el proceso de peroxidación de los lípidos.

Otros autores han estudiado los efectos del ácido gálico, un polifenol presente en los extractos de aceituna, en ratas. Induciendo una obesidad por alimentación rica en grasas y suplementando con diferentes concentraciones de ácido gálico durante un periodo de 10 semanas. Obteniendo unos resultados que evidencian que es beneficioso en el tratamiento de la obesidad, su ingesta disminuye la ganancia de peso (en hígado y de tejido adiposo) y los parámetros en sangre, tales como colesterol, fosfolípidos, insulina y leptina (Hsu et al, 2007).

En ensayo en seres humanos se ha demostrado un significativo retraso en la absorción de la grasa después del consumo de polifenoles de vino tinto. Los extractos del té verde, ricos en catequinas, han mostrado tener propiedades termogénicas, incrementando 24 horas el gasto de energía y oxidación de grasa en personas.

En un ensayo con mujeres en Japón, el té oolong muestra aumento en el consumo de energía. El efecto del té oolong puede ser debido a los polifenoles polimerizados; en comparación con el té verde, el té oolong contiene la mitad de la cafeína y EGCG, pero el doble de polifenoles polimerizados (Ghosh y Skinner, 2007). El té también contiene cafeína y teatina, los cuales pueden tener efecto en el control de peso. Zhang et al (2013) han mostrado recientemente que la cafeína y teatina eran las partes constituyentes del extracto en polvo del té verde, responsables del efecto de pérdida de peso corporal, ellos también demostraron que la catequina y cafeína tienen una actividad sinérgica anti obesidad.



6. CONCLUSIONES





6. CONCLUSIONES

Tras la realización de este proyecto, se establecen las siguientes conclusiones:

1. Se ha estudiado la capacidad neuroprotectora y regulación del metabolismo graso de un extracto de huesos de oliva.
2. Para identificar la bioseguridad del extracto se determinó el rango de concentración no tóxica entre 10-50 ppm, demostrando que es bioseguro y con una dosis máxima tolerada de 100 mg/l.
3. La evaluación in vitro de la neuroprotección se realizó con la línea celular THP1-Xblue-CD14, con NFKB como biomarcador general, simulando un efecto preventivo a 50 ppm consiguiendo una reducción de la actividad NFKb (inflamatoria) del 26%.
4. El estudio del efecto terapéutico en la misma línea celular, presentó una actividad a la misma concentración de 50 ppm y una reducción de NFK del 35%.
5. Este efecto neuroprotector, con la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (biomarcador más específico), que se diferencia a células similares a neuronas y mediante el gen Bax (proapoptóticos) y gen Bcl2 (antiapoptótico), presentó un balance entre ambos similar al de células controles.
6. La evaluación in vivo mediante las larvas de pez cebra muestra que el extracto incrementa significativamente los niveles de AChE comparados con el grupo tratado con la neurotoxina ácido kaínico, indicando un efecto neuroprotector.
7. También se presenta un efecto beneficioso en el desarrollo del SNC de dicho modelo vivo.
8. La evaluación in vitro del efecto del extracto sobre la obesidad con la línea celular 3T3-L1 e inductores a adipocito, y estudiando la formación de cuerpos grasos como biomarcador, mostró a 50 ppm capacidad para inhibir la formación de los mismos.
9. Sobre esta misma línea celular, y mediante estudio de los genes PPAR γ y de la leptina mostró a esta concentración de extracto una reducción significativa de la expresión génica.
10. La evaluación del extracto con larvas de pez cebra no presentó diferencias significativas con el grupo control, en el peso corporal, contenido en colesterol total, triglicéridos, ni en el perfil de ácidos grasos.

11. Esta falta de efecto sobre el metabolismo graso es debido seguramente a que el modelo de la larva no es adecuado al efectuarse el desarrollo completo del tejido graso a partir de los 5 días de postfertilización.





7. BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

Aldini G, Piccoli A, Beretta G, Morazzoni P, Riva A et al. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia* 2006; Feb;77(2):121-8.

Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 2007; 22(5):1304-9.

Adams JM. y Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-26.

Agudo M, Trejo JL, Lim F, Avila J, Torres-Aleman I et al. Highly efficient and specific gene transfer to Purkinje cells in vivo using a herpes simplex virus I amplicon. *Hum Gene Ther* 2002; 13:665-74.

Aldini G, Piccoli A, Beretta G, Morazzoni P, Riva A et al. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia* 2006; Feb;77(2):121-8. Epub 2006 Jan 6.

Almanza-Perez JC, Alarcon-Aguilar FJ, Blancas-Flores G, Campos-Sepulveda AE, Roman-Ramos R et al. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. *Biomed Pharmacother* 2010; Oct;64(8):534-40.

Almanza-Pérez JC, Blancas-Flores G, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar FJ, Cruz M. Leptin and its association with obesity and type 2 diabetes. *Gac Med Mex* 2008; Nov-Dec;144(6):535-42.

Ban JY, Nquyen HT, Lee HJ, Cho SO, Ju HS et al. Neuroprotective properties of gallic acid from *Sanguisorbae radix* on amyloid beta protein (25--35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Biol Pharm Bull* 2008; Jan;31(1):149-53

Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA. Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. *Neuron* 1994; 12:243-60.

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S et al. The sytemic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 2000; 10:1351-58.

Baret P, Septembre-Malaterre A, Rigoulet M, Lefebvre d'Hellencourt C, Priault M et al. Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; Jan;45(1):167-74.

Bartlett H, Eperjesi F. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003; 23 (5):383-99.

Bazoti FN, Bergquist J, Markides K, Tsarbopoulos A. Noncovalent Interaction between Amyloid- β -Peptide (1– 40) and Oleuropein Studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006; 17:568-75.

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

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

Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hidrytyrosol. *J Pharm Pharmacol* 1999; Aug; 51(8):971-4.

Blancas-Flores G, Almanza-Pérez JC, López-Roa RI, Alarcón-Aguilar1 FJ, García-Macedo R, Cruz M. Obesity as an inflammatory process. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2010; Vol. 67.

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.

Boqué N, Campión J, de la Iglesia R, de la Garza AL, Milagro FI et al. Screening of polyphenolic plant extracts for anti-obesity properties in Wistar rats. *J Sci Food Agric* 2013; Mar 30;93(5):1226-32.

Boqué N, de la Iglesia R, de la Garza AL, Milagro FI, Olivares M et al. Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns. *Mol Nutr Food Res*. 2013 Mar 25.

Boualloui Z. Hydroxytyrosol acyl esters: biosynthesis and activities. *Appl Biochem Biotechnol* 2011; Mar;163(5):592-9.

Bowman TV, Zon LI. Swimming into the future of drug discovery: 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, Manzillo PA, Miller RJ. Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 1994; 14:187-97.

Brorson JR, Manzillo PA, Gibbons SJ, Miller RJ. AMPA receptor desensitization predicts the selective vulnerability of cerebellar Purkinje cells to excitotoxicity. *J Neurosci* 1995; 15:4515-24.

Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:622-9.

Celis LG, Rozo C, Garay J, Vargas D, Lizcano F. Efecto lipolítico del Resveratrol en células 3T3-L1. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)* 2008; 24(2):165-71.

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.

Chim HJ, Gilard J, Cillard P, Rahmani M. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1991; 68:307-12.

Chuang CC, Shen W, Chen H, Xie G, Jia W et al. Differential effects of grape powder and its extract on glucose tolerance and chronic inflammation in high-fat-fed obese mice. *J Agric Food Chem.* 2012; Dec 26;60(51):12458-68.

Clark R, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW et al. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J* 1999; 13:813-21.

Commenges D. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 2000; 16:357-63.

Covas MI, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Sebastia N, de la Torre-Boronat C, Marrugat J. Virgin olive oil polyphenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation. *Int J Pharm Res* 2000; XX: 49-54.

D'Angelo S, Ingrosso D, Migiardi 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 Radic Biol Med* 2005; Apr 1; 38(7):908-19

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(2):858-67.

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; Jul 27;69(10): 1213-22.

de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Houtt JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol* 1999; Feb 15;57 (4): 445-9

Deiana M, Aruoma O, Bianchi ML, Spencer JP, Kaur H et al. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radical Biol Med* 1999; Mar; 26:5-6.

Dekanski D, Selaković V, Piperski V, Radulović Z, Korenić A, Radenović L. Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. *Phytomed* 2011; Oct 15;18(13):1137-43.

Della Ragione FD, Cuccilla V, Borriello A, Pietra VD, Pontoni G et al. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; Nov 30; 278(3):733-9.

Diplock AT, Aggett PA, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *Br J Nutr* 1999; 81: supp 1:S1-S27.

Drira R, Shu Chen S, Kazuichi Sakamoto K. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life Sciences* 2011; 89:708-16.

Duthie GG, Gadner PT, Kyle JAM. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc* 2003; 62:599-603.

Dutta A, Dutta SK. Vitamin E and its Role in the Prevention of Atherosclerosis and Carcinogenesis: A Review. *J Am Col Nutr* 2003; 22(4):258-68.

Eisen JS, Smith JC. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 2008; 135:1735-43.

Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Feather Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88-95.

Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev* 2002; Aug; 11(4):351-8.

Flynn EJ, Trent ChM, Rawls JF. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*) *Lipid Res* 2009; August; 50(8):1641-52.

FAO. Etiquetado de los alimentos Textos completos. Codex Alimentarius. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 1999. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W8612S/W8612S00.htm>

Fki I, Allouche N, Sayadi S. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chem* 2005; 93:197-204.

Frabiani R, De Bartomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R et al. 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.

Fu M, Sun T, Bookout AL, Downes M, Yu RT et al. A nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 Adipogenesis *Molecular Endocrinol* 2005; 19(10):2437-2450.

Furneri PM, Piperno A, Sajia A, Bisignano G. Antimycoplasmas activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; Dec; 48 (12):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.

Gaya M, Repetto V, Piwien Pilipuk G, Moreno S. Estudio del efecto antiadipogenico de compuestos bioactivos de *Rosmarinus officinalis* L. en la linea celular 3T3-L1. *Medicina Buenos Aires* 2010; 70:185.

Ghosh D, Skinner M. Polyphenols from fruit and vegetables in weight management and obesity control. In: *Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Prevention*. CRC Press, USA. 2007, pp. 321-337.

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; Sep;84(4):755-67.

Girgin F, Yildirim E. Anti-inflammatory effects of dietary antioxidants. *Curr Med Chem* 2004; 3:19-30.

Grimble RF. Nutritional modulation of immune function. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 389-397.

Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 2002; 3:717-24.

Guinda A, Lanzón A, Rios JJ, Albi T. Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja del olivo: extracto de hexano. *Grasas y Aceites* 2002; 419(53) Fasc. 4:419-22.

Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav* 2004; 3:63-74.

Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; Jun; 116(6):598-620.

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(sup):268S–76S.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Medicine and Biology*. Oxford University Press: New York, 1999.

Hammond EN, Tetzlaff W, Mestres P, Giehl KM. BDNF, but not NT-3, promotes long-term survival of axotomized adult rat corticospinal neurons in vivo. *Neuroreport* 1999; 10, 2671-5.

Hao J, Shen W, Yu G, Jia H, Li X et al. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem* 2010; Jul;21(7):634-44.

Harmon AW, Patel YM, Harp JB. Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression. *Biochem J* 2002; Oct 1;367(Pt 1):203-8.

Hasumura T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Nishimura Y, Meguro S et al. Green tea extract suppresses adiposity and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish. *Nutr Metab (Lond)* 2012; Aug7;9(1):73.

Henderson RJ, Tocher DR. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog Lipid Res* 1987; 26:281–347.

Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L et al. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med* 2004; 164 (21):2335-42.

Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1999; 274:22569-80.

Hölttä-Vuori M, Salo VTV, Nyberg L, Brackmann C, Enejder A et al. Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochem J* 2010; 429:235-42.

Hsu CL, Lo WH, Yen GC. Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes via a Fas- and mitochondrial-mediated pathway. *J Agric Food Chem* 2007; Sep 5;55(18):7359-65.

Hsu CL, Yen GC. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *Br J Nutr* 2007; Oct; 98(4): 727-35.

Huang Z. *The Chemical Biology of Apoptosis: Exploring Protein-Protein Interactions and the Life and Death of Cells with Small Molecules*. *Chem Biol* 2002; 9(10): 1059-72.

Hughes J, Kelly CN, Buttriss J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutr* 2004; 7(3):407-22.

Imrie D, Sadler KC. White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. *Dev Dyn* 2010; Nov; 239(11):3013-23.

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.

Jacomelli M, Pitozzi V, Zaid M, Larrosa M, Tonini G et al. Dietary extra-virgin olive oil rich in phenolic antioxidants and the aging process: long-term effects in the rat. *J Nutr Biochem* 2010; Apr 21(4):290-6.

Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem Biol Interact* 2008; Nov 25;176(2-3):88-98.

Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A et al. 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.

Ju HY, Chen SC, Wu KJ, Kuo HC, Hseu YC et al. Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(3-4):492-502.

Juman S, Yasui N, Okuda H, Ueda A, Negishi H et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Suppresses the Production of Adipocytokines, Leptin, Tumor Necrosis Factor -Alpha and Resistin, during Differentiation to Adipocytes in 3T3-L1 Cells *Biol Pharm Bull* 2011; 34(4):490-4.

Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. In: *Natural antioxidants*. Frei, B., ed. San Diego, Academic Press. 1994, pp 25-62.

Kim HJ, Song JY, Park HJ, Park HK, Yun DH, Chung JH. Naringin Protects against Rotenone-induced Apoptosis in Human Neuroblastoma SHSY5Y Cells. *Kor J Physiol Pharmacol* 2009; 13:281-5.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullman B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Develop Dyn* 1995; 203:255-310

Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S, Sekiya K. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; Feb; 61(2):347-50

Kussmann M, Raymond F, Affolter M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *J Biotech* 2006; 124:758-87.

Lee H, Kang R, Yoon Y. Shikonin Inhibits Fat Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes. *Phytother Res* 2010; 24:344-51.

Lee YY, Kim HG, Jung HI, Shin YH, Hong SM et al. Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Mol Cells* 2002; 14:305-11.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007; 8:353-67.

Lin JT, Mckeon TA, Stafford AE. Gradient reserved-phase high-performance liquid chromatography of saturated unsaturated and oxygenated free fatty acids and their methyl esters. *J Chromatography* 1995; 699:85-91.

Lindahl PE, Oberg KE. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp Cell Res* 1961; 23:228-37.

Linney E, Upchurch L, Donerly S. Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicol Teratol* 2004; 26:709-18.

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.

Lu Z, Nie G, Belton PS, Tang H, Zhao B. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochem Int* 2006; Mar;48(4):263-74.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727-47.

Manna C, D'Angelo S, Migliardi V, Loffredi E, Mazzoni O et al. Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *J Agricult Food Chem* 2002; 50:6521-6.

Manna C, Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, D'Angelo S et al. Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity. *Advan Exp Med Biol* 1999; 472:115.

Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro G, Zappia V. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem* 1999; 10:159-65.

Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, Dangelo S, Zappia V. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters* 2000; 470:341-4.

Martinez A, del Carmen J, Gonzalez MR. _Evaluación de los efectos histopatológicos de un extracto alcohólico de *Microcystis sp* en hígado de Carpa Dorada (*Carassius auratus*) y Tilapia (*Cichlasoma nigrofasciatum*) CIVA 2006; 767-73.

Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 2006; 21:749-60.

Menendez JA, Vazquez-Martin A, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Oliveras-Ferraro C et al. Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *BMC Cancer* 2008; Dec 18;8:377.

Merlo-Pich M, Deleonardi G, Biondi A, Lenaz G. Methods to detect mitochondrial function. *Exp Gerontol* 2004; 39:277-81.

Mizoguchi T, Edano T, Koshi T. A method of direct measurement for enzymatic determination of cholesteryl esters. *J Lipid Res* 200; Feb;45(2)16:396-401.

Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulian 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; Jan 15;18:170-5.

Morais S, Knoll-Gellida A, André M, Barthe C, Babin PJ. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. *Physiol Genom* 2007; 28:239-52.

Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 2003; Oct;19(10):876-9.

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.

Nanjee, Miller. Sequential microenzymatic assay of cholesterol, triglycerides and phospholipids in a single aliquot. *Clin Chem* 1996; 42:915.

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. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812:346-52.

O'Brien NM, Woods JA, Aheme SA, O'Callaghan YC. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc Trans* 2000; 28:22-6.

Oben JE, Ngondi JL, Blum K. Inhibition of *Irvingia gabonensis* seed extract (OB131) on adipogenesis as mediated via down regulation of the PPAR γ and leptin genes and up-regulation of the adiponectin gene. *Lipids Health Dis* 2008; 13;7:44.

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; Jan;22(1):227-34.

Ohama H, Ikeda H, Moriyama H. Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicol* 2006; 221(1):95-111.

Oltvai 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.

Orzechowski A, Ostaszewski P, Jank M, Berwid SJ. Bioactive substances of plant origin in food-impact on genomics, reproduction *Nutr Develop* 2002; 42:461-77.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhader B, Bartsch H. The antioxidant/ anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil . *Eur J Cancer* 2000; Jun; 36(10):1235-47.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* 2000; Oct;1:107-12.

Owen RW, Haubner R, Würtele G, Hull E, Spiegelhader B, Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 2004; Aug; 13(4):319-26.

Panickar KS. Effects of dietary polyphenols on neuroregulatory factors and pathways that mediate food intake and energy regulation in obesity. *Mol Nutr Food Res* 2013; Jan;57(1):34-47.

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.

Pereira-Caro G, Madrona A, Mateos R, Rodríguez G, Trujillo M et al. 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 neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum. *J Neurochem* 2005; 92:678-91.

Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 1995; 78:151-60.

Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235(10):1185-93.

Powell DR. Obesity drugs and their targets: correlation of mouse knockout phenotypes with drug effects in vivo. *Obes Rev* 2006; Feb;7(1):89-108.

Quiles JL, Huertas JR, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J, Manas M. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. *Nutr* 2003; Apr; 19(4):363-8.

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.

Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci* 2013; Sep 5;14(9):18284-318.

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.

Roginsky V. Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles. *Arch Biochem Biophys* 2003; 414:261-70.

Roh C, Jung U, Jo SK. Screening of anti-obesity agent from herbal mixtures. *Molecules* 2012; Mar 23;17(4):3630-8.

Ryan D, Robards K. Phenolic compounds in olives. *Analyst* 1998; 123:31R-44R.

Salami M, Galli C, De Aggelis L, Visoli F. Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hidroxitirosol. *Pharmacol Res* 1995; 31:275-9.

Sato H, Genet C, Strehle A, et al. Antihyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362:793-8.

Saura-Calisto F, Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish mediterranean diet. *Food Chem* 2006; 94:442-7.

Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacotherapy* 2002; 56:276-82.

Schaffer S, Müller WE, Eckert GP. Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res* 2010; Oct;62(4):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; Sep;16(9):1137-54.

Sheng H, Enghild JJ, Bowler R, Patel M, Batinić-Haberle I et al. Effects of metalloporphyrin catalytic antioxidants in experimental brain ischemia. *Free Radic Biol Med* 2002; Oct 1;33(7):947-61.

Shenkin A. The key role of micronutrients. *Clin Nutr* 2006; 25(1):1-13.

Shisheva A, Shechter Y. Role of cytosolic tyrosine kinase in mediating insulin-like actions of vanadate in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1993; Mar 25;268(9):6463-9.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; (2):291-5.

Singh N, Shukla N, Singh P, Sharma R, Rajendran SM et al. Verbascoside isolated from *Tectona grandis* mediates gastric protection in rats via inhibiting proton pump activity. *Fitoterap* 2010; Oct;81(7):755-61.

Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, LeMieux M, Greer B, Moustaid-Moussa N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J Nutr Biochem* 2013; Apr;24(4):613-23.

Smith et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:765.

Song Y, Cone RD. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J*. 2007; 21:2042-9.

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.

Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruomab OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Res* 2005; 579:200-13.

Stoletov K, Fang L, Choi SH, Hartvigsen K, Hansen LF et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circ Res* 2009; 104:952-60.

Student AK, Hsu RY, Lane MD. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 1980; 225(10):4745-50.

Suzuki R, Tanaka M, Takanashi M, Hussain A, Yuan B et al. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. *Nutr Metab (Lond)* 2011; Mar 8;8:14.

Takehiko O, Yuhei N, Liqing Z, Minoru H, Yauhito S et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol* 2010; 10:21.

Tangney CC, Rasmussen HE. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2013; May;15(5):324.

Tian C, Ye X, Zhang R, Long J, Ren W et al. Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via erk1/2-PPAR γ -adiponectin pathway. *PLoS One* 2013; 8(1):e53796.

Tingaud-Sequeira A, Ouadah A, Babin PJ. Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *J lipid Res* 2011; Sep 52(9)-1765-72.

Tong L, Perez-Polo R. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protects cultured rat cerebellar granule neurons against glucose deprivation-induced apoptosis. *J Neural Transm* 1998; 105:905-14.

Vauzour D, Corona G, Spencer JP. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Arch Biochem Biophys* 2010; Sep 1;501(1):106-11.

Vaya J, Aviram M. Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications *Curr Med Chem* 2001; 1:99-117.

Velísková J, Velíšek L, Mares P. Epileptic phenomena produced by kainic acid in laboratory rats during ontogenesis. *Physiol Bohemoslov* 1988; 37:395-405.

Visoli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; Jun 247(1):60-4.

Visoli F, Galli C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci* 1994; 55(24):1965-71.

Visoli F. Antioxidant and aother biological activities of phenols from olives and olives oil. *Med Res Rev* 2001; 22:65-75.

Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2003; 361(9374):2017-23.

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.

Wintergerst E, Maggini S, Hornig D. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann Nutr Metab* 2006; 50(2):85-94.

Woodside J, McCall D, McGartland C, Young I. Micronutrients: dietary intake v. supplement use. *Proc Nutr Soc* 2005; 64(4):543-53.

Xiang-hui L, Zhang J, Sui S, Yang M. Effect of daidzin, genistin, and glycitin on osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells and adipocytic transdifferentiation of osteoblasts. *Acta Pharmacol Sinica* 2005; 26(9):1081-6.

Yang JQ, Zhou QX, Liu BZ, He BC. Protection of mouse brain from aluminum-induced damage by caffeic acid. *CNS Neurosci Ther* 2008; Spring;14(1):10-6.

Yao Y, Li XB, Zhao W, Zeng YY, Shen H et al. Anti-obesity effect of an isoflavone fatty acid ester on obese mice induced by high fat diet and its potential mechanism. *Lipids Health Dis* 2010; 9:49.

Zbidi H, Salido S, Altarejos J, Perez-Bonilla M, Bartegi A et al Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood Cells Mol Dis* 2009; May-Jun;42(3):279-85.

Zhang R, Tian C, Ye X, Long J, Ren W et al. Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via erk1/2-PPAR γ -adiponectin pathway. *PLoS One* 2013; 8(1):e53796.

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.

Zhang Y, Guo K, Diaz P, Heo M, Leibel R. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002; 282:R226–R234.

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; Jun 14;564 (1-3):18-25.

Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:35-44.

