



ATENUACIÓN DE PROCESOS INFLAMATORIOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER TRAS CONSUMO DE ACEITE DE ORUJO

INFORME FINAL DE ACTIVIDADES

Dr. Javier Sánchez Perona

Dr. José María Castellano Orozco

Dra. Angélica Quintero Flórez

Natalia Carrasquilla García

Juan Manuel Espinosa

Emilio Montero Romero



INDICE

1. Antecedentes e hipótesis	3
2. Objetivos	4
3. Métodos	4
3.1. Selección de voluntarios y administración de los aceites experimentales.....	4
3.2. Aislamiento y caracterización de lipoproteínas ricas en Triglicéridos (TRL) humanas	6
3.3. Activación microglial en células BV-2 tratadas con TRL humanas	6
4. Resultados	8
4.1. Composición de las comidas experimentales y los aceites empleados en el estudio.....	8
4.2. Características basales de las voluntarias participantes en el estudio	11
4.3. Efecto de los aceites sobre parámetros bioquímicos postprandiales.....	12
4.4. Activación de células microgliales BV-2 por TRL.....	20
5. Interpretación de los resultados	29
6. Conclusiones	36



1. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

El presente proyecto parte de la demostración previa de que las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) son capaces de provocar la activación de la microglía, un fenómeno asociado a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer que interviene en el proceso inflamatorio asociado a esta enfermedad. Pero, además, los compuestos bioactivos del aceite de orujo demostraron ser capaces de atenuar dicha activación, lo que se manifestó a través de una reducción en la producción de marcadores de inflamación y un incremento de los sistemas de defensa antioxidante. Sin embargo, esos estudios se realizaron empleando TRL artificiales, creadas en el laboratorio con concentraciones controladas de los compuestos bioactivos del aceite de orujo. Por tanto, la hipótesis del presente proyecto de investigación establece que **TRL humanas generadas durante el periodo postprandial tras la ingesta de aceite de orujo de oliva incorporarán los componentes bioactivos liposolubles del aceite y, por lo tanto, conservarán su capacidad protectora frente a la activación de la microglía y la respuesta inflamatoria.**

De ser así, las evidencias obtenidas sentarían las bases para el desarrollo de nuevas aplicaciones del aceite de orujo en la salud, que tendrían como fundamento la influencia de las TRL formadas en el periodo postprandial y que podrían emplearse para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.



2. OBJETIVOS

Para probar la hipótesis anterior, se abordarán dos objetivos específicos:

1. Obtener y caracterizar TRL humanas postprandiales obtenidas tras la ingesta de aceite de orujo rico en sus componentes bioactivos.
2. Evaluar el efecto atenuante de la activación microglial por TRL postprandiales obtenidas tras la ingesta de aceite de orujo.

3. MÉTODOS

3.1. Selección de voluntarios y administración de los aceites experimentales

El estudio se diseñó como un ensayo aleatorizado y cruzado en fase postprandial. Voluntarias sanas, de las mismas características, se dividieron en dos grupos, a los que se administró un aceite de orujo de oliva o aceite de girasol alto-oleico (AGAO) como control. El aceite de orujo fue suministrado por el grupo de Laura Bravo (ICTAN-CSIC), procedente de proyectos anteriores con ORIVA, mientras que el aceite de girasol alto-oleico se adquirió en un comercio.

El ensayo postprandial se realizó siguiendo los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa y de la Declaración Universal de la UNESCO y tuvo lugar en la consulta de Urgencias del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla. Se seleccionaron 18 voluntarias adultas (18-26 años) sanas y con peso normal, sin ningún trastorno digestivo o metabólico. Para su participación, las voluntarias firmaron su consentimiento a un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Bioética del CSIC, después de ser convenientemente



informadas tanto oral como documentalmente. Las características antropométricas de las voluntarias fueron determinadas empleando cintas métricas homologadas, tallímetro y mediante bioimpedancia (Tanita) (Tabla 1). Además, se realizaron determinaciones bioquímicas basales para asegurar el estado de salud de las participantes (Tabla 2).

Las voluntarias del estudio fueron asignadas de forma aleatoria a cada grupo de intervención (aceite de orujo o AGAO). El día del ensayo, y después de 12 horas de ayuno nocturno, a cada participante se le extrajo una muestra de sangre por punción de la vena cubital. Seguidamente, recibieron una dosis de aceite de orujo o AGAO, que ingirieron como parte de un desayuno que incluía leche desnatada, tostada con pan integral y tomate. La composición de las comidas experimentales y los aceites se expone en las Tablas 3 y 4. Tras su ingesta, a cada participante se le extrajeron alícuotas de sangre cubital cada hora, durante un período postprandial de 6 horas. A las horas 0 (basal), 2 y 4 del periodo postprandial, se recogió un volumen superior de sangre para aislar TRL. Tras cuatro semanas de lavado, se repitió el ensayo postprandial, cambiando el aceite experimental para que ambos grupos recibieran los dos aceites y actuaran como sus propios controles.

3.2. Aislamiento y caracterización de lipoproteínas ricas en Triglicéridos (TRL) humanas

De las alícuotas de sangre obtenidas a las horas 0, 2 y 4, se obtuvieron los sueros por centrifugación y se conservaron a -80 °C hasta su empleo. En el suero sanguíneo se determinó la concentración de lípidos, glucosa e insulina (Tabla 3).

Las TRL se aislaron de los sueros mediante ultracentrifugación y se emplearon para el estudio de activación microglial. La presencia de algunos de los componentes bioactivos del aceite de orujo como los tocoferoles y el ácido oleanólico se determinó mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia y mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, respectivamente.

3.3. Activación microglial en células BV-2 tratadas con TRL humanas

En esta actividad se empleó la línea celular BV-2 de ratón como modelo de células microgliales. Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% FBS inactivado por calor, estreptomycin (100 mg/ml) y penicilina (100 UI/ml) y fueron tratadas con las TRL obtenidas en el ensayo postprandial, es decir, tras la ingesta del aceite de orujo o el AGAO. Los tratamientos se mantuvieron durante 24h. Los ensayos se realizaron en cultivos con viabilidad superior al 95%.

En el sobrenadante del cultivo de las células tratadas con las TRL, se determinó la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina-6 (IL-6), empleando para ello kits comerciales de ELISA de acuerdo con los protocolos del fabricante. Para determinar la expresión génica de las citoquinas de interés, así como de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), se empleó la técnica de PCR a



tiempo real tras retrotranscripción a cDNA, usando para ello primers diseñados con ese propósito. Para la determinación de la concentración intracelular de ROS se empleó la sonda fluorescente 2',7'-diclorofluorescein-diacetato (DCFH-DA). La intensidad de la fluorescencia emitida se midió a 825 nm, tras excitación a 485 nm. La determinación de la concentración en el medio de cultivo de óxido nítrico se llevó a cabo mediante la reacción de Griess



4. RESULTADOS

4.1. Composición de las comidas experimentales y los aceites empleados en el estudio.

La Tabla 1 muestra la composición de las comidas experimentales empleadas en el estudio, de acuerdo a lo declarado en las etiquetas de los envases. El desayuno consistió en 3 rebanadas de pan integral, un vaso de leche desnatada y el aceite de orujo o AGAO. Además, las voluntarias que lo deseaban, podían añadirle tomate triturado. Evidentemente, el aceite fue el ingrediente que contribuyó en mayor medida al contenido energético del desayuno, con un 66% de las calorías totales, mientras que el pan integral y la leche aportaron un 22% y un 10%, respectivamente. Del mismo modo, el aceite contribuyó con un 96,7% del contenido graso total del desayuno, por lo que la contribución del resto de ingredientes no fue significativa. El contenido en carbohidratos se debió fundamentalmente al pan integral, sobre todo en forma de almidón, mientras que la leche aportó azúcares en forma de lactosa. Las comidas experimentales no contenían cantidades apreciables de colesterol, pero el pan de molde integral, sí aportó fibra dietética.

Tabla 1. Composición de las comidas experimentales

	Pan integral	Leche desnatada	Tomate	Aceite*	Total
Total (g)	71	208	20	50	329
Energía (kcal)	149	71	4	450	674
Energía (kJ)	621	295	15	1875	2806
Proteínas (g)	6,4	6,2	0,2	0,0	12,8
Carbohidratos (g)	27,7	9,4	0,6	0,0	39,7
Azúcar (g)	1,7	9,4	0,0	0,0	11,1
Polialcoholes (g)	0,8	0,0	0,0	0,0	0,8
Grasas (g)	1,1	0,6	0,1	50,0	51,8
Colesterol (g)	0,0	0,0	0,0	0,0	0
Fibra (g)	6,4	0,0	0,3	0,0	6,7

* Aceite de girasol alto-oleico (AGAO) o aceite de orujo de oliva.

La Tabla 2 muestra la composición en ácidos grasos de los dos aceites experimentales empleados en el estudio. Ambos aceites se caracterizaron por un contenido en ácidos grasos similar, con presencia mayoritaria de ácido oleico (18:1), algo superior en el AGAO, al igual que el ácido palmitoleico (16:1), aunque la presencia de éste fue testimonial. En cambio, el contenido en ácido palmítico (16:0) fue superior en el aceite de orujo. El AGAO, además presentó concentraciones algo mayores de ácido esteárico (18:0) y de ácido linoleico (18:2). En definitiva, **la composición fue muy similar, aunque el contenido en ácidos grasos monoinsaturados fue ligeramente superior en el AGAO y el de ácidos grasos saturados en el orujo.**

Tabla 2. Composición en ácidos grasos de los aceites de girasol alto-oleico (AGAO) u orujo de oliva (Orujo) (%).

	AGAO	Orujo
16:0	4,1	11,6
16:1	1,3	1,0
18:0	4,0	2,8
18:1	77,4	71,0
18:2	14,3	11,5
20:0	0,1	0,5
18:3	0,3	0,8
20:1	0,1	0,3
22:0	0,9	0,2
Otros	0,3	0,3

Además, se determinó la composición en algunos componentes mejores de interés de los aceites. **El AGAO presentó un contenido en tocoferoles totales de 393,2 mg/kg, prácticamente idéntico al que contenía el aceite de orujo (389 mg/kg).** En cambio, el contenido en esteroides totales fue muy superior en el aceite de orujo (2839 mg/kg) en comparación con el AGAO (1497 mg/kg), siendo prácticamente el doble. Por otra parte, en el aceite de orujo se encontró presencia importante de escualeno (799 mg/kg), ácido oleanólico (187 mg/kg) y eritrodiol+uvaol (638,5 mg/kg).

4.2. Características basales de las voluntarias participantes en el estudio

Las voluntarias en el estudio, con una edad media de casi 21 años, presentaron datos antropométricos acordes con la normalidad, tanto en el peso y talla, como en la composición corporal y los índices antropométricos usualmente empleados para diagnosticar la obesidad, como son el índice de masa corporal (IMC), las circunferencias de la cintura y la cadera y los índices calculados a partir de estos valores (Tabla 3).

Tabla 3. Características antropométricas de las voluntarias

	Media	SD
Edad (años)	20,9	1,8
Peso (kg)	57,2	6,1
Altura (cm)	162,3	5,2
Circunferencia de la cintura (cm)	68,6	5,0
Circunferencia de la cadera (cm)	94,4	4,2
Masa grasa (kg)	15,4	3,2
Masa grasa (%)	26,3	4,7
Masa magra (kg)	41,6	3,7
Agua total (kg)	30,4	2,7
Grasa visceral (kg)	1,5	0,6
Altura (m)	1,62	0,05
IMC	21,4	2,1
Índice cintura-cadera	0,73	0,04
Índice cintura-altura	0,42	0,03

IMC: índice de masa corporal. SD: desviación estándar. N=18

Además, se realizaron determinaciones bioquímicas en plasma sanguíneo para asegurar la idoneidad de las voluntarias para participar en el estudio (Tabla 4). Las concentraciones basales de lípidos plasmáticos, así como las de glucosa e insulina, se encontraron dentro de los rangos de referencia normales.

Tabla 4. Características bioquímicas plasmáticas de las voluntarias

	Media	SD
Glucosa (mg/dL)	69,8	6,6
Colesterol (mg/dL)	177,8	34,6
Triglicéridos (mg/dL)	78,4	17,7
HDL- colesterol (mg/dL)	65,6	16,7
LDL- colesterol (mg/dL)	95,5	26,1
Insulina (μ UI/mL)	7,8	3,5

SD: desviación estándar. N=18

4.3. Efecto sobre parámetros bioquímicos postprandiales.

Las figuras 1 a 6 muestran la evolución de los niveles plasmáticos de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol, LDL-colesterol y HDL-colesterol a lo largo del periodo postprandial.

Los niveles de glucosa no se modificaron de forma significativa tras la ingesta de las comidas experimentales en el periodo postprandial (Figura 1). Se observa un ligero incremento de las concentraciones plasmáticas de glucosa en la primera hora tras la ingesta de los desayunos, debido a su contenido en carbohidratos. Después, los niveles vuelven a bajar para mantenerse estables hasta la hora sexta, en la que se observa otro incremento, probablemente debido a la producción de

glucosa hepática como mecanismo de compensación por la falta de nutrientes tras varias horas de ayuno. No se encontraron diferencias significativas entre los dos aceites estudiados.

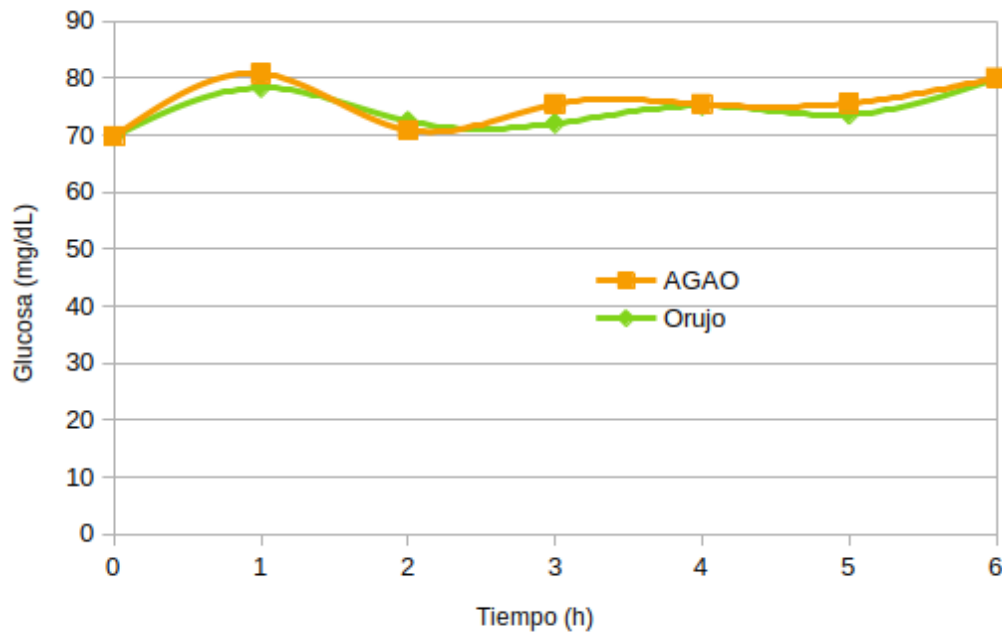


Figura 1. Concentraciones plasmáticas postprandiales de glucosa tras la ingesta de una comida rica en aceite de girasol alto-oleico (AGAO) o aceite de orujo (Orujo). N=18.

El efecto de la ingesta de las comidas experimentales tuvo un marcado efecto sobre los niveles de insulina plasmáticos, observándose un pico insulinémico en la primera hora del periodo postprandial (Figura 2). Las concentraciones de la hormona se fueron reduciendo paulatinamente en las horas posteriores, llegando a los niveles basales en la última hora analizada. **El consumo del desayuno experimental que contenía aceite de orujo dio lugar a una menor respuesta insulinémica postprandial que el desayuno que contenía AGAO**, que se evidenció a las 2 h tras la ingesta. El mismo resultado se observó una hora después, aunque en este caso la diferencia no fue estadísticamente significativa. Estos datos apuntan a una

mayor reducción de los niveles de insulina postprandial, una vez alcanzado el pico máximo, cuando se consume aceite de orujo.

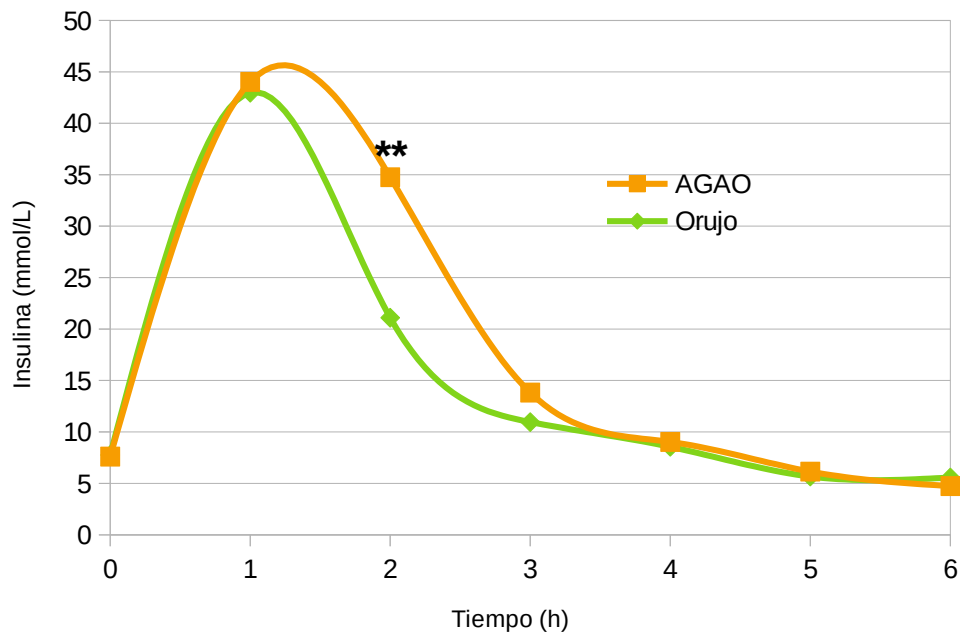


Figura 2. Concentraciones plasmáticas postprandiales de insulina tras la ingesta de una comida rica en aceite de girasol alto-oleico (AGAO) o aceite de orujo (Orujo). **, $p < 0,01$. $N = 18$.

Tras el análisis de triglicéridos plasmáticos en el periodo postprandial, se observó un pico máximo de concentración hacia las dos horas tras la ingesta de los desayunos experimentales (Figura 3). En el caso del AGAO, el pico se retrasó ligeramente y, aunque los valores volvieron a los niveles basales a partir de la cuarta hora, lo hicieron algo más lentamente que tras el consumo de aceite de orujo, aunque la diferencia no fue significativa. **Este resultado indica que el aceite de orujo tendría una capacidad ligeramente superior de aclarar los triglicéridos plasmáticos que el AGAO.**

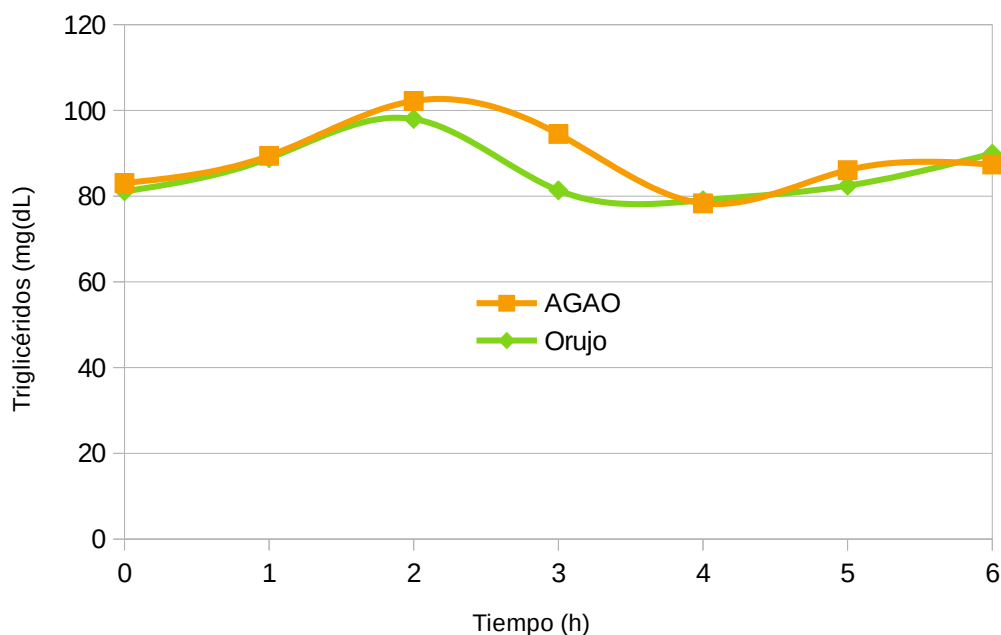


Figura 3. Concentraciones plasmáticas postprandiales de triglicéridos tras la ingesta de una comida rica en aceite de girasol alto-oleico (AGAO) o aceite de orujo (Orujo). N=18.

En cuanto a las concentraciones plasmáticas de colesterol, colesterol-LDL y colesterol-HDL, no se encontraron cambios de importancia a lo largo de todo el periodo postprandial tras la ingesta de ninguno de los dos aceites de estudio (Figuras 4, 5 y 6). Este resultado era de esperar, dado que es conocido que las concentraciones de colesterol no varían de forma significativa en fase postprandial.

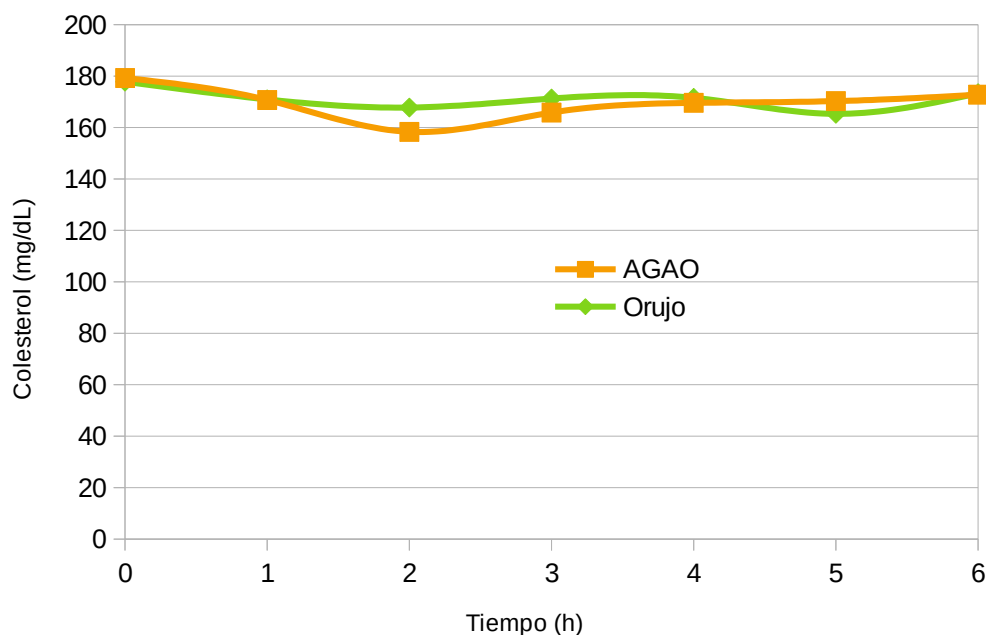


Figura 4. Concentraciones plasmáticas postprandiales de colesterol tras la ingesta de una comida rica en aceite de girasol alto-oleico (AGAO) o aceite de orujo (Orujo). N=18.

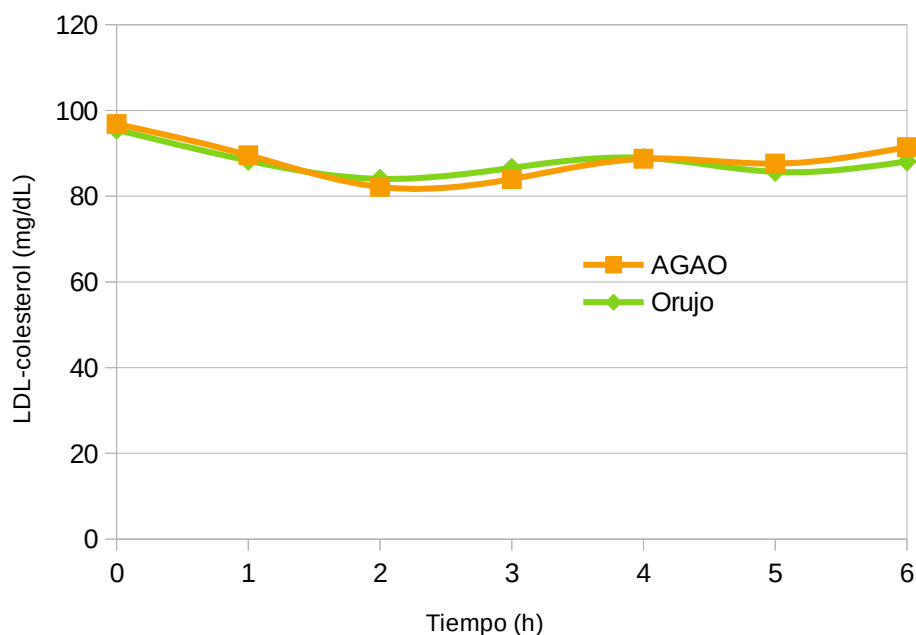


Figura 5. Concentraciones plasmáticas postprandiales de colesterol-LDL tras la ingesta de una comida rica en aceite de girasol alto-oleico (AGAO) o aceite de orujo (Orujo). N=18.

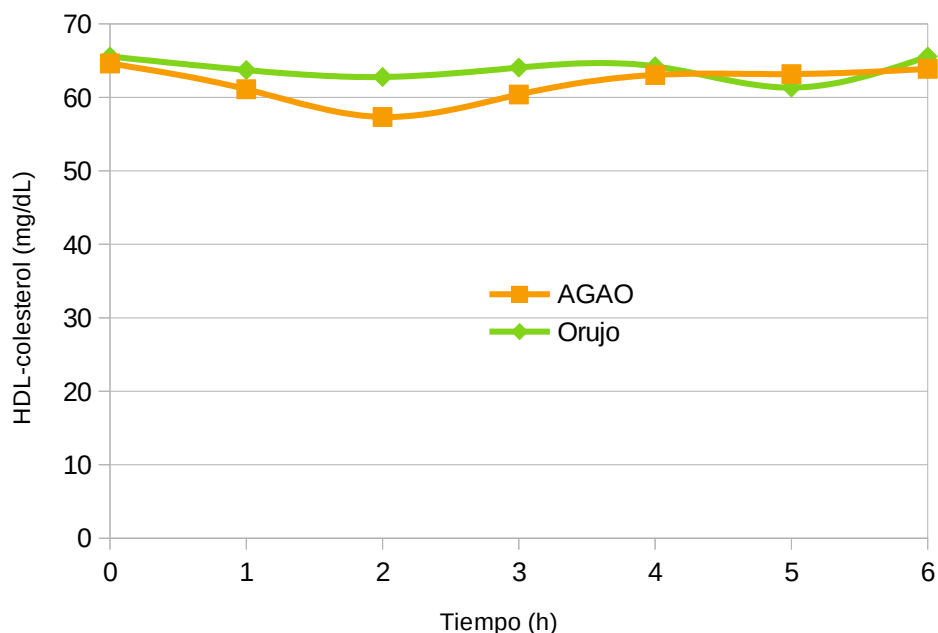


Figura 6. Concentraciones plasmáticas postprandiales de colesterol-HDL tras la ingesta de una comida rica en aceite de girasol alto-oleico (AGAO) o aceite de orujo (Orujo). N=18.

Las TRL fueron aisladas de los sueros sanguíneos obtenidos tras la ingesta de ambos aceites y se estudió su composición en apolipoproteína B, que sirve como indicador de número de partículas de TRL. Como puede apreciarse en la Figura 6, el número de partículas de TRL se fue reduciendo a lo largo del periodo postprandial, lo que sugiere un aclaramiento paulatino. Excepto en la fase anterior a la ingesta de los desayunos experimentales, se observa a todas las horas estudiadas (2 y 4 horas postprandiales), que el contenido de apolipoproteína B es superior en las TRL obtenidas tras el consumo de AGAO, en comparación con el aceite de orujo, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. **Este resultado sugiere que el número de partículas circulantes tras el consumo de aceite de orujo es menor a lo largo de todo el periodo postprandial.**

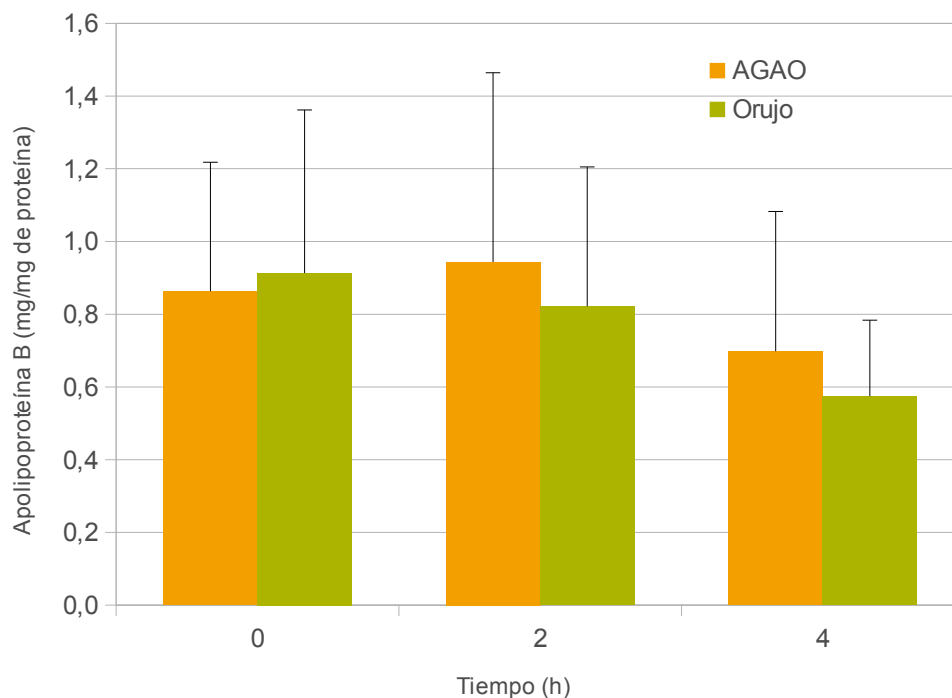


Figura 6. Concentraciones plasmáticas postprandiales de apolipoproteína B en lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) tras la ingesta de una comida rica en aceite de girasol alto-oleico (AGAO) o aceite de orujo (Orujo). N=18.

Como se mencionó previamente, la composición de los dos aceites experimentales fue similar, sobre todo en cuanto a su contenido en ácidos grasos, y en particular en ácido oleico. En cambio, el aceite de orujo contenía concentraciones superiores de algunos compuestos minoritarios, como esteroides, escualeno y compuestos triterpénicos. Estas sustancias son liposolubles o tienen determinada capacidad para disolverse en medios lipídicos, por lo que deben ser transportadas en sangre incorporadas a TRL. De esa forma, tendrían la capacidad de alcanzar las células encefálicas e interactuar con ellas, ejerciendo su actividad protectora.



En el presente estudio se hizo un esfuerzo por determinar algunos de esos compuestos en TRL humanas, **algo que no está descrito en la literatura científica por el momento debido a las dificultades metodológicas que encierra el procedimiento**, puesto que la cantidad de partículas que se obtienen del suero sanguíneo humano es muy reducida. En concreto, fuimos capaces de determinar ácido oleanólico y α -tocoferol en TRL, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas y HPLC-fluorescencia, respectivamente, pero no β -sitosterol, cuyo procedimiento preparativo requiere una cantidad de muestra mucho mayor. Salvo en las TRL de una de las voluntarias, **no fue posible detectar ácido oleanólico en estas lipoproteínas, lo que indica que este compuesto bioactivo no se transporta mediante esta vía**. Estudios previos, llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, demostraron que la vía principal de transporte de ácido oleanólico es unido a albúmina. A modo de control del ensayo, se determinó la presencia de colesterol en TRL. Esta medida se realizó a las 2 h tras la ingesta de los desayunos experimentales, por ser aquella en la que se observó una mayor presencia de TRL, estimada por el contenido de triglicéridos plasmáticos como por la concentración de apolipoproteína B. La concentración de colesterol fue ligeramente superior en las TRL procedentes de la ingesta de AGAO frente a las obtenidas tras la ingesta del aceite de orujo ($0,16 \pm 0,10$ vs. $0,12 \pm 0,09$ mg/mg de proteína, respectivamente), pero las diferencias no fueron significativas.

La determinación de tocoferoles mediante HPLC-fluorescencia permitió la detección y cuantificación de α -tocoferol y β -tocoferol en TRL obtenidas 2 horas después del consumo de los desayunos. Como era previsible, **no se encontraron diferencias**

en el contenido de α -tocoferol entre TRL obtenidas tras la ingesta de AGAO o aceite de orujo ($1,48 \pm 1,35$ vs. $1,00 \pm 0,94$ ng/mg de proteína, respectivamente). En cambio, el consumo de aceite de orujo dio lugar a una mayor presencia de β -tocoferol en TRL ($0,56 \pm 0,16$ ng/mg de proteína), en comparación con las TRL procedentes de la ingesta de AGAO ($0,28 \pm 0,14$ ng/mg de proteína).

4.4. Activación de células microgliales BV-2 por TRL

Con el fin de determinar si la ingesta de aceite de orujo es capaz de atenuar la activación de la microglía en comparación con el AGAO cuando sus componentes son transportados en forma de TRL postprandiales, estas partículas fueron incubadas con células BV-2 murinas durante 24h. Tras el periodo de tratamiento con TRL, obtenidas a diferentes tiempos en fase postprandial, se analizaron diversos marcadores de activación, como son la presencia de citoquinas pro-inflamatorias y marcadores de estado redox, entre otros.

4.4.1. Captura de TRL por células microgliales

La capacidad de captación de TRL por las células microgliales se determinó de forma cualitativa mediante tinción con aceite rojo O de los lípidos intracelulares. Como puede observarse en la Figura 7, en ausencia de TRL (control), no se observan gotículas lipídicas intracelulares (color rojo), mientras que en presencia de TRL son abundantes, **indicando que el contenido lipídico de estas partículas ha sido incorporado por las células.**

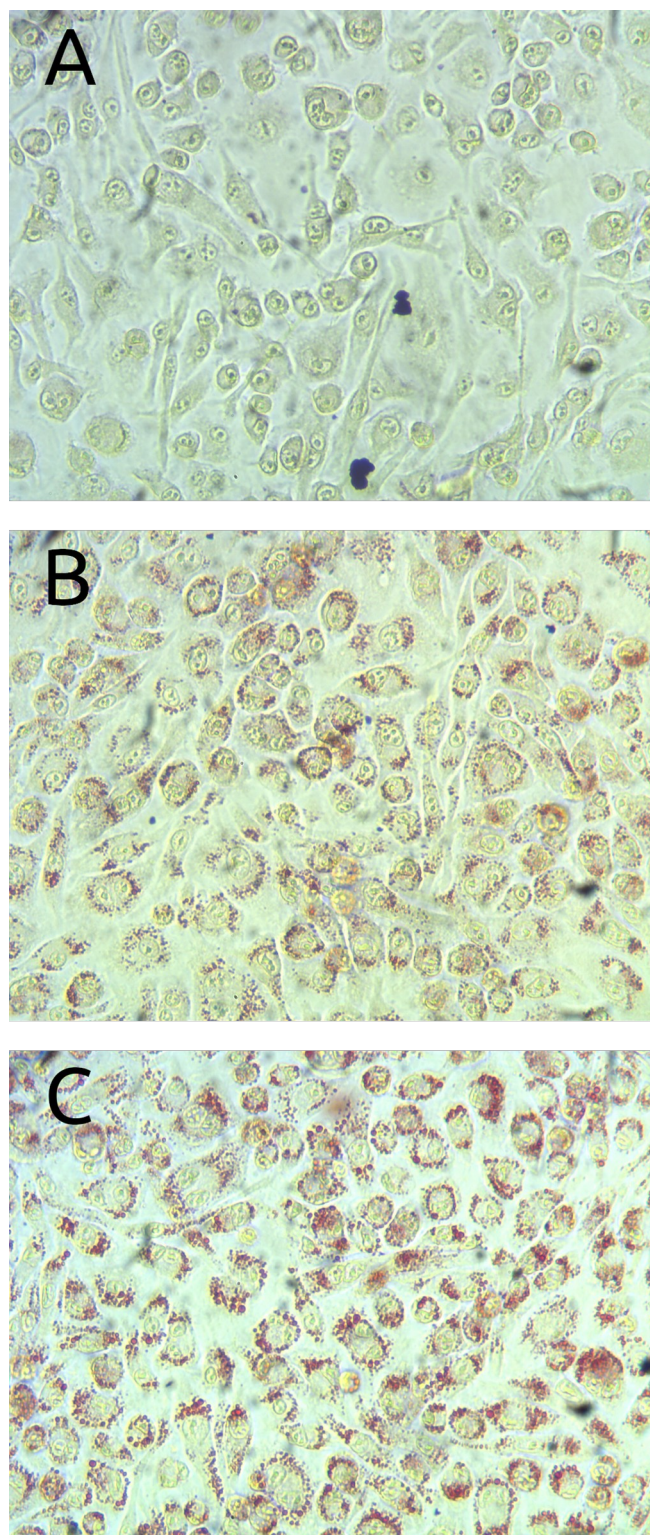


Figura 7. Microfotografías de cultivo de células BV2 teñidas con Aceite Rojo O, tras ser tratadas durante 24h en ausencia (A) o presencia de TRL obtenidas 2h después de la ingesta del desayuno rico en AGAO (B) o aceite de orujo (C).

4.4.1. Producción de citoquinas pro-inflamatorias

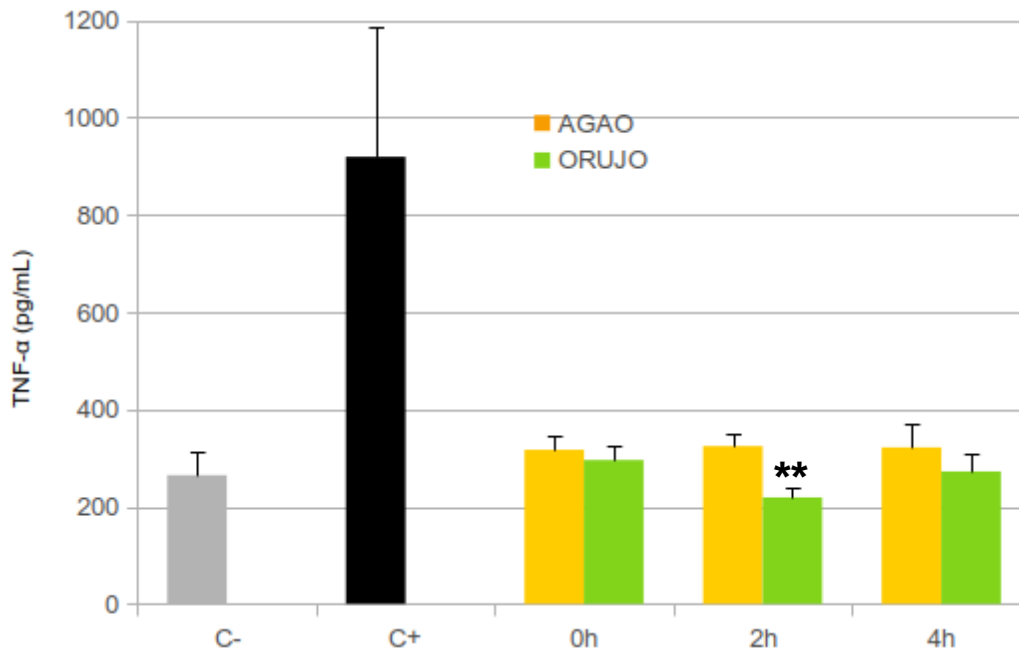


Figura 8. Concentraciones de TNF- α en el medio tras el tratamiento de células microgliales BV-2 con solución salina (control negativo C-, barra gris), lipopolisacárido (LPS, control positivo C+, barra negra) o TRL postprandiales procedentes de la ingesta de AGAO o aceite de orujo. **, $p < 0,01$. Valores expresados como media \pm SEM.

La activación celular de la microglía se manifiesta a través de la liberación de diversos marcadores de inflamación, entre los cuales destacan las citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-6. En la Figura 8 se muestra el efecto en la producción de TNF- α tras el tratamiento de la microglía con TRL procedentes de la ingesta de AGAO o aceite de orujo. Las TRL indujeron un ligero incremento en la liberación de TNF- α por las células en comparación con el control negativo pero que muy inferior al efecto del LPS (control positivo). En cualquier caso, **las concentraciones en el medio fueron siempre inferiores tras el tratamiento con TRL procedentes de la ingesta de aceite de orujo.** La diferencia fue muy

significativa a las 2 horas, aunque a la hora 4 se observaron también valores inferiores, con una diferencia no significativa.

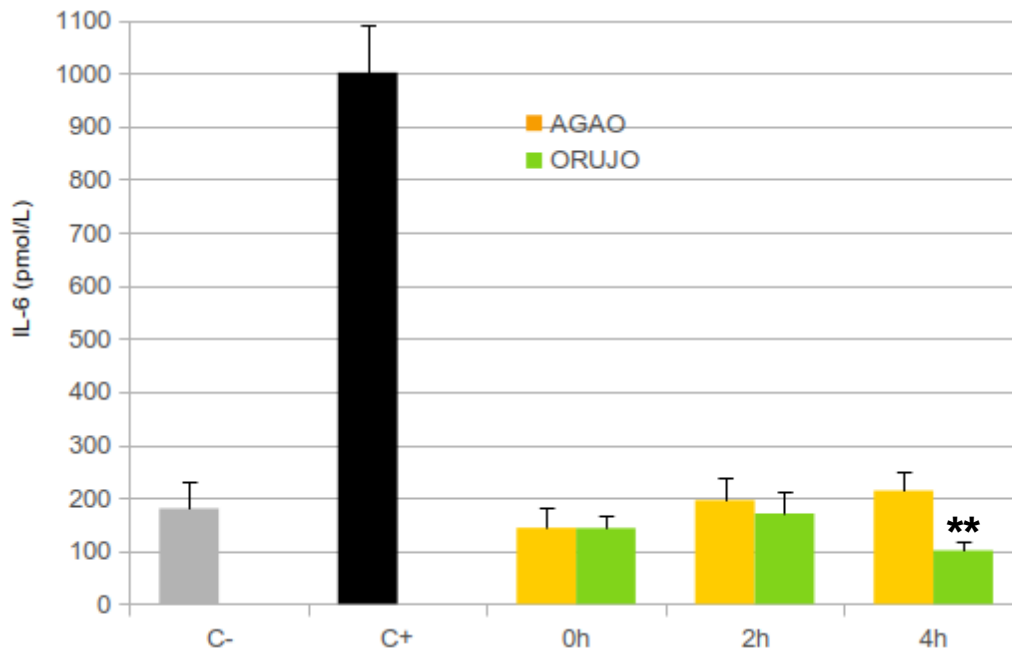


Figura 9. Concentraciones de IL-6 en el medio tras el tratamiento de células microgliales BV-2 con solución salina (control negativo C-, barra gris), lipopolisacárido (LPS, control positivo C+, barra negra) o TRL postprandiales procedentes de la ingesta de AGAO o aceite de orujo. **, $p < 0,01$. Valores expresados como media \pm SEM.

La Figura 9 muestra la liberación de IL-6 como consecuencia de la incubación de las células BV-2 con TRL obtenidas tras la ingesta de los dos aceites del ensayo, además de los correspondientes controles negativo y positivo (LPS). Al igual que en el caso del TNF- α , el tratamiento con TRL elevó las concentraciones de IL-6, pero de una forma mucho más modesta que el LPS. Como era previsible, a la hora 0, en la que las voluntarias aún no habían consumido los aceites, no se aprecian diferencias

entre tratamientos. En cambio a las horas 2 y 4, se observa que el aceite de orujo contiene mejor la liberación de esta citoquina, aunque la diferencia solo fue significativa a las 4h.

4.4.2. Expresión génica de citoquinas proinflamatorias

Con el fin de elucidar los mecanismos moleculares implicados en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, se estudió la expresión de los genes que regulan su síntesis.

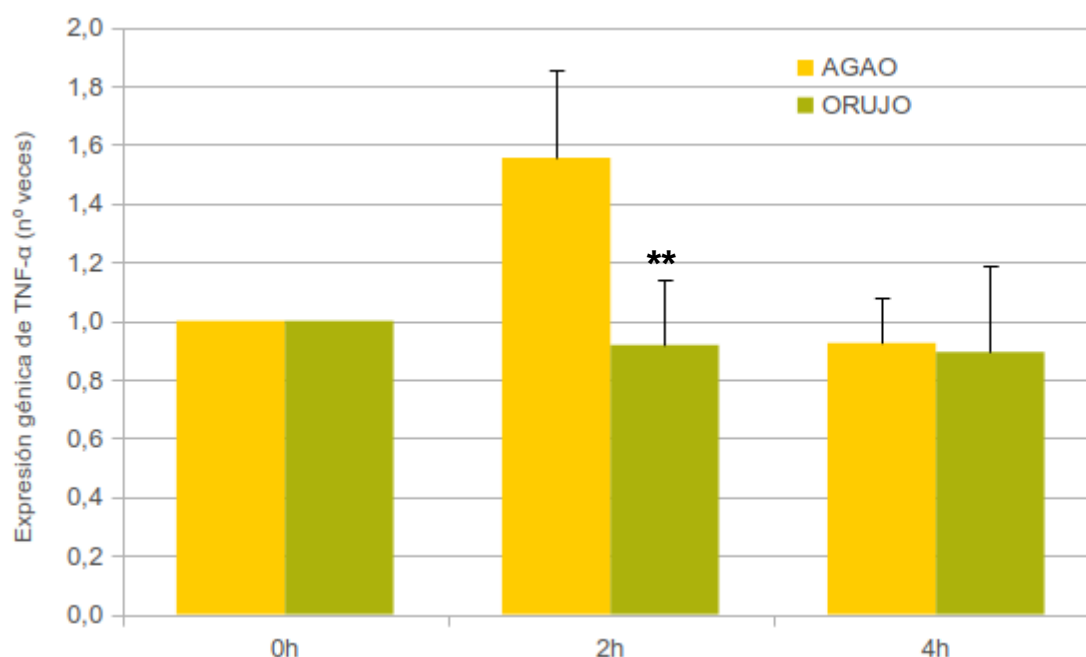


Figura 10. Expresión génica de TNF- α tras el tratamiento de células microgliales BV-2 con TRL postprandiales procedentes de la ingesta de AGAO o aceite de orujo. Valores referidos a 0h. **, $p < 0,01$. Valores expresados como $\text{media} \pm \text{SEM}$.

Los valores de expresión génica se muestran como número de veces que un gen se expresa más tras un tratamiento que tras el otro, tomando como referencia la expresión a las 0h, momento el cual las voluntarias aún no habían consumido los

desayunos experimentales. En el caso del TNF- α (Figura 10), se observa que en las células tratadas con TRL obtenidas 2 horas tras la ingesta de los desayunos experimentales, **el nivel de expresión es muy inferior tras el consumo del aceite de orujo, lo que concuerda con la producción de la proteína** (Figura 8). Por tanto, es altamente probable que el efecto observado en la liberación de este marcador de inflamación se deba a una interacción de los componentes del aceite de orujo con el gen codificante para esta citoquina.



Figura 11. Expresión génica de IL-6 tras el tratamiento de células microgliales BV-2 con TRL postprandiales procedentes de la ingesta de AGAO o aceite de orujo. Valores referidos a 0h. *, $p < 0,05$. Valores expresados como media \pm SEM.

De forma similar, **el tratamiento con TRL originadas tras el consumo de aceite de orujo dio lugar a una menor expresión del gen que codifica la citoquina IL-6** (Figura 11), tanto a la hora 2 como a la 4, aunque solo a la última hora analizada se alcanzó significancia estadística. Los resultados indican, de nuevo, que la menor la

liberación de esta citoquina proinflamatoria por células BV-2 encontrada tras el consumo de aceite de orujo estaría relacionada con una menor expresión de su gen.

4.4.3. Producción de óxido nítrico y expresión génica de iNOS

Durante la respuesta inflamatoria que sigue a la activación de microglia, se han detectado niveles elevados de óxido nítrico, que están mediados por la expresión del gen de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

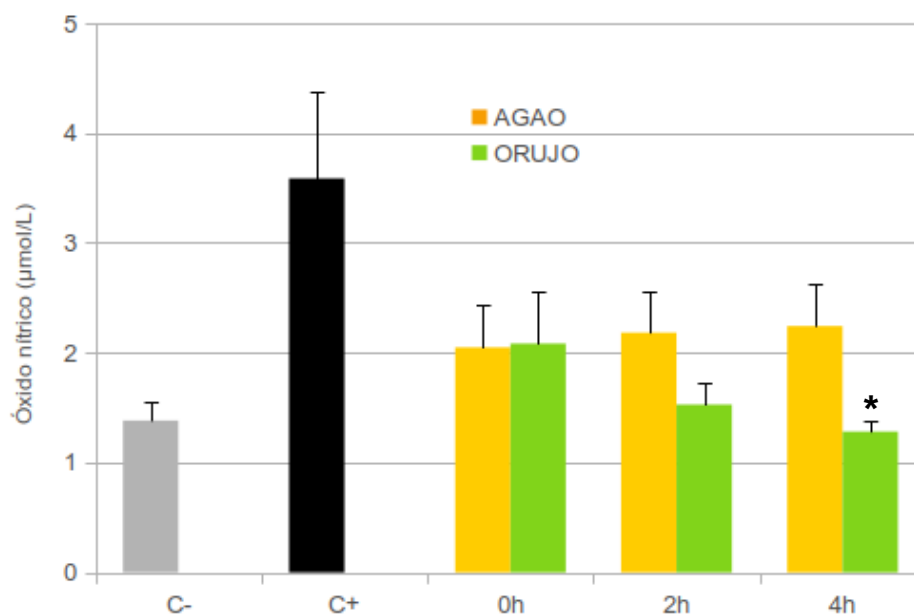


Figura 12. Concentraciones de óxido nítrico en el medio tras el tratamiento de células microgliales BV-2 con solución salina (control negativo C-, barra gris), lipopolisacárido (LPS, control positivo C+, barra negra) o TRL postprandiales procedentes de la ingesta de AGAO o aceite de orujo. *: $p < 0,05$. Valores expresados como media \pm SEM.

En la Figura 12 se observa que el tratamiento de células BV-2 con TRL postprandiales dio lugar a un incremento en la liberación de óxido nítrico por las células, en comparación con el control negativo, pero que no fue tan elevado como

el de la agresión con LPS. **Cuando las células incorporaron TRL formadas tras la ingesta de aceite de orujo, la producción de óxido nítrico fue inferior, en comparación con TRL generadas tras el consumo de AGAO**, siendo la diferencia significativa a las 4h.

Sin embargo, este efecto no pudo ser asociado con la expresión génica de iNOS, dado que, aunque se observa un incremento en los tiempos postprandiales estudiados, no se encontraron diferencias significativas.

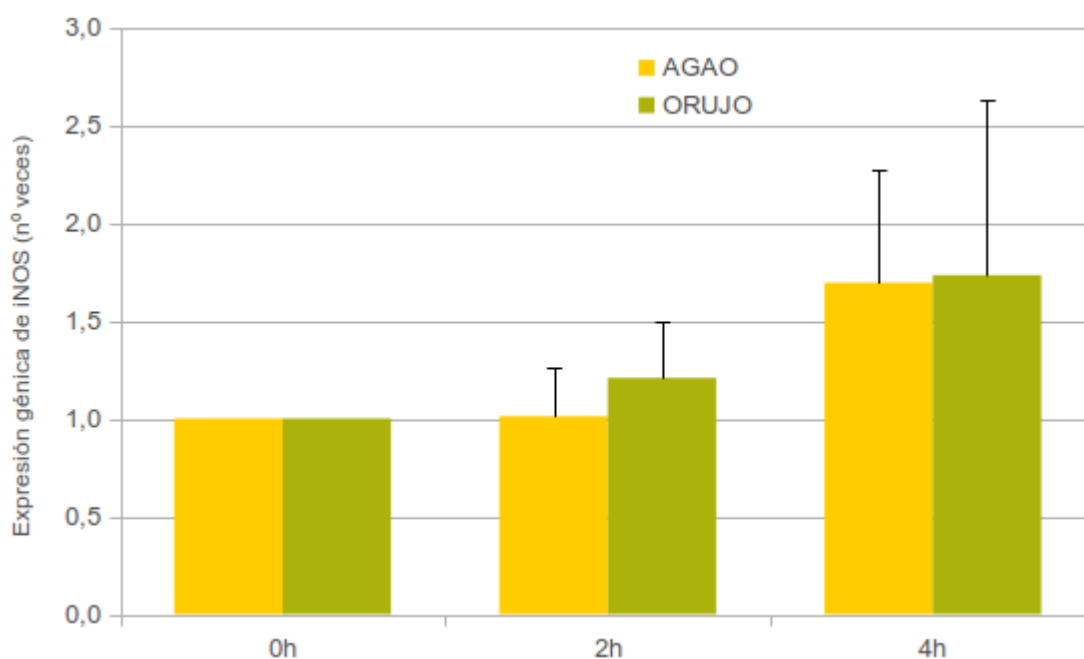


Figura 13. Expresión génica de iNOS tras el tratamiento de células microgliales BV-2 con TRL postprandiales procedentes de la ingesta de AGAO o aceite de orujo. Valores referidos a 0h. Valores expresados como media \pm SEM.

4.4.4. Producción de especies reactivas de oxígeno

Las células BV-2 fueron estimuladas con TRL del mismo modo que en los experimentos anteriores, pero en este caso, además con peróxido de hidrógeno y solo con partículas obtenidas 0h y 2h tras la ingesta de los desayunos experimentales. La ingesta de ambos desayunos dio lugar a la formación de TRL que provocaron un incremento en la producción celular de ROS, **si bien fue más moderado cuando la comida experimental contenía aceite de orujo.**

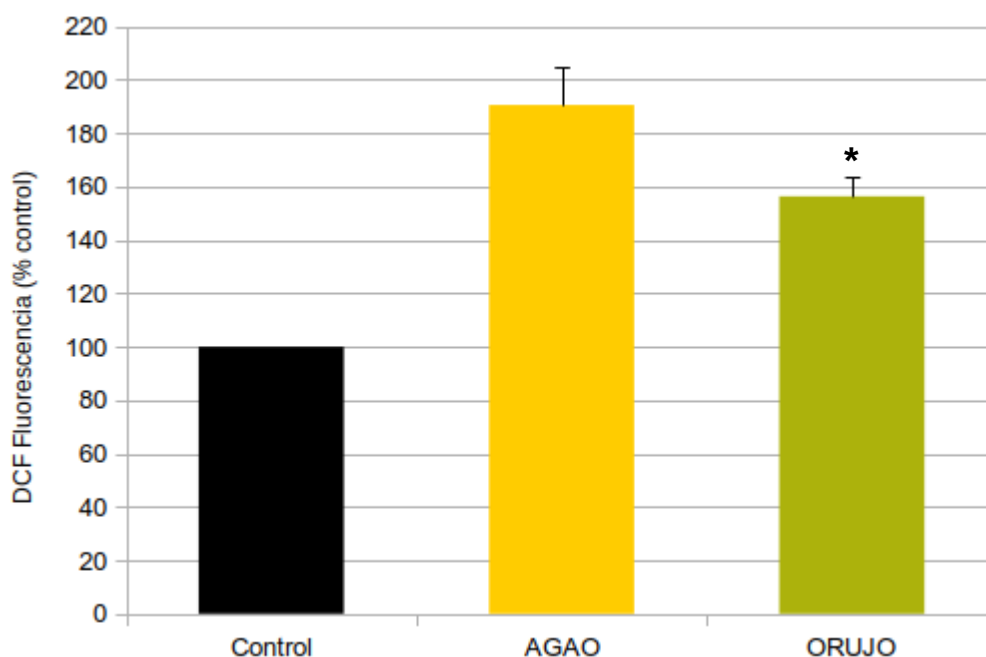


Figura 14. Producción de especies reactivas de oxígeno tras el tratamiento de células microgliales BV-2 con TRL postprandiales obtenidas 2 horas después de la ingesta de AGAO o aceite de orujo. Valores expresados como media±SEM en porcentaje respecto del control (TRL obtenidas a las 0 h). *, $p < 0,05$.



5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En un estudio anterior demostramos que TRL fabricadas en el laboratorio y son capaces de provocar la activación microglial, un fenómeno asociado a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Además, señalamos que algunos de los compuestos bioactivos del aceite de orujo tenían la capacidad de atenuar dicha activación cuando se añadían a las células en forma de TRL. Por tanto, el siguiente paso lógico era demostrar que las TRL humanas generadas tras la ingesta de aceite de orujo de oliva mantienen esa misma capacidad protectora y que son capaces de atenuar la respuesta inflamatoria causada por la activación microglial.

El aceite de orujo de oliva y el AGAO comparten características composicionales, dado que ambos son ricos en ácido oleico, su ácido graso más abundante. Los aceites empleados en este estudio tenían una concentración superior al 70% de ácido oleico, aunque el contenido en el AGAO era ligeramente superior (77,4% frente a 71,0%). En cambio, estos dos aceites se diferencian en su contenido en componentes minoritarios, que aunque suponen una fracción reducida respecto a la composición lipídica total, son muy relevantes debido a su elevada actividad biológica. En el caso que nos ocupa, ambos aceites presentaron un contenido similar en tocoferoles. En cambio, el contenido en esteroides totales fue muy superior en el aceite de orujo y se encontró una presencia importante de escualeno, ácido oleanólico y eritrodil+uvaol. En cualquier caso, puesto que el resto de componentes de los desayunos experimentales era idéntico, las diferencias observadas en los efectos de los aceites deben ser atribuidas a la distinta composición en componentes



menores. La similitud en el contenido en tocoferoles entre ambos aceites quedó reflejada en la concentración de estos compuestos en las TRL, aunque el contenido de β -tocoferol fue superior tras la ingesta del aceite de orujo. Dadas las dificultades metodológicas que requiere la determinación de esteroides en TRL no fue posible su determinación. Sin embargo, sí fue posible analizar la presencia de ácido oleanólico, aunque no pudo ser detectado en TRL. Este resultado indica que su transporte no se produce por la vía de las TRL, confirmando estudios previos que demostraron el transporte unido a albúmina.

Para este estudio se reclutaron mujeres jóvenes (edad media 20,9 años) y sanas, que manifestaron no tener enfermedades metabólicas, ni de otro tipo, que pudieran interferir con los resultados del estudio. Los niveles de los parámetros antropométricos y bioquímicos generales estaban dentro la normalidad. Las voluntarias recibieron los desayunos experimentales, en los que se les administró AGAO o aceite de orujo y se tomaron muestras de sangre durante las seis horas posteriores a la ingesta de los aceites. Esas muestras de sangre se emplearon en análisis bioquímicos y en el aislamiento de TRL, partículas transportadoras de los componentes lipídicos de la dieta.

Los análisis bioquímicos postprandiales mostraron que la ingesta de los dos aceites empleados en la experimentación no ejercían ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de colesterol (total, LDL y HDL) y glucosa. Este es un resultado esperable, puesto que es conocido que los niveles plasmáticos de colesterol no se modifican a lo largo del periodo postprandial, independientemente del contenido



graso de la comida. Para observar modificaciones en los niveles de colesterol es necesario realizar intervenciones dietéticas a largo plazo. Las concentraciones plasmáticas postprandiales de glucosa sí son dependientes de la composición de la comida experimental, pero en este caso no se encontraron diferencias, probablemente debido a que el contenido en carbohidratos de las dos comidas experimentales era idéntico.

En cambio, se encontraron diferencias importantes en las curvas postprandiales de insulina tras la ingesta de los dos aceites. **La curva insulinémica correspondiente al aceite de orujo fue significativamente más baja que la correspondiente al AGAO, lo que indica una menor presión en el sistema.** La insulina es una hormona clave en el metabolismo de los carbohidratos, pero también de los lípidos, ya que, entre otras funciones, regula la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL). Esta enzima es la encargada de liberar los ácidos grasos transportados en TRL en forma de triglicéridos mediante hidrólisis para facilitar su incorporación a los tejidos corporales. Ese proceso hidrolítico da lugar a la reducción de los triglicéridos del plasma y a la formación de partículas remanentes de TRL, que tienen un menor tamaño. Estas partículas de menor tamaño son más peligrosas porque pueden atravesar con más facilidad el tejido vascular en el caso de la aterosclerosis. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, las TRL remanentes podrían entrar más fácilmente en contacto con células gliales o neuronales al atravesar la barrera hematoencefálica.



Por otra parte, **se encontró una menor concentración, aunque no significativa, en los triglicéridos plasmáticos tras el consumo de aceite de orujo en comparación con el AGAO.** Esta reducción podría deberse a una ralentización en la producción de quilomicrones por el intestino o a un mayor aclaramiento de las TRL ya producidas. Este aclaramiento puede darse por dos vías. En primer lugar, a través de la hidrólisis por LPL, ya mencionada y en segundo lugar, a través de la captación y retirada de las partículas por el hígado. En cualquier caso, menores niveles de triglicéridos plasmáticos en fase postprandial se han relacionado con un menor riesgo cardiovascular. Aún hay poca evidencia sobre la influencia de los triglicéridos postprandiales en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, pero estudios en animales de experimentación han mostrado que la presencia de TRL puede alterar la barrera hematoencefálica. Aunque estudios en humanos han encontrado la presencia de componentes de TRL en el cerebro de pacientes de Alzheimer, una intervención postprandial no reportó ningún efecto inflamatorio de una comida con alto contenido graso. De todos modos, en ese estudio no se evaluó la composición lipídica de la comida, sino solo la cantidad total de grasa.

Puesto que las TRL tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, es de sumo interés evaluar si estas partículas pueden interactuar con los tipos celulares encefálicos, como es la microglía, y si su composición puede afectar a la activación de esas células. En un estudio anterior demostramos que las células de microglía murina BV-2 pueden captar TRL artificiales creadas en el laboratorio. **En el presente estudio, demostramos que la microglía también pueden incorporar TRL humanas,** como se evidencia por la presencia de su contenido lipídico en el



interior celular, agrupado en gotículas grasas, del mismo modo que ocurre en los macrófagos durante el proceso aterogénico. **Este es un hecho sin precedentes, que indica que las TRL estarían en disposición de activar la microglía, desencadenando un proceso inflamatorio.**

Las células microgliales respondieron al insulto por incubación con TRL liberando marcadores de inflamación, como son las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6, aunque de forma mucho más modesta que tras el tratamiento con LPS, que sirvió como control positivo del ensayo. El efecto fue observado con TRL obtenidas en fase basal (ayuno) y a las 2 y 4 horas tras la ingesta de los desayunos experimentales, lo que sugiere que tanto VLDL, que están presentes solo en periodo de ayuno, como quilomicrones, presentes en fase postprandial, son capaces de activar la microglía.

En cualquier caso, lo más importante es que se pudieron evidenciar diferencias significativas entre tratamientos con TRL procedentes de la ingesta de AGAO y de aceite de orujo. **En el caso del TNF- α , se apreció una menor liberación por las células microgliales cuando fueron tratadas con TRL obtenidas 2h tras la ingesta de aceite de orujo, en comparación con AGAO.** Se encontró un efecto similar con la incubación de TRL obtenidas tras 4h de periodo postprandial, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. **De forma similar, se observó una menor producción de IL-6 en las células tratadas con TRL obtenidas 4h después de la ingesta de aceite de orujo.** De nuevo, el mismo efecto se observó a las 2h, pero sin significancia estadística.



Es importante señalar que los resultados se reprodujeron de la misma forma en la expresión de los genes que regulan la producción de estas dos citoquinas. Es decir, que la expresión de TNF- α e IL-6 fue menor cuando las células fueron tratadas con TRL procedentes de la ingesta de aceite de orujo, obtenidas a las 2 y 4 horas, respectivamente, del periodo postprandial. **Estos datos indican que la menor liberación de marcadores de inflamación y, por tanto, el efecto de atenuación de la activación microglial se debe a la actividad de los componentes del aceite de orujo sobre el núcleo de la célula.** En este sentido, es conocido que algunos de esos componentes, como el β -sitosterol, el escualeno y los triterpenos ácido oleanólico y, probablemente eritrodilol, tienen capacidad de modular la actividad del factor de transcripción nuclear NF- κ B, que está íntimamente ligado a la producción de citoquinas. Estos compuestos bioactivos inhiben la translocación al núcleo celular de NF- κ B, reduciendo la expresión génica de las citoquinas pro-inflamatorias, y por ende, su liberación al medio.

La estimulación con TRL dio lugar a un incremento en la producción de ROS. Se ha demostrado que estas especies reactivas pueden actuar como desencadenantes del proceso inflamatorio, ya que activan las rutas metabólicas asociadas. En nuestro estudio, comprobamos que **la ingesta de aceite de orujo conducía a la formación de TRL con una menor capacidad de producción de ROS, en comparación con la ingesta de AGAO**, lo que podría estar asociado con la inhibición de la liberación de citoquinas. Probablemente, dicho efecto reductor de ROS se deba a la capacidad de los compuestos bioactivos del aceite de orujo de restaurar los niveles de los sistemas de defensa antioxidante, como ya demostramos en el anterior estudio.



Otro de los parámetros que indican la activación microglial es el incremento en la liberación de óxido nítrico. **Los resultados de este estudio muestran una menor producción de esta sustancia cuando las células fueron tratadas con las TRL obtenidas tras administración del desayuno que contenía aceite de orujo,** aunque la diferencia con el AGAO solo fue significativa a las 4h del periodo postprandial. Al contrario que en el caso de las citoquinas, la liberación de óxido nítrico no se asoció con cambios en la expresión del gen iNOS, que es el encargado de regular su producción, por lo que es probable que el efecto observado se deba a alteraciones post-transcripcionales.



6. CONCLUSIONES

La neuroinflamación y la activación microglial son marcadores patológicos de varias enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer. Existe evidencia científica que sugiere que los componentes de los aceites de la dieta pueden impactar sobre los procesos inflamatorios asociados a estas enfermedades cuando son transportados en forma de TRL. En nuestro anterior estudio demostramos que los componentes minoritarios del aceite de orujo son capaces de inhibir la activación de la microglía, un proceso asociado con la liberación de marcadores de inflamación, tanto de forma aislada como formando parte del TRL. Con esos antecedentes, el presente estudio se planteó con el objetivo de evaluar el efecto atenuante de la activación microglial por TRL postprandiales obtenidas tras la ingesta de aceite de orujo por comparación con las producidas tras el consumo de AGAO. **Los resultados obtenidos han confirmado los datos obtenidos en el anterior estudio.**

Además, los ensayos realizados en el presente estudio, empleando TRL humanas obtenidas de voluntarias sanas después de la ingesta de aceite de orujo de oliva o AGAO para el tratamiento de células de microglía murina BV-2, permiten extraer las siguientes conclusiones:



- 1. Las células microgliales fueron capaces de captar TRL humanas del mismo modo que las TRL artificiales, acumulando en su citoplasma el contenido lipídico.**
- 2. Las TRL obtenidas 2 y 4 horas tras la ingesta del aceite de orujo dieron lugar a una menor liberación de citoquinas pro-inflamatorias que las TRL producidas tras la ingesta de AGAO, lo que se asoció con una menor expresión de los genes implicados en su regulación.**
- 3. Estos efectos fueron sostenidos por una menor producción de ROS y de óxido nítrico cuando las células se incubaron con TRL aisladas tras el consumo de aceite de orujo.**

En definitiva, nuestros resultados muestran que la presencia de compuestos bioactivos del aceite de orujo tiene una actividad atenuante de la activación microglial tras la estimulación con TRL, que no se aprecia cuando se ingiere AGAO. De ese modo, el consumo de aceite de orujo podría tener un efecto protector frente a la enfermedad de Alzheimer mediante la inhibición de los procesos inflamatorios asociados con esta patología.

Sevilla, a 5 de agosto de 2021

Fdo. Javier Sánchez Perona
Científico Titular del CSIC