

**ÁREA DE FARMACOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA**  
**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**



**TESIS DOCTORAL**

*Efecto de hidroxitirosol en los biomarcadores  
vasculares y retinopatía en un modelo de  
diabetes experimental*

**Lucía Márquez Estrada**

*Departamento de Farmacología  
y Terapéutica Clínica*



*Laboratorio de Investigaciones  
Antitrombóticas e Isquemia Tisular*





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Lucía Márquez Estrada

 <http://orcid.org/0000-0002-2874-1287>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



# AGRADECIMIENTOS





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

*En primer lugar, mención especial a los profesores y doctores José Pedro de la Cruz Cortés, José Antonio González Correa y Juan Antonio López Villodres.*

*Todo comenzó cuando me asignaron a José Pedro tutor de mi trabajo fin de máster. Gracias a él pude descubrir lo bonito que era investigar y al proponerle continuar, encantadamente me aceptó. Gracias por tu paciencia, confianza y tu buena guía.*

*A José Antonio, gracias, por orientarme y aconsejarme, por acogerme en su grupo de trabajo, así como la guía que me ha ofrecido durante estos años, por los consejos que me ha brindado y en general por estar siempre disponible para ayudar.*

*A Juan agradecerle, su dedicación, el tiempo que ha pasado junto a mí, en el Laboratorio, en el Animalario, por compartir tus conocimientos con todos nosotros y por tus consejos y humor que tanto me han hecho falta.*

*A la Dra. Ana Guerrero Loriguillo por su forma tan dulce y profesional de enseñar, y ser tan comprensiva. Gracias por enseñarme a trabajar en el laboratorio.*

*Al Sr. Antonio Pino Blanes por enseñar con tanta alegría y sentido del humor, a todos nos alegrabas el tiempo en el laboratorio. Gracias por tus invitaciones, mi hermana todavía recuerda con sorpresa como la invitaste a comer el día que no terminábamos una prueba y tuvimos que comer todos juntos y ella se vino.*

*A mis compañeros Dr. José Julio por ayudarme y a estar siempre disponible, Dra. Maribel por enseñarme a manejar en el animalario y a la Dra. Beatriz que sin ella esta etapa no hubiera sido igual, con su risa contagiosa, con su acento, que de forma cariñosa nos reíamos, mi compañera de animalario durante todo este tiempo.*

*Gracias a mis compañeras de laboratorio, a María Dolores, por compartir conmigo todos tus conocimientos, enseñarme y guiarme en la recta final, a María por estar siempre disponible para ayudar, a Miriam, por estar siempre ahí apoyando, a Rocío, por ser un gran pilar para mí en el laboratorio, mi compañera de risas, por ayudarme en el animalario, a Noelia y Mercedes, que aunque fue breve su paso quedaron marcados esos tan buenos momentos. Gracias a ellas tres han hecho que este camino fuera más ameno y más divertido, gracias por apoyarme en momentos no tan buenos y darme tantos consejos.*

*A mis queridas amigas Elena y Marisa, por estar desde la distancia dándome apoyo y ayudándome a traducir artículos, que a veces hasta para ellas eran difíciles. Gracias*

## *Agradecimientos*

*por todo. A mi buen amigo y compañero de trabajo Ale, por acompañarme en esos almuerzos y a Susa por dar ese toque cómico a todo lo que hacemos.*

*A mis amigas de toda la vida, María, Estefanía y a mis dos Lauras, por apoyarme y comprender que a veces no podía compartir con ellas el tiempo necesario.*

*Gracias a mi querido Juan, por tener tanta paciencia conmigo, por no dejarme tirar la toalla, por ayudarme, apoyarme, escucharme y aguantarme.*

*Finalmente agradezco a mis padres, por su apoyo incondicional, por soportarme, por obligarme a seguir cuando todo era oscuro, a mi hermana por estar siempre ahí alegrándome la vida, a mis tíos, a mi tía Flores, por ser como eres, una hermana más, a mi abuela Mariana, por ser tan fuerte y hacer todo lo que haces por nosotros, a mis abuelos que donde estén, estarán orgullosos de mi.*

*Gracias a la vida, por darme la oportunidad de descubrir la investigación, tan importante hoy en día.*

*En fin gracias a todo el equipo del laboratorio LIAIT de la UMA.*

# ABREVIATURAS





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## A

AA: Ácido araquidónico

ADO: Antidiabéticos orales

AGI: Ácido graso insaturado

AGS: Ácido graso saturado

AII: Angiotensina

ANG: Sistema angiopoyético

AOV: Aceite de oliva virgen

AR: Aldosa reductasa

## B

BHR: Barrera hematorrenitiana

## C

CCG: Capa de células ganglionares

CFN: Capa de fibras nerviosas del nervio óptico

CML: Células de músculo liso

CNE: Capa nuclear externa (CNE)

CNI: Capa nuclear interna

cNOS: Forma constitutiva de óxido nítrico

COX: Ciclooxygenasa

CPE: Capa plexiforme externa

CPI: Capa plexiforme interna

CSEFR: Capa de los segmentos externos fotorreceptores

## D

DAG: Diacilglicerol

DM: Diabetes mellitus

## E

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

ECE: Enzima convertidora de endotelina

EDHF: Factores hiperpolarizantes derivados del endotelio

eNOS: Óxido nítrico endotelial

EO: Estrés oxidativo

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

ERG: Electrorretinograma

ERN: Especies reactivas derivadas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas derivadas de oxígeno

ET: Endotelina

## F

FNDC: Factor neurotrófico derivado del cerebro

FNkB: Factor nuclear kappa B

FvW: Factor von Willebrand

## G

GC: Guanilciclase

GLUT4: Glucosa transportadora tipo 4

GMPC: Monofosfato de guanosina cíclico

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutati3n reducido

GSSG: Glutathion oxidado

GTPc: Trifosfato de guanosina c3clico

## H

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Per3xido de hidr3geno

Hb1AC: Hemoglobina glicosilada

HO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Radical perhidr3xido

HT: Hidroxitirosol

## I

ICAM-1: Mol3cula de adhesi3n intercelular 1

IL: Interleucina

iNOS: Forma inducible de 3xido n3trico

IRS-1: Receptor de insulina tipo 1

## L

LDL: Lipoprote3na de baja densidad

## M

MAPK: Prote3nas quinasas activadas por mit3genos

MDA: Malondialdeh3do

MEC: Matriz extracelular

MLE: Membrana limitante externa

MLI: Membrana limitante interna

## Abreviaturas

### N

N-MDA: Receptor del glutamato

nNOS: Óxido nítrico neuronal

NO<sup>•</sup>: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintetasa

### O

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Anión superóxido

ONOO<sup>•-</sup>: Peroxinitrito

### P

PAI-1: Inhibidor de la activación del plasminógeno tipo 1

PFG: Productos finales de glicación

PGI<sub>2</sub>: Prostaglandina

PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina

PkC: Proteína quinasa

### R

RD: Retinopatía diabética

RDNP: Retinopatía diabética no proliferativa

RDP: Retinopatía diabética proliferativa

RL: Radical libre

ROO<sup>•-</sup>: Radical peróxido

ROOH: Hidroperóxido

## S

SDH: Sorbitol deshidrogenasa

SOD: Superóxido dismutasa

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

STZ: Estreptozotocina

## T

TBARS: Ácido tiobarbitúrico

TGF: Factores transformantes de crecimiento

TIE-2: Receptor endoteliala tirosina quinasa

TNF $\alpha$ : Factor necrosis tumoral

tPa: Activador de pasminógeno tisular

TxA<sub>2</sub>: Tromboxano

## V

VCAM: Moléculas de adhesión de células vasculares



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ÍNDICE





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**INTRODUCCIÓN**

1. DIABETES MELLITUS .....	1
1.1. CLASIFICACIÓN.....	1
1.2. FACTORES DE RIESGO .....	3
1.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA A NIVEL MUNDIAL .....	4
1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA A NIVEL NACIONAL .....	6
1.4. COMPLICACIONES .....	8
1.4.1.COMPLICACIONES AGUDAS .....	8
1.4.2 COMPLICACIONES CRÓNICAS .....	9
2. ALTERACIONES FUNCIONALES .....	9
2.1. PRIMERA FASE (DISFUNCIONES BIOQUÍMICAS) .....	10
2.2. SEGUNDA FASE (DISFUNCIÓN VASCULAR).....	15
2.2.1. ESTRUCTURA VASCULAR .....	15
2.2.2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL .....	23
2.2.3. INFLAMACIÓN.....	24
2.3. TERCERA FASE (COMPLICACIONES VASCULARES) .....	26
2.3.1. MACROANGIOPATÍA .....	26
2.3.2. MICROANGIOPATÍA.....	27
3. RETINOPATÍA DIABÉTICA .....	28
3.1 ESTRUCTURA DEL GLOBO OCULAR.....	28
3.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	33
3.2. DIAGNÓSTICO Y FACTORES DE RIESGO.....	34
3.2.MECANISMO DE DESARROLLO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA .....	35
4. PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LA VASCULOPATÍA DIABÉTICA .....	44
4.1. DAÑOS PRODUCIDOS POR LOS RADICALES LIBRES .....	46
4.1.1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA .....	48
4.1.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RETINA.....	50
5. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES .....	51
5.1. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICAS .....	51
5.2. CLASIFICACIÓN ANTIOXIDANTES NATURALES NO ENZIMÁTICOS..	54
6. DIETA MEDITERRÁNEA.....	58
6.1. ACEITE DE OLIVA .....	59
6.1.1. COMPONENTES BIOACTIVOS DEL AOV .....	60
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>73</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	
1. TIPO DE ESTUDIO.....	79
2. DE EXPERIMENTACIÓN .....	79
3. COMPUESTO DE ESTUDIO .....	80
4. MÉTODO DE INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DIABETES EXPERIMENTAL .....	80
4.1. PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA .....	80
4.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL.....	80
4.3. MEDICIÓN Y CONTROL DE LAS CIFRAS DE GLUCEMIA .....	81
5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	81
5.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA VASCULAR.....	82
6. PARÁMETROS DETERMINADOS.....	83
6.1. PARÁMETROS ENDOTELIALES .....	83
6.2. PARÁMETROS PLAQUETARIOS .....	83
6.3. PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	83

6.4. PARÁMETROS INFLAMATORIOS.....	84
6.5. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS.....	84
7. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS .....	85
7.1. VARIABLES ENDOTELIALES.....	85
7.2. VARIABLES PLAQUETARIAS.....	85
7.3. VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO (EO) .....	87
7.4. DETERMINACIÓN DE PROCESOS INFLAMATORIOS.....	90
7.5. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS.....	91
7.5.1. ESTUDIO DE LA RETINA.....	92
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	94
<b>RESULTADOS</b>	
1. PARÁMETROS ZOOMÉTRICOS.....	99
2. EQUILIBRIO TROMBOGÉNICO .....	104
3. VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	109
4. VARIABLES RELACIONADAS CON EL OXIDO NITRICO .....	115
5. PARAMETROS INFLAMATORIOS.....	118
6. DETERMINACIONES MORFOMETRICAS EN RETINA.....	123
7. CORRELACIONES ENTRE ANALISIS MORFOLOGICO DE LA RETINA Y BIOMARCADORES A NIVEL VASCULAR .....	136
<b>DISCUSIÓN</b>	
1. INFLUENCIA DE LA HIPERGLUCEMIA MANTENIDA.....	146
2. ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA.....	147
3. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO COMO EJES FUNDAMENTALES DEL PROCESO .....	149
4. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	153
5. ACTIVACIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO .....	158
6. DAÑO TISULAR RETINIANO .....	159
7. CONSIDERACIONES FINALES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	165
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>167</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>171</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>195</b>



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**ZOCCOZON-  
-RORZ-**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de los lípidos y las proteínas resultantes de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambos (Julioet al, 2009).

La diabetes mellitus puede presentarse con las siguientes manifestaciones clínicas como poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, pérdida progresiva de visión, hipertensión arterial y dolor isquémico o neuropático de las extremidades. En sus formas más graves encontramos la cetoacidosis o estado hiperosmolar no cetósico que puede desarrollar y llevar a estupor, coma y, en ausencia de tratamiento eficaz, la muerte.

A menudo, los síntomas no son graves, o pueden estar ausentes, por lo que una hiperglucemia suficiente para causar cambios patológicos y funcionales, puede estar presente durante un periodo prolongado antes de que se realice el diagnóstico.

Los efectos a largo plazo de la diabetes mellitus son el desarrollo progresivo de las complicaciones, tales como retinopatía, nefropatía, neuropatía, riesgo de úlceras en los pies, amputación, articulaciones de Charcot, disfunción sexual..., además de un mayor riesgo de padecer enfermedades vasculares, cardiovasculares y cerebrovasculares.

Algunos procesos patogénicos implicados en el desarrollo de la diabetes mellitus destruyen las células beta del páncreas con la consiguiente deficiencia de insulina, en otros, sin embargo se presenta una resistencia a la acción de la insulina. Las anomalías del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas se deben a la acción de la insulina sobre los tejidos diana que resultan de la insensibilidad o la falta de insulina (Bosch et al, 2002; Organización Mundial de la Salud 1999).

### 1.1. CLASIFICACIÓN

La clasificación de la diabetes mellitus, propuesta por la OMS (1999) es la siguiente:

- **Diabetes mellitus tipo 1 autoinmune**

Este tipo de diabetes llamada anteriormente *diabetes insulino dependiente* o *diabetes de comienzo juvenil*, está caracterizada por la producción deficiente de insulina debido a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas. Éste deja de secretar la cantidad de insulina necesaria para las necesidades metabólicas del individuo. Puede afectar a todas las edades, pero es más frecuente en niños, jóvenes y adultos jóvenes, y por lo general se diagnostica antes de los 30-40 años. A menudo aparece de forma aislada, pero en ocasiones, existen antecedentes familiares.

Estos pacientes necesitan la administración de insulina para poder controlar los niveles de glucosa en sangre.

- **Diabetes mellitus tipo 2**

Hace años se conocía como diabetes mellitus no insulino-dependiente. En este caso el páncreas produce insulina pero, no produce suficiente y además, se crea una resistencia en los órganos diana, no pudiendo aprovecharse la insulina liberada del páncreas o la administrada de forma artificial. Esto significa que el receptor de insulina de las células que se encargan de facilitar la entrada de la glucosa a la propia célula está dañado. Es la forma de diabetes más común constituyendo un 90-95% de la población de pacientes diabéticos. Es más frecuente en adultos y ancianos, aunque puede aparecer en niños y adolescentes, ya que se relaciona con la obesidad, la cual es origen o factor agravante de la resistencia a la insulina. Es frecuente que varios miembros de la familia la padezcan.

Frecuentemente se presenta asintomática, por lo que se diagnostica después de algún tiempo de padecerla sin saberlo. Para controlarla, es necesario el uso de antidiabéticos orales, y pueden acabar precisando inyecciones de insulina.

- **Metabolismo alterado de la glucosa:**

Es una alteración metabólica intermedia entre la normalidad y la diabetes. Se constituye como un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus y de enfermedad cardiovascular.

- **Diabetes mellitus gestacional:**

Se trata de una intolerancia a la glucosa que aparece en una mujer gestante sin diabetes mellitus previa conocida. Esta alteración ocurre en el 10% de las mujeres embarazadas. Se consideran como factores predisponentes la edad superior a 30-35 años, antecedentes familiares, obesidad y diabetes gestacional en embarazos previos.

Si no se trata puede dar problemas en el recién nacido como exceso de peso, glucosa y calcio bajos y en la madre riesgo a medio plazo de hipertensión arterial y diabetes.

Posterior al embarazo, es aconsejable un control periódico, ya que un porcentaje de estas personas puede desarrollar una diabetes tipo 2 con el paso del tiempo.

Según la American Diabetes Association los criterios diagnósticos para la diabetes mellitus en la actualidad son:

1. Glucemia basal (en ayunas de al menos las 8 horas previas a la medición) mayor o igual a 126 mg/dL (7,0 mmol/L).
2. Glucemia mayor o igual a 200 mg/dL(11,1 mmol/L), a cualquier hora del día, y sin tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la última ingesta, en presencia de sintomatología compatible con síndrome hiperglucémico (poliuria, polifagia, polidipsia o pérdida de peso inexplicable).
3. Glucemia a las 2 horas tras sobrecarga oral de 75 g de glucosa por encima de 200 mg/dL en 2 días cercanos, detectada en plasma venoso, si el paciente está asintomático. Se recomienda realizar esta prueba de tolerancia a la glucosa durante el embarazo o en casos específicos como varones con disfunción eréctil y en mujeres con hijos de alto peso al nacer o con candidiasis vaginales recurrentes.

## 1.2. FACTORES DE RIESGO

Los principales factores de riesgo para la diabetes son la edad (se incrementa con la edad), el sobrepeso o la obesidad, los antecedentes familiares, el sedentarismo, el pertenecer a un grupo étnico de alto riesgo y el haberle identificado pre-diabetes con anterioridad.

Otros factores de riesgo son la diabetes gestacional o haber dado a luz un bebé con un peso igual o superior 4 kg, la hipertensión arterial, la hipertrigliceridemia (> 2.82 mmol/L o 250 mg/dL) o tener niveles séricos bajos de colesterol de alta densidad (HDL 0.9 mmol/L o 35 mg/dL). El síndrome de ovarios poliquísticos y la historia de enfermedad vascular también son considerados factores de riesgo para la diabetes. En pacientes con síndrome metabólico el riesgo de desarrollar diabetes es, en promedio tres veces mayor (Gerstein et al, 2007).

El conocimiento de los principales factores de riesgo para estas enfermedades y las conductas adecuadas en la población, son fundamentales para la prevención y el control de estas afecciones.

### 1.3. EPIDEMIOLOGÍA

#### 1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA A NIVEL MUNDIAL

La diabetes, actualmente está considerada como una epidemia, ya que desde 1980 la prevalencia de diabéticos casi se ha duplicado. Ha pasado del 4,7% al 8,5% en 2014 en la población adulta y en el 2012 un 1,5 de millones de personas fallecieron como consecuencia directa de la diabetes. Además, otras 2,2 millones de muertes fueron debidas, entre otras, al aumento de los riesgos de enfermedades cardiovasculares, provocados por un nivel de glucosa en sangre superior al deseable. A estos datos hay que sumarle, además, los casos de diabetes no diagnosticados.

Las nuevas estimaciones, según la International Diabetes Federation en 2013, muestran una tendencia creciente en el desarrollo de la diabetes en los jóvenes, una tendencia muy preocupante para las generaciones futuras. Esta cifra está, además, subestimada ya que tiene en cuenta los cambios sólo en la población y los patrones de urbanización. Las estimaciones de la diabetes tipo 1 y el aumento del tipo 2 en los jóvenes también muestran aumentos inexplicables y rápidos en varias regiones.

Este documento también ha aproximado la prevalencia de diabetes gestacional informando de que en 2013 la cifra ascendió a 21,4 millones de mujeres.

También sorprende la cifra de mortalidad ya que ha aumentado el número de muertes prematuras, pues casi la mitad de la población diabética falleció antes de los 60

años en países desarrollados en el 2013. Y esta cifra aumenta a casi un 75% en países menos desarrollados.

Su aumento no es progresivo ni homogéneo, ya que en la última década la prevalencia de diabéticos ha aumentado más rápido en los países de ingresos bajos y medios, que en los de ingresos altos. El cambio demográfico más importante en cuanto a la prevalencia de la diabetes en todo el mundo, se incrementa en personas mayores de 65 años de edad (OMS, 2015; Wild et al, 2004). La región con más número de personas diabéticas es el Pacífico occidental según la International Diabetes Federation, 2013.

Con respecto al número de personas diabéticas según el sexo, hay alrededor de 14 millones de hombres más que mujeres con diabetes (198 millones de hombres vs 184 millones de mujeres).

La Organización Mundial de la Salud, ha pronosticado que en el año 2030 la diabetes afectará a 370 millones de personas, lo que supone un aumento de un 114% con respecto al último registro publicado por esta entidad (año 2000) y que además será la séptima causa de mortalidad mundial. Este aumento se debe entre otros factores, al envejecimiento de la población y el estilo de vida sedentario, y a una de sus consecuencias, el aumento de la obesidad, especialmente entre los niños.

En cuanto a la incidencia, la diabetes mellitus tipo 2 podría cifrarse en torno a 60-150 casos nuevos por 100.000 habitantes y año, mientras que en la diabetes tipo 1 se acercaría a 10-12 casos por 100.000 habitantes.

Con respecto a la población infantil, proyectos como Diabetes Mondiale Study (DIAMOND), Europe and Diabetes Study (EURODIAB) y Search for Diabetes in Youth Study, indican que la incidencia de la diabetes tipo 1 en los niños está aumentando en muchos países, especialmente a los niños menores de 15 años. Además, como hemos comentado en párrafos anteriores, en esta tendencia también hay indicios de diferencias geográficas, pero el aumento anual global se estima que sea en torno al 3%. Sin embargo, hay pruebas (aunque pocas) de que también está aumentando la diabetes tipo 2 en niños y en adolescentes en algunos países. Con el aumento de los niveles de obesidad y falta de actividad física entre los jóvenes de muchos países, la diabetes tipo 2 en la infancia tiene el potencial de convertirse en un problema de salud pública mundial dando lugar a consecuencias graves para la salud. Pero se necesitan más estudios que lo demuestren.

## - REPERCUSIONES ECONÓMICAS

La diabetes y sus complicaciones no solo suponen un grave problema sanitario, sino que además, conllevan importantes pérdidas económicas para las personas que la padecen y sus familias, así como para los sistemas de salud y economía nacional por los costos médicos directos y la financiación de los tratamientos. Aunque los principales costos se derivan de la atención hospitalaria y ambulatoria, un factor coadyuvante es el aumento en el costo de los análogos de las insulinas, que se recetan cada vez más, pese a que hay pocas pruebas de que ofrezcan ventajas importantes con respecto a insulinas humanas más económicas. (OMS, 2015)

En respuesta a esta epidemia, hay grandes diferencias económicas según las regiones estudiadas (África, Europa, norte y mitad este de África, América del norte y Caribe, América central y Sudamérica, sudeste de Asia y el oeste Pacífico). Las regiones del Caribe y del norte de Latinoamérica gastaron más que las demás regiones juntas, mientras que el sudeste de Asia y África representaron menos del 1% de todo el gasto en salud global de la enfermedad, a pesar de que los casos de diabetes aumentan más rápidamente en esta región que en otras (International Diabetes Federation, 2013).

### 1.3.2 EPIDEMIOLOGÍA A NIVEL NACIONAL

En España, la diabetes mellitus es una de las primeras causas de mortalidad debido principalmente a sus complicaciones, sobre todo la enfermedad isquémica cardiaca. Canarias y Andalucía presentan la mayor mortalidad, con una tendencia descendente, como se muestra en la tabla 1. Las estimaciones de prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en España varían entre el 4,8 y el 18,7%, las de diabetes mellitus tipo 1 entre el 0,08 y el 0,2%, en la tabla 2 está representada por sexos en números totales sin distinción entre diabetes mellitus tipo 1 o 2. En cuanto a incidencia anual, se estima entre 146 y 820 por 100.000 personas para la diabetes mellitus tipo 2 y entre 10 y 17 nuevos casos anuales por 100.000 personas con respecto a la diabetes mellitus tipo 1. Los costes económicos de la diabetes mellitus tipo 1 van de 1.262 a 3.311 €/persona/año. Los costes de la diabetes mellitus tipo 2 oscilan entre 381 y 2.560 €/paciente/año. Los estudios que estiman costes totales los sitúan entre 758 y 4.348 €/persona/año. Se ha demostrado que a menor nivel socioeconómico peor es el control

de la enfermedad y mayor su frecuencia y los otros factores de riesgo de diabetes mellitus2 (Ruiz-Ramos et al, 2006).

**Tabla 1.1.** Población total vs población diabética en Andalucía distribuida por género en 2011 vs 2015 (Población mayor de 15 años)

2011	TOTAL (x1000)	DIABÉTICOS (x1000)
AMBOS GENEROS	6.853,0	558,2
HOMBRES	3.367,6	291,5
MUJERES	3.485,4	266,7

2015	TOTAL (x1000)	DIABÉTICOS (x1000)
AMBOS GÉNEROS	6.957,2	491,5
HOMBRES	3.411,7	230,4
MUJERES	3.545,5	261,1

Fuente INE, encuesta nacional de salud ([www.ine.es](http://www.ine.es))

**Tabla 1.2.** Población total vs población diabética en España distribuida por sexos en 2015 (población mayor de 15 años)

	TOTAL (x1000)	DIABÉTICOS (x1000)
AMBOS GÉNEROS	38.959,7	2.653,2
HOMBRES	19.005,4	1.375,9
MUJERES	19.954,3	1.277,3

Fuente INE, encuesta nacional de salud ([www.ine.es](http://www.ine.es))

## 1.4. COMPLICACIONES

La importancia de la diabetes mellitus no sólo radica en su alta prevalencia, sino también en la naturaleza multifactorial de su aparición, evolución y especialmente sus complicaciones (Olmos et al, 2009). Estas últimas son la principal causa de discapacidad, reducción de calidad de vida y muerte.

La aparición de complicaciones en relación a la diabetes mellitus depende en gran medida de un control glucémico no adecuado, sobre todo en hiperglucemias que asocian cifras de HbA1c mayores de 7% de forma crónica. La aparición de complicaciones agudas está asociada a un déficit agudo de insulina o a un exceso de la misma.

### 1.4.1. COMPLICACIONES AGUDAS

#### a. Hipoglucemia

Es la complicación aguda más frecuente, sobre todo en la diabetes mellitus tipo 1 tratada con insulina. Consiste en el descenso de la glucemia por debajo de 60mg/dl, acompañados de síntomas leves como taquicardia, palidez cutánea, sudoración fría, sensación imperiosa de hambre, pudiendo llegar a otros signos neurológicos más importantes como convulsiones y coma, terminando en parada cardiorrespiratoria si no se toman las medidas adecuadas.

Esto es debido a diversas causas como administración de dosis excesiva de insulina o antidiabéticos orales (ADO), incremento de la intensidad y/o duración del ejercicio físico y consumo excesivo de alcohol, entre otras.

#### b. Cetosis diabética

Es un cuadro clínico caracterizado por la presencia de cetonuria sin alteración del equilibrio ácido-base ni del pH sanguíneo. Puede estar causada por un aporte insuficiente de hidratos de carbono o por un déficit de insulina.

c. Cetoacidosis diabética

Se desencadena por un déficit absoluto o relativo de insulina y se caracteriza por hiperglucemia, cetonuria y acidosis metabólica. Suele presentarse en diabetes desconocida o en descompensación de diabetes tipo 1, siendo rara en una descompensación del tipo 2.

Los síntomas más frecuentes suelen ser: sed intensa, poliuria, cansancio, debilidad, anorexia, náuseas, vómitos y dolor abdominal.

d. Coma hiperosmolar

Sus causas desencadenantes son similares a las de la cetoacidosis diabética, incidiendo especialmente en ancianos (con alteración de la consciencia), en los que la falta de ingesta de líquidos desencadena el cuadro.

#### 1.4.2. COMPLICACIONES CRÓNICAS

Los problemas crónicos, surgen en los dos tipos de diabetes, porque aparece por una descompensación en los valores de glucemia, apareciendo las complicaciones microangiopáticas y macroangiopáticas. Aunque estas complicaciones se desarrollarán posteriormente, los procesos que lo desencadenan se exponen a continuación.

## 2. ALTERACIONES FUNCIONALES

La hiperglucemia crónica es el defecto subyacente sobre el que giran todas las alteraciones implicadas en el desarrollo de la diabetes (De La Cruz et al, 2004 y “The Diabetes Control and Complications Trial,” 1995)

En individuos sanos la glucosa se metaboliza en el citoplasma por la vía glucolítica y por la vía de las pentosas fosfato, pero, cuando hay exceso de glucosa, ésta se metaboliza por las vías alternativas, normalmente poco activas (Bonafonte et al, n.d.).

Las cifras altas de glucosa sanguínea provocan cambios importantes en el metabolismo celular, entre los que destacan, por su especial importancia, los siguientes (De La Cruz et al, 2004 y Miranda et al, 2004, 2006):

- Activación de la vía de los polioles.

- Activación de la vía de la hexosamina.
- Activación de la vía del diacilglicerol-proteincinasa C.
- Formación de productos finales de la glicación de proteínas.
- Estímulo del estrés oxidativo celular.

Estas alteraciones pueden explicar la mayor parte de las lesiones celulares, fundamentalmente las más precoces, que se centran en el endotelio, finalizando en la disfunción endotelial (De Vriese et al, 2000). Dichas alteraciones están relacionadas entre sí, influyendo cada una en todas las demás y serán explicadas en tres fases.

## 2.1. PRIMERA FASE (DISFUNCIONES BIOQUÍMICAS)

La hiperglucemia mantenida en sangre, produce cambios importantes en el metabolismo celular, entre los cuales los siguientes son especialmente importantes:

### **Activación de la vía de poliol:**

En la diabetes, esta vía metaboliza el exceso de glucosa. En presencia de hiperglucemia, la vía glucolítica se satura, favoreciendo la reducción de glucosa en sorbitol utilizando la enzima aldosa reductasa (AR), que produce daño *per se*, y usando la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como cofactor. Posteriormente, se transforma este sorbitol en fructosa mediante sorbitol deshidrogenasa (SDH) y usando NAD<sup>+</sup> como coadyuvante.

Esta vía, que se encuentra usualmente inactiva, se activa con el exceso de glucosa, de modo que se inicia su propio proceso metabólico que interfiere con la viaglicolítica normal.

El sorbitol, que se difunde difícilmente a través de las membranas celulares, produce un aumento del estrés osmótico intracelular, con el potencial daño tisular por edema celular (Navarro-González et al, 2010). Además, hay estudios que sugieren que la oxidación del sorbitol conduce, por una parte, a un aumento en la formación de metilglioxal, un precursor de los productos finales de glicación avanzados (PFG) que activa la PKC, mientras que, por otra parte, se altera la relación NADH/NAD<sup>+</sup>, lo cual crea un ambiente pseudohipóxico e inhibe la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (enzima que inicia la segunda fase

de la glucólisis), aumentando la concentración de D-gliceraldehído 3-fosfato y por tanto, la formación también de metilglioxal, y del diacilglicerol (DAG), potente estimulador de la proteincinasa C (PCK) (Williamson et al, 1993).

Pero además, el uso de NADPH como cofactor en la vía de los polioles reduce la actividad de otras enzimas que también la necesitan, como la óxido nítrico sintasa (NOS), la glutatión reductasa (GR), la catalasa y la NADPH oxidasa, las cuales algunas participan en los mecanismos antioxidantes; por lo tanto, el agotamiento de NADPH explicaría, en parte, la deficiencia de los sistemas antioxidantes en el paciente diabético como el dependiente del glutatión y de la catalasa.

Además, la aldosa-reductasa (AR) activada en la vía del poliol, cataliza la reacción de galactosa a galactitol (aparte de la ya explicada transformación de la glucosa en sorbitol), teniendo más afinidad por la galactosa que por la glucosa. Por este motivo, la acumulación de polioles es mayor en la galactosemia que en la diabetes, ya que la enzima sorbitol deshidrogenasa transforma lentamente el sorbitol a fructosa, pero no metaboliza el galactitol (Tarr et al, 2013), aumentando por tanto, la concentración de sorbitol.

La activación de esta vía está relacionada con el aumento del estrés oxidativo, aumento de la síntesis de prostaglandinas, disminución de óxido nítrico (ON) y cambios celulares que conducen a una apoptosis celular. (King et al, 1996; De La Cruz et al, 2004 y Olmos et al, 2009).

### **Activación de la vía de hexosaminas:**

La fructosa, proveniente de la vía del poliol, y la glucosa-6-fosfato, se transforman gracias a la acción de la enzima fructosa-6-fosfato aminotransferasa, en fructosa-6-fosfato, a la que se le une la glutamina formando glucosamina-6-fosfato y glutamato (neurotóxico), y tras varias reacciones se genera uridin-difosfatoNacetil-glucosamina.

Esta vía favorece cambios en la transcripción de genes relacionados con la microangiopatía, como factores transformante de crecimiento  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ 1) y el del inhibidor de la activación del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) (Kolm-Litty et al 1998), al desarrollo de complicaciones diabéticas y a la resistencia a la insulina aunque

no está claro su mecanismo. Se han propuesto varias hipótesis como por ejemplo, que la glucosamina impide la acción de la insulina al inhibir la fosforilación y la activación del sustrato proteico del receptor de la insulina tipo 1 [(IRS-1), proteína de señalización post receptor de insulina] o por la alteración de algunas de las proteínas participantes en la acción de la insulina (los IRS y el transportador GLUT4) por la adición de la N-acetilglucosamina. Al producirse esta unión, no se fosforilan los residuos de serina y/o treonina requeridos para que la insulina ejerza su acción.

### **Activación de la vía diaglicerol- proteína quinasa C (DAG-PKC):**

Como acabamos de comentar, de las dos fosforilaciones anteriores se produce formación de novo de DAG a partir del NADH y NAD<sup>+</sup> procedentes de estas y del acumulo de glucosa en los tejidos. El DAG estimula la formación de la proteína Quinasa C (PKC) (Aronson et al, 2008 y Das Evcimen et al, 2007) pudiendo favorecer ambos la expresión de endotelina-1 (ET-1), citoquina que produce disminución del flujo capilar.

La enzima PKC fosforila diversas proteínas responsables de la transducción de señales intracelulares y participa en la regulación de diversas funciones vasculares, como la contractilidad, la proliferación celular y la permeabilidad vascular. Las alteraciones atribuidas a la activación de la PKC son variadas y dependen de la función de esta enzima en las vías de transducción de señales y en su participación en la regulación de la expresión de diversos genes, incluidos fibronectina, colágeno tipo IV, PAI-1 y TGF $\beta$  y su receptor (Navarro-González et al, 2010).

La familia de la PCK comprende 15 isoformas, 9 de las cuales son activadas por el DAG (segundo mensajero de los lípidos). La activación de la PKC afecta a nivel vascular, induce al engrosamiento de la membrana basal y oclusión vascular, aumenta el PAI-1 y disminuye la acción fibrinolítica.

La isoforma de la PKC- $\beta$  disminuye la producción de NO glomerular y en el musculo liso, a la vez que estimula la producción de ET-1, activa la fosfolipasa A2 y aumenta la producción de prostaglandina PGE2 y de tromboxano-A2, por lo que se altera la permeabilidad endotelial y la respuesta a la angiotensina II (AII) en el músculo liso vascular, aumentando la vasoconstricción. La actividad de esta isoforma, aumenta

con la isquemia y tras la exposición del endotelio vascular al estrés oxidativo (Giacco et al, 2010 y Taher et al, 1993), por lo que sigue disminuyendo el flujo sanguíneo.

### **Estrés oxidativo:**

Se produce cuando la formación de especies reactivas de oxígeno supera la capacidad antioxidante celular. Normalmente este estrés aparece cuando se forman radicales libres, se deterioran las defensas antioxidantes endógenas (principalmente el sistema glutatión) o ambas a la vez, que es lo que ocurre con mayor frecuencia. (De La Cruz et al, 2004 y Miranda et al, 2004, 2006). Al activarse la vía del poliol, el sistema glutatión se debilita (como ya hemos mencionado).

Este proceso, que será explicado más adelante, está caracterizado por la acción de dos mecanismos: la producción de radicales libres de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), y la dificultad de su eliminación. Estas moléculas reactivas, los ERO y ERN, se producen en todas las células aerobias por distintas reacciones de oxi-reducción.

En condiciones normales hay un equilibrio entre los mecanismos oxidantes y los antioxidantes, estableciéndose el denominado estatus oxidativo tisular. Definiéndose, por tanto, EO tisular como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, superándose el límite máximo de formación mitocondrial de ERO. (De La Cruz et al, 2004 y Miranda et al, 2004, 2006).

### **Formación de productos finales de glicación avanzada (PFG):**

Los PFGs son un grupo heterogéneo de moléculas formadas a partir de la reacción no enzimática de azúcares reductores con grupos amino libres de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estos PFGs se acumulan en las proteínas de vida media larga, como en el cristalino del ojo y en el colágeno de las membranas basales de los capilares de la retina y glomerulares (Huebschmann et al, 2005; Olmos et al, 2009 y Tarr et al, 2009).

Los PFGs se forman de forma lenta y constante desde el desarrollo embrionario y se acumulan a lo largo del tiempo. Sin embargo, esta formación se acelera notablemente en la diabetes debido a la mayor disponibilidad de la glucosa.

Los primeros productos de esta reacción se denominan base de Schiff (grupo carbonilo de la molécula glucosa unido de forma no enzimática a grupos amino- $\epsilon$  ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>) de los residuos de lisina, de proteínas o lipoproteínas, que pueden desaparecer o reorganizarse espontáneamente en un producto de Amadori. Uno de los productos Amadori más conocido es la hemoglobina glicosilada (HbA1c), utilizado clínicamente para evaluar la evolución de los pacientes diabéticos (Makita et al, 1992).

La hemoglobina glicosilada se caracterizan por tener unido un resto de monosacárido en el amino terminal de la cadena beta, punto donde la hemoglobina se glicosila con más facilidad. En 1976, Koenig et al, relacionaron la hiperglucemia y los valores de HbA1c en los pacientes diabéticos, comprobándose, además, la existencia de una correlación entre el grado de disfunción endotelial y el porcentaje de HbA1c. Así, al estudiar las respuestas endotelio-dependientes en segmentos aórticos y microvasos mesentéricos de ratas con diferentes niveles de hemoglobina glicosilada se ha observado que los niveles de HbA1c  $>7.5\%$  presentan disfunción endotelial (Rodríguez et al, 1998).

Los productos Amadori, productos intermedios en el tiempo de la glicación, por cambios o transposiciones moleculares y oxidaciones, se entrecruzan (cross-linking) unos con otros mediante complejas reacciones bioquímicas irreversibles formando los precursores de los productos finales de la glicación (PFG), los  $\alpha$ -dicarbonilos ( $\alpha$ -oxoaldehídos) como la 3-desoxiglucosona, el metilglioxal y el glioxal. Las proteínas ricas en aminoácidos básicos (L-lisina y L-arginina) son especialmente susceptibles a la glicación.

La 3-desoxiglucosona se puede formar también directamente por la autooxidación de la glucosa catalizada por metales, produciendo el radical superóxido, precursor de otras especies reactivas de oxígeno. El metilglioxal y el glioxal derivan principalmente de intermediarios de la glucólisis como el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato, que se acumulan a consecuencia de la hiperglucemia. (Diaz-Flores et al, 2004).

Aparte de estas vías de formación de PFG, también se pueden formar por el proceso de glucoxidación (combinación de la glicación y la oxidación) siendo marcadores de estrés oxidativo acumulado en los tejidos. Por ejemplo, el N $\epsilon$ -carboximetil lisina (CML) es un producto de glucoxidación, que sirve como un biomarcador de estrés oxidativo en general, se acumula en los tejidos con la edad pero,

se acelera en la diabetes mellitus (Wang et al, 2010). La principal característica en la unión de los productos de amadori con las proteínas es la capacidad para la formación de reticulación covalente (unión muy estable), alterando su estructura y función en la matriz celular, las membranas basales, y los componentes de la pared del vaso. Otras características importantes de PFG es su interacción con una variedad de receptores de unión de la superficie celular, incluyendo el receptor para productos finales de glicación avanzada, conllevando a eventos proinflamatorios, como la activación y prooxidación celular.

En condiciones de alta producción de PFG, como en la DM, los efectos indirectos de los PFG mediados por receptores de superficie celular, actúan como mediadores de la endocitosis y degradan los PFG, y además, activan la PKC, la producen radicales libres y liberan los factores de crecimiento y citoquinas, dando como resultado un proceso acelerado de crecimiento y de respuestas inflamatorias (Sharma et al, 1996).

La estructura y la función de las proteínas se alteran debido a la unión de los azúcares y también a la unión de los PFGs a receptores específicos en diferentes localizaciones, como en células endoteliales y musculares lisas. La unión a estos receptores resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno, la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (FNkB), la liberación de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) o la interleucina (IL)-1 y 6, la expresión de moléculas de adhesión y factores de crecimiento, como el TGF-b o el factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE), y la proliferación de diversas células, como macrófagos, células endoteliales y células del musculo liso arterial (Tan et al, 2007).

## 2.2. SEGUNDA FASE (DISFUNCIÓN VASCULAR)

Las vías bioquímicas anteriormente comentadas se unen en el endotelio causando disfunción endotelial.

Pero antes de continuar, haremos un breve repaso a la estructura vascular, más concretamente del endotelio.

### 2.2.1. ESTRUCTURA VASCULAR

Los vasos sanguíneos están formados por una capa adventicia, una capa media formada por células musculares lisas (CML) de potencia variable, y por la íntima, constituida por la capa subendotelial (inmediatamente después de la capa media) y por la endotelial, más interna, cuya estructura varía según el tipo de vaso (arterial o venoso, grandes vasos, medianos o microvasculatura) y el territorio (cerrado, continuo, discontinuo o fenestrado).

#### **Endotelio**

El endotelio forma una monocapa celular que cubre la superficie interior de los vasos sanguíneos (arterias, venas, capilares y vasos linfáticos). Cada célula endotelial es nucleada y está rodeada por una lámina basal formada de matriz extracelular (MEC). La MEC está compuesta fundamentalmente por glucoproteínas (laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, entactina, heparan sulfato y factor Von Willebrand, entre otros) (Esteller, 2005). Además, tiene dos superficies, la apical o luminal hacia la luz del vaso, y la zona basal, hacia la capa subendotelial. Las diferentes proteínas de membrana de la célula interactúan con las proteínas de la matriz extracelular. Entre las células endoteliales se constituyen puentes de hidrógeno que regulan la permeabilidad entre la sangre y los tejidos. Su estructura y función depende del territorio vascular que se considere (Badimón et al, 2006 y Dalli et al, 2005).

El endotelio, no expresa sus funciones de manera homogénea ya que existe una heterogeneidad que depende del tipo de vaso y del territorio en el que se encuentre, así, en los capilares es importante su función de permeabilidad, mientras que en los vasos cerebrales son endotelios cerrados y en el hígado es fenestrado.

Pero independientemente a su función de barrera, debido a su ubicación estratégica, detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como las señales químicas transportadas por la sangre y responde a ellas utilizando las células endoteliales que ejercen funciones vasodilatadoras y vasoconstrictoras, mitógenas y antimitógenas, procoagulantes y anticoagulantes, inflamatorias y antiinflamatorias, fibrinolíticas y antifibrinolíticas, oxidantes y antioxidantes, proliferativas y antiproliferativas, angiogénicas y antiangiogénicas, inmunes y autoinmunes, y autocrinas, paracrinas y endocrinas. De su equilibrio depende la

homeostasis y la salud vascular. El endotelio sano presta su superficie para elementos claves del metabolismo (lipoproteína lipasa) y del sistema antitrombótico (heparinoides de superficie, proteínas anticoagulantes) pero además produce y libera una serie de sustancias como el NO, ET, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), y factor von Willebrand (FvW), entre otras. De otra manera, de su desequilibrio dependerá la disfunción endotelial reconocida hoy día como el primer detonante y marcador de enfermedades cerebro-cardiovasculares, inflamación, crecimiento y propagación de tumores sólidos e incluso alteración de la memoria. (Gómez et al, 2005)

### **Funciones del endotelio**

#### **a. ACCIÓN ANTITROMBÓTICA**

Esta acción antitrombótica se produce con la liberación de sustancias antiagregantes (prostaciclina, NO, ATPasa), sustancias anticoagulantes (heparina y trombomodulina) y estimuladores de la fibrinólisis (activador del plasminogeno tisular o tPa).

Todas estas funciones se deterioran en la diabetes mellitus, y además, muchos estudios evidencian un aumento en la activación de las plaquetas en el plasma en la fase de coagulación que, junto con la actividad fibrinolítica deficiente, favorece, de este modo, un estado protrombótico en pacientes con diabetes. Esta situación, conduce a su vez, a un mayor riesgo de infarto de miocardio, ictus, amputación y muerte vascular.

#### **b. REGULACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO**

- Sustancias vasoconstrictoras

#### Endotelina (ET)

La endotelina-1 (ET-1) es un péptido vasoconstrictor con propiedades pro-mitogénicas y pro-inflamatorias, siendo de interés, por tanto, en el desarrollo de la disfunción endotelial. ET-1 actúa como un antagonista fisiológico del NO y es producida en macrófagos, células de músculo liso y, principalmente, en la célula endotelial a partir de la proendotelina, sobre la que actúa la enzima convertidora de endotelina (ECE) (Lemkens et al, 2012). Se libera a través de la acción de factores

como factores de crecimiento, citoquinas, trombina e insulina y es controlado de forma indirecta por la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), NO, y la heparina, entre otras sustancias

Angiotensina II (se comentará en el punto de la alteración bioquímica en la retinopatía).

### Tromboxano (TxA<sub>2</sub>)

El tromboxano, potente vasoconstrictor y agregante de plaquetas, es el resultado, principalmente, de la acción de la enzima ciclooxigenasa(COX) sobre el ácido araquidónico, que origina compuestos con efecto autocrino y paracrino. El TxA<sub>2</sub> es un metabolito del ácido araquidónico generado por la acción de la COX y, en un paso posterior, por la tromboxanosintasa.

Las plaquetas son ricas en la enzima tromboxanosintetasa y producen una cantidad elevada de TxA<sub>2</sub>. Su principal función es participar en la hemostasia, en los procesos de coagulación y agregación plaquetaria (Nakahata, 2008).

El TxA<sub>2</sub> ejerce su efecto específico activando el receptor del tromboxano en el tejido muscular vascular y en plaquetas, contrarrestando la acción del NO y PGI<sub>2</sub> en ambos tipos celulares (Dogné et al., 2006). Debido a su función en la agregación plaquetaria, es importante en el cierre de las heridas y hemorragias.

- Sustancias vasodilatadoras

### Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)

La prostaciclina es el principal eicosanoide producido por las células endoteliales. Pertenecen al grupo de los prostanoides y son sustancias vasodilatadoras que además inhiben la agregación plaquetaria mediante la activación de la adenilciclase y es rápidamente degradada por el plasma (Mitchell et al, 2014 y Moncada et al, 1976). Además también inhiben la liberación de factores de crecimiento implicados en el engrosamiento de la pared vascular (Zou et al, 2007).

Al igual que las prostaglandinas, éstas se forman en el endotelio a partir del ácido araquidónico a través de la participación de la COX, con sus dos isoformas (COX-1 y COX-2). La COX-1 se expresa de forma constitutiva por la mayoría de los

tejidos y participa en la síntesis de las prostaglandinas que controlan procesos fisiológicos. Por el contrario, la isoforma COX-2 es inducible y se expresa en respuesta a diferentes estímulos proinflamatorios o factores mitogénicos en distintos tipos celulares (células endoteliales, células de músculo liso vascular, macrófagos, etc.).

La ciclooxigenasa cicla y oxigena al ácido araquidónico para formar endoperóxidos cíclicos y a partir de ahí los prostanoides y las prostaglandinas. Como el tromboxano es también un prostanoides, la formación de éste es similar a las prostaciclina pero en las plaquetas, con la principal diferencia en que en las plaquetas está implicado el tromboxanosintetasa, mientras que en el endotelio está implicada la prostaciclina sintetasa, como se muestra en la figura 1. Por tanto, un adecuado equilibrio entre los dos es un papel fundamental para la interacción fisiológica entre las plaquetas y la pared vascular.

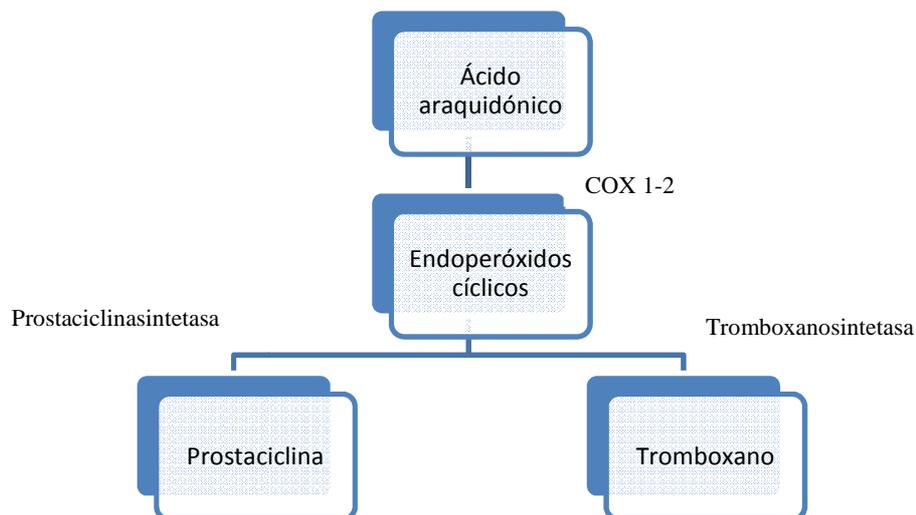


Figura 1.1. Diferencia en la síntesis de los prostanoides

La síntesis de eicosanoides en un ambiente rico en radicales libres de oxígeno, como ocurre en la diabetes mellitus, favorece la producción de subproductos tales como isoprostanos (De La Cruz et al, 2004).

Los eicosanoides son liberados en respuesta a múltiples estímulos agresivos y en su mayoría contribuyen a los síntomas de la inflamación. Tanto los derivados de la vía de la ciclooxigenasa (COX), fundamentalmente las prostaglandinas de tipo E y las prostaciclina, como algunos de la vía de la lipooxigenasa (LOX), como el LTB<sub>4</sub>,

LTD4 y LTE4, favorecen la vasodilatación aguda, incrementan la permeabilidad vascular y la subsiguiente infiltración de leucocitos y células fagocíticas.

La prostaciclina se une a receptores de membrana específicos vinculados a una proteína G que estimula la adenilciclase. Esto a su vez aumenta los niveles de AMP cíclica (cAMP) en la fibra del músculo liso vascular y en las plaquetas (en el caso de la síntesis de las células endoteliales).

### Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico es un gas inorgánico, presente en casi todas las células del organismo, que en condiciones normales actúa como mediador fisiológico de la vasodilatación. Su síntesis se realiza a partir de L-arginina y tiene como producto final de la reacción la L-citrulina (Moncada et al, 1995).

Hay dos formas principales de la NO, forma constitutiva (cNOS) e inducible (iNOS). La cNOS, que es dependiente de calcio, forma pequeñas cantidades de NO (en el rango nanomolar) constantemente. Se han identificado dos formas diferentes de cNOS: endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS). La iNOS normalmente no se expresa en las células humanas, pero se activa sólo después de la estimulación por citoquinas (tales como interleuquinas, factores de crecimiento, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), etc.) y produce NO en grandes cantidades, por tanto, el NO producido por cNOS se cree que está implicado en funciones fisiológicas, mientras que la producida por iNOS participa en los mecanismos fisiopatológicos, especialmente cuando la concentración de radicales libres en el medio ambiente es alta (como se produce en la diabetes mellitus).

El eNOS tipo III produce NO, que se difunde desde el endotelio a la capa muscular lisa vascular, a través de enzima guanilatociclase (GC), y aquí estimula directamente la adenilatociclase, provocando la degradación del trifosfato de guanosina cíclico (GTPc) y liberando, a su vez, monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), molécula que reduce la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico, responsable de la vasodilatación a nivel de las células musculares lisas. A nivel de la plaqueta, la elevación del GMPc es responsable de la antiagregación (Rooke et al, 2008).

La forma soluble de guanilciclase (GCs) es considerada el receptor del NO compartida con la nitroglicerina y sorprendentemente con el monóxido de carbono (CO). Las GC no solubles o de membrana son activadas por péptidos. El NO además de

actuar sobre la GCs también actúa sobre otras enzimas, activándolas o inhibiéndolas. A las primeras pertenece la COX, y a las segundas la ribonucleótido-reductasa, el citocromo P450 y la oxidasa de NADPH. A nivel plaquetario, además de producir una elevación del GMPc, disminuye la P-selectina en el endotelio, que interviene en el frenado de la plaqueta, e inhibe la glicoproteína IIb/IIIa. Ésta representa el principal receptor en la membrana plaquetaria y es un miembro de la familia de las integrinas. Participa en la agregación plaquetaria por unión a las proteínas adhesivas como el FvW y el fibrinógeno. El NO además de antiagregante y vasodilatador, es *scavenger* o captador de RL, antiproliferativo (inhibe la proliferación de las células musculares lisas) y antiapoptótico. Junto a ello disminuye la expresión de moléculas de adhesión como moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM) y quemoquinas como MCP-1 (Ruiz et al, 2009).

Además, la S-nitrosilación de la guanilatoclasa soluble (GCs) por el NO endotelial fue identificado recientemente como un mecanismo que puede compensar la reducción moderada de la biodisponibilidad de NO vascular (Oppermann et al, 2011). La vasodilatación mediada por el NO dependiente del endotelio se ve afectada en los ratones con diabetes tipo II, al cual se le atribuye la expresión reducida y / o fosforilación de la eNOS (Park et al, 2008 y Zhang et al, 2009), el aumento del desacoplamiento de la eNOS (Pannirselvam et al, 2002) y el incremento de la inactivación de NO debido a los ERO (Wang et al, 2010).

Debido a que la vida media de NO es muy corta, los efectos de esta molécula se ven sólo en las células más cercanas al sitio de la síntesis.

El NO es rápidamente inactivado por sustancias reactivas del oxígeno (ROS), así su unión con  $O_2^-$  forma peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que es un potente antioxidante, pero sin embargo, las producciones patológicas del NO(iNOS) convierte a esta molécula en un prooxidante muy perjudicial para las células, que será explicado más adelante (Vittone et al, 2008 y Vicent et al, 2003). En relación con estas sustancias, se ha demostrado que la expresión de iNOS y el contenido de los radicales libres son elevados en las arterias de ratas diabéticas (Wang et al, 2009 y 2006). Estos cambios, junto con el aumento de la producción de radicales libres y el aumento de la agregación plaquetaria, conducen a un entorno vascular que favorece la reducción del flujo sanguíneo del tejido y a la formación de un trombo intravascular para formar (Wong et al, 2010 y Goodwill et al, 2008).

Lo anteriormente expuesto, junto con la menor biodisponibilidad de NO, causada por una disminución en su síntesis o un aumento de la velocidad con que se degrada, constituye el fenómeno más temprano y la característica más importante de disfunción endotelial.

Entre las alteraciones descritas en la diabetes con respecto a sustancias vasodilatadoras, demuestran una disminución en la síntesis de la prostaciclina y un aumento en la actividad de iNOS (Wang et al, 2009; Watanabe et al, 2005 y Warboys et al, 2009).

### Factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (EDHF)

Además de NO, EDHF es también un mediador importante del tono vascular y reactividad en la diabetes, especialmente en los vasos pequeños.

En los vasos sanguíneos, las respuestas vasodilatadoras no pueden ser totalmente explicadas por la liberación de sólo estos dos últimos mediadores. En presencia de las ciclooxigenasas (COX) y los inhibidores de la NOS, la estimulación del endotelio vascular es todavía capaz de inducir la vasodilatación gracias a la hiperpolarización de músculo liso que se ha atribuido a EDHF.

Estos factores provocan la relajación del músculo liso vascular por hiperpolarización de su membrana celular y el cierre de los canales de calcio, reduciendo el nivel de calcio libre intracelular. Las respuestas de tipo EDHF se atribuyen a una serie de mecanismos cuya contribución varía dentro y entre los lechos vasculares y las especies estudiadas. Las sustancias que pueden incluirse como EDHF son citocromo P450, metabolitos de ácido araquidónico, ácido 15-epoxieicosatrienoico (EET) (Godecke et al, 2002), y peróxido de hidrógeno (Hamid et al, 2010) en las arterias coronarias, EET en las arterias subcutáneas, de iones de potasio en las arterias renales, EET en las arterias mamarias internas, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las arterias mesentéricas (Jaffrey et al, 2001). Las respuestas de tipo EDHF en los vasos sanguíneos humanos se asocian a la activación de varios tipos de canales de potasio, incluyendo los canales IKCa y SKCa en el endotelio, (Gewaltig et al, 2002.). Estudios recientes sugieren que el péptido natriurético tipo C también sirve como un mediador EDHF través de la activación de los canales rectificadores interiores de K<sup>+</sup> y de la adenosina trifosfato-dependiente de los canales de K<sup>+</sup> (KATP) en los músculos lisos con la consecuente

hiperpolarización (Frantz et al, 2009; Kojda et al, 2005). También hay evidencia que apoya el papel de las uniones intercelulares mioendoteliales como en la ruta de la respuesta mediada por EDHF en los músculos lisos vasculares (Mokhtar et al, 2015).

### 2.2.2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La disfunción endotelial se define como el deterioro de la vasodilatación endoteliodependiente, siendo la causa principal de las complicaciones vasculares, debido al desequilibrio explicado en la segunda fase. Esta suele ser causada por varios factores:

1. Una menor biodisponibilidad de ON, causada por una disminución en su síntesis o por un aumento en la velocidad con que la que se degrada. Constituye el fenómeno más temprano y la característica más importante de disfunción endotelial (Pickup et al, 2000).
2. Una alteración en la producción de prostanoïdes
3. Un deterioro de la hiperpolarización dependiente de endotelio
4. Una mayor liberación de factores vasoconstrictores.

El endotelio vascular es, gracias a sus propiedades, un órgano multifuncional, determinante para el buen funcionamiento cardiovascular, regulador de flujo sanguíneo y de la homeostasis humoral-tisular. Se opone a la formación de trombosis y desarrollo de la aterogénesis y regula el flujo sanguíneo mediante la producción de NO, principal mediador de la reactividad vascular. Cuando su fisiología se altera por daño estructural o funcional, se inicia un largo proceso que puede desembocar en patologías cardiovasculares tan graves como el infarto de miocardio, el ictus y la patología vascular periférica. Más concretamente, la función antitrombótica deficiente (prostaciclina, NO, tPA), junto con la estimulación de la función plaquetaria, puede favorecer la aparición de fenómenos isquémicos.

Algunos estudios afirman que la hiperglucemia interfiere con NO y la producción de iNOS, por la activación de la proteincinasa C en células de ratas WistarKyotonormotensas, sin tener este efecto en ratas espontáneamente hipertensas (Pacheco et al, 2006). Este estudio sugiere que la función del endotelio puede estar alterada en los pacientes con DM. Otros estudios indican que un aumento transitorio de las concentraciones sanguíneas de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos y la insulina son

capaces de deprimir la vasodilatación dependiente del endotelio en sujetos sanos y que la hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia son generadores de especies reactivas del oxígeno que originan una cascada de acontecimientos fisiopatológicos resultantes en la activación del NF- $\kappa$ B. Estos mecanismos están implicados en el desarrollo de la disfunción del endotelio y el EO (Nitenberg et al, 2006).

### 2.2.3. INFLAMACIÓN

Cuando se lesiona un tejido, ya sea por la acción de bacterias, traumatismos, sustancias químicas, calor u otros fenómenos, el tejido lesionado libera múltiples sustancias que le provocan cambios secundarios. Todo el complejo de cambios tisulares se denomina inflamación y junto a la respuesta inmunitaria se activan como mecanismo de defensa (Hall, 2011).

La inflamación se caracteriza por:

- 1) La vasodilatación de los vasos sanguíneos locales, con el consiguiente exceso de flujo sanguíneo local.
- 2) El aumento de la permeabilidad de los capilares, lo que permite la fuga de grandes cantidades de líquido hacia los espacios intersticiales.
- 3) A menudo la coagulación del líquido de los espacios intersticiales por cantidades excesivas de fibrinógeno y otras proteínas que salen de los capilares.
- 4) La migración de un gran número de granulocitos y monocitos a los tejidos colindantes.
- 5) La tumefacción de las células tisulares.

Algunos de los muchos productos tisulares que provocan estas reacciones son la histamina, la bradicinina, la serotonina, las prostaglandinas, varios productos de reacción diferentes del sistema del complemento, los productos de reacción del sistema de coagulación de la sangre y múltiples sustancias llamadas linfocinas. Algunas de estas sustancias activan el sistema macrofágico y en pocas horas los macrófagos comienzan a devorar los tejidos destruidos, en ocasiones también lesionan las células tisulares aún vivas.

La inflamación desempeña un papel central en la fisiopatología de las complicaciones vasculares, a partir de la iniciación, progresión y a través de las complicaciones trombóticas.

Uno de los objetivos iniciales de la inflamación es “aislar” la zona lesionada del resto de los tejidos, bloqueando los espacios tisulares y los linfáticos de la zona inflamada con coágulos de fibrinógeno, de forma que durante algún tiempo fluye escaso líquido a través de los espacios. Este proceso de incomunicación retrasa la diseminación de bacterias y residuos tóxicos. La intensidad del proceso inflamatorio suele ser proporcional al grado de lesión tisular. Así, si se produce la entrada de un microorganismo muy lesivo (toxinas...) se inicia este proceso rápidamente bloqueando la diseminación de estos agentes, sin embargo, si la lesión no es tan dañina, este aislamiento se produce de forma más lenta y progresiva, permitiendo a veces, la propagación de los microorganismos en los tejidos adyacentes, ocasionando un daño más grave.

La activación inflamatoria de las células endoteliales causa un aumento de la expresión de moléculas de adhesión como la selectina (P y E), VCAM-1 y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). Las diferentes citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$ ) y la proteína de fase aguda, LDLox, CD40 / CD40 ligando también inducen la expresión de moléculas de adhesión. Aunque el endotelio arterial normal resiste el contacto prolongado con leucocitos, incluyendo los monocitos de la sangre, con el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, existe un mayor reclutamiento de monocitos y su adhesión al endotelio. Una vez que los monocitos entran en la íntima adquieren características de macrófagos.

La IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  son citoquinas pro-inflamatorias producidas por múltiples estímulos celulares en respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Son mediadores que actúan en la superficie de las células vasculares sobre receptores específicos de membrana, los cuales, una vez activados, desencadenan una señalización intracelular que genera especies reactivas de oxígeno y activa diferentes vías sensibles a ellas, como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las MAPK promueven la síntesis proteica y activan distintos factores de transcripción, incluyendo el factor nuclear (NF- $\kappa$ B) que, a su vez, facilita la expresión de genes sensibles al estado de óxido-reducción intracelular que codifican citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y enzimas proinflamatorias, como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la sintasa

inducible de óxido nítrico (iNOS) (Kracht et al, 2002). La iNOS inducida en el músculo liso y/o endotelio vascular es capaz de producir importantes cantidades de ON y aniones superóxido, cuya interacción inactiva el ON y conduce a la formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).

Actualmente, hay estudios que muestran que los marcadores inflamatorios elevados no son tan sólo factores de riesgo que predisponene a un desarrollo posterior de la DM, sino que, una vez establecida la enfermedad, desempeñan un papel crucial en la patogénesis de la retinopatía y las complicaciones renales y cardiovasculares de la DM (Leiva et al, 2001).

### 2.3. TERCERA FASE (COMPLICACIONES VASCULARES)

Las complicaciones crónicas, surgen en los dos tipos de diabetes, porque aparece una descompensación en los valores de glucemia, apareciendo las complicaciones microangiopáticas y macroangiopáticas.

#### 2.3.1. MACROANGIOPATÍA

La macroangiopatía, está ligada a un proceso de aterosclerosis y aterogénesis progresivo, afectando a los vasos de grueso y mediano calibre, fundamentalmente a las arterias coronarias, cerebrales, aorta, corazón y los miembros inferiores. Sus manifestaciones clínicas son: la cardiopatía coronaria isquémica, los accidentes vasculares cerebrales y la arteriosclerosis obliterante de las extremidades (Rask-Madsen et al, 2013). La macroangiopatía diabética no difiere de la que padecen personas no diabéticas, aunque aparece antes que en éstas, sobre todo en la diabetes tipo 2.

La enfermedad coronaria es la principal causa de muerte entre los pacientes que padecen diabetes mellitus tipo 2, siendo el aumento del estrés oxidativo uno de los factores de riesgo que explica la mayor tasa de enfermedad coronaria.

Los pacientes diabéticos tienen el doble de riesgo de accidente cerebral isquémico que los no diabéticos debido a numerosas causas: glicación de proteínas tisulares que aumenta la aterogénesis, aumento de la agregación plaquetaria, del fibrinógeno y del factor VII, y disminución de la actividad fibrinolítica. La

macroangiopatía presenta en conjunto una prevalencia de casi el doble comparada con la prevalencia de la microangiopatía.

La presión arterial, el colesterol y los niveles de glucemia alto y junto a otros factores contribuyen al aumento del riesgo de las complicaciones de enfermedades cardiovasculares.

### 2.3.2. MICROANGIOPATÍA

Afecta a los pequeños vasos y sus manifestaciones de mayor relevancia son las que afectan a la retina (retinopatía diabética), al riñón (nefropatía diabética) y nervios periféricos (neuropatía diabética). La diabetes tipo 1 es la que generalmente progresa hacia estas complicaciones (De la Cruz et al, 2012).

Entre dos de los mecanismos implicados en la génesis y progresión de complicaciones microangiopáticas en pacientes con diabetes mellitus y en animales diabéticos experimentales se encuentra el aumento de la activación plaquetaria y el aumento en la síntesis de tromboxano, la disminución en la sensibilidad de las plaquetas a las sustancias endógenas de éstas tales como óxido nítrico (NO) y prostaciclina, y una disminución en la síntesis de estos mediadores (De la Cruz et al, 1998, 2003, 2012).

Además, la microangiopatía diabética se relaciona con el aumento de glucosa intracelular, por lo que no aparece en tejidos (como el adiposo o muscular) que requieren insulina para transportar la glucosa al citoplasma celular. Sin embargo, en otros tejidos, donde la glucosa penetra en el citosol gracias a transportadores de membrana, como el tejido retiniano (de los 5 tipos conocidos hasta ahora, en la retina se han encontrado: GLUT1, GLUT2 y GLUT3), sistema nervioso y renal, se producen cambios microangiopáticos, como la retinopatía, neuropatía y nefropatía diabéticas.

### **Nefropatía diabética**

Es la principal causa de muerte.

Es más frecuente que la retinopatía. La aparición de microalbuminuria es un factor a tener en cuenta en los pacientes diabéticos para prestar atención al control de

fondo de ojo, mientras que por el contrario, la retinopatía no implica la aparición de microalbuminuria y por tanto, nefropatía.

El mantenimiento de niveles casi normales de glucosa en la sangre y la presión arterial se puede reducir en gran medida el riesgo de nefropatía.

### **Neuropatía diabética**

Normalmente, se observan manifestaciones clínicas tras 20 años de evolución de la diabetes, aunque en un 20% se producen en el inicio. Es la más común. Afecta a los nervios de todo el cuerpo.

Este daño puede conducir a problemas con la digestión y la micción, disfunción eréctil y una serie de otras funciones. Las zonas más comúnmente afectadas son las extremidades, en particular los pies. Es muy importante la vigilancia de estas lesiones, ya que la mayoría pasan desapercibidas, pudiendo terminar en amputación de la extremidad afectada. (Atlas diabetes, 2013)

### **Retinopatía diabética**

Por ser motivo principal de nuestro estudio nos centraremos en la retinopatía diabética.

## **3. RETINOPATÍA DIABÉTICA**

La retinopatía diabética es la enfermedad microvascular mediada por la alteración de la glucosa junto con la inflamación crónica, provocando la incapacidad de la retina a adaptarse al estrés metabólico, causando finalmente la degeneración y disfunción de ésta (Liu et al, 2008). Para entender este proceso en primer lugar explicamos la estructura comprometida.

### **3.1 ESTRUCTURA DEL GLOBO OCULAR**

El globo ocular está constituido por tres capas, dos cámaras y una cavidad. La capa externa que se compone por la córnea y la esclerótica, la media o úvea y la interna o retina. La túnica externa está compuesta en su mayoría por la esclerótica, de color

blanco y opaco y en su polo externo está constituida por la córnea, que es transparente. La parte intermedia es una capa vascular. Está formada por coroides en la parte posterior, cuerpo ciliar e iris en la parte anterior. El cuerpo ciliar posee un músculo, el músculo ciliar, que es el encargado de segregar el humor acuoso. La capa más interna es una túnica nerviosa cuya función es transformar la luz en impulsos nerviosos. Está en contacto con la coroides en su parte externa y con el humor acuoso en la parte interna.

## **Retina**

La retina es la capa sensible del ojo y es una prolongación del SNC en el globo ocular. A menudo, ésta se utiliza para hacer estudios fisiológicos y morfológicos sobre SNC, ya que es fácil acceder a ella (Dowling, 1987).

La retina está organizada en diferentes capas las cuales están constituidas por diversos tipos de neuronas (fotorreceptores, células horizontales, células interplexiformes, células bipolares, células amacrimas y células ganglionares) y células no neuronales o gliales (células de Müller, astrocitos y células de la microglía). Estas capas están especializadas para la recepción y el procesamiento del estímulo visual.

Los fotorreceptores (células fotosensibles) captan la energía luminosa y se estimulan, y tras el paso de ésta por todas las capas retinianas se transforma en energía eléctrica mediante cambios en el potencial de membrana. Aquí comienza la percepción de la visión. Luego, transmiten esta energía mediante contacto sináptico a neuronas intermedias hasta las células ganglionares de la retina (CGR), cuyas prolongaciones constituyen el nervio óptico (Hubel et al, 2000).

La vascularización depende de la arteria central de la retina. Esta se dirige a la retina pasando por las fibras del nervio óptico y emergiendo a nivel del punto ciego (zona circular situada en el centro de la retina, por donde salen del ojo los axones de las células ganglionares de la retina que forman el nervio óptico), dividiéndose en ramas terminales (entre 5 y 7) que se dirigen hacia el ecuador.

- Tipos de células

### **Neuronales:**

#### Fotorreceptores:

Existen dos tipos: Conos y bastones, distinguidos entre sí por su forma, tipo de fotopigmento que contienen, su distribución en retina y conexión sináptica.

Los conos son los que responden a la luz de alta intensidad y por tanto los responsables de la visión diurna y permiten la visión en color, al contrario de los bastones con la visión en blanco y negro y permiten la visión nocturna, pues son los que responden al estímulo luminoso de baja intensidad.

#### Células horizontales y amacrinas:

Son interneuronas, es decir, interconectan una neurona con otra y no generan potenciales de acción, sino que transmiten lo que han recibido.

#### Células bipolares:

Son dos tipos de células, uno que recibe los estímulos de los conos y otro que hace sinapsis con los bastones. Los potenciales de acción de estas células son graduales, es decir, hiperpolarizantes o despolarizantes.

#### Células ganglionares (CGR):

Sus axones mielinizados van hacia el cerebro formando el nervio óptico. Se encuentran en la superficie interna de la retina.

**Células de la glía:** Dan soporte y regulan tanto a las neuronas retinianas como a los vasos sanguíneos.

#### Célula de Müller:

Se localizan a lo ancho de toda la retina, teniendo sus cuerpos celulares en la capa nuclear interna. Son células de sostén que sintetizan glucógeno y ceden glucosa a otras células nerviosas. Regula el metabolismo del glutamato. El aumento de la

concentración de glutamato, como sucede en la diabetes mellitus, causan toxicidad y muerte neuronal.

#### Astroцитos:

Son también, células que aportan soporte mecánico y se sitúan en la capa de las fibras nerviosas, rodeando a éstas y a los vasos sanguíneos. Tienen la función de formación y desarrollo de la vasculatura retiniana a través de la producción de FCEV.

#### Microglía:

Son células de pequeño tamaño, cuya función principalmente es fagocítica. Está inactivo hasta que las alteraciones de la homeostasis retiniana las activan para combatir a las células circunvecinas.

#### - Estructura de la retina (Figura 2 y 3)

Como hemos mencionado anteriormente, la retina está formada por varias capas organizadas, más concretamente por diez, que desde su parte más externa (en contacto con la coroides, por donde entra el estímulo luminoso a la retina), hasta la más interna (en contacto con humor vítreo), son las siguientes:

1. Epitelio pigmentario de la retina (EPR): Monocapa de células pigmentadas que nutre sus células visuales. Anclada en la coroides. La retina termina en la ora serrata (donde comienza el cuerpo ciliar en la coroides) pero el epitelio continúa (por encima) por el cuerpo ciliar.
2. Capa de los segmentos externos fotorreceptores (CSEFR): Formada por el segmento externo de estas neuronas.
3. Membrana limitante externa (MLE): Entramado de uniones entre la región más externa de células de Müller y entre estas y entre fotorreceptores.
4. Capa nuclear externa (CNE): Formada por núcleos de fotorreceptores.
5. Capa plexiforme externa (CPE): Formada por terminales axonales de fotorreceptores y procesos de las células bipolares, horizontales y plexiformes.
6. Capa nuclear interna (CNI): Formada por núcleos de células amacrinas, interplexiformes, de Müller y de células horizontales.

7. Capa plexiforme interna (CPI): Región de conexión de las células ganglionares y amacrimas y axones de células bipolares.
8. Capa de células ganglionares (CCG): Constituida por células ganglionares y amacrimas desplazadas en esta capa.
9. Capa de fibras nerviosas del nervio óptico (CFN): Formada principalmente por CGR en su paso hacia el punto ciego.
10. Membrana limitante interna (MLI): Formada por los procesos internos de células de Müller.

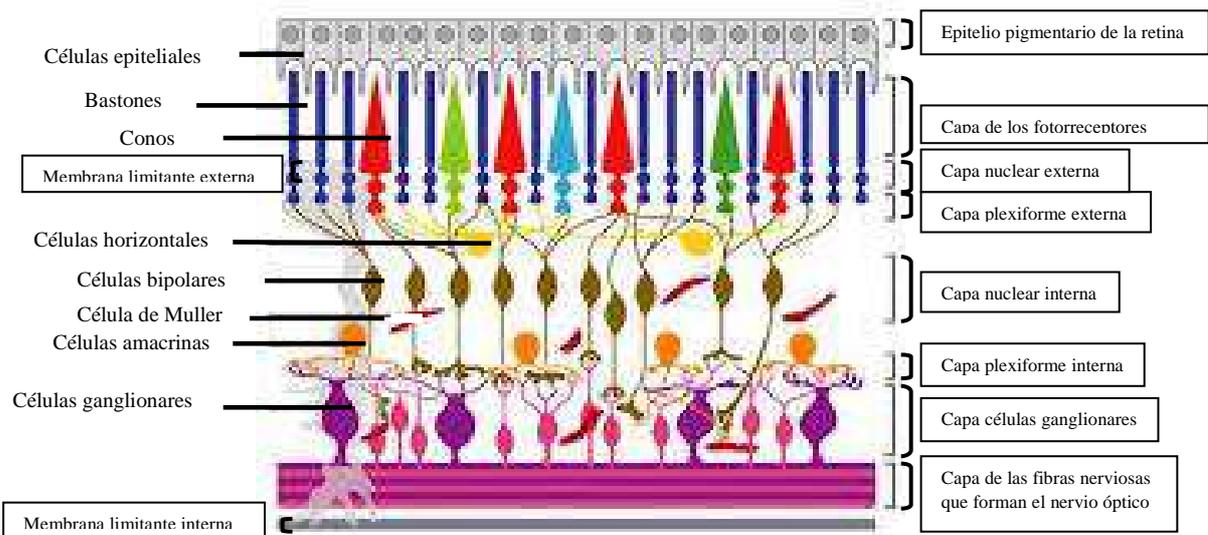


Figura 1.2. Esquema de la organización de la retina. Modificada de la revisión de expertos en medicina molecular por la Universidad de Cambridge, 2004.

<https://cosmicglaze.wordpress.com/2013/01/13/science-fashion-for-the-well-dress-nerd-in-your-life/>

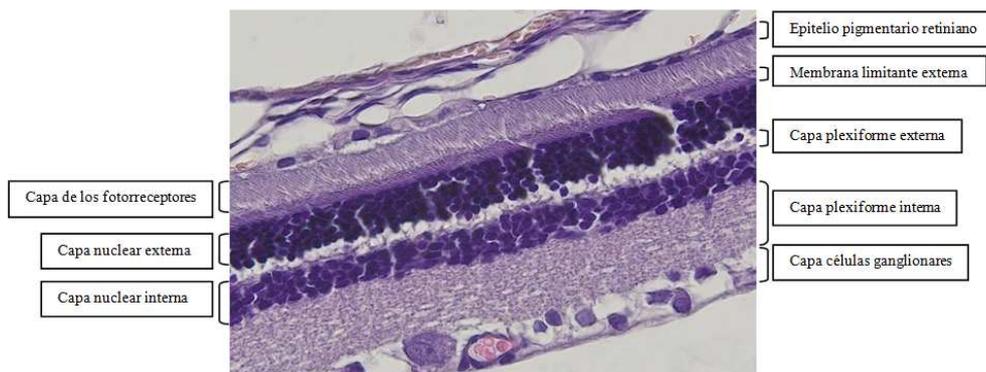


Figura 1.3. Capas de la retina

- **Circulación retiniana**

La circulación retiniana está formada por arterias y venas que se introducen en la retina por el agujero del nervio óptico, formando arterias secundarias que dan lugar a la microcirculación formada por capilares, vénulas y arteriolas. Éstos tienen en su capa

media pericitos, células de músculo liso modificadas, que nutren y tiene gran capacidad de autorregulación. La autorregulación es el mecanismo fisiológico por el que se asegura un flujo sanguíneo adecuado, independientemente de la presión arterial.

El endotelio vascular también regula funciones de homeostasis al constituir la barrera hematorretiniana (BHR) que constituyen una separación entre las células inflamatorias y las células neuronales. La condición de barrera las dan las uniones estrechas, en las que intervienen distintas proteínas, existentes entre las células endoteliales.

### 3.2.EPIDEMIOLOGÍA

La retinopatía diabética (RD), se produce por el deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina. Es la principal causa de pérdida de visión y ceguera en pacientes menores de 45 años (Berkowitz et al, 2015), aunque la aparición depende principalmente de la duración de la enfermedad y el control metabólico de éstos. Tras 20-25 años de diabetes, más del 80% de los pacientes tienen algún tipo de lesión retiniana, siendo 20 veces más propensos a la ceguera que los miembros de la población en general (De la Cruz et al, 2001).

Se espera que en el 2025 el número de personas diabéticas aumente a 380 millones, dando lugar a aproximadamente 4 millones de personas pérdida de visión por retinopatía diabética, ya que la pérdida de visión afecta aproximadamente al 5% de los casos de diabetes mellitus tipo 1 y 2 (Engerman et al, 1995 y Kempen et al, 2004).

Como se prevé que la incidencia de la diabetes mellitus aumentará un 33% en la población de Estados Unidos en el 2050, existe una necesidad urgente de desarrollar estrategias que intenten reducir con éxito esa tendencia y que prevengan las complicaciones oculares asociadas con la diabetes. Sin embargo, se han producido reducciones en la prevalencia de la retinopatía diabética en personas con diabetes tipo 1 en los últimos 10 a 20 años. Estos se han asociado con mejoras en la diabetes, en la atención y gestión, así como mejoras en el control de factores.

El impacto de la discapacidad visual va más allá de la persona, ya que debido a ella las comunidades y las economías sufren alteraciones en su capacidad de ingreso y producción, creándose una necesidad de mayor apoyo social. De este modo los costes

sociales y financieros de discapacidad visual y ceguera son importantes no sólo para los directamente afectados y sus familias, sino también a las comunidades y países enteros.

Según la International Diabetes Federation, la prevalencia de la retinopatía diabética fue mayor en general en los países en desarrollo, aunque en el estudio participaron pocos países subdesarrollados.

No obstante, hay una falta de datos sobre la prevalencia de la retinopatía diabética, y grandes diferencias en las características del estudio y las metodologías usadas, por lo que las comparaciones entre los estudios son complejas.

### 3.3. DIAGNÓSTICO Y FACTORES DE RIESGO

Según la Sociedad Española de Diabetes una de las pruebas diagnósticas más efectiva es la angiografía, que consiste en la fotografía de la retina después de inyectar una sustancia con fluoresceína intravenosa. Como efecto secundario, aparece la tinción de piel y orina de color amarillo fluorescente durante 24 horas.

Los síntomas aparecen tardíamente, de forma que el propio paciente no puede detectar las lesiones de forma precoz. Por ese motivo se debe seguir controles oftalmológicos periódicos, que consisten en determinación de agudeza visual, medición de la tensión ocular y exploración del fondo del ojo. Se debería realizar con esta frecuencia:

- Diabetes tipo 1: en el momento del diagnóstico de diabetes y cada 1-2 años a partir de los 5 años de evolución, ya que es excepcional la apariciones de alteraciones antes de la pubertad y en los primeros 5 años de la diabetes.
- Diabetes tipo 2: en el momento del diagnóstico y cada 1-2 años.

Es muy importante para prevenir la retinopatía un buen control de la glucosa plasmática, la presión arterial y mantener un nivel bajo de lípidos en la sangre; además, hay determinantes de salud que también influyen en el progreso, incluyendo la pobreza, la mala alimentación, la falta de acceso a los sistemas sanitarios y la falta de medicamentos. En 15 de 23 estudios realizados en los países en desarrollo y en los grupos minoritarios de etnia dentro de los países desarrollados, la prevalencia de la retinopatía diabética fue más del 35%, mientras que en los lugares donde el buen

cuidado y manejo son accesibles a las personas con diabetes, las tasas de retinopatía son más bajas.

Los daños a nivel celular en la retina son irreversibles y difíciles de tratar. Una vez que la RD progresa hasta manifestarse los síntomas clínicos suele estar ya extendida la enfermedad. Las opciones de tratamiento se limitan a la intervención quirúrgica en forma de terapia de coagulación con láser orientado al daño vascular, pero actualmente la única forma de prevención y retrasar la progresión de RD es el mantenimiento de un buen control de glucemia (Abu et al, 2011).

### 3.4.MECANISMOS DE DESARROLLO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

La retina es el tejido ocular que más sufre con la diabetes mellitus: con el paso de los años casi todos los pacientes diabéticos desarrollan algún grado de retinopatía. La circulación retiniana y cerebral son similares anatómicamente y bioquímicamente, pero en pacientes humanos, la pérdida de pericitos, la formación de microaneurismas y la neovascularización solo ocurren en la retina, posiblemente debido a la tremenda capacidad metabólica de ésta (la oxidación de la glucosa y captación de oxígeno excede a todos los tejidos, incluida la corteza cerebral).

La deficiencia de pericitos o la disfunción de éstos en los vasos, los hace propensos a convertirse en angiogénicos (Durham et al, 2015).

La RD es un proceso dinámico que comienza siendo no proliferativa pero que finaliza en proliferativa, por tanto, la intervención debería hacerse en la no proliferativa porque a medida que progresa la enfermedad, la ceguera aumenta considerablemente y la posibilidad de recuperación se disminuye (Cabarellano et al, 2002; Rein et al 2011 y Gardner et al, 2011).

La hiperglucemia crónica conduce a una serie de alteraciones relacionadas entre sí que pueden causar una disfunción endotelial evidente, que a su vez puede causar lesiones vasculares en la retina y retinopatía en los pacientes diabéticos (De la Cruz et al, 2001). Ensayos clínicos como “Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)” and “United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)” confirman la fuerte relación entre la hiperglucemia crónica y el desarrollo y la progresión de la retinopatía diabética, pero el mecanismo subyacente de éste que conduce al desarrollo de daño microvascular sigue siendo poco clara (Tarr et al, 2013). Estas lesiones en el endotelio finalizan en un

pérdida lenta de conos y bastones, relacionado con la pérdida de las membranas de los segmentos externos y/o acortamiento de éstas, conduciendo a una reducción gradual de células amacrinas y ganglionares.

Si la hiperglucemia persiste durante un tiempo prolongado, los vasos sanguíneos se dañan a través de las diferentes vías antes comentadas. Por tanto, en la retinopatía se producen alteraciones bioquímicas, que conducen a su vez a cambios morfológicos.

### Alteraciones morfológicas

En general, las lesiones que caracterizan la retinopatía diabética son el resultado de cuatro procesos principales: la aparición de microaneurismas, aumento de la permeabilidad vascular, oclusión capilar y la proliferación fibrosa y neovascular.

Las primeras etapas están caracterizadas por una vasorregresión progresiva, iniciada por la pérdida de pericitos y degeneración endotelial. Por tanto, al producirse la muerte de estos, se compromete la nutrición, los vasos se dilatan formando microaneurismas (Figura 4) y se debilita la función de BHR, ya que la membrana basal se engrosa y permite la glicosilación aumentando la permeabilidad, con la consiguiente salida de plasma rico en lipoproteínas al fondo del ojo, llegando en casos extremos a un edema macular (Figura 5). Además, pequeñas grietas producidas a causa de estos eventos, pueden facilitar la salida de glóbulos rojos y plaquetas formando hemorragias intrarretinianas (Figura 4).

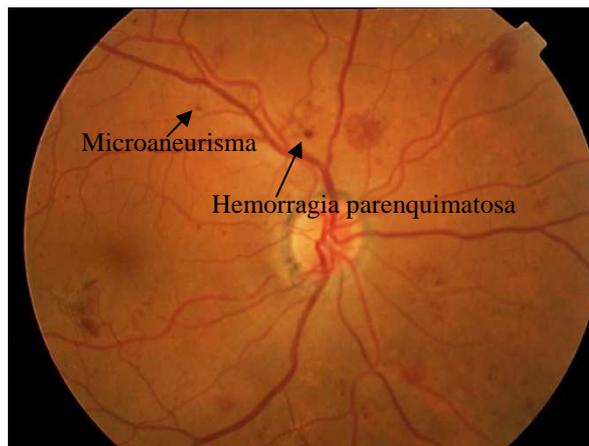


Figura 1.4. Retinografía de ojo derecho de un paciente con retinopatía diabética no proliferante y edema macular moderado. Cedida por S. del Río

La barrera hematorretiniana (BHR) juega un papel crítico en la división de los elementos neurales de la retina y en la protección de ellos de las células inflamatorias circulantes y sus productos citotóxicos (Bucolo et al 2013).

Otra de las causas que interfieren en la retinopatía es la formación microtrombos, que conduce junto con otros factores que reducen el flujo capilar, a una oclusión capilar y por tanto a una isquemia en algún área retiniana, visualizándose en el examen oftalmológico manchas pálidas de bordes difusos, llamadas exudados duros (Figura 5).

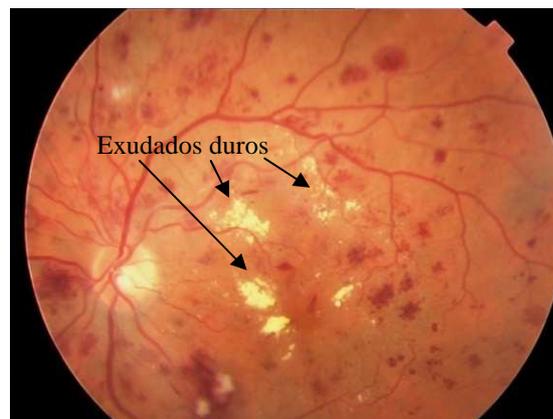


Figura 1.5. Retinografía ojo derecho de paciente con retinopatía diabética no proliferante y edema macular moderado. Cedida por S. del Río

Para intentar defenderse los vasos de esta isquemia, producen sustancias como el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) que estimula el crecimiento de nuevos capilares que buscan nuevas rutas alternativas al riego de la zona afectada. Generalmente, estos vasos son frágiles y compuestos por células endoteliales sin membrana basal firme y sin núcleo, no pudiendo estar perfundidos, conllevando a la hipoxia tisular local (Figura 6). A veces estos vasos están rodeados además, de tejido fibroso. Estas uniones fibrovasculares invaden silenciosamente el cuerpo vítreo, que si no son diagnosticadas a tiempo, cualquier movimiento brusco del humor vítreo puede romper las estructuras neovasculares produciendo una hemorragia vítrea o desprendimiento de retina causando ceguera (Olmos et al, 2009 y De la Cruz et al, 2004). En la figura 7 se muestra la cascada de eventos a nivel del capilar retinal.

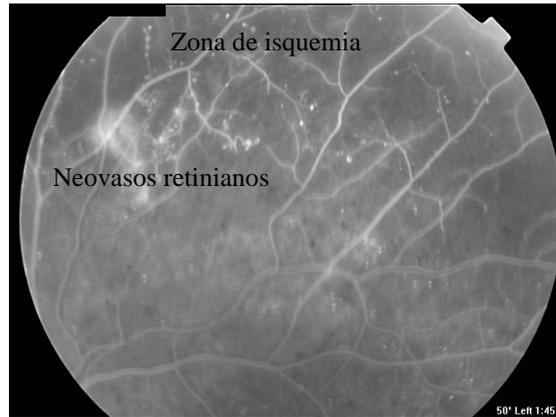


Figura 1.6. Angiografía con fluoresceína de un paciente con isquemia y neovascularización retiniana por retinopatía diabética proliferante. Cedida por S. del Río.

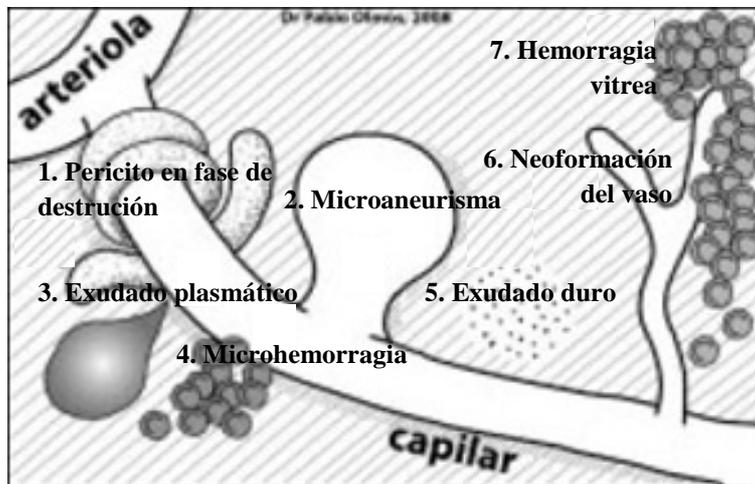


Figura 1.7: Retinopatía diabética.

Secuencia de eventos (aunque pueden acontecer en el mismo tiempo) a nivel del capilar retiniano.

Modificado de Olmos et al, 2009.

En términos generales, la retinopatía edematosa predomina en la DM-2, mientras que las alteraciones proliferativas en DM-1, aunque en la práctica clínica los signos de ambos tipos se ven generalmente en cualquier paciente (De la Cruz et al, 2012).

### Alteraciones bioquímicas

Como se ha comentado en la morfología, el inicio de la retinopatía comienza con la disminución de los pericitos que rodean los vasos retinianos y la degeneración endotelial. Hay varias vías que pueden estar implicadas, la activación del sistema angiopoyético (ANG) y de la vía del poliol y la cascada de eventos consecuentes.

Como se ha explicado en la diabetes a nivel general, el diacilglicerol neoformado a partir de la vía del poliol activa PKC aumentando la expresión de la citoquina vasoconstrictora endotelina 1 (ET-1), causando la muerte de los pericitos por isquemia.

De las isoformas conocidas de la familia PKC, el PKC- $\alpha$  aumenta la permeabilidad capilar retiniana, al fosforilar las proteínas de unión de las células endoteliales de la barrera hematorretiniana (favoreciendo los microaneurismas y el edema macular), esto estimula la angiogénesis y altera la contractibilidad vascular. Además, desempeña un papel muy importante como mediador de los factores de crecimiento vascular endotelial.

Hay estudios recientes sobre los elementos de la vía del poliol que demuestran que el aumento de AR se localiza en varias células de la retina como son los pericitos, células endoteliales de los capilares de la retina, células ganglionares, células de Müller, células epiteliales pigmentarias de la retina y neuronas, aumentando la destrucción de estas (Engerman et al, 1993). Pero también hay otros autores que proponen que la sorbitol deshidrogenasa tiene más importancia en el desarrollo de esta patología, ya que la sobreexposición conduce a la toxicidad de los pericitos a través del aumento de la producción de ERO.

Además, en este tipo de tejido al igual que en el riñón o endotelio, que son ricos en colágeno, hay un mayor daño tisular que en otros órganos provocado por la glicosilación de proteínas ya que la entrada de glucosa no está regulada por la insulina.

La angiopoyetina-1 (ANG-1) es un ligando activador del receptor endotelial tirosina quinasa (TIE-2) que promueve la supervivencia endotelial y la impermeabilidad de la BHR. El antagonista endógeno es ANG-2 al unirse al receptor promueve la angiogénesis con ayuda del factor de crecimiento endotelial (FCVE), e induce la vasorregresión en sitios donde este factor está disminuido.

Varios estudios han demostrado que la transcripción de ANG-2 se modifica por la acción de las vías bioquímicas inducidas por la hiperglucemia, conllevando a un aumento de la concentración de ANG-2. El equilibrio a favor de ANG-2 precede a que los pericitos migren de la retina diabética, quedando por tanto capilares acelulares degenerando a remanentes tubulares formados de lámina basal y no pudiendo, por tanto, ser perfundidos, conllevando a la hipoxia tisular local. Estos procesos conducen a la oclusión capilar. Esto al principio no tiene importancia clínica, pero a medida que progresa aparecen zonas de isquemia con la subsecuente producción de FCEV.

## **Alteraciones en el endotelio y disfunción endotelial**

Las distintas vías bioquímicas alteradas en la diabetes confluyen en el endotelio, originando una disfunción endotelial, siendo ésta la génesis de las lesiones de la retinopatía diabética. El endotelio es el principal órgano antitrombótico y regulador del flujo sanguíneo tisular del organismo. Además, en la vascularización retiniana es preciso considerar dos hechos adicionales: que los pericitos que juegan un papel modulador del funcionalismo endotelial (sirven de células nutricias, así como de *scavenger* metabólico y enlentecen la producción de factores de crecimiento vascular) y las células endoteliales son capaces de liberar factores de crecimiento vascular, cuya importancia se centra en la proliferación vascular, clave en el desarrollo de la RD.

Con respecto a la alteración de la activación antitrombótica, en el lecho vascular de la retina en pacientes diabéticos con retinopatía inicial, Boeri et al en 2001, demostraron la presencia de microtrombosis, con respecto a los ojos de sujetos no diabéticos. Por esa razón, el desequilibrio endotelial / plaquetas puede favorecer fenómenos isquémicos en la retinopatía diabética, un hecho que ha llevado a ensayos de fármacos antiagregantes para prevenir esta complicación (Berkowitz et al, 2015).

En cuanto a la regulación del flujo sanguíneo, las ET-1 son consideradas como uno de los factores causantes de la disminución de éste en la retina y de la proliferación endotelial, ya que, además de ser el principal subtipo de endotelina encontrado en ella, se ha demostrado que en animales diabéticos su actividad está aumentada y los factores que la inhiben disminuidos (Chakravarthy et al, 1997 y Chakrabarti et al, 1997, 1998).

Otro de los factores que desempeña un papel central en la regulación del flujo sanguíneo ocular es el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

El angiotensinógeno, gracias a la enzima renina (encontrada en el riñón) y a la enzima convertidora de angiotensina, (ECA), en el pulmón cataliza la angiotensina II [AII, (principal efector de este sistema)] que entra a la circulación general regulando a tensión arterial de forma sistémica. Pero hay estudios que revelan que todos los componentes del SRAA pueden ser encontrados en tejidos como el corazón, páncreas, retina y vasos sanguíneos entre otros, llamándose SRAA tisular y puede ser regulado independientemente del sistémico.

A la AII también se le conoce rol en las complicaciones diabéticas (como nefropatía diabética y retinopatía diabética) afectando al sistema vascular de cada

órgano a través del SRAA. Este péptido desempeña un papel importante en la fisiología vascular normal a través del receptor de la AII tipo 1 y parcialmente a través del receptor tipo 2. El funcionamiento anormal de este sistema está asociado a muchos trastornos visuales y está implicado en la patogénesis y desarrollo de la retinopatía diabética, ya que según varios estudios, la acción de la AII sobre sus receptores causa daños en la micro y macrocirculación, estimulando la producción de ET-1 y otros mediadores, como el activador de plasminógeno, induciendo además, la muerte de las células neuronales y gliales. (Andresen, et al 2004 y Foureaux, et al 2015).

Todas estas complicaciones implican isquemia, induciendo a los mecanismos de control de factores de crecimiento.

- Mecanismos de control de factores de crecimiento

Al causar la ET-1 isquemia, los pericitos responden produciendo factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) y éstos estimulan los receptores endoteliales subyacentes, pero los pericitos mueren antes de ejercer sus efectos a causa de las vías activadas por la alta concentración de glucosa, comenzando entonces las alteraciones histológicas.

El FCVE es el principal causante de neovascularización retiniana, formando nuevos vasos tras la isquemia.

Éste, pertenece a una gran familia de proteínas con capacidad angiogénica y mitogénica. Se produce en el epitelio pigmentario, en la capa neurosensorial, en los pericitos, y en la capa de músculo liso vascular. Desde las primeras fases de la retinopatía, la expresión del ARN mensajero (ARNm) del FCVE parece estar aumentado en el epitelio pigmentario de la retina.

Éste induce la proliferación de células endoteliales, favoreciendo la formación de nuevos vasos. Al mismo tiempo, el factor de crecimiento de fibroblastos indiferenciados en la retina se activa, y este factor actúa en sinergia con FCVE induciendo la formación de nuevos vasos en los que la matriz subendotelial es mucho más débil que en los vasos normales (Pe'er, et al 1998).

Ambos factores favorecen la expresión y la actividad de eNOS y iNOS, siendo el NO un factor limitante de la síntesis de FCEV, por lo que parece que es un

mecanismo de auto-control. Este equilibrio desaparece en la DM, favoreciendo como resultado, la formación de factores de crecimiento.

Sin embargo, los efectos de FCVE no se limitan sólo a la proliferación y la formación de neovasos, este factor también facilita la extravasación de fluido al líquido intersticial. Este proceso parece ser puesto en marcha por dos mecanismos (demostrado en las células endoteliales no retinianas): por un lado, la estimulación de iNOS conduciendo a la producción de grandes cantidades de NO, favoreciendo a su vez a la extravasación de fluidos intracelulares; y por otro, la formación de neovasos “defectuosos”, con espacios entre las células endoteliales, un proceso que puede dar lugar a canales intercelulares a través de los cuales los fluidos pueden fugarse (Roberts WG et al, 1995).

El FCVE también parece dañar la BHR mediante la inducción de la ICAM-1 (molécula de adhesión celular) y de la fosforilación rápida de la ocludina (proteína de unión hermética que asegura la integridad estructural y funcional de la BHR).

En resumen, la disfunción endotelial, a través de los desequilibrios bioquímicos que origina, se considera la causa fundamental de las lesiones de la retinopatía diabética. El déficit de su función antitrombótica (prostaciclina, NO, tPA) se une al estímulo del funcionalismo plaquetario y favorece fenómenos de isquemia, la reducción de los factores vasodilatadores (prostaciclina, NO) se une al estímulo de los vasoconstrictores endoteliales (ET) y plaquetarios (tromboxano A<sub>2</sub>), así como a la presencia de radicales libres, que tornan un tono vasodilatador en vasoconstrictor, y el estímulo de factores de crecimiento vascular (FCVE) favorecen la formación de neovasos como respuesta a una isquemia. Si unimos a estos desequilibrios el hecho de que muchos de estos factores favorecen la salida de líquido desde el interior de los vasos al intersticio retiniano, podemos dibujar un esquema fisiopatológico que explicaría diversas y complejas lesiones morfológicas que aparecen en pacientes diabéticos afectados de retinopatía diabética.

## Inflamación

En la retinopatía diabética, existe una inflamación de bajo grado caracterizada por la regulación positiva de varias moléculas de adhesión de células endoteliales (por ejemplo, ICAM-1, VCAM-1 y la selectina E) que causa la leucostasis y la disfunción de las células endoteliales (Jousen et al, 2001 y van Hecke et al, 2005). Estos eventos conducen a la inflamación y a la lesión de la pared vascular (Blake et al, 2001 y Pepys et al, 2003), con el acompañamiento de la expresión del vasoconstrictor ET-1 y del vasodilatador NO que refleja un tono vascular anormal (Schneider et al, 2002).

Hay estudios que han mostrado asociaciones de marcadores circulantes de inflamación [por ejemplo, proteína C reactiva (PCR), ICAM-1 y VCAM-1 solubles] con la retinopatía diabética, mientras que otros autores han demostrado una asociación entre los altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias y el desarrollo de la retinopatía diabética. Se ha demostrado de que los niveles séricos de receptores TNF solubles 1 y 2 se correlacionan con la prevalencia de retinopatía diabética (Kuo et al, 2012).

En los niños con diabetes mellitus tipo 1 (DM-1), aquellos que presentan retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) tuvieron niveles significativamente más altos de TNF circulante que aquellos sin retinopatía (Myśliwska et al, 2007). Otro estudio realizado en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 también mostró una asociación significativa entre los niveles séricos de TNF $\alpha$  y la retinopatía diabética proliferativa (RDP) (Gustavsson et al, 2008 y Hernández et al, 2015).

## Consecuencia disfunción endotelial en células neuronales

Los elementos neuronales se ven afectados desde etapas iniciales de la diabetes, manifestado en los potenciales oscilatorios del electroretinograma (ERG) que representan disfunción retiniana (Kizawa et al, 2006; Yonemura et al, 1962 y Whitmire et al, 2011).

El ERG graba la activación de las células fotorreceptoras que se extienden en la capa nuclear externa de la retina y la convierte en señales eléctricas que son después procesadas por el sistema de red sináptica en la capa nuclear interna.

La patogénesis de las células neuronales es iniciada por la hiperglucemia y EO que interrumpe la homeostasis del glutamato de la retina dando como resultado

excitotoxicidad, puesto que las células de Müller han sufrido cambios en su metabolismo perdiendo la capacidad para convertir el glutamato en glutamina por disminución de la expresión de la glutamino sintetasa. Estas células se originan a partir de una célula progenitora de la retina común con las células neuronales, por tanto, el daño de éstas también puede influir en la función visual.

Patológicamente, el aumento crónico de glutamato extracelular activa los receptores del glutamato (N-MDA), causando un flujo de calcio extracelular, traduciéndose en radicales libres y apoptosis celular.

Otros procesos fisiológicos que contribuyen a la muerte de las células de la retina son la activación de las células gliales y la función alterada de los factores neurotróficos, agravando el daño neuronal de la retina. La pérdida del apoyo trófico compromete la regeneración neuronal resultando en un aumento de susceptibilidad al daño y neurodegeneración patológica.

Los PFGs hacen que las células endoteliales expresen diferentes factores de adhesión y quimiotaxis a través de la generación de ERO intracelular. Estos también activan el factor nuclear kappaB (FNkB) y NADPH que aumentan la producción de ERO y apoptosis de neuronas en la retina (Ola et al, 2012 y Kaja et al, 2011).

#### 4. PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LA VASCULOPATÍA DIABÉTICA

Un radical libre (RL) es un átomo o molécula que en su orbital más externo posee uno o más electrones desapareados, situación energéticamente inestable, por lo que tiende rápidamente a reaccionar con otro átomo o molécula a fin de aparear su electrón y alcanzar la estabilidad. (Grisham et al, 1986). Cualquier molécula puede convertirse en un RL, no obstante, cuánto más pequeña sea, más capacidad de formación de RL posee. En este sentido, es el oxígeno el que con mayor frecuencia e importancia biológica lo realiza.

Estas sustancias, en condiciones fisiológicas, participan en la respuesta inflamatoria defensiva frente a procesos infecciosos o inflamatorios, pero en circunstancias patológicas, puede aparecer una excesiva proliferación de RL que puede conducir a la aparición de la aterosclerosis, el Alzheimer o la diabetes (Cruz et al, 2011 y Sies, 2007).

Un exceso de producción de RL puede dañar a cualquier estructura celular, ya sean las membranas (peroxidación lipídica), proteínas (polimerización anómala) o el núcleo celular (daño en la estructura del ADN). También se ha demostrado que la acumulación de RL descrito en la diabetes, puede originar glicación no enzimática de las proteínas (PFG) y acúmulo de sorbitol en las células endoteliales (De La Cruz et al, 2010). Las lesiones producidas por los RL pueden ser de muy diversa naturaleza, pero normalmente actúan por algún mecanismo de los siguientes (McCall et al, 1987):

- Captando un hidrogenión de una molécula.
- Introduciéndose el radical libre como tal en la molécula diana, siendo este, por ejemplo, el principal mecanismo del anión hidroxílico.
- Transfiriendo un electrón.

En los tejidos de los órganos diana de las complicaciones consecuentes de la diabetes mellitus, aumenta el EO, implicando así, la sobreproducción citoplasmática de ERO, y disminuyendo a su vez los antioxidantes endógenos, causando, por tanto, un aumento de los marcadores del EO como son los marcadores de la peroxidación lipídica.

### **Tipos de radicales:**

Radicales libres derivados del oxígeno: El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es esencial en la célula dado el papel que juega en la cadena respiratoria, pues es responsable de la producción de adenosíntrifosfato (ATP), requerido para todas las funciones celulares. Durante este proceso, se forman consecutivamente radicales libres derivados de oxígeno como productos intermedios en la cadena respiratoria.

Aunque la cadena respiratoria en las mitocondrias sea la principal fuente de radicales libres derivados del oxígeno en el organismo, existen otras reacciones de óxido-reducción localizadas en distintos orgánulos intracelulares y que son catalizadas por las enzimas NADPH reductasa, la xantino-oxidasa, la citocromo C reductasa y otras deshidrogenasas que también generan radicales. (Hernández-Rodríguez et al, 2014). Se forman por la autooxidación de glucosa y por cualquier de las vías bioquímicas descritas anteriormente, sobre todo por la vía de los polioles (Wolff et al, 1978). En este grupo tenemos: anión hidroxilo ( $OH^-$ ), radical perhidroxilo ( $HO_2^-$ ), oxígeno singular

(O<sub>2</sub>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), pero el más importante parece ser la hiperproducción de éste último por la cadena mitocondrial del transporte de electrones que provocan lesiones oxidativas vasculares.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> no son verdaderos RL, pero el H<sub>2</sub>O se encuentra en el centro de todas las reacciones de formación de las demás ERO y el segundo, aunque tenga en su orbital externo dos espines pueden ser contrarios o no paralelos y aparearse con otras moléculas.

Radicales libres derivados del nitrógeno (ERN): En este grupo está formado por óxido nítrico (NO<sup>-</sup>) y peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>). El peroxinitrito está formado a partir de la reacción:



El anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) es citotóxico porque inhibe la cadena de transporte electrónico mitocondrial, oxida los grupos tioles (-SH) de las proteínas, inicia la peroxidación lipídica sin el requerimiento de metales de transición y nitrosila aminoácidos como la tirosina formando la nitrotirosina (Berkowitz et al, 2015 y Wang et al, 2010), afectando a numerosas vías de transducción de señales.

Ésta es un biomarcador de estrés nitrosativo, implicado como mecanismo clave en la patología diabética. Afecta a las actividades enzimáticas, capacidades antioxidantes, la transducción de señales y la integridad del ADN.

#### 4.1. DAÑOS PRODUCIDOS POR LOS RADICALES LIBRES

En la retina el exceso de glucosa conduce a la autooxidación celular produciendo en esta reacción formación de aniones hidróxilo, al que hay que sumarle que la capacidad antioxidante en los diabéticos está disminuida. Este exceso de los radicales libres pueden dañar a cualquier estructura celular (en la membrana se produce peroxidación lipídica, en las proteínas polimerización anómala).

Estos aniones hidroxilos se pueden unir con moléculas de óxido nítrico dando lugar a otros radicales libres, los peroxinitritos que causan más daño que los aniones de hidroxilo.

Una vez formados los RL, éstos “atacan” a las principales macromoléculas de la célula, modificando su estructura y/o actividad y provocando una alteración general de los orgánulos celulares. De esta forma, las ERO peroxidan los ácidos grasos de las membranas biológicas, dañando a su vez la fluidez y permeabilidad, alterando además, la unión de enzimas y receptores de la membrana. Las ERN pueden nitrosilar diversas macromoléculas y alteran su estructura, como en el ADN, provocando junto con las ERO, rotura de la cadena de nucleótidos. Si hay un gran daño, la célula será incapaz de funcionar y morirá, por apoptosis o necrosis.

Cuando el “ataque” de los ERO superan a la defensa de los antioxidantes se produce el EO.

La aparición de la diabetes, el desarrollo de resistencia a la insulina y de las complicaciones tardías de la diabetes, están estrechamente asociados al EO, ya que la producción de las ERO se encuentra aumentada tanto en la DM1 como en la DM2, y en modelos experimentales. Las ROS contribuyen a la resistencia a la insulina, al interferir con las vías de señalización inducida por esta hormona y evitan la traslocación del transportador de glucosa GLUT 4 a la membrana plasmática. Se conoce parcialmente el mecanismo por el que contribuyen a las complicaciones de la diabetes y se piensa que actúan por la modificación oxidativa de macromoléculas y por la activación del factor de transcripción FNkB, conduciendo a la expresión alterada de genes. En concordancia con esta hipótesis, se ha encontrado que en pacientes diabéticos el empleo de antioxidantes como el ácido lipoico reduce la activación del FNkB (Díaz-Flores et al, 2004).

El exceso de glucosa origina la autooxidación de la misma, formando aniones hidroxílicos ( $\text{OH}^-$ ) —los radicales libres más reactivos de los que hasta el momento se conocen— capaces de producir daño en distintos tejidos y contribuir al establecimiento de las complicaciones tardías de la diabetes.

Estas acciones afectan a diversos tipos de moléculas:

- **PROTEÍNAS:** Los radicales libres originan la oxidación de los grupos sulfhidrilo. Por este motivo, proteínas ricas en aminoácidos del tipo metionina y cisteína ven totalmente anulados su funcionalismo. Entre las proteínas sometidas a un mayor riesgo de afectación por esta acción de los radicales libres se

encuentran la  $\alpha$ -1-antiproteasa, la calmodulina, la ATPasa-calciodependiente, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

- ÁCIDOS NUCLEICOS (fundamentalmente en la estructura del ADN): los radicales libres alteran la secuencia de azúcares-fosfatos que forman la cadena del ácido desoxirribonucleico directamente, o pueden unirse a bases púricas o pirimidínicas, convirtiéndolas en inestables y altamente reactivas (este es el caso del radical hidroxílico). Los radicales libres formados pueden perpetuar la reacción en cadena, así como inducir deleciones cromosómicas con la consiguiente aparición de mutaciones o muerte celular.
- MATRIZ EXTRACELULAR: los radicales libres provocan la fragmentación de los polipéptidos proteoglicanos e impiden la formación de las hélices de colágeno.
- LÍPIDOS DE MEMBRANA: originan la producción de peroxidación lipídica. Esta lesión destaca más sobre las anteriores por lo que se explicará más detalladamente.

La sobreproducción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno por la hiperglucemia mantenida de forma crónica es primordial en la patogénesis del daño endotelial en la diabetes mellitus. Las arterias de los animales diabéticos son más sensibles a los radicales libres que las de los animales sanos e igualmente ocurre con la retina, muy rica en membranas con lípidos poliinsaturados, que resulta muy sensible a los radicales libres oxigenados y a la peroxidación lipídica.

#### 4.1.1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

El principal daño que producen los radicales libres en la membrana plasmática es la peroxidación lipídica, la destrucción de la porción hidrofóbica o interna de la membrana de los ácidos grasos poliinsaturados, por oxidación de sus componentes, rindiendo en la reacción hidroperóxidos, en un sistema de propagación en cadena, en el que cuando aparece un radical libre, reacciona con un ácido graso de la membrana y lo

transforma en otro radical libre; el electrón pasa de unos ácidos grasos a otros, formando radicales libres lipídicos sucesivamente. El producto final de la peroxidación lipídica, malondialdehído (MDA), en los diabéticos tipo 1 y 2 está elevado, utilizándose como marcador de la peroxidación lipídica de los mismos.

Los radicales libres actúan sobre los ácidos grasos poliinsaturados, presentes en los fosfolípidos, para producir su peroxidación no enzimática. Los radicales más reactivos, fundamentalmente  $\text{OH}^-$ , captan protones de los residuos de carbono del ácido graso dejando un electrón desapareado que puede reaccionar con el oxígeno (fundamentalmente durante la reperfusión) para formar un radical peroxilo ( $\text{ROO}^-$ ), que a su vez es muy reactivo pudiendo llevar a cabo la peroxidación de otros ácidos grasos. La peroxidación de los lípidos de membrana también es iniciada por acción enzimática (activación de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa). Los peróxidos lipídicos son muy tóxicos para componentes celulares por sí mismos o a través de su descomposición en aldehídos, que tienen lugar por acción del calor o de iones metálicos (cobre y hierro).

Las membranas celulares están constituidas por una doble capa lipídica formada por fosfolípidos y proteínas; los fosfolípidos son por lo general ácidos grasos poliinsaturados y son los responsables de las propiedades fisicoquímicas de dicha membrana. Estos ácidos grasos se caracterizan por presentar gran cantidad de enlaces dobles, lo que los hace especialmente susceptibles a la acción de los radicales libres.

Como consecuencia de la afectación de las membranas en el proceso de peroxidación lipídica, se altera secundariamente el metabolismo en cascada del ácido araquidónico y el flujo iónico a través de la membrana.

Este proceso se desarrolla en tres fases:

- **Fase I o iniciación:** Las formas reducidas parciales del oxígeno, sobre todo el radical hidroxílico, un radical hiperóxido, o cualquier otra especie reactiva, extrae un hidrógeno de la zona hidrofóbica del ácido graso poliinsaturado (PUFAs) y se une por doble enlace (más inestable) a un átomo de carbono vecino. El producto formado en esta reacción es el llamado “radical lipídico”. Esta reacción se localiza por lo general a nivel del ácido linoleico o el ácido araquidónico (Ekstron et al, 1986 y McCall et al, 1987).

- **Fase II o propagación:** Cadena de reacciones en cadena a partir de la anterior a moléculas próximas. El radical lipídico es muy reactivo y puede interaccionar con otro radical de ácido graso o ligarse a proteínas de membrana mediante reacción de unión cruzada si se ha producido en el interior de la membrana biológica (Comporti et al, 1985; Ritcher et al, 1987; Nikiy et al, 1991 y Seppi et al, 1991). Al reaccionar el radical lipídico con el oxígeno en un medio suficientemente rico en este elemento forma el radical perhidroxilo (Emeryt et al, 1986).

Este radical para volverse más estable, puede sustraer un ion hidrógeno de una molécula vecina provocando la conversión de esta molécula en un nuevo radical libre (Gotto, 1979 y Emeryt et al, 1986). Esta especie puede, en presencia de iones metálicos como el ion férrico ( $Fe^{++}$ ) convertirse en el radical alcoxilo, (Scraitch et al, 1992) de naturaleza más lesiva que el radical hidroxilo. Éste puede reinicializar el proceso, perpetuando de esta forma la reacción en cadena e incrementando el daño en la membrana, en un proceso que recibe el nombre de auto-oxidación lipídica (Emeryt et al, 1986).

- **Fase III o terminación:** Esta reacción se produce cuando el radical lipídico o el hidroperóxido lipídico son desactivados (McCall et al, 1987). Las organelas que se afectan con mayor intensidad son los lisosomas y las mitocondrias. La descomposición a nivel de la membrana lisosomal provoca la liberación de las enzimas lisosomiales, lo que potencia aún más el daño provocado por los radicales libres (Porter et al, 1984).

A nivel mitocondrial, el daño de la membrana altera el sistema enzimático de la citocromo-oxidasa con la consiguiente perturbación del metabolismo energético celular.

Como consecuencia de esta afectación de las membranas en el proceso de la peroxidación lipídica, se altera secundariamente el metabolismo en cascada del ácido araquidónico y el flujo iónico a través de la membrana.

#### 4.1.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RETINA

Unas células especialmente susceptibles a la peroxidación lipídica son las del sistema nervioso central, por la importancia relativa de los ácidos grasos que integran sus membranas.

Hay datos recientes que sugieren que, siguiendo algún mecanismo menos ordenado que el suicidio celular, el estrés oxidativo (posiblemente mediado por el anión tóxico peroxinitrito) podría ser capaz de activar la muerte de las células nerviosas por apoptosis.

El estrés oxidativo inducido por la diabetes se cree que es el factor central del daño de la retina. La diabetes produce un desequilibrio redox mediante la activación de enzimas como NADPH, xantina oxidasa y NOS que producen ERO y ERN y mediante la reducción de actividad superóxido dismutasa, catalasa y el nivel de antioxidante glutatión endógeno en la retina.

En la retina también se produce la peroxidación, por tanto, aumenta el EO que activa factor nuclear Kappa B (FNkB) que es responsable de la regulación positiva de citoquinas proinflamatorias, enzimas antioxidantes y proteínas pro-apoptóticas dañando la retina.

Las ERO están relacionadas con la actividad neuronal sobre la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), ya que su concentración disminuye en la diabetes, debido a que los peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) inhiben la señalización de la cascada del FNDC. Este factor es una proteína que regula el crecimiento axonal y la actividad sináptica, así como la supervivencia neuronal de la retina. Por tanto al disminuirse la concentración afecta, al menos en parte, la supervivencia (Ali et al, 2008).

Además, el aumento de los aniones superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) conduce a la disminución de la biodisponibilidad de ON, que originalmente es inducido en la retina para la protección de tejidos, para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).

Según Bruce A. Berkowitz et al, el principal tipo de células afectadas por este estrés oxidativo no son las células endoteliales, sino las células fotorreceptoras.

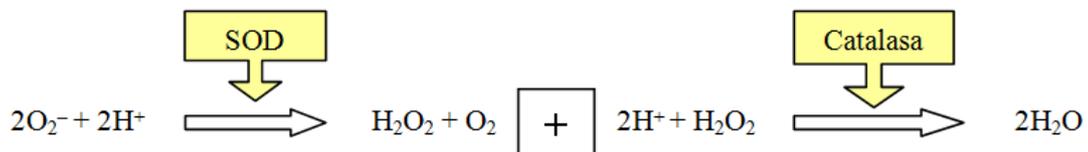
## 5. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Para contrarrestar el efecto pernicioso de los radicales libres de oxígeno existe en los sistemas biológicos una gran diversidad de sustancias, de naturaleza enzimática (superóxidodismutasa-catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y NADPH) y no enzimáticas, que constituyen los denominados sistemas de defensa antioxidante.

### 5.1. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICAS

#### a. SUPERÓXIDO DISMUTASA-CATALASA

Este sistema antioxidante actúa en base a dos reacciones. El anión superóxido (formado por la unión de un electrón a la molécula de oxígeno) puede reaccionar rápidamente con moléculas orgánicas y producir un daño reductor al liberarse del electrón sobrante, pero este sistema facilita el paso de este anión a agua en dos pasos: la enzima superóxidodismutasa (SOD), en presencia de protones, facilita el paso de dicho anión a peróxido de hidrógeno acelerando 10 veces la dismutación espontánea del anión. El peróxido de hidrógeno formado en la reacción anterior puede dar lugar a radicales libres muy reactivos (como se ha explicado anteriormente), por tanto la enzima catalasa lo degrada formando agua:



La catalasa está presente en el citosol, en las mitocondrias y en otros gránulos, encontrándose en concentraciones bajas o ausentes en el plasma. La vida media de esta enzima, al igual que la de la SOD, es muy corta, por lo que deben ser fabricadas continuamente para mantener su concentración plasmática.

#### b. SISTEMA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA

El glutatión —GSH (forma reducida) o GSSG (forma oxidada) — es uno de los sistemas detoxificadores más importantes que posee el organismo: cuantitativamente es el que mayor peso específico tiene.

El glutatión es un tripéptido formado por ácido L-glutámico, L-cisteína y glicina. Se trata de una molécula cuya cisteína contiene un grupo tiol (-SH) que la hace idónea para atenuar el efecto de los radicales libres, por lo que es empleado como cofactor esencial en diversos sistemas enzimáticos (aunque no debe considerarse un coenzima propiamente dicho).

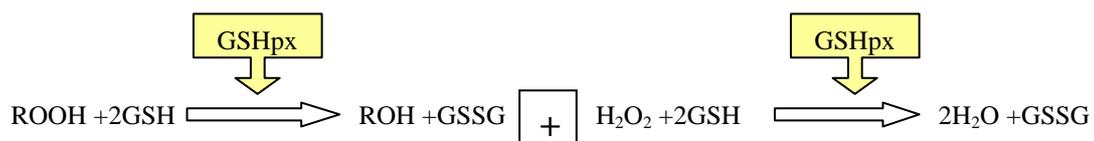
El glutatión se encuentra prácticamente en todas las células del organismo, siendo sintetizado mayoritariamente por el hígado. Un claro ejemplo de su acción lo constituye la glutatión peroxidasa unida a la membrana, que reduce los hidroperóxidos fosfolipídicos. La concentración más elevada del organismo corresponde al cristalino, para proteger de la oxidación producida por la radiación solar.

El glutatión juega un papel crítico en muchos procesos biológicos, tanto de manera directa, actuando de cofactor de algunas reacciones enzimáticas, como de forma indirecta, comportándose como el principal tampón en las reacciones de óxido-reducción tiol-disulfido de las células de los mamíferos. También nos provee de un sistema crítico para la defensa y protección celular ante diversas formas de estrés.

Para que el glutatión realice su acción como principal antioxidante intracelular en respuesta a especies reactivas de oxígeno es requisito indispensable que mantenga su forma reducida (GSH), por acción de la glutatión reductasa, sobre la forma oxidada (GSSG), lo que requiere del consumo de NADPH. Esta disminución de los glutatión reducido significa una menor respuesta protectora contra el estrés oxidativo.

Son varios los sistemas enzimáticos que han aprovechado el enorme potencial reductor de este tripéptido: glutatión peroxidasa, glutatión transferasa y glutatión reductasa.

La glutatión peroxidasa cataliza la oxidación del glutatión reducido (GSH), que se transforma en glutatión oxidado (GSSG) a expensas de hidroperóxidos (ROOH) y de peróxido de oxígeno:



Está localizada en el citosol de las células, pudiendo reducir tanto  $H_2O_2$  como otros peróxidos orgánicos libres, por ejemplo los peróxidos de ácidos grasos. El sitio activo de la glutatión peroxidasa contiene un residuo de un aminoácido poco frecuente, la selenocisteína (análogo de la cisteína en la que el selenio sustituye al azufre).

Otras enzimas relacionadas pero de menor importancia son la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, que contribuyen al sistema defensivo antioxidante, proporcionando GSH para la actividad glutatión peroxidasa la primera y NADPH para la actividad glutatión reductasa la segunda. La localización de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa es idéntica a la de la glutatión peroxidasa, mientras que la glutatión reductasa es citosólica y mitocondrial. (Gotgreave et al, 1988 y Davies et al, 1990).

Estos sistemas antioxidantes son insuficientes cuando los radicales libres se producen en gran cantidad, como en la exposición a la radiación ionizante, infecciones, determinadas toxinas y en la isquemia tisular, sobre todo si ésta se sigue de reperfusión. En estos casos los radicales libres son un importante mecanismo productor de daño tisular, siendo uno de los principales órganos diana la fracción lipídica de la membrana tisular.

En total, hay evidencia de que las estrategias de neuroprotección y antioxidantes son capaces de beneficiar a los pacientes con retinopatía diabética. Dado el potencial de la suplementación antioxidante y neuroprotector para frenar la progresión de la RD, nuevos ensayos clínicos deben incluir terapias de combinación.

Los antioxidantes parecen mejorar la disfunción endotelial en la diabetes por el re-acoplamiento de eNOS y la función mitocondrial.

## 5.2. CLASIFICACIÓN ANTIOXIDANTES NATURALES NO ENZIMÁTICOS

Se ha demostrado que muchas enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, enfermedades oculares, etc, son el resultado del estrés oxidativo a largo plazo. Los antioxidantes tienen un papel importante en la protección contra el daño oxidativo y entre estos vamos a destacar los siguientes:

### **Flavonoides:**

Los flavonoides tienen potentes actividades antioxidantes que juegan un papel protector en las enfermedades mediadas por estrés oxidativo, como es la diabetes (Rice-Evans et al, 1998; Pandey et al, 2009; Babu et al, 2013 y Liu et al, 2013). Sin embargo, no se sabe mucho acerca del papel de flavonoides en la retina diabética, especialmente a la protección de las neuronas.

Sasaki et al en 2010 sugiere que la suplementación con luteína flavonoide de roedores diabéticos mejoró el estrés y la neurodegeneración oxidativa e impidió el deterioro del electroretinograma en la retina diabética.

Entre los flavonoides, el más abundante es el glucósido quercetina, que se encuentra en distintos alimentos, incluyendo cebollas, manzanas, el té y el vino tinto (Havsteen, 1983).

Otro flavonoide importante es la rutina o rutósido, por su capacidad de eliminar los radicales libres y para inhibir la peroxidación de lípidos, evitar el estrés oxidativo inducido por la estreptozotocina (STZ) y protege las células beta del páncreas conduciendo a una mayor secreción de insulina y disminución de los niveles de glucosa en sangre. Este glucósido reduce eficazmente el aumento de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico e hidroperóxidos en diabetes. (Kamalakkannan et al, 2006).

### **Licopeno:**

El licopeno es un tipo de carotenoide, que se encuentra abundantemente en los tomates y productos de tomate. Tiene una alta capacidad antioxidante y acción anti-radicales libres. Visioli et al en 2003 demostraron que la ingesta de tomates y productos de tomate fortalece el sistema antioxidante, e inhibe la peroxidación de lípidos en los seres humanos.

### **Carnosina:**

La carnosina, un dipéptido de origen natural producido principalmente en el músculo esquelético y el sistema nervioso central actúa como un eliminador de ERO y un inhibidor de la producción de PGF (Boldrev et al 2004 e Hipkiss et al, 2002). La

carosina se sintetiza a partir E-alanina y la histidina y es específicamente degradada por el suero de carosinasa.

La carosina es uno de los antioxidantes más abundantes en el cerebro, y en la retina, donde está presente tanto en neuronas como en la glía (sobre todo en células de Müller) (Fleisher-Berkovic et al 2009 y Kusakari et al, 1997). A medida que el dipéptido inhibe la síntesis de mediadores inflamatorios y de estrés oxidativo microgliales, se demuestran su implicación en la prevención de la muerte celular por apoptosis neuronal.

### **Polifenoles:**

Los polifenoles son antioxidantes y se encuentran en los alimentos vegetales, explicando potencialmente los efectos beneficiosos del alto consumo de verduras y frutas. La característica común de todos los polifenoles, la presencia de grupo (s) fenolichidroxilo (s), es la base de su actividad antioxidante in vitro e in vivo.

Numerosos estudios observacionales ha examinado la asociación entre la ingesta de alimentos ricos en polifenoles (cebollas, manzanas, té, cacao, vino tinto) y enfermedades crónicas.

#### - Isoflavona

Las isoflavonas son un tipo de flavonoides que se encuentran en plantas leguminosas como la soja (*Glycine max*) y kudzu (*Pueraria lobata*). Las isoflavonas típicas incluyen genisteína, daidzeína y puerarin (el 8-C-glucósido de daidzeína). Las isoflavonas son conocidas como fitoestrógenos y tienen actividad parecida a los estrógenos cuando se administran a mamíferos. Aunque investigaciones recientes sugieren que los mecanismos funcionales de las isoflavonas y los estrógenos son diferentes (Fritz et al, 2013). La genisteína actúa como un antioxidante y puede reducir la lesión de tejido relacionado con radicales libres (Han et al, 2009). De acuerdo con algunos autores, la actividad de eliminación de radicales por la genisteína, la tasa de captación de ERO es similar a la del glutatión y tiene capacidad de extracción de oxígeno singular (Sueishi et al, 2014). La genisteína mejora la expresión de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa.

Las isoflavonas también están asociadas con un efecto antidiabético. Por ejemplo, las isoflavonas redujeron el riesgo de padecer diabetes en las mujeres. Según el estudio epidemiológico en Corea, la concentración plasmática de genisteína se correlacionó con la disminución del riesgo de diabetes tipo 2 en mujeres (Ko et al, 2015).

#### - Resveratrol

El resveratrol (3, 4', 5-trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina que pertenece a la clase de compuestos estilbeno, abundante en muchas plantas, como maní, arándanos, piñones y uvas, donde se acumula principalmente en forma glicosilada y es sintetizada en respuesta a la infección por hongos ya algunas tensiones ambientales como el clima, la radiación ultravioleta y el ozono (Harikumar et al, 2008).

La variedad de mecanismos moleculares mediados por este compuesto se traduce en un aumento de acciones biológicas, principalmente, efectos antioxidantes y anti-inflamatorios. El resveratrol es un buen antioxidante y bloquea la oxidación *in vitro* de LDL. (Khurana et al., 2013). En los roedores, se ha demostrado que el suplemento con resveratrol disminuye el factor de riesgo cardiovascular, incluyendo los lípidos sanguíneos y la VCAM-1.

Resveratrol, así como sus derivados, presentan un amplio abanico de propiedades biológicas y farmacológicas:

- Atraviesan la barrera hematoencefálica y muestran capacidad neuroprotectora en varios modelos experimentales *in vitro* y de neurotoxicidad en animales (Basliet al. 2012).
- Actúan reduciendo el nivel de A $\beta$  mediante la inducción de la degradación de la proteasa del péptido en la enfermedad de Alzheimer (Riviére et al, 2007).
- Han demostrado un efecto anticancerígeno. Inhiben el crecimiento tumoral en animales de experimentación y en cultivos celulares mediante la alteración de la actividad de determinadas enzimas y la expresión de genes específicos (Heet et al, 2008).

- Estudios epidemiológicos demuestran que un consumo moderado de vino está asociado a un efecto antitrombótico reduciendo el riesgo cardiovascular asociado (De Gaetano et al, 2002).
- Mejora el control de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en pacientes diabéticos, pero no afecta los valores glucémicos en sujetos no diabéticos. (Liu et al, 2014).

- Epigallocatequina:

El galato de epigallocatequina del té verde se ha demostrado que tienen propiedades neuroprotectoras en la retina (Silva et al, 2013), aunque sólo en dosis moderadas (Mustata et al, 2005).

- Los polifenoles del aceite de oliva virgen extra se comentarán en el punto siguiente por ser tema central en esta revisión.

## 6. DIETA MEDITERRÁNEA

Los estudios epidemiológicos han demostrado que las personas de la cuenca mediterránea disfrutan de un estilo de vida saludable con disminución de la incidencia de enfermedades cardíacas (Covaset al, 2006), el cáncer de próstata y colon (Tuck et al, 2002 y Owen et al, 2004), y la artritis reumatoide (Wahle et al, 2004). Una de las posibles razones es que la población que vive en la cuenca del Mediterráneo consume de forma moderada el aceite de oliva y aceite. Entre todos los antioxidantes naturales conocidos, los polifenoles contienen la mayor actividad antioxidante.

Uno de ellos, el hidroxitirosol (HT), es abundante en las aceitunas (especialmente aquellos que no se han sometido al proceso de salado español), y aceite de oliva virgen, que ha sido ampliamente utilizado en Europa, especialmente en la dieta mediterránea. Los estudios han demostrado que el HT, que se absorbe en el intestino después de la administración oral, es un antioxidante eficaz incluso en la fase postprandial (Manna et al, 2000). HT ejerce varios efectos en la salud (Tuck et al, 2002), por ejemplo, el extracto de agua de oliva con alto porcentaje de HT, se relaciona con el

aumento de la capacidad antioxidante del plasma y reduce el efecto de los radicales libres (Manna et al, 1999; Visoliet, 2002 y Stupanset al, 2002).

Según la Fundación de Dieta Mediterránea, ésta es un estilo de vida equilibrado que no sólo recoge los alimentos, sino también recetas, formas de cocinar, costumbres, productos típicos y actividades humanas diversas. En ella destacan numerosas propiedades beneficiosas para la salud como el tipo de grasa que lo caracteriza (aceite de oliva, pescado y frutos secos), proporciones adecuadas de los nutrientes principales en sus recetas (cereales y vegetales como base de los platos y carnes) y riqueza en micronutrientes.

Las recomendaciones propuestas por esta fundación son:

1. Utilizar el aceite de oliva como principal grasa de adición, ya que es rico en vitamina E, beta-carotenos y ácidos grasos monoinsaturados.
2. Consumir abundante alimentos de origen vegetal: frutas, verduras, legumbres, champiñones y frutos secos, son la principal fuente de vitaminas, minerales y fibra de nuestra dieta.
3. Aporte diario de pan y alimentos procedentes de cereales (arroz y pasta preferentemente integral), aportan parte importante de energía.
4. Los alimentos más adecuados son los pocos procesados, frescos y de temporada pues se consumen en su mejor momento por la aportación de nutrientes y por aroma y sabor.
5. Consumir diariamente productos lácteos, principalmente yogurt y queso, ya que son una gran fuente de proteínas de alto valor biológicos, minerales (calcio, fósforo, etc.) y vitaminas, y además, al ser fermentados se asocian a una serie de beneficios para la salud por contener microorganismos vivos.
6. Consumir con moderación la carne roja y preferentemente como parte de guisos
7. Consumir abundante pescado (el tipo azul una o dos veces a la semana, ya que sus grasas, aunque de origen animal, son muy similares a las de origen vegetal) y huevos con moderación (alimento rico en proteínas)
8. Dulces y pasteles deben ser consumidos de forma ocasional.
9. Beber abundante agua y vino tomarlo con moderación y durante las comidas
10. Muy importante la actividad física, que debería realizarse todos los días, ya que es tan importante como comer adecuadamente.

Estas recomendaciones se estipularon a partir del estudio PREDIMED (*Efecto de la dieta tipo mediterránea en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular*), que fue desarrollado entre más de 200 centros de salud de todo el país durante tres años, verificó las propiedades preventivas de la dieta mediterránea en personas con factores de riesgo cardiovascular. En dicho estudio (Ramón Estruch, M.D, et al, 2013) se estudiaron alrededor de 7.500 pacientes con riesgo coronario repartidos en tres grupos, observándose el efecto que en ellos producen el aceite de oliva (1l por semana) y frutos secos [30 g diarios de avellanas, nueces y almendras son ricas en ácido fólico, ácidos grasos esenciales (como el  $\alpha$ -linolénico) y vitamina E] contrastándose con un grupo control de dieta baja en grasa propuesta por “American HeartAssociationguidelines”.

Los resultados obtenidos fueron una intervención con una Dieta Mediterránea tradicional suplementada con Aceite de Oliva Virgen Extra y Frutos Secos reduce en un 30% la incidencia de complicaciones cardiovasculares mayores (muerte de causa cardiovascular, infarto de miocardio y accidente vascular cerebral).

## 6.1. ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva es un alimento energético que aporta 9kcl/g proveniente de los ácidos grasos, de los cuales el ácido oleico representa el 68-81,5% (Lozano et al, 2010), considerándose por ello el AOV como una grasa monoinsaturada. Pero más allá de su valor energético, presenta efectos beneficiosos sobre las personas que lo consumen, convirtiéndose así, en un alimento funcional.

Su composición varía dependiendo de diversos factores, como la variedad de la aceituna, grado de maduración, condiciones agronómicas y características tecnológicas de la producción, además de sus características físicas, químicas y organolépticas (Ruiz-Domínguez et al, 2013), pero la principal característica que lo diferencia de los demás aceites, es el alto índice de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), y antioxidantes.

### 6.1.1. COMPONENTES BIOACTIVOS DEL AOV

El AO está compuesto por dos fracciones, una fracción saponificable y otra insaponificable. La fracción saponificable representa más del 98%, comprende ácidos grasos, que pueden ser saturados (AGS) e insaturados (AGI). Éstos últimos pueden ser monoinsaturado (ácido oleico) y poliinsaturados (ácido linoleico y linolénico). Y la fracción insaponificable, el 2% restante, forma más de 230 compuestos químicos, derivados de los ácidos grasos (fosfolípidos, ceras y ésteres de esteroides) y los no derivados (hidrocarburos, alcoholes alifáticos y triterpénicos, esteroides libres, ceras, compuestos volátiles y antioxidantes) (Muniz, 2009 y Servili et al, 2013).

La mayor parte de estos ácidos grasos del AO están esterificados a una molécula de glicerol, formando los triacilglicéridos o triglicéridos, aunque también están presentes en un porcentaje minoritario formando parte de mono y diglicéridos, fosfátidos y ácidos grasos libres.

Los compuestos más importantes del AOV para la salud de las personas, son el escualeno (hidrocarburo), ácido oleico y los fenoles (antioxidante).

El ácido oleico (18:1n9) es el componente principal de los ácidos grasos monoinsaturados y de la fracción saponificable. Presenta propiedades cardiosaludables al disminuir la concentración de colesterol LDL en sangre y la oxidabilidad de lipoproteínas de baja densidad, comparado con las grasas saturadas (Visser et al, 2001). Otros ácidos grasos son palmítico, esteárico, linoleico, linolénico y  $\alpha$ -ácidos (Servili et al, 2013).

Se ha demostrado que el ácido oleico juega un papel en la prevención del cáncer (Giacosa et al, 2013), aunque la posibilidad de que éste fuese un efecto secundario de los ácidos grasos en la estabilidad del aceite o un efecto anticancerígeno directo, sigue siendo discutible. Los datos relativos a los beneficios en la salud del ácido oleico son contradictorios. La preferencia hacia la última teoría se basa en el hecho de que aunque se encuentra en alta concentración en el aceite de oliva, también se encuentra en niveles relativamente altos en los productos alimenticios que forman una parte importante de las dietas de países no mediterráneos, aunque en estos países la incidencia no es tan baja con respecto a la enfermedad cardiovascular y de ciertos tipos de cáncer.

El escualeno es un hidrocarburo triterpénico, uno de los compuestos principales de la fracción insaponificable, importante precursor bioquímico de la biosíntesis de los

esteroles. Se encuentra en plantas y animales pero las cantidades pueden llegar a ser muy diferentes. Mientras que el aceite de oliva está compuesto de aproximadamente un 0,7% de escualeno, otros alimentos y aceites suelen estar en el rango de 0,002-0,03% (Waterman et al. 2007).

Los componentes fenólicos, principal antioxidante junto con los carotenos, están relacionados con las propiedades saludables del AO y están asociados con la estabilidad de la oxidación y sabor característico de AOV. El contenido de estos componentes en el AO varía dependiendo de la variedad de la aceituna, el clima, la maduración en la cosecha, el sistema de tratamiento utilizado y las condiciones de almacenamiento (Di Giovacchino et al, 2002 y Servili et al, 2007).

La concentración de estos compuestos varían entre los frutos y aceites de las variedades *Arbequina*, *Cornicabra*, *Morisca*, *Picolimón*, *Picudo* y *Picual* a tres índices de maduración diferentes (verde, envero y negra) (Gómez-Rico et al, 2008).

El estudio PREDIMED asoció una menor incidencia de eventos cardiovasculares en personas que habían consumido AOV, así como una mejora en la capacidad cognitiva de pacientes ancianos con factores de riesgo cardiovascular (Martínez-González et al, 2015).

Históricamente, los efectos beneficiosos para la salud del AO se le atribuía al ácido oleico (Hannachi et al, 2008). Sin embargo, otros aceites de semilla como: girasol, soja y colza contienen altas cantidades de grasas monoinsaturadas y son ineficaces en el riesgo de enfermedades crónicas (Di Vaio et al, 2013 y Vinha et al, 2005).

Por tanto, nuevas investigaciones se centraron en las propiedades de otros componentes del AOV, como los compuestos fenólicos.

## COMPUESTOS FENÓLICOS

La proporción fenólica del AOV, única en este aceite, consiste en una mezcla heterogénea de componentes, presentes en el mesocarpio de la aceituna que afectan frente a la estabilidad de la oxidación, sabor y aroma del aceite obtenido del fruto. La concentración total puede variar entre 50 y 200mg/kg de aceite, pero se pueden encontrar algunos con hasta 1000mg/kg. El contenido en compuestos fenólicos del aceite depende de la variedad cultivada y del grado de madurez de las aceitunas en el

momento de la recogida; es decir, la concentración de hidroxitirosol, tirosol y luteolina se incrementa proporcionalmente al grado de madurez de los frutos, mientras que la cantidad total de compuestos fenólicos y de  $\alpha$ -tocoferol disminuye cuanto más madurez presentan las aceitunas.

Estudios recientes evidencian el importante papel de los compuestos fenólicos en la salud vascular y la prevención de enfermedades derivadas de la disfunción de los vasos sanguíneos. La publicación del proyecto EUROLIVE (Cicero et al, 2008) demostró que el incremento de los niveles de colesterol HDL y la disminución de los niveles de colesterol LDL tras el consumo de aceite de oliva virgen se relacionaba directamente con su contenido de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos, a bajas concentraciones, como se ha comentado anteriormente, funcionan como antioxidantes. Esta propiedad es beneficiosa tanto para el alimento en sí, como en el organismo después de haberlo ingerido, ya que en ambos casos evitan la oxidación de otros componentes importantes del alimento o de las células del cuerpo humano. Esta actividad antioxidante está relacionada con el efecto que se le atribuye a los fenoles como antiarterioescleróticos, cardioprotectores, neuroprotectores, antiinflamatorios, antimutagénicos, anticarcinogénicos, moduladores hormonales, protectores endoteliales, protectores del sistema inmunológico, antialérgicos y antidiabéticos (Cicerale et al., 2010; Han, Shen, & Lou, 2007). Hoy en día, se considera el aceite más saludable frente al resto de aceites vegetales gracias a la presencia de estos compuestos fenólicos (Visseret al, 2001).

- **Efecto vasodilatador:** proporcionan una adecuada producción y biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) (Zenebe et al, 2003).

-**Efectos antilipémico y antiaterogénico:** mejoran el perfil lipídico, disminuyen los niveles de triglicéridos, ácidos grasos libres y apolipoproteína B, aumentan el cociente colesterol- HDL/colesterol-LDL en plasma y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

**-Efecto antitrombótico:** inhibición de la función plaquetaria, muy relacionada también con la inflamación, al inhibir la acumulación de enzimas implicadas en la síntesis de eicoisanoides, como el Tromboxano A<sub>2</sub> (Murphy et al, 2003), la producción de moléculas pro-inflamatorias y la actividad de la lipoxigenasaaraquidonato (González-Correa et al, 2009 y 2008).

**-Efecto antiinflamatorio:** inhibición de las enzimas COX y lipooxigenasa (LPO), reducción de la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, modulación y mejora de los mediadores inflamatorios, como el NO y las citoquinas (Fan et al, 2008; Bernini et al, 2013 y Richard et al, 2011).

**-Efecto apoptótico y antiapoptótico:** poseen actividad inhibidora de la apoptosis inducida por la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yamagishi et al, 2002) y modulan el nivel de expresión de distintos factores proapoptóticos (Delmas et al, 2011).

**- Efecto antioxidante:** pueden directamente neutralizar especies reactivas de oxígeno como el anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, evitando la formación de los radicales libres producidos por la reacción de Fenton (Quiñones et al, 2012).

Los compuestos fenólicos del AOV sólo aparecen en el aceite crudo, eliminándose, por ejemplo, en el proceso de refinación. Se distinguen entre fenoles hidrofílicos como alcoholes y ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y secoiridoides, mientras que los fenoles lipofílicos, incluyen a los tocoferoles.

Gracias a la presencia de estos compuestos fenólicos, el AOV hoy en día se considera el aceite más saludable del resto de los aceites vegetales (Visser et al. 2001).

Los principales responsables de la estabilidad oxidativa del aceite son los alcoholes fenólicos, entre ellos, hidroxitirosol (forma aldehídica y dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína) y el tirosol (Gutiérrez-Rosales et al. 2012), entre otros, motivo por el que generalmente se han centrado los estudios en estos dos compuestos fenólicos específicos, además, los compuestos secoiridoides principales en la aceituna

son oleuropeína y ligustrósido, que son formas glucosiladas de ésteres del ácido elenólico con 2- (3,4-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol) y 2- (4-hidroxifenil) etanol (tirosol), respectivamente (Ghanbari et al, 2012 y Soler-Rivas et al, 2000).

También, gran parte de los derivados secoiridoides presentes en el AO, son transformados a tirosol e hidroxitirosol durante la digestión. Estos compuestos se absorben en el intestino y sus metabolitos son posteriormente detectados en el plasma sanguíneo (Fitó et al, 2007 y Rubió et al, 2012).

Por tanto, la ingesta dietética de los polifenoles del AO puede reducir el riesgo de enfermedades mediadas por ROS y explicar el efecto beneficioso de la Dieta Mediterránea sobre la salud humana (Antonio Moreno et al, 2003).

### Hidroxitirosol

El hidroxitirosol (HT) (figura 8), es un polifenol que se encuentra en diversas fuentes naturales, especialmente en el olivo, pudiéndose obtener también de la hidrólisis de la oleuropeína. El contenido de HT es superior en las hojas que en los frutos del olivo, por lo que puede ser extraído con mejores rendimientos a partir de extractos metanólicos de la hoja (Ryan et al, 2003). Químicamente el HT es un orto-difenol. Su fórmula molecular es  $C_8H_{10}O_3$ , y su peso molecular es 154,166 g/mol y su contenido en aceites varía de un tipo a otro.

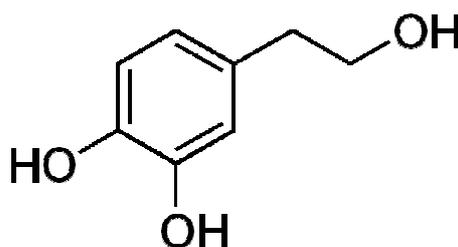


Figura 8. 3,4-dihidroxifeniletanol (Hidroxitirosol)

En su forma pura es un líquido transparente e inodoro. El HT se encuentra en el AOV extra bien en forma libre o en forma de éster, contribuyendo en un 70 - 80% a la fracción fenólica total (Ruiz, 2013).

A nivel mundial, la cantidad de polifenoles en el AO oscila entre 200 y 1000 mg/kg, dependiendo de la variedad y las prácticas agrícolas. Por lo tanto, la dosis diaria

para HT (que combina el volumen de AO y la cantidad de polifenoles) no podrá exceder de 7 mg/kg/día (Rodríguez-Morató et al, 2015).

Un grupo de investigadores del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Sevilla), ha desarrollado un sistema de aislamiento y purificación de HT, a escala industrial, a partir de subproductos de la fabricación de aceitunas de mesa o del aceite, utilizando agua de lavado, hueso de aceituna, alpechín y alperujo, que son mezclas de agua y sólidos residuales de la obtención de AO (protegido bajo patente) y por lo tanto, más económico. Este HT puede tener una pureza de hasta el 95% (Fernández-Bolaños et al, 2005).

La principal actividad del HT se basa en sus propiedades antioxidantes lo que posiblemente incluya su uso como aditivo alimentario para estabilizar alimentos funcionales ricos en los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3.

#### Propiedades de hidroxitirosol:

HT ha demostrado un gran número de propiedades beneficiosas para la salud, entre ellas actividad antimicrobiana, antihipertensiva, hipoglucémica, antiagregante plaquetaria, cardioprotectora y antiinflamatoria (Visioli et al, 2002a; Tuck et al, 2002a; Bianco et al, 2006; Covas et al, 2006a y b; Bendini et al, 2007; Reyes et al, 2013 y Covas et al, 2015), además de inhibir la proliferación y promover la apoptosis en numerosas líneas celulares tumorales humanas (Fabiani et al, 2009).

- Antiaterogénica y cardioprotectora

El HT tiene propiedades antiaterogénicas gracias a su poder antioxidante. Neutraliza radicales libres como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, etc. Además, posee efecto quelante sobre el catión hierro, hecho que previene la formación de ERO. Esta característica es responsable del efecto en la aterosclerosis, caracterizado por la entrada de lipoproteínas de baja densidad (LDL-ox) en el interior de la íntima arterial. Es capaz de prevenir la oxidación de estas lipoproteínas por macrófagos (Fito et al, 2007), ya que aumenta la capacidad antioxidante de estas células relacionadas con los bajos niveles de glutatión (Granados-Principal et al, 2010)

HT y oleuropeína muestran mayor protección antioxidante frente al daño por hipoclorito y mayor capacidad de eliminación del anión superóxido *in vitro*. Además el HT *in vitro* muestra una mayor potencia antioxidante que la vitamina E y C (De la Fuente et al, 2004). Los resultados de estos estudios han sido confirmados por otros experimentos *in vivo* (en humanos y ratas) al determinar la secreción urinaria de la 8-ISO-PGF2 $\alpha$ , un marcador biológico de estrés oxidativo (Pérez-Jiménez et al, 2012).

Por otra parte, HT no solo participa en las fases iniciales del proceso aterogénico sino también en sus consecuencias, fundamentalmente en el proceso trombótico. Se ha demostrado que inhibe la agregación plaquetaria por inhibición del Tromboxano B2 debido a una inhibición de la enzima ciclooxigenasa y por un aumento en la vida media del óxido nítrico (González-Correa et al, 2008, 2009).

Todo ello, como hemos ido comentando, está relacionado con la inflamación, sus consecuencias y la enfermedad cardiovascular. Por lo que el HT también está implicado en la inhibición de la agregación plaquetaria, la acumulación del tromboxano agente proagregante en el suero humano, la producción de leucotrienos moléculas proinflamatorias y la inhibición del araquidonatolipooxigenasa (Visioli et al, 2002).

Además, el HT reduce el riesgo de enfermedad de la arteria coronaria como consecuencia de su alto contenido de antioxidantes, debido a las ICAM-1 y VCAM-1 , E-selectina y moléculas de adhesión a monocitos, que son cruciales para la activación endotelial y se las relaciona con la inflamación y propiedades antiagregantes (Dell'Agli et al, 2006 y Caterina et al, 2009).

Otros estudios como el de Carluccio et al en 2003, demostraron que el tratamiento con HT y resveratrol disminuyen la expresión del ARNm de VCAM-1 mediante el bloqueo de la activación de los factores de transcripción FNkB, pudiendo regular directamente la expresión de sustancias proinflamatorias/genes proaterogénicos.

También fue medido el iNOS y la COX-2 en macrófagos de ratón J774 estimulados con lipopolisacárido, que disminuyó gracias al HT, bloqueando además, la activación de la NF- $\kappa$ B, transductor de señal nuclear y activador de la transcripción-1 alfa (STAT-1 $\alpha$ ) y el factor 1 regulador de interferón (Zhang et al, 2009).

El HT ha demostrado que puede prevenir la enfermedad cardiovascular mediante la reducción de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y la prevención de la oxidación de LDL (Fitó et al, 2007 y Rafahi et al, 2012). Se observó

que HT además ejerce dicho efecto por otros mecanismos adicionales, inhibiendo o frenando la vía inflamatoria (Bitler et al, 2005).

También ejerce un efecto beneficioso sobre la función plaquetaria, al reducir *in vitro* la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares (Carluccio et al., 2007) o inhibir *in vivo* la agregación plaquetaria en ratas (Correa et al, 2009, 2008). También en estudios de intervención con humanos, se ha relacionado el HT y derivados a la mejora del perfil hemostático postprandial trombogénico de FVIIa y PAI-1 (Ruano et al, 2007).

Otro estudio realizado en ratas Wistar alimentadas con dieta rica en colesterol, demostró que la administración de extractos de hidroxitiroxol redujo significativamente los niveles séricos de CT, TG y LDL-C y aumentó el nivel sérico de colesterol de HDL (HDL-C), con respecto a la actividad de la oleuropeína. Además, también disminuyó significativamente, el contenido de ácido barbitúrico (TBARS) en el hígado, corazón, riñones y aorta (Jemai et al, 2008).

- Anticancerígena

El estrés oxidativo y los radicales libres también parecen estar implicados en la patología del cáncer y se ha sugerido que el HT y los compuestos fenólicos del AOV pueden ser eficaces en la prevención del cáncer.

La alteración oxidativa del ADN y ARN son esenciales en la patogenia de las principales enfermedades degenerativas y puede constituir el inicio de cualquier tipo de cáncer (Evans, Dizdaroglu, & Cooke, 2004), por tanto el HT parece contrarrestar las características iniciales del cáncer por su poder antioxidante, antiproliferativo, actividad proapoptótico y antiinflamatoria (Bernini et al, 2013).

Además, se ha comprobado que el HT atenúa la proliferación de células en cultivos celulares humanos de adenocarcinoma colo-rectal, efecto que se puede relacionar con su actividad antiinflamatoria (Terzuoli et al, 2010). Y otros estudios dedujeron que el consumo de AO tiene beneficios para la prevención del cáncer de colon y de mama (Owen et al, 2004 y Waterman et al, 2007).

- Antimicrobiana

Diversas propiedades antimicrobianas se han identificado en el HT, tirosol y oleuropeína contra infecciones de tracto respiratorio y gastrointestinal (Waterman et al, 2007), ya que se ha demostrado la eficacia antimicrobiana *in vitro* frente a *Haemophilus influenzae*, *Moraxellacatarralis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* *Staphylococcus aureus*, a concentraciones mínimas inhibitorias inferiores incluso a antibióticos como la ampicilina (Bisignano et al., 1999) y frente al *Mycoplasma pneumoniae* (causante de la neumonía) (Furneri et al, 2004; Granados-Principal et al, 2010).

Además, se encontró relación bactericida entre el AOV, por sus compuestos fenólicos, y el *Helicobacter pylori*, causante de las úlceras gástricas y vinculado a los cánceres gástricos (Waterman et al, 2007).

- Neuroprotectora

El HT y acetato de hidroxitirosilo tienen actividad neuroprotectora, como se demostró en experimentos *in vitro* y *ex vivo* tras la administración oral, en éste último, en ratas de ambos compuestos y someter el tejido cerebral a un proceso de hipoxia-reoxigenación (González-Correa et al. 2008). También fue demostrado por Schaffer et al. en 2007 y 2010 con células cerebrales *in vitro* y *ex vivo*, en cultivos celulares PC12 y células cerebrales de ratones después de la administración oral de HT subcrónica. Así se identificó la importancia de las propiedades antioxidantes de esta sustancia en el efecto neuroprotector mostrado.

También se ha identificado que algunos factores dietéticos de las dietas ricas en ácidos grasos insaturados, polifenoles, antioxidantes y vitaminas previenen el riesgo de la enfermedad de Alzheimer, ya que se realizó un estudio para determinar los efectos protectores de tirosol e HT junto con la exposición del inductor tóxico A $\beta$ , en cultivos celulares de neuroblastoma N<sub>2</sub>, observando que el tratamiento del péptido amiloide- $\beta$  (100 g/ml) indujo una disminución del glutatión (GSH) y la activación del factor de transcripción FNkB y la muerte celular (St-Laurent-Thibault et al, 2011).

Destaca, además, la ausencia de toxicidad que se ha observado en los datos científicos disponibles, incluso a altas concentraciones, tanto *in vitro* como *in vivo* (Granados-Principal et al. 2010).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# SOLOS OBJETIVOS





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

La diabetes mellitus es uno de los principales factores de riesgo de la denominada enfermedad cardiovascular, incrementando *per se* el riesgo de aparición de un evento cardíaco, cerebral o arterial periférico. Pero la propia evolución de la diabetes mellitus, mediante mecanismos muy similares a los que definen su carácter de factor de riesgo cardiovascular, presenta como complicación directa del mantenimiento de un estado de hiperglucemia, la alteración de pequeños vasos sanguíneos, apareciendo la denominada microangiopatía diabética, patognomónica de esta endocrinopatía y que ha sido descrita en la introducción del presente trabajo. En este tipo de complicaciones se centra nuestro estudio.

En la fisiopatología de la microangiopatía inciden una serie de factores, asimismo analizados en la introducción de este trabajo, y que reconocen como eje principal, además de una hiperglucemia mantenida en el tiempo, la presencia de un estrés oxidativo endotelial intracelular. La consecuencia es una alteración de la función vascular y por lo tanto un daño tisular derivado de esta disfunción. Uno de los tejidos diana de esta microangiopatía es la retina, motivo principal de nuestro estudio.

Al aceptar el papel predominante del estrés oxidativo en este proceso, se plantea la posibilidad de que un compuesto antioxidante pueda frenar o evitar la aparición y desarrollo de la microangiopatía. Hoy en día no se reconoce ningún fármaco como antioxidante eficaz con resultados evidentes, de ahí que volvamos la mirada hacia el mundo natural y en concreto hacia la alimentación.

Los beneficios que la adherencia a una dieta mediterránea tiene sobre diversos aspectos de la salud humana, es algo que ya no es elemento de discusión ni controversia. El amplio estudio PREDIMED ha demostrado que este tipo de dieta es un pilar muy importante para la prevención de enfermedades cardiovasculares (cardíacas, cerebrales y periféricas), síndrome metabólico, procesos neurodegenerativos (Martínez-González et al., 2015) y, más recientemente, algunos tipos de cánceres (Toledo et al., 2015).

Por otra parte, como consecuencia de numerosos estudios preclínicos y clínicos, se centra la responsabilidad de este beneficio en varios aspectos, siendo posiblemente el de más relevancia la mayor ingesta de micronutrientes, respecto a otro tipo de alimentación. Entre dichos micronutrientes se encuentran los flavonoides y los polifenoles (Tresserra-Rimbau et al., 2014): los primeros se encuentran

mayoritariamente en cereales, frutas y verduras; los polifenoles principales se encuentran en vino tinto y aceite de oliva virgen.

En este esquema no hay que olvidar que la dieta mediterránea también se caracteriza por el consumo habitual de pescados ricos en ácidos grasos omega-3, los cuales han demostrado también un beneficio evidente sobre algunos aspectos de la prevención de enfermedades (Enns et al., 2014).

Por último, los factores no alimenticios (sociabilidad de la comida, ambiente tranquilo y relajado, ejercicio moderado, etc.) hay que tenerlos en cuenta a la hora de entender globalmente por qué la dieta mediterránea es recomendada en todos los ámbitos de la Medicina como factor preventivo de primera línea.

Debido a la trayectoria de investigación de nuestro grupo, nos interesó especialmente el papel del aceite de oliva virgen y de su principal componente polifenólico, hidroxitirosol, en diversos aspectos de la bioquímica y función cardiovascular, sobre todo en lo referente a su papel en la prevención de fenómenos isquémicos. Se ha demostrado que este componente del aceite de oliva virgen disminuye una serie de factores bioquímicos y/o funcionales reconocidos como participantes fundamentales en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, tales como agregación plaquetaria, oxidación de la lipoproteína LDL, estrés oxidativo, etc. (Covas et al., 2015; Reyes et al., 2013; López-Villodres et al., 2016).

En un trabajo previo de nuestro grupo (López-Villodres et al., 2016) se abordó el efecto de hidroxitirosol sobre diversos biomarcadores cardiovasculares en un modelo experimental de diabetes mellitus. Por ello, en el presente estudio hemos querido estudiar el posible efecto de hidroxitirosol en la retina de animales diabéticos, como representación tisular de la microangiopatía diabética a nivel ocular.

Por todo ello nos planteamos un trabajo en un modelo experimental de diabetes mellitus similar a la tipo 1 humana, con los siguientes objetivos:

1. Objetivo principal. Analizar el efecto de la administración de hidroxitirosol sobre los cambios morfológicos retinianos en animales diabéticos.
2. Objetivo secundario. Valorar la posible modificación de los principales biomarcadores reconocidos que inciden en la aparición de la angiopatía diabética, tras la administración oral de hidroxitirosol y su posible relación con los hallazgos retinianos.

# METODOLOGÍA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1. TIPO DE ESTUDIO

Realizamos un estudio experimental *ex vivo* en ratas estreptozotocin-diabéticas.

## 2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 250-350g, que permanecieron bajo condiciones estándar de estabulación en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, mantenidos con un ciclo alternante de luz/oscuridad de 12 h, temperatura ambiente de 22°C y con libre acceso a comida y agua.

Los animales fueron estabulados de acuerdo con la normativa de uso, manejo y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia), según lo dispuesto en la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo, de 22 de septiembre de 2010. El protocolo de estudio fue aprobado y supervisado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Málaga.

Para realizar este estudio utilizamos de forma inicial un total de 24 animales que establecimos en 4 grupos de 6 animales cada uno. Establecimos dos grupos controles, uno no diabético y uno diabético, a los que se les administró suero fisiológico. El resto de grupos experimentales estaban compuestos por animales diabéticos a los cuales se les administró un pre-tratamiento de 5mg/kg/día durante la semana anterior a la inducción a la diabetes se les administraron las siguientes concentraciones de HT: 1 y 5 mg/kg/día. Una vez que fueron intervenidas, volviéndolas diabéticas, se estabularon de manera individual.

El tratamiento a todos los animales se les administró diariamente vía oral mediante canulación orogástrica (Animal Feeding Needles – STR 13 X 3” (76.2MM) W/4 HARVARD APPARATUS) durante un periodo de dos meses.

### 3. COMPUESTO DE ESTUDIO

El compuesto de estudio fue el siguiente:

**HIDROXITIRO SOL:** 3,4-dihidroxifeniletanol (cedido gentilmente por Dr. Juan Fernández Bolaños, Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa, CSIF, Sevilla).

### 4. MÉTODO DE INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

#### 4.1. PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA

Para inducir la diabetes experimental, se utilizó una única dosis de 40 mg/kg de estreptozotocina (S0130, Sigma-Aldrich Chem.) administrada por vía intravenosa disuelta en 1 mL de tampón citrato. El tampón citrato se preparó mezclando dos soluciones: la solución A es una preparación de ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España) 2,1 g/100 ml de agua destilada; la solución B se preparó con fosfato sódico (Panreac, Barcelona, España) 2,8 g/100 ml de agua destilada. El tampón citrato lo obtuvimos mezclando 11,2 ml de la solución A con 8,8 ml de la solución B. Se conservó en el frigorífico a 4°C.

#### 4.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

Los animales de experimentación fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de diazepam (Valium®, Roche Farma, S.A. Madrid-España). Una vez anestesiados, se procedió a realizar una incisión longitudinal en el pliegue inguinal (afectando a la piel, el tejido celular subcutáneo y las aponeurosis musculares).

Tras la localización del paquete vasculonervioso femoral, se inyectó la estreptozotocina en la vena femoral con una jeringa U-100 de insulina (0.33x13mm/29G Becton Dickinson, Madrid-España). Finalizada la administración, se procedió a suturar la piel con seda trenzada de 4/0.

#### 4.3. MEDICIÓN Y CONTROL DE LAS CIFRAS DE GLUCEMIA

Se localizó la vena safena externa, se realizó una punción con una aguja desechable. Obtenida la gota de sangre, la toma de muestra se hizo por capilaridad. Se utilizó una determinación electroquímica de glucosa en sangre total con las tiras reactivas Glucocard™ G Sensor (Barcelona-España) con las cuales se utilizó el analizador de glucosa para sangre capilar Glucocard™ Gmeter (Barcelona-España).

Una vez obtenida la muestra sanguínea se realizó el control de glucemia con la siguiente pauta temporal:

- Antes de anestesiarse el animal e inducirle la diabetes.
- A las 24 horas de la administración de estreptozotocina.
- Medición diaria hasta considerar un animal como diabético, que se definió cuando se obtuvieron dos días de manera consecutiva cifras de glucemia superior a 200 mg/dl.
- Para controlar la glucemia durante la evolución de diabetes, se realizaron mediciones cada 15 días.
- Previo al sacrificio del animal.

Igualmente se practicó un control quincenal del peso de los animales a todos los grupos experimentales, ajustándose la dosis del fármaco al peso del animal tratado.

Todos los animales diabéticos mantuvieron cifras de glucemia entre 400 y 600 mg/dl. Para mantener esas cifras, inyectamos insulina subcutánea *Levemir FlexPen*® (Bagsværd-Dinamarca) usando agujas desechables *NovoFine*® (Madrid-España). La dosis de insulina administrada osciló entre 4 y 6 UI dependiendo de la cifra de glucemia obtenida previamente.

#### 5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Al finalizar el periodo de tratamiento de dos meses, se procedió a la obtención de muestras, obteniéndose muestras sanguíneas, de tejido ocular y de la arteria torácica. Una hora antes del sacrificio se les administró la última dosis del tratamiento. Se realizó una inducción anestésica con 50 mg/kg de diazepam (*Valium*®, Roche Farma, S.A. Madrid-España) y tras ello se anestesiaron con una dosis de 50 mg/kg de pentobarbital sódico (*Dolethal*. Vetoquinol S.A.). Una vez anestesiadas fueron inmovilizadas en

decúbito supino, se procedió a abrir la cavidad abdominal, y, previo desplazamiento del paquete intestinal hacia el lado derecho, se procedió a la disección de la aorta abdominal a nivel de su bifurcación en las dos ilíacas primitivas. A este nivel fue puncionada dicha arteria, procediéndose a la extracción de sangre de 10 ml.

La sangre obtenida se dividió en dos muestras:

1. La primera fue anticoagulada con citrato sódico 3.8% en proporción 1:10 y, a su vez, fue dividida en dos. Una para ser posteriormente usada como tal en la técnica de agregometría plaquetaria inducida con colágeno, previo conteo celular de las plaquetas (Coulter MD10. Coulter Electronics Limited). La otra parte de esta muestra anticoagulada fue centrifugada a 1500 x g (centrífuga refrigerada modelo 5800. Kubota Co. Japón), durante 15 minutos y a una temperatura de 4°C, el plasma obtenido se congeló a -80°C (ultracongelador -80°C. Heraeus. USA, modelo HFU 686 Basic) para la posterior determinación de los distintos parámetros bioquímicos. Del pellet obtenido, se obtuvo lisado de hematíes diluyendo 1mL del mismo con 3 mL de agua HPLC fría y tras un proceso de centrifugación a 5000 x g (Eppendorf Centrifuge 5415D), durante 15 minutos y a 4 °C. Posteriormente, se realizó un conteo celular de los hematíes también en el Coulter MD10 y tras ello se procedió a su congelación a -80°C hasta su procesamiento.

2. La segunda muestra de sangre total sin anticoagulantes, se dejó 30 minutos a 37°C, transcurridos los cuales se paralizó la actividad ciclooxigenasa con 10 µl de indometacina 100 µM y se centrifugó a 1500 x g durante 15 minutos. El suero obtenido se congeló a -80°C.

Tras la obtención de la sangre se procedió a la extracción de los ojos. Para ello sujetamos el globo ocular con unas pinzas desplazándolo de la cavidad ocular y con unas tijeras cortamos el nervio ocular y lo introducimos en PBS.

## 5.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA VASCULAR

Una vez abierta la cavidad abdominal, por el procedimiento descrito anteriormente para obtención de sangre, continuamos la incisión y descubrimos la cavidad torácica de la cual se extrajo la aorta torácica completa.

La aorta se lavó cuidadosamente en suero salino isotónico, se dividió en 3 partes y se pesó. Dos segmentos se introdujeron en un recipiente con 500 µl de tampón compuesto por: NaCl (100 mM), KCl (4 mM), NaHCO<sub>3</sub> (25 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.1 mM), citrato sódico (20 mM), glucosa (2.7 mM) y Tris (50 mM) (pH 8.3). Se añadió 10µl de ionoforo de calcio A23187 (Sigma Chemical Co. USA), se incubó durante 20 minutos a 37°C y se conservó el sobrenadante a -80°C hasta su utilización para la determinación de la 6-keto prostaglandina F<sub>1α</sub> y producción de NO.

## 6. PARÁMETROS DETERMINADOS

### 6.1. PARÁMETROS ENDOTELIALES

Producción vascular de 6-keto-prostaglandina F<sub>1α</sub> (metabolito estable de la PGI<sub>2</sub>) y de nitritos y nitratos (índice indirecto de la producción endotelial de NO). Ambos parámetros en pared de aorta torácica obtenida según procedimiento detallado anteriormente. También se ha realizado la determinación de la producción de peroxinitritos a través de la nitración de proteínas, concretamente de la 3-nitrotirosina, por ello a través de su expresión se puede valorar el efecto tóxico del NO.

### 6.2. PARÁMETROS PLAQUETARIOS

Agregometría plaquetaria en sangre total inducida con colágeno y determinación de la producción de TxB<sub>2</sub> (metabolito estable del TxA<sub>2</sub>) en suero.

### 6.3. PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO

En las muestras obtenidas se valoraron una serie de parámetros que definen el *estrés oxidativo*.

## DAÑO OXIDATIVO

Determinación de la capacidad de peroxidación lipídica a través de la cuantificación de los productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en muestras de plasma.

### **LDL OXIDADA (LDLox)**

La oxidación de las moléculas de LDL constituye la forma más aterogénica de las mismas, acontece ante un exceso de RL de oxígeno y se ha postulado como clave en el desarrollo de la patología vascular, estando en el origen de, entre otros procesos, de la disfunción endotelial. Se realizó en muestras de plasma.

### **GLUTATION Y GLUTATION PEROXIDASA**

Estudio de la capacidad defensiva antioxidante del tejido mediante la cuantificación del contenido celular de glutatión total, oxidado y reducido (GST, GSSG y GSH, respectivamente) y actividad glutatión peroxidasa (GSHpx).

#### **6.4. PARÁMETROS INFLAMATORIOS**

Determinación de parámetros presentes en procesos inflamatorios vasculares, se estudió en muestras séricas donde se cuantificó la concentración de moléculas de adhesión (VCAM-1) interleucina 6 (IL-6) y de mieloperoxidasa como índice de expresión de moléculas de adhesión endotelio-leucocitos. A través de su expresión se puede valorar el efecto tóxico del NO. Se realizó en muestras de plasma.

#### **6.5. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS**

Como hemos mencionado anteriormente, la diabetes provoca un daño considerable en el sistema retiniano. La DE, que predispone a la retinopatía y otros problemas microvasculares, es generalizada en la diabetes y entre otros, causa efectos sobre el tono vascular provocando vasoconstricción y microtrombos que afectan a la pared de la retina. Por ello se determinó el grosor de las capas retinianas, la densidad de las capas CNE eCNI y cuantificó el número de células ganglionales en la capa ganglionar.

## 7. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS

### 7.1. VARIABLES ENDOTELIALES

#### **PRODUCCIÓN VASCULAR DE 6-KETO-PROSTAGLANDINA F1 $\alpha$ (6-KETO-PGF1 $\alpha$ )**

La determinación y posterior medición de la producción vascular de 6-keto-PGF1 $\alpha$  en el sobrenadante de las muestras inducidas de aorta, se realizó mediante técnicas de enzimoimmunoensayo en las muestras congeladas (6-keto-Prostaglandin F1 $\alpha$  EIA Kit. Cayman Chemical). Los resultados de la lectura se ajustaron según el peso de la porción arterial correspondiente.

#### **PRODUCCIÓN ENDOTELIAL DE ÓXIDO NÍTRICO**

Se realizó mediante la determinación de nitritos-nitratos, que se utiliza como medida indirecta de la producción de NO, se determinó en el sobrenadante obtenido tras inducción de arteria aórtica con ionóforo de Ca. Una vez obtenidos, se congelaron a -80°C hasta su procesamiento con el kit nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical Company) y posterior medición en espectrofluorímetro. Los resultados de la lectura se ajustaron según el peso de la porción arterial correspondiente.

#### **PRODUCCIÓN DE PEROXINITITOS**

Esta valoración se realizó a través de la detección de 3-nitrotirosina en plasma, un producto final estable de los peroxinitritos y cuyo incremento está presente en diversos procesos patológicos como los ateroscleróticos en los que existe un incremento de la presencia de RL de oxígeno y de nitrógeno. Para la determinación de la 3-nitrotirosina utilizamos el Nitrotyrosine Elisa Test Kit de Hycult biotechnology.

### 7.2. VARIABLES PLAQUETARIAS

#### **AGREGACIÓN PLAQUETARIA**

Esta prueba tiene por finalidad establecer cuantitativamente la proporción de plaquetas que forman agregados tras la adición de un inductor de la agregación

plaquetaria. Como consecuencia estudia la actividad global plaquetaria ante determinados estímulos químicos.

Esta técnica aporta como ventaja fundamental la posibilidad de explorar el funcionalismo plaquetario en presencia de todos los elementos sanguíneos. Es por ello que sea considerada como una de las técnicas que más fisiológicamente explora el funcionalismo plaquetario.

Esta técnica se basa en la introducción de dos electrodos en la muestra de sangre, dejando circular una corriente eléctrica entre ambos, que pasará a través de la sangre. Cuando se añade un agente inductor de la agregación plaquetaria, las plaquetas se adhieren a los electrodos en proporción directa al grado de agregabilidad, incrementando la resistencia al paso de la corriente eléctrica de forma proporcional al número de plaqueta agregadas en dichos electrodos. Estos cambios en la impedancia eléctrica se pueden registrar gráficamente, constituyendo la denominada curva de agregación plaquetaria.

Para la realización de las curvas de agregación se utilizó sangre anticoagulada. Posteriormente se distribuyó la sangre en cubetas siliconadas, 500  $\mu$ L en cada cubeta, a las cuales se les añadió 500  $\mu$ L de suero salino isotónico. De esta forma el volumen final de cada cubeta fue de 1 ml. Esta dilución se realizó en base a trabajos previos según los cuales el registro gráfico es más apropiado y cuantificable empleando esta dilución. Las cubetas con las muestras y un imán agitador se introducen en unos pocillos de incubación que para tal efecto posee el agregómetro (modelo 590-2D Chrono-log Corporation Havertown USA) a una temperatura constante de 37°C.

Cuando la sangre adquirió esta temperatura, se introdujo la muestra en el pocillo de agregación, fijándose la velocidad del imán a 1000 rpm. A continuación se introdujeron los electrodos en la sangre, graduando el registro gráfico en su línea basal (mínima impedancia o máximo paso de corriente eléctrica). Después se añadió el agente inductor, en nuestro caso colágeno, registrándose la agregación durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Una vez obtenida la curva de agregación, se consideró como intensidad máxima de agregación la altura en centímetros (correspondiente al valor numérico de la impedancia en ohmios) desde la línea basal hasta el punto máximo de la curva. Dicho valor fue expresado en ohmios de resistencia eléctrica.

## DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN PLAQUETARIA DE TROMBOXANO B2

Mediante la determinación del tromboxano B2 (TxB2) conocemos la actividad metabólica del AA trombocitario. El TxB2 se cuantificó mediante técnicas de enzimoimmunoensayo, al igual que para la determinación de 6-keto-prostaglandina, en las muestras congeladas de suero (RPN-220 Thromboxane B2 biotrak assay. GE Healthcare) y para su posterior medición se necesitó un espectrofluorímetro (Polarstar Galaxy. BMG Labtechnologies. Alemania).

### 7.3. VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO (EO)

#### PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Se valoró el EO a través de la determinación de la reacción con el ácido tiobarbitúrico, cuantificándose los productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico o TBARS, cuyo principal representante es el malondialdehído (MDA).

El MDA es un producto derivado del metabolismo del ácido araquidónico (AA), que se produce por hidrólisis del endoperóxido cíclico PGH<sub>2</sub> junto al ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico (HHT).

La determinación de este metabolito del AA nos indica de modo indirecto los niveles de peroxidación alcanzados y aunque no es un metabolito específico del catabolismo peroxidativo, es un buen indicador, aceptado por muchos autores, del funcionalismo de esta vía oxidativa. Presenta también la ventaja de que puede colorearse al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, lo que nos permite de forma fácil cuantificar sus niveles en cualquier muestra determinando simplemente su absorbancia espectrofotométrica (Polarstar Galaxy. BMG Labtechnologies. Alemania). Se determinó la concentración de proteínas en plasma antes de centrifugar, para ello, aplicamos el método de Bradford (técnica más detallada más adelante). Tomamos 500 µl de muestra en un tubo y añadimos 250 µl de ácido tricloroacético, agitamos y centrifugamos 5 min a 20000 x g (ultracentrífuga Modelo L-80. Beckman Instrument S.A. España). Se preparó el reactivo TRIS-TBA de la siguiente manera:

- TRIS: 1,5 g de Tris en 50 ml de agua destilada
- 17,2 mg de TBA por 1 ml de TRIS.

Tomamos 500 µl del sobrenadante de la muestra tras su centrifugación y le añadimos 100 µl de TRIS-TBA. Incubamos en el baño de 100° durante 15 min. A continuación enfriamos y tomamos 200 µl en las placas transparentes y medimos la absorbancia espectrofotométrica a 532 nm. El cero se hace con suero fisiológico o agua.

Los valores de MDA en nmoles producidos por las muestras, se relacionaron posteriormente con los mg de proteínas existentes en ella, expresando el índice de productos lipídicos reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico en último término en nmoles de MDA/mg de proteínas.

### **DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD**

Se tomaron 5mL del reactivo de Bradford y se vertieron en tubos de plástico de 10mL. A cada tubo se le añadieron 100µL de las muestras, excepto al blanco al que se le adicionó 100µL de disolución de ClNa 5N. Se agitaron los tubos y tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió a realizar la medición de las proteínas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm.

Para hallar el valor de las proteínas, sólo restó por aplicar la ecuación de la curva-patrón para las proteínas, siendo la siguiente un ejemplo de la misma:

$$(y)= 7.25(x) + 14.2$$

Sustituimos "y" por su valor, que es la absorbancia de cada muestra, despejamos la "x" obteniendo así la concentración de proteínas, expresada en µg de proteína/100µL.

### **PRODUCCIÓN DE LDLox**

Un paso clave en la génesis del proceso ateromatoso vascular es la oxidación de la LDL colesterol mediante los RL, esta desarrolla un papel fundamental en el inicio del proceso oxidativo e inflamatorio vascular que acontece en esta patología vascular. Por ello realizamos la determinación de LDLox en muestras plasmáticas utilizando el ELISA Kit for Oxidized Low Density Lipoprotein de USCN Life Science Inc.

## DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION

La determinación de los niveles de glutatión se realizó mediante espectrofluorimetría.

Antes de centrifugar la muestra, medimos las proteínas en plasma por el método Bradford.

1. Tomamos 250µl de muestra y añadimos 1.88ml de tampón GSH y 500µl de ácido ortofosfórico 25%.

2. Centrifugamos la muestra de sangre a 15000 rpm durante 30 min a 4°C

3. Durante la espera de la centrifugación, se elaboró una curva patrón de GSH, a partir de una solución 1 mol/l (3,073 mg de GSH en 10 ml de tampón fosfato sódico), realizando sucesivas diluciones: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 y 1/2048. Todo ello se mantuvo en frío utilizando hielo triturado y agua.

3. Una vez finalizada la centrifugación se recoge del sobrenadante del cual 200µl se utilizan para la determinación de GSSG y se le añadieron 8 µl de 4-vinil-piridina (V3204. Sigma-Aldrich. USA), con el objetivo de bloquear todo paso de glutatión reducido a oxidado. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. A continuación, se pusieron en tubos de plástico y según el orden que se indica, los siguientes componentes: 0,9 ml de tampón fosfato sódico a todos los tubos, 50µl de las muestras (ya sean de GST o de GSSG) o de la correspondiente concentración estándar y por último a todos los tubos se le añadió 50 µl de o-phthaldehído (P0657. Sigma-Aldrich. USA).

8. Se agitaron y se incubaron durante 15 minutos.

9. Pasado este tiempo se procedió a la lectura en el espectrofluorímetro, utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm dando lugar a los valores de la curva patrón y del glutatión total (GST) y oxidado (GSSG).

### Valoración de los resultados

Una vez obtenido el dato de glutatión en nmol/100 µl, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y la cantidad de tejido añadido, se aplicó la siguiente expresión matemática (para una dilución 1:5):

$$\text{Glutation} = \frac{\text{Glutation (nmol/100}\mu\text{l)} \times 273,5}{\text{Hb (g/L)}}$$

Expresándose los resultados, de esta forma, en  $\mu\text{mol/n}$  de hematíes.

Esta valoración se realizó para glutatión total (GST) y glutatión oxidado (GSSG), calculándose el glutatión reducido (GSH) mediante la diferencia:

$$\text{GSH} = \text{GST} - \text{GSSG}$$

Asimismo, se calculó el porcentaje de glutatión que se encontraba en forma oxidada, según la siguiente expresión:

$$\% \text{ GSSG} = \frac{\text{GSSG} \times 100}{\text{GSH} + \text{GSSG}}$$

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA**

El estudio se llevó a cabo mediante cinética espectrofotométrica.

En primer lugar se procedió a la obtención de las muestras del tejido, con una cantidad de 250  $\mu\text{l}$  de sangre a la que se le añadieron 4mL de tampón fosfato potásico 0.1M pH 8.0.

El siguiente paso consistió en someter la muestra a una centrifugación a 13000xg durante 15 minutos a 4°C. Terminada la centrifugación se extrajo el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur y se vertió en un tubo de plástico siliconado de 5mL, que se mantuvo en inmersión en hielo triturado y agua. Con el sobrenadante obtenido se llevó a cabo a continuación la determinación de proteínas por el método de Bradford.

Se tomó de cada muestra un volumen equivalente a 25 $\mu\text{g}$  de proteínas determinadas por el método de Bradford, que se añadieron a una microcubeta, añadiendo además y según el orden en el que se indica, tampón fosfato potásico 0.1M, en un volumen necesario para conseguir 880 $\mu\text{L}$  tras restar el volumen de muestra añadido, 53 $\mu\text{L}$  de GSHrd, 133 $\mu\text{L}$  de GSH y 100 $\mu\text{L}$  de NADPH. Se agitó la microcubeta por inversión y se incubó en un baño termostático a una temperatura de 37°C durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se extrajo la microcubeta del baño, y se le añadió a la muestra 100 $\mu\text{L}$  de ter-Butyl-hidroperóxido, agitando de nuevo por inversión, e

introduciéndola en el espectrofotómetro. A continuación se realizó la lectura a una longitud de onda de 340nm durante 5 minutos, midiendo el decremento de la absorbancia de la muestra cada 30 segundos.

#### 7.4. DETERMINACIÓN DE PROCESOS INFLAMATORIOS

##### **ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA**

El incremento de la actividad de la MPOx se ha demostrado en diversos procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al EO e inflamatorio, ambos presentes en el origen de los procesos ateroscleróticos. Un aumento de la actividad de MPOx, se relaciona de forma directa al número y actividad de leucocitos activos.

Para su determinación en plasma se utilizó el Enzyme-linked Immunosorbent assay kit for Myeloperoxidase de USCN Life Science Inc.

##### **PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA (VCAM-1)**

La activación leucocitaria marca el inicio del proceso ateromatoso vascular. Hay diversos parámetros que determinan esta actividad, entre los cuales se encuentra la VCAM-1 (proteína de adhesión leucocitaria) que propicia la adhesión de estas células inflamatorias al endotelio vascular. Su presencia en muestras plasmáticas se cuantificó con el Enzyme-linked Immunosorbent assay kit for VCAM-1 de USCN Life Science Inc.

##### **PRODUCCIÓN DE INTERLEUCINA 6 (IL- $\beta$ )**

El incremento de la expresión de interleucina IL- $\beta$  se ha demostrado en procesos patológicos especialmente en aquellos con un importante desarrollo de fenómenos inflamatorios vasculares. El procesado de las muestras plasmáticas recogidas se realizó mediante kit comercial (IL- $\beta$  Elisa Kit Rat, ThermoScientific Inc.).

## 7.5. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS

Tras la extracción de los globos oculares y limpieza con suero fisiológico se fijó en formol al 10% durante 48 h en agitación suave y a temperatura ambiente, posteriormente se realizó la fijación e inclusión en parafina siguiendo un protocolo convencional para más tarde realizar los cortes con micrótomos de rotación HM 325. Los

Los cortes se realizaron sin hacer el vaciado del ojo para así mantener la tensión en los tejidos, con un grosor de 7  $\mu\text{m}$  y siempre se comenzó por la zona posterior a nivel del nervio óptico, el estudio sobre la retina se realizó en aquellas fotos donde la retina cubría más del 100 % el perímetro de corte y esta es homogénea en aumentos de 10X, aunque el estudio morfológico se llevó a cabo en aumentos de 40X. Tras el desparafinado se procedió a la tinción con hematoxilina-eosina, realizando los siguientes pasos:

### 1. Hidratación

Alcohol 100° → 10'

Alcohol 96° → 10'

Alcohol 80° → 5'

### 2. Tinción

Hematoxilina → 4'

Lavar con agua del grifo durante unos minutos.

Eosina → 6'

Lavar con agua del grifo durante unos minutos, hacer dos pases de 10' c/u en agua destilada.

### 3. Deshidratación

Alcohol 80° → 5'

Alcohol 96° → 5'

Alcohol 100° → 5'

### 4. Montaje

5. Meter en estufa 24h a 37 °C.

### 7.5.1. ESTUDIO DE LA RETINA

Sobre las secciones histológicas obtenidas se procedió a la realización de un estudio cuantitativo realizado por dos observadores.

Las fotos de las muestras estudiadas fueron obtenidas por el programa VS-ASW FL del Servicio de Análisis de Imágenes SCAI, de la Universidad de Málaga, utilizando un objetivo 40x. Estas imágenes fueron acopladas a un sistema de análisis de imágenes (Fiji) para el estudio de las medidas cuantitativas. El observador desconocía la muestra que estaba estudiando.

Los resultados de las áreas eran dados por el programa en pixeles, estos se pasaron a  $\mu$  o  $\mu^2$  según se tratara de longitud o volumen respectivamente. Conociendo que 116 pixeles equivale a  $20 \mu$ , obtenidos de la escala que aparece en cada foto.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

#### **NÚMERO DE CÉLULAS EN LA CAPA NUCLEAR EXTERNA Y CAPA NUCLEAR INTERNA**

Se utiliza como método indirecto para cuantificar los núcleos de dichas células (conos y bastones y células bipolares respectivamente). Se midió un área fija (cuadrícula) y se contó dos veces en un total de 1 corte por porta en 10 portas totales, es decir 5 cortes por muestra. (Figura 2.1)

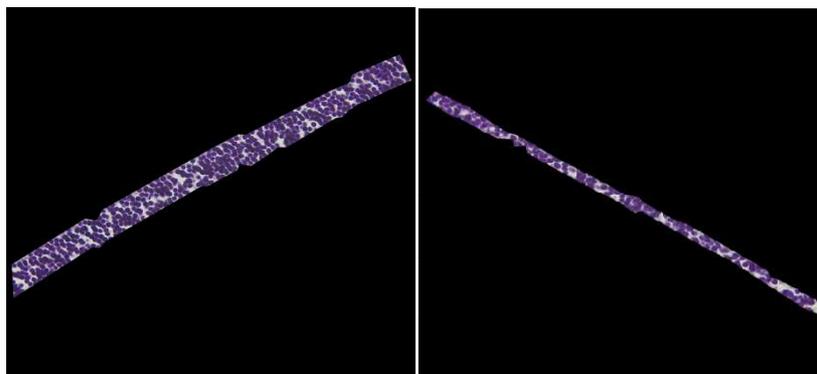


Figura 3.1. Capa CNE (izquierda) e CNI (derecha) de la retina

## NÚMERO DE CÉLULAS GANGLIONARES

Se contaron las células de la capa ganglionar en un total de 10 cortes por rata (2 por porta) en una distancia conocida, que será aquella que nos de la foto 40x tras la tinción, sobre una media de 300 $\mu$ , aunque los resultados se dieron con respecto a 100 $\mu$ , para que fuera un mismo área para todas las muestras.

## TAMAÑO CELULAR DE LA CAPA NUCLEAR EXTERNA E INTERNA

Se escogió al azar una media de 50 células por capa determinando su área. El estudio se realizó en todos los cortes de cada muestra.

## MEDIDA DEL GROSOR DE LAS DISTINTAS CAPAS QUE COMPONEN LA RETINA

Se miden las 5 capas más significativas (Szabadfi et al, 2012) (figura 2.2):

1. Grosor entre la membrana limitante interna y la externa, lo que equivale al grosor de la retina.
2. CNE, es el grosor de la capa nuclear o granular externa.
3. CPE, es el grosor de la capa plexiforme externa.
4. CNI, es el grosor de la capa nuclear o granular interna.
5. CPI es el grosor de la capa plexiforme interna.

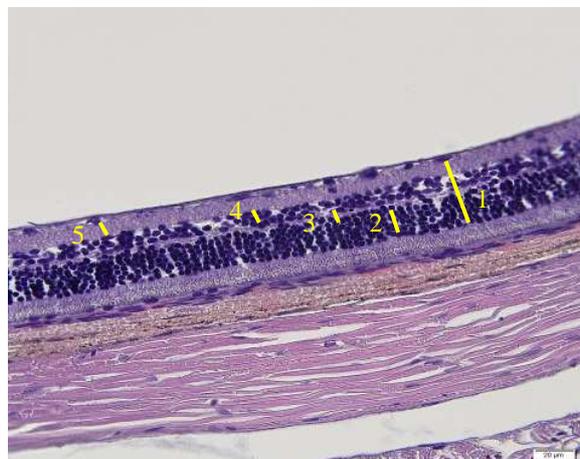


Figura 3.2. Medición del grosor de las distintas capas

Para el estudio sobre los diferentes grosores de la retina se midió para cada muestra un total de 10 cortes, 2 por portas elegidos al azar en el que al menos tenía que haber una distancia de 14 micras por corte analizado.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS ver. 23.0 (Licenciado para el Servicio Central de Informática de la Universidad de Málaga).

Se realizó análisis univariante con la finalidad de obtener las medias y error estándar de la media de las distintas variables analizadas.

El análisis bivariante ha permitido evaluar las diferencias en las variables analizadas en función del grupo experimental. Para ello se ha empleado el test de la t de student para muestras no relacionadas y ANOVA de una vía con posterior corrección mediante el test de Bonferroni.

Con la finalidad de establecer la relación entre la variable principal de resultado, conteo de células ganglionares (como variable representativa del daño retiniano) con las distintas variables bioquímicas (predictoras), se ha realizado un análisis de correlación (coeficiente de correlación de Pearson).

Finalmente, se ha calculado el riesgo relativo de los principales parámetros bioquímicos que influyen de forma significativa en el conteo de células ganglionares mediante análisis de regresión lineal múltiple (método hacia delante), lo que ha permitido establecer la ecuación que predice el conteo de células ganglionares tras la administración o no de hidroxitirosol.

En todos los casos, se ha asumido significación estadística con un valor de  $p < 0,05$ .



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# RESULTADOS





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1. PARÁMETROS ZOOMÉTRICOS

En la Tabla 4.1. se muestran los valores medios (media  $\pm$  error estándar de la media) correspondientes a los principales parámetros zoométricos obtenidos en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con hidroxitirosol (1y 5 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

Estas variables hacen referencia al peso de los animales al final del periodo experimental, los niveles de glucemia y determinaciones básicas hematimétricas, tales como los recuentos celulares (hematíes, leucocitos y plaquetas), hemoglobina y parámetros de segundo orden como el hematocrito y el volumen plaquetario.

En términos generales se observa una obvia diferencia estadísticamente significativa en la glucemia de los animales diabéticos respecto a los no diabéticos.

En las Figuras 4.1 a 4.3 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados zoométricos.

Tabla 4.1. Valores medios (media  $\pm$  SEM) de las principales variables zoométricas cuantificadas en los grupos experimentales.

	<b>CND</b>	<b>CD</b>	<b>HT 1.0</b>	<b>HT-5.0</b>
<b>Peso (g)</b>	420 $\pm$ 55	418 $\pm$ 37	417 $\pm$ 32	419 $\pm$ 41
<b>Glucemia (mg/dL)</b>	98 $\pm$ 3*	478 $\pm$ 17	461 $\pm$ 15	463 $\pm$ 18
<b>Hematíes (X10<sup>12</sup>/L)</b>	8.6 $\pm$ 0.1	8.9 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.2
<b>Leucocitos (X10<sup>6</sup>/L)</b>	5.9 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.4
<b>Plaquetas (X10<sup>6</sup>/L)</b>	893 $\pm$ 42	917 $\pm$ 24	897 $\pm$ 33	901 $\pm$ 21
<b>Hb (g/L)</b>	15.8 $\pm$ 0.5	15.7 $\pm$ 0.6	16.3 $\pm$ 0.3	16.9 $\pm$ 0.2
<b>Hematocrito (%)</b>	47.2 $\pm$ 0.9	48.3 $\pm$ 1.5	46.1 $\pm$ 0.8	48.5 $\pm$ 0.8
<b>Vol.plaquetario (fL)</b>	5.4 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.1

\*P < 0.05 respecto al resto de grupos.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 1 y 5 mg/kg/día p.o.)

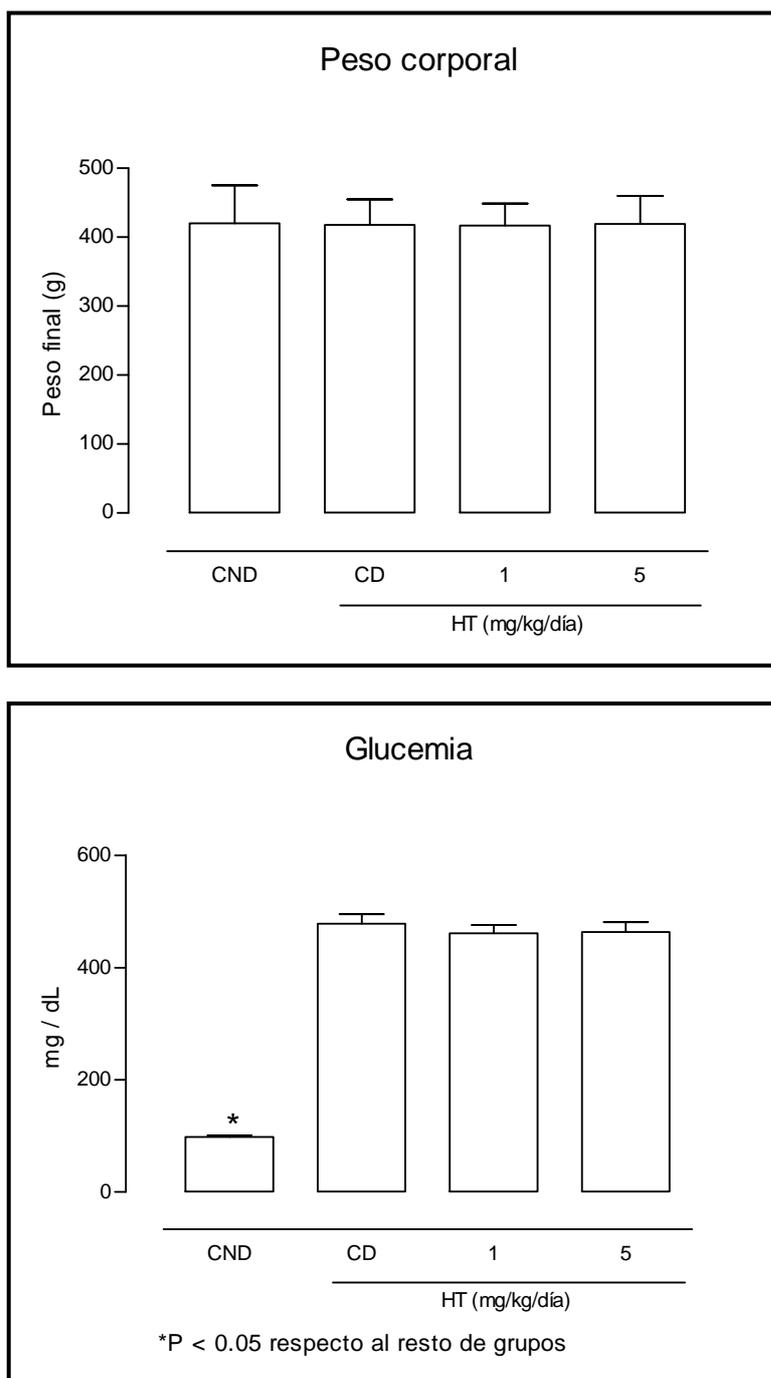


Figura 4.1. Valores medios de peso corporal y glucemia al finalizar el periodo de seguimiento.

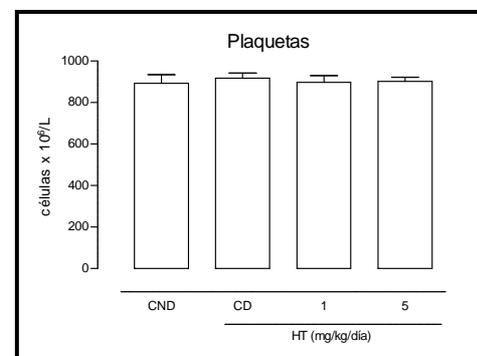
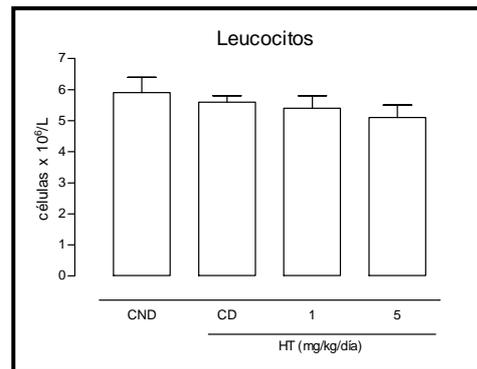
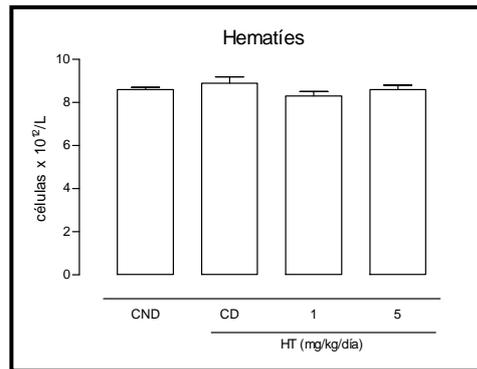


Figura 4.2. Valores medios de recuentos celulares sanguíneos al finalizar el periodo de seguimiento.

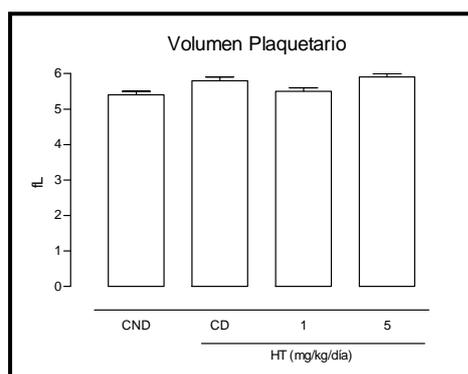
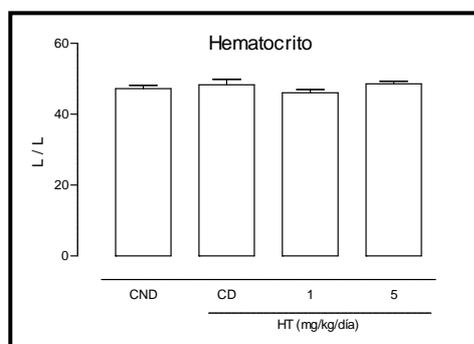
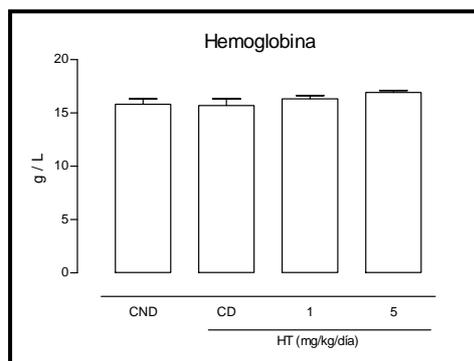


Figura 4.3. Valores medios de hematimetría al finalizar el periodo de seguimiento.

## 2. EQUILIBRIO TROMBOGÉNICO

En la Tabla 4.2. se muestran los valores medios (media  $\pm$  error estándar de la media) correspondientes a la intensidad máxima de agregación plaquetaria (Imax), producción plaquetaria de tromboxano B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) y vascular de 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con hidroxitirosol (1 y 5 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

Asimismo se muestra el cociente tromboxano/prostaciclina, calculado mediante la división aritmética de los niveles de TxB<sub>2</sub> y de 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> .

En las Figuras 4.4a 4.7 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados correspondientes al equilibrio en la producción de ambos prostanoides.

Tabla 4.2. Valores medios (media  $\pm$  SEM) de las principales variables plaquetarias cuantificadas en los grupos experimentales.

mg/kg/día p.o.	Imax (ohm,)	TxB <sub>2</sub> (pg/mL)	6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> (pg/mg aorta)	Indice TxB <sub>2</sub> /6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub>
<b>CND</b>	14.5 $\pm$ 1.3	45.0 $\pm$ 5.3	0.89 $\pm$ 0.13	50.8 $\pm$ 6.8
<b>CD</b>	28.3 $\pm$ 1.4*	73.5 $\pm$ 3.9*	0.38 $\pm$ 0.032*	191 $\pm$ 16*
<b>HT – 1</b>	21.6 $\pm$ 0.4 $\dagger\dagger$	65.6 $\pm$ 4.4 $\dagger$	0.51 $\pm$ 0.07	126 $\pm$ 13 $\dagger\dagger$
<b>HT – 5</b>	16.8 $\pm$ 1.1 $\dagger\dagger$	54.4 $\pm$ 4.5 $\dagger$	0.81 $\pm$ 0.08 $\dagger\dagger$	68.2 $\pm$ 5.9 $\dagger\dagger$

\*P <0.0001 respecto a CND.  $\dagger$ P <0.05,  $\dagger\dagger$ P < 0.0001 respecto a CD.

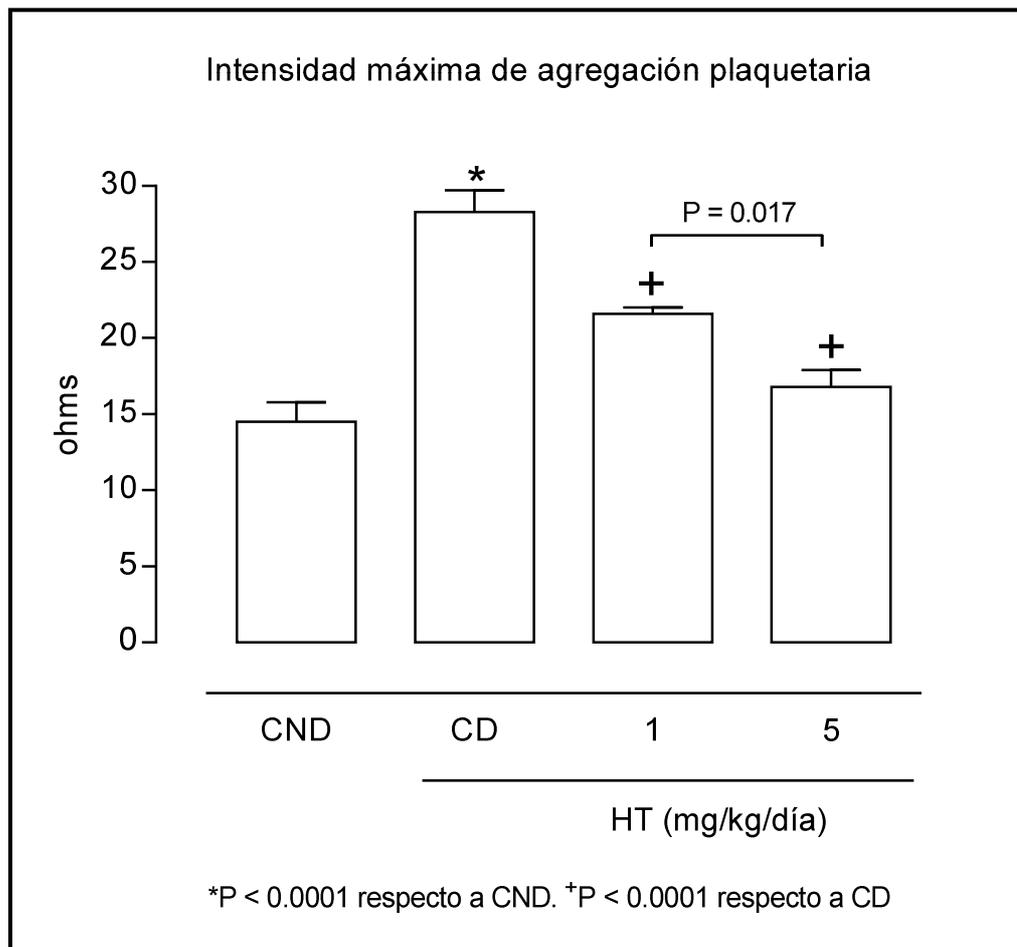


Figura 4.4. Valores medios de intensidad máxima de agregación plaquetaria inducida con colágeno al finalizar el periodo de seguimiento

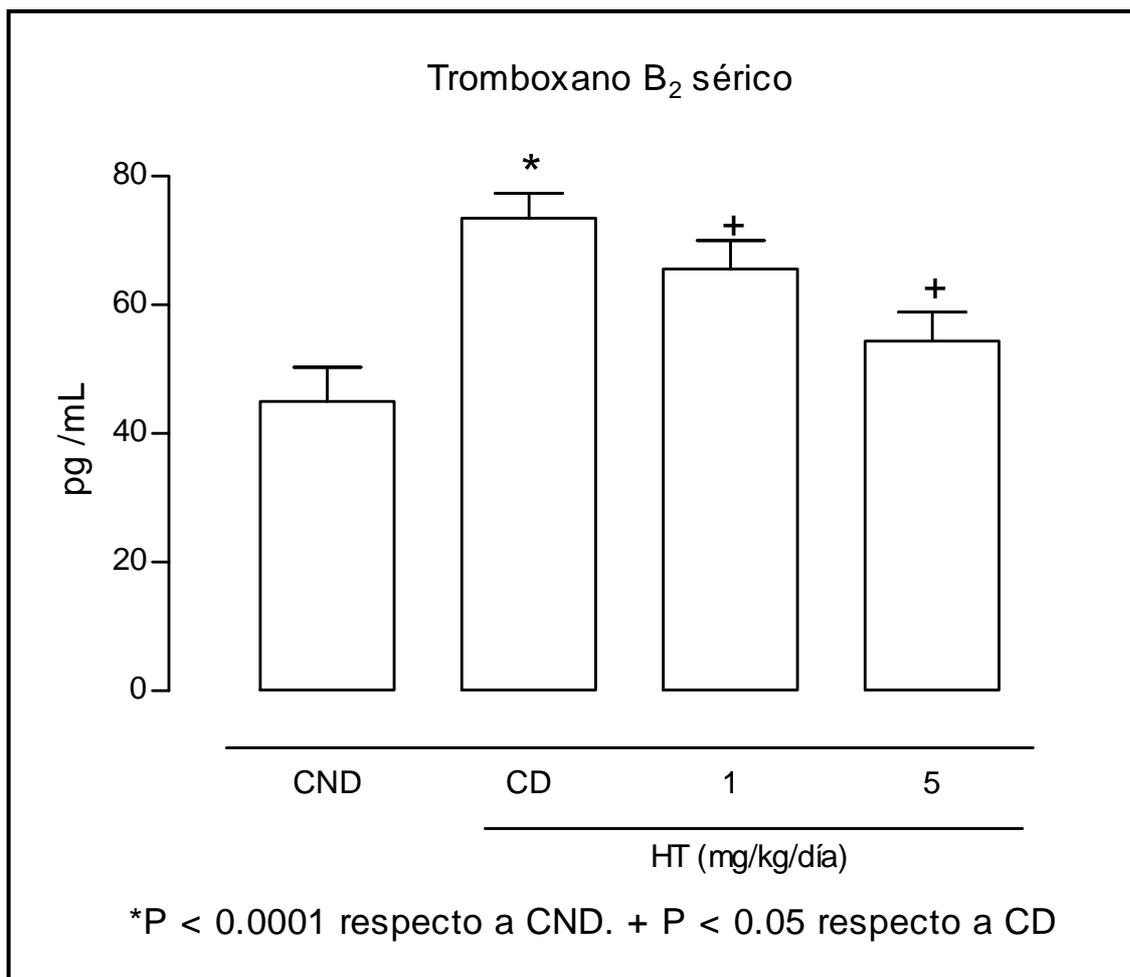


Figura 4.5. Valores medios de concentración sérica de tromboxano B<sub>2</sub> al finalizar el periodo de seguimiento

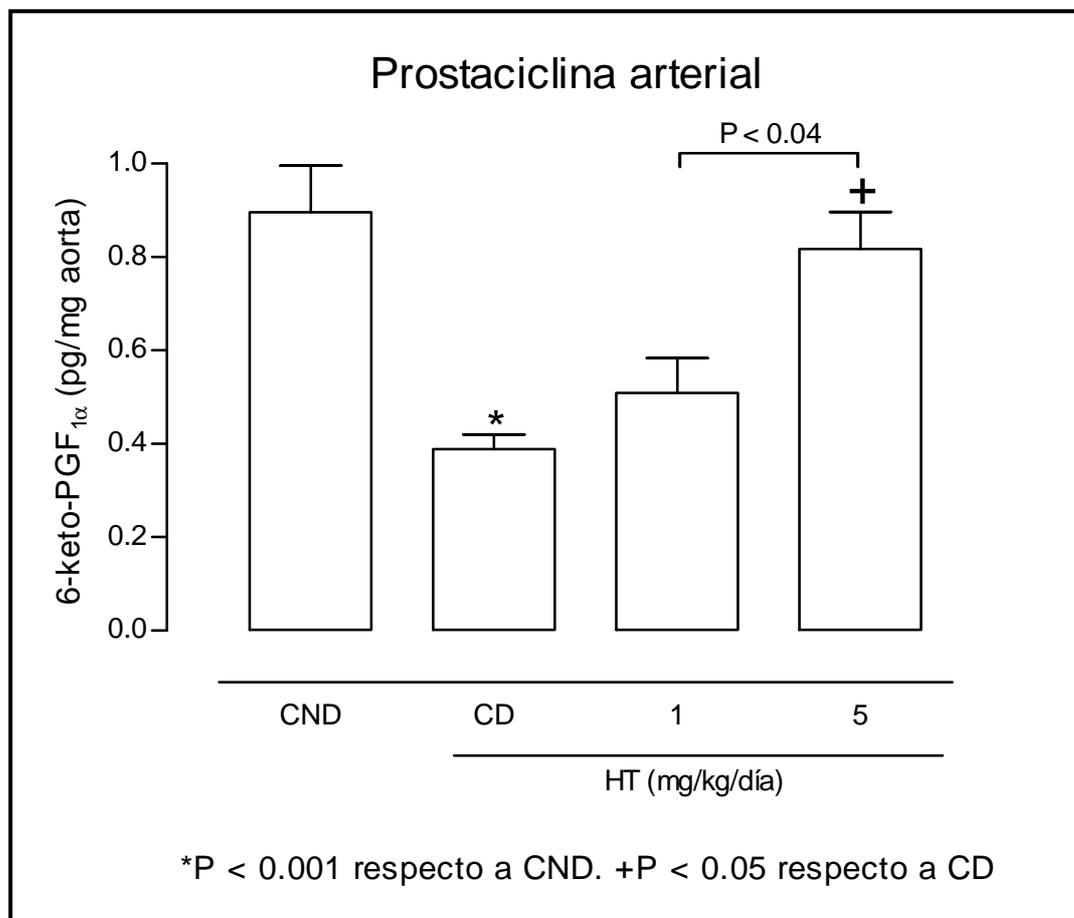


Figura 4.6. Valores medios de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> en anillos aórticos al finalizar el periodo de seguimiento

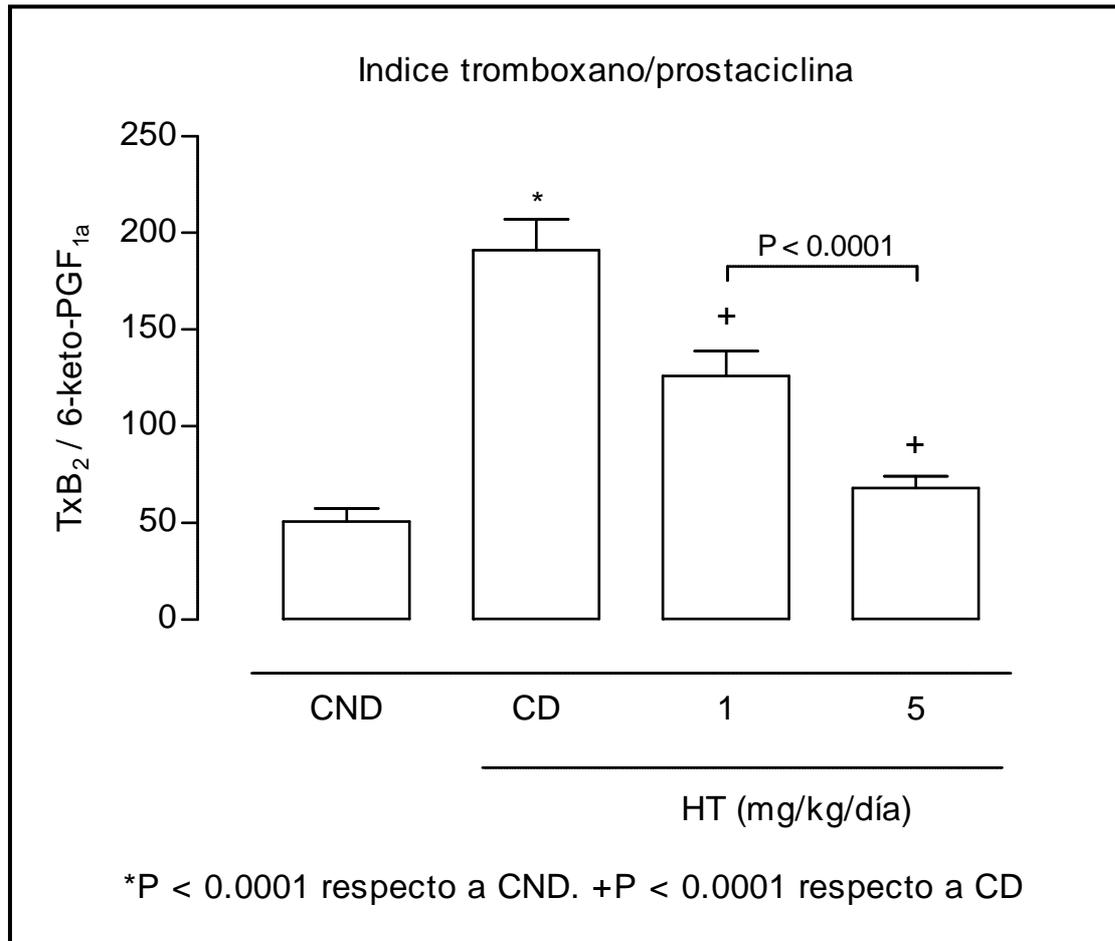


Figura 4.7. Valores medios del cociente  $\text{TxB}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$  al finalizar el periodo de seguimiento

### 3. VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO

En la Tabla 4.3. se muestran los valores medios (media  $\pm$  error estándar de la media) correspondientes a la concentración plasmática de lipoproteína de baja densidad en forma oxidada (LDLox), de los productos de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS), de la concentración eritrocitaria de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y de la actividad glutatión peroxidasa (GSHpx), en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con hidroxitirosol (1 y 5 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

En las Figura 4.8 y 4.12 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados.

Tabla 4.3. Valores medios (media  $\pm$  SEM) de las variables definitorias del estrés oxidativo cuantificadas en los grupos experimentales.

<b>mg/kg/día p.o.</b>	<b>LDLox (ng/mL)</b>	<b>TBARS (pmol/mg proteína)</b>	<b>GSH (<math>\mu</math>mol/g Hb)</b>	<b>%GSSG respecto a GSH+GSSG</b>	<b>GSHpx (nmol/min/mg proteína)</b>
<b>CND</b>	12.3 $\pm$ 2.6	290 $\pm$ 40	110 $\pm$ 8.3	25.9 $\pm$ 4.3	27.9 $\pm$ 4.2
<b>CD</b>	20.2 $\pm$ 1.5*	613 $\pm$ 55**	71.2 $\pm$ 8.1*	30.0 $\pm$ 1.2	32.6 $\pm$ 2.1
<b>HT – 1</b>	14.1 $\pm$ 1.2†	301 $\pm$ 28††	89.9 $\pm$ 5.9	26.4 $\pm$ 4.2	32.5 $\pm$ 1.5
<b>HT – 5</b>	12.4 $\pm$ 1.3††	113 $\pm$ 6.5††	99.5 $\pm$ 5.8†	30.9 $\pm$ 3.5	32.6 $\pm$ 1.6

\*P < 0.01, \*\*P < 0.0001 respecto a CND. †P < 0.05, ††P < 0.0001 respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 1 y 5 mg/kg/día p.o.)

LDLox: lipoproteína de baja densidad oxidada. TBARS: productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico. GSH: glutatión reducido. GSSG: glutatión oxidado. GSHpx: actividad glutatión peroxidasa.

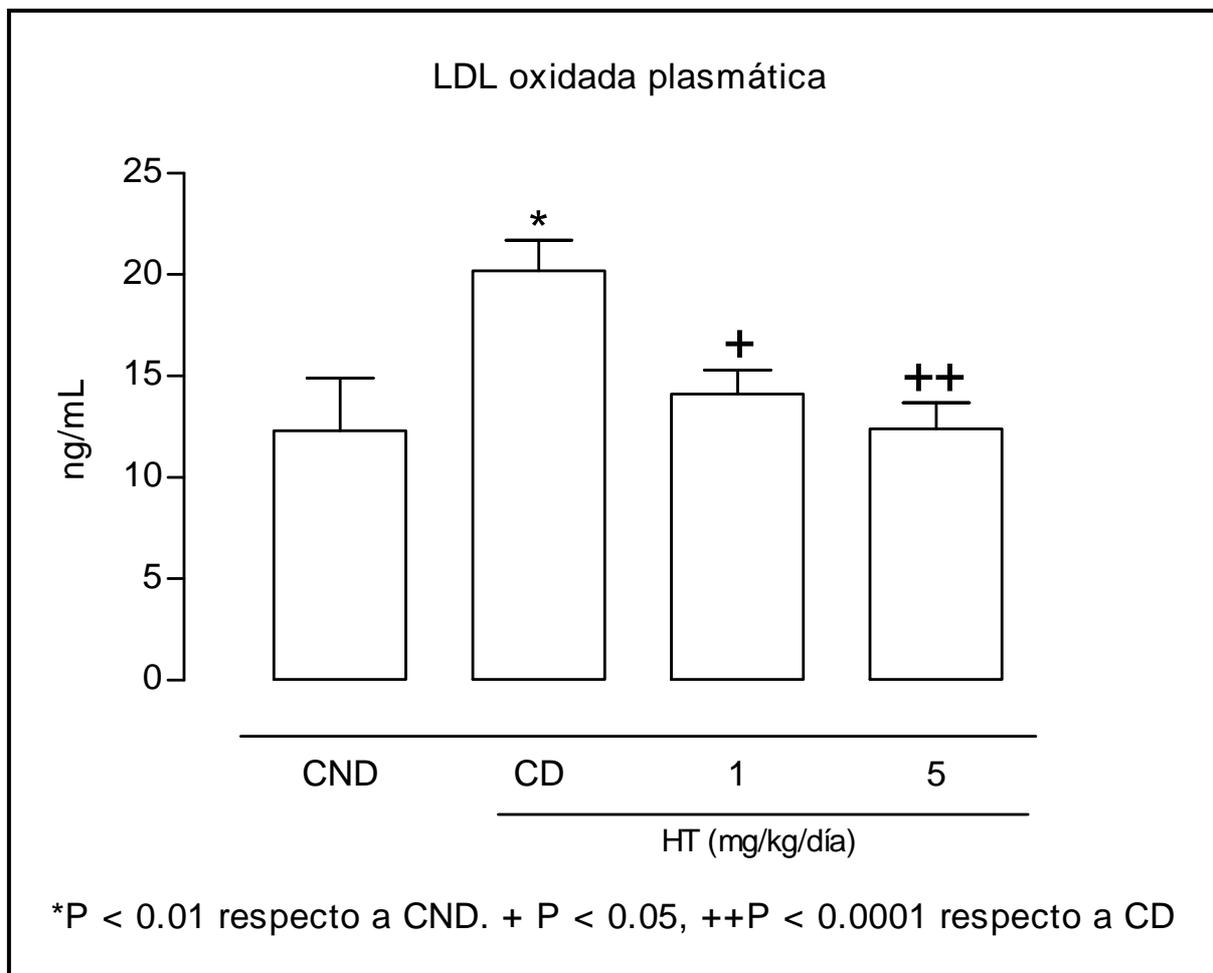


Figura 4.8. Valores medios de la concentración de lipoproteína de baja densidad en forma oxidada (LDLox) al finalizar el periodo de seguimiento

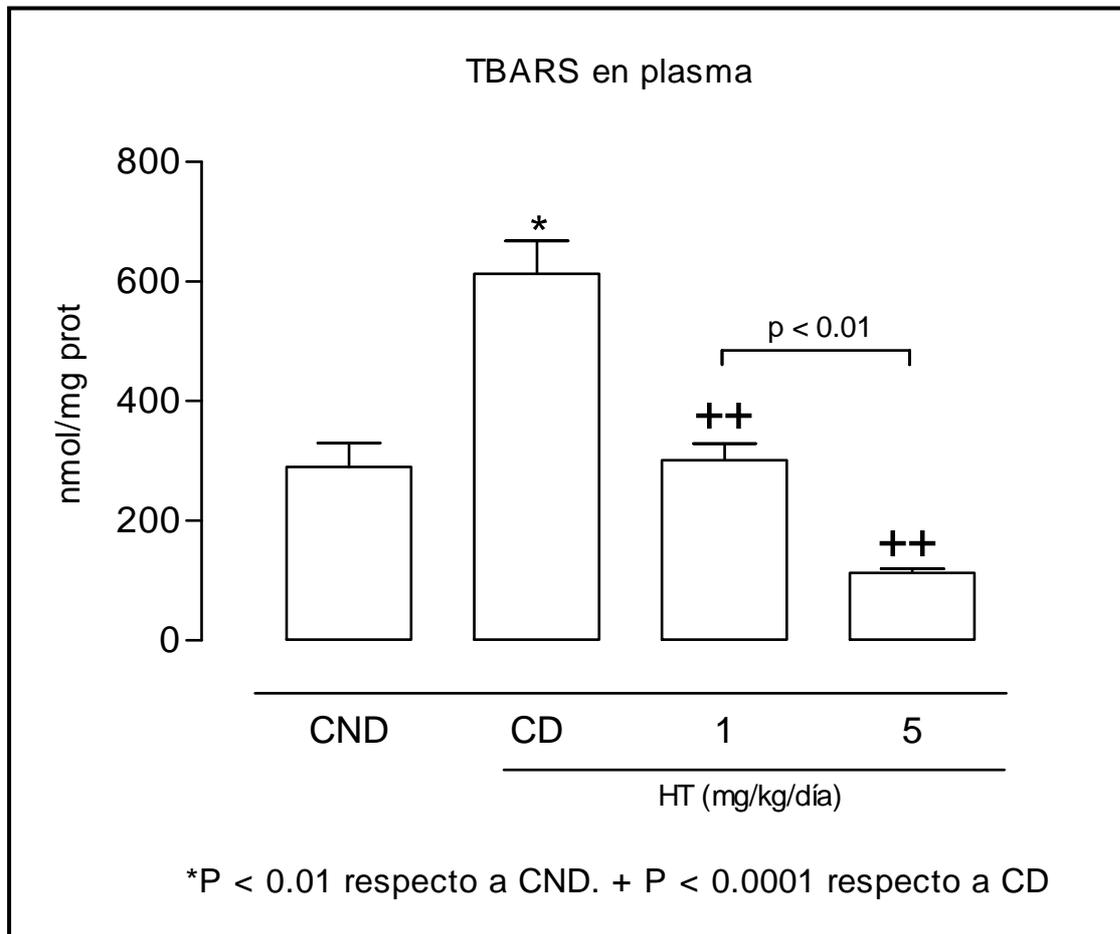


Figura 4.9. Valores medios de la concentración de peróxidos lipídicos plasmáticos (TBARS) al finalizar el periodo de seguimiento

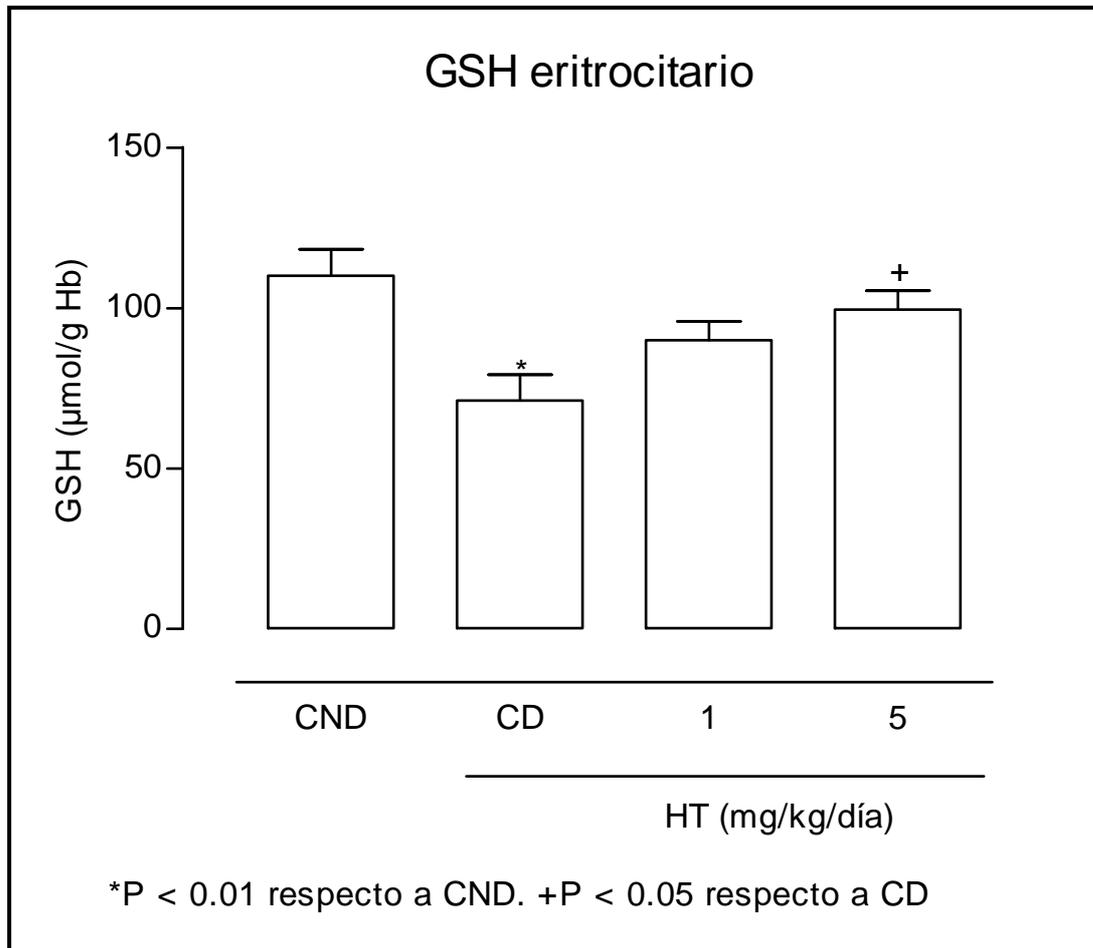


Figura 4.10. Valores medios de la concentración de glutatión reducido eritrocitario (GSH) al finalizar el periodo de seguimiento

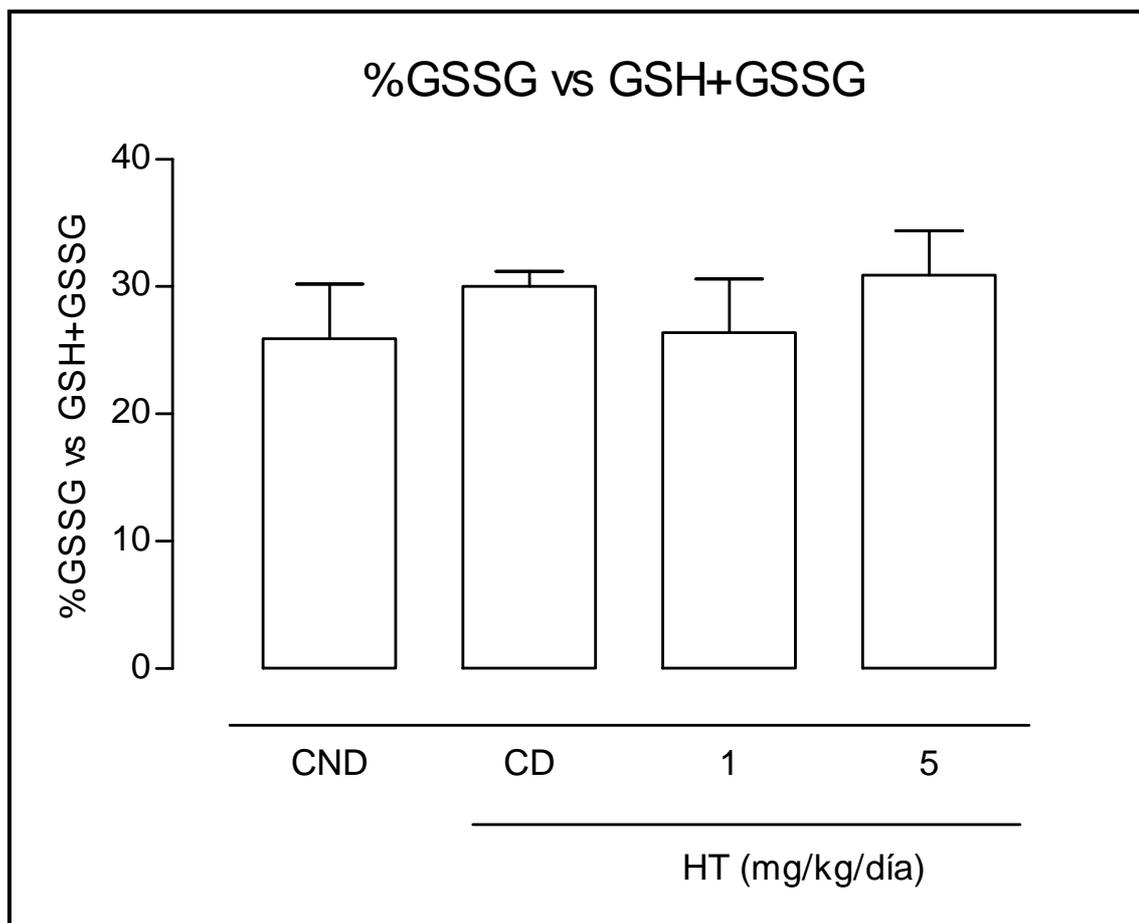


Figura 4.11. Valores medios del porcentaje de glutatión oxidado (GSSG) respecto a glutatión total (GSH+GSSG) al finalizar el periodo de seguimiento

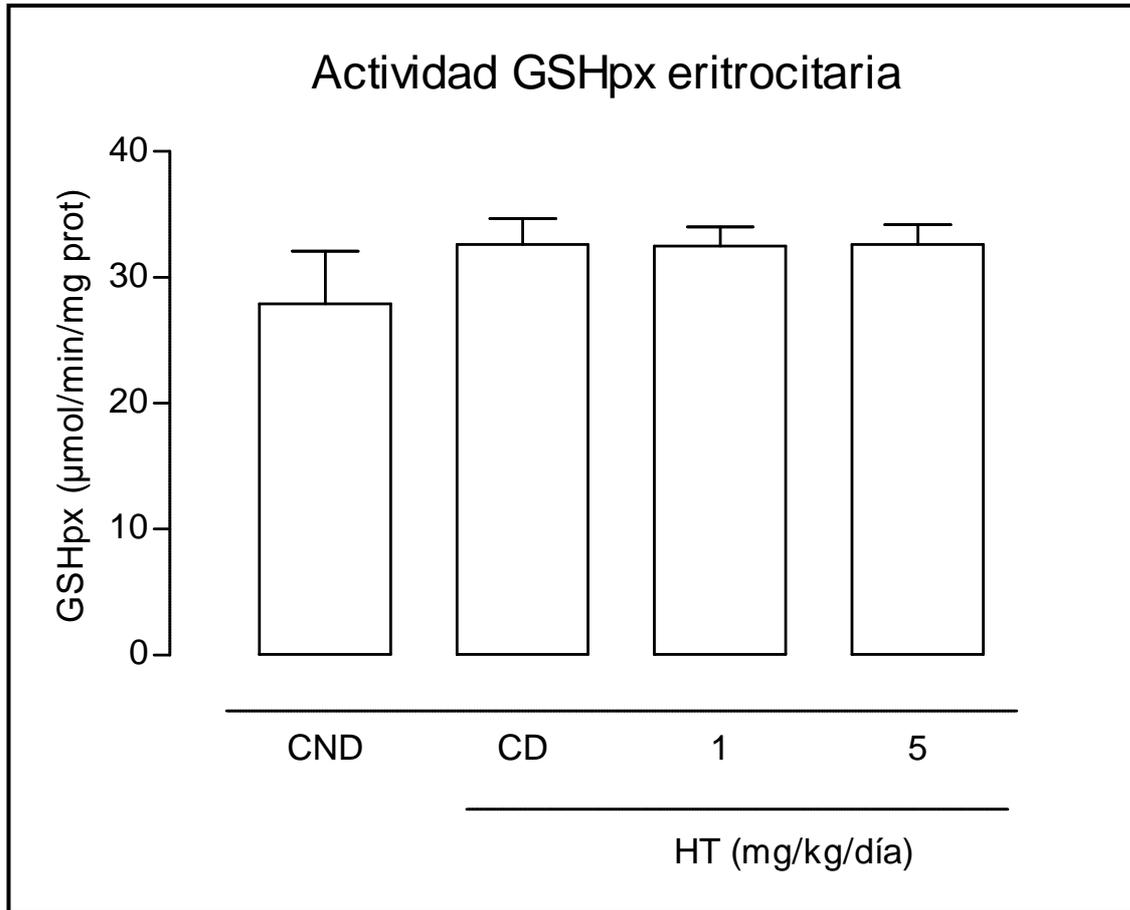


Figura 4.12. Valores medios de la actividad glutatión peroxidasaeritrocitaria (GSHpx) al finalizar el periodo de seguimiento

#### 4. VARIABLES RELACIONADAS CON EL ÓXIDO NÍTRICO

En la Tabla 4.4. se muestran los valores medios (media  $\pm$  error estándar de la media) correspondientes a la producción de nitritos+nitratos ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) (representación de la producción de óxido nítrico) y de 3-nitrotirosina (representación de la producción de peroxinitritos), en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con hidroxitirosol (1 y 5 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

En la Figura 4.13 y 4.14 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados.

Tabla 4.4. Valores medios (media  $\pm$  SEM) de las principales variables de estrés nitrosativo cuantificadas en los grupos experimentales.

<b>mg/kg/día p.o.</b>	<b><math>\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-</math></b> <b>(nmol/mg proteína)</b>	<b>3-nitrotirosina</b> <b>(pg/mL)</b>
<b>CND</b>	12.2 $\pm$ 1.5	0.8 $\pm$ 0.02
<b>CD</b>	6.4 $\pm$ 0.5*	6.2 $\pm$ 0.7*
<b>HT – 1</b>	6.7 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 0.3†
<b>HT – 5</b>	8.4 $\pm$ 0.7	2.4 $\pm$ 0.5†

\*P <0.003 respecto a CND. †P <0.05 respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 1 y 5 mg/kg/día p.o.)

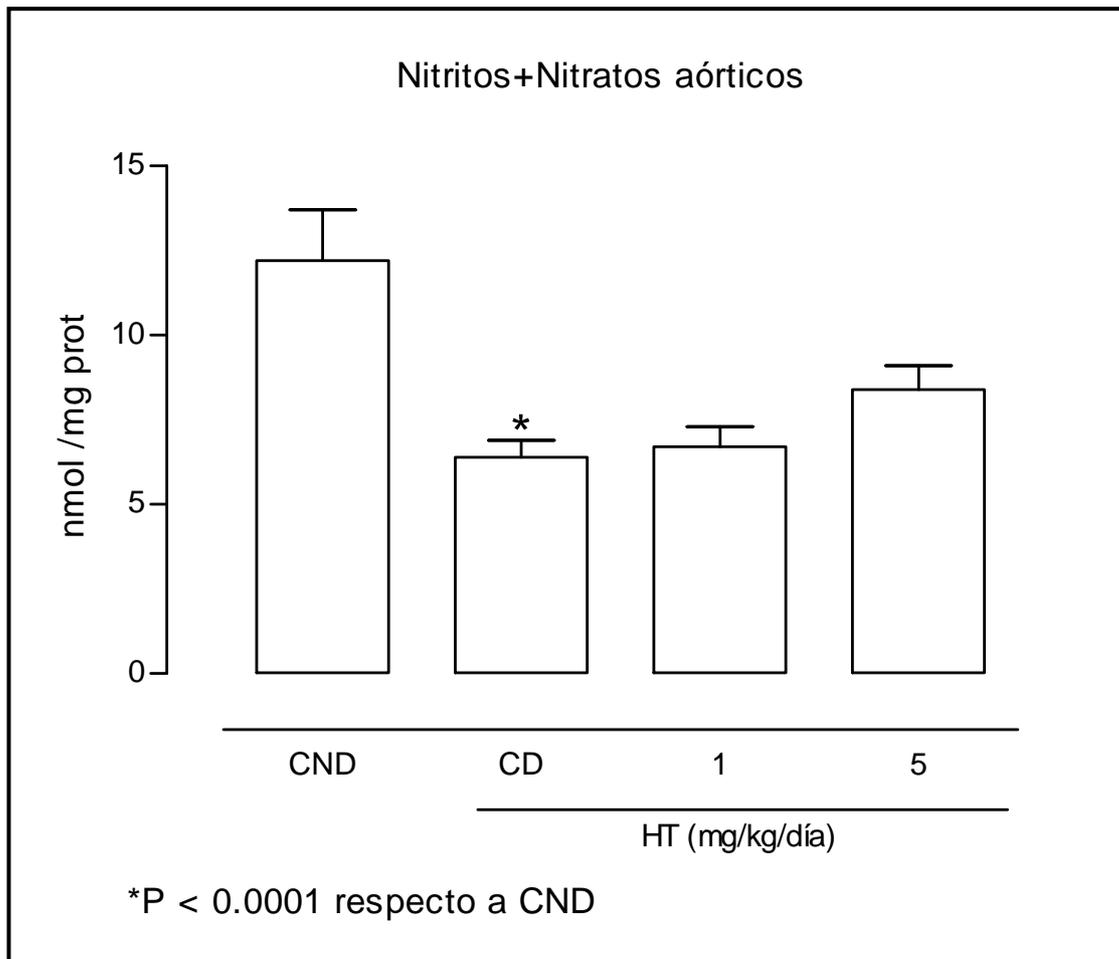


Figura 4.13. Valores medios de nitritos+nitratos en plasma al finalizar el periodo de seguimiento

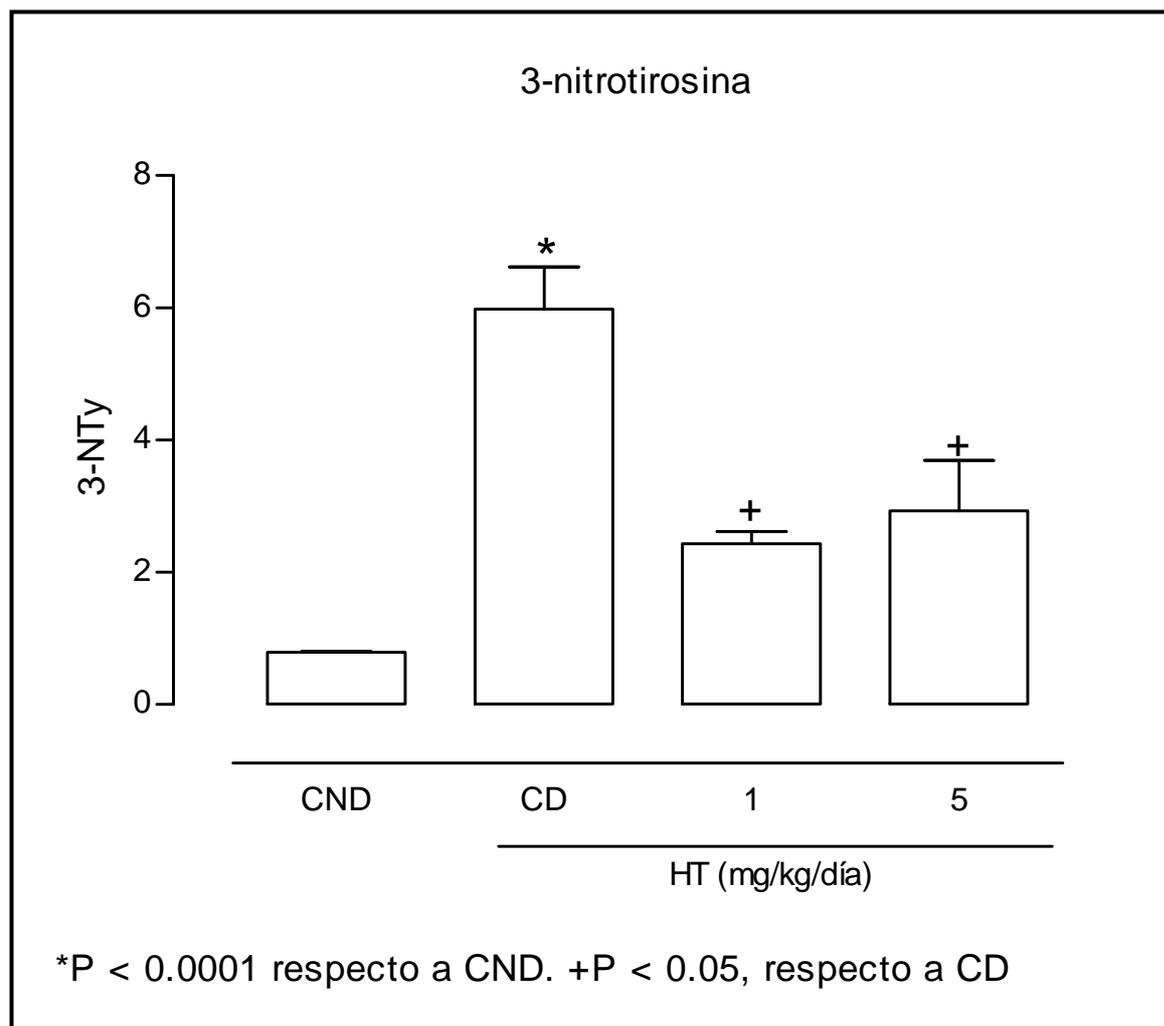


Figura 4.14. Valores medios de la concentración sérica de 3-nitrotirosina al finalizar el periodo de seguimiento

## 5. PARÁMETROS INFLAMATORIOS

En la Tabla 4.5. se muestran los valores medios (media  $\pm$  error estándar de la media) correspondientes a la concentración séricas de mieloperoxidasa (MPOx), VCAM-1 e interleucina 1 $\beta$ , en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con hidroxitirosol (1 y 5 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

En las Figuras 4.15a 4.17 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados de variables inflamatorias.

Tabla 4.5. Valores medios (media  $\pm$  SEM) de las principales variables inflamatorias cuantificadas en los grupos experimentales.

<b>mg/kg/día p.o.</b>	<b>MPOx (ng/mL)</b>	<b>VCAM-1 (ng/mL)</b>	<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>
<b>CND</b>	2.2 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.04	1.8 $\pm$ 0.05
<b>CD</b>	12.8 $\pm$ 1.6**	1.3 $\pm$ 0.05**	2.3 $\pm$ 0.06*
<b>HT – 1</b>	3.9 $\pm$ 0.6†	0.4 $\pm$ 0.06†	2.0 $\pm$ 0.05
<b>HT – 5</b>	2.5 $\pm$ 0.06†	0.5 $\pm$ 0.06†	1.7 $\pm$ 0.06††

\*P < 0.02, \*\*P < 0.0001, respecto a CND. †P < 0.0001, ††P < 0.05, respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 1 y 5 mg/kg/día p.o.)

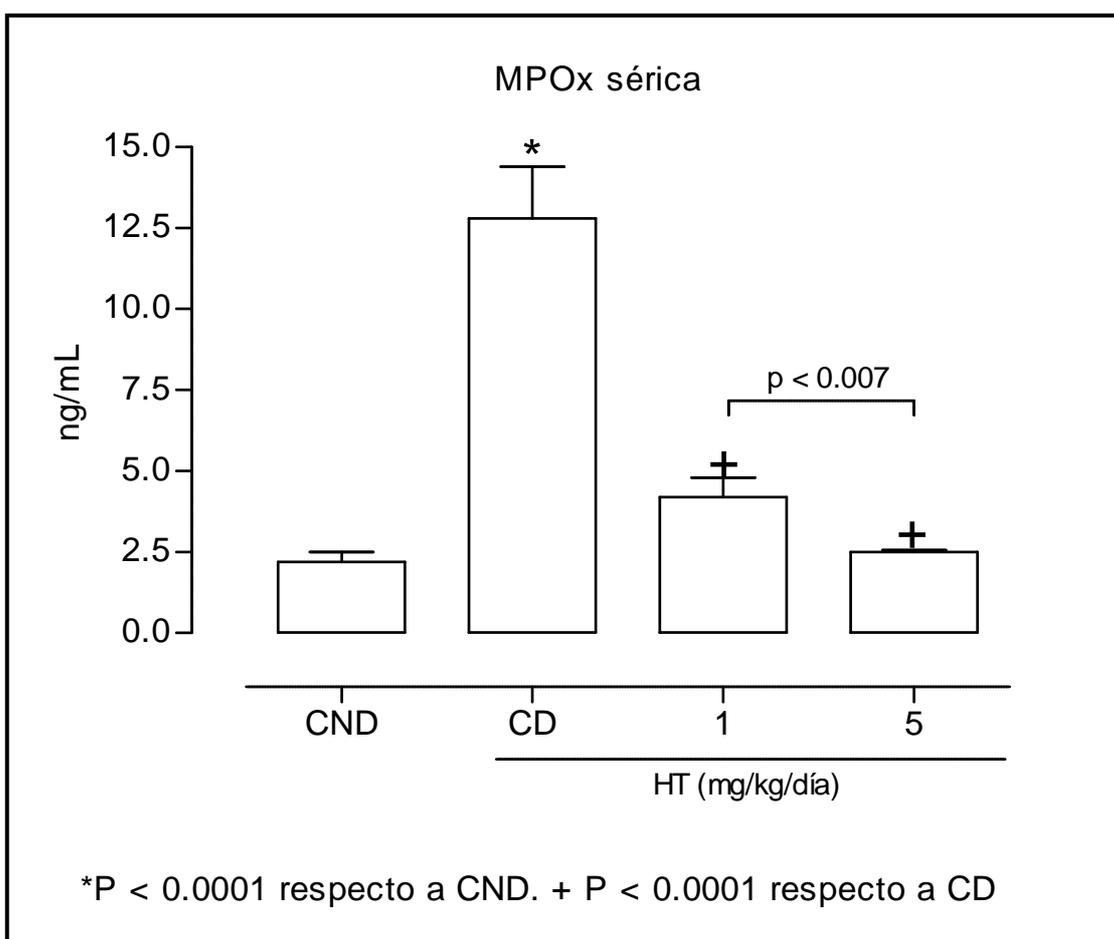


Figura 4.15. Valores medios de la concentración sérica de mieloperoxidasa (MPOx) al finalizar el periodo de seguimiento

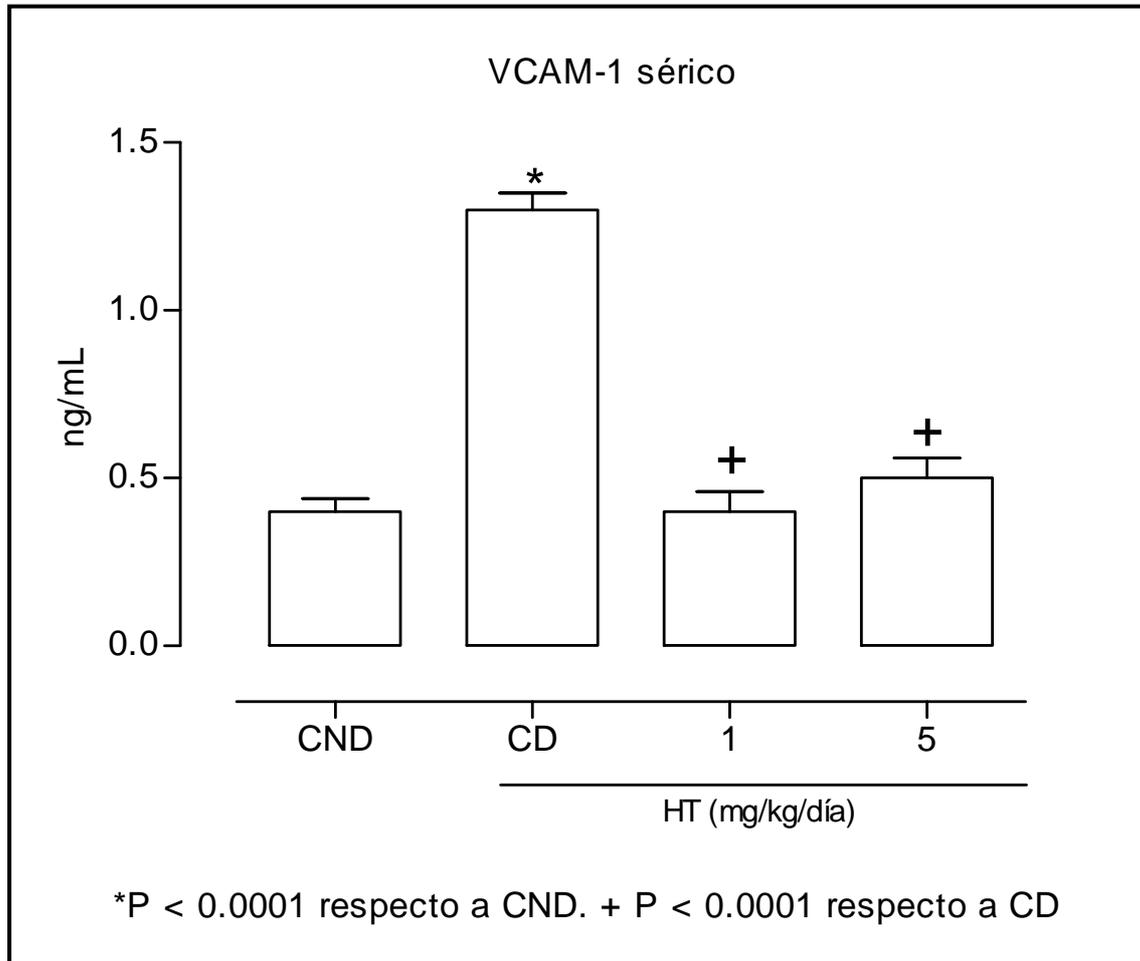


Figura 4.16. Valores medios de la concentración sérica de VCAM-1 al finalizar el periodo de seguimiento

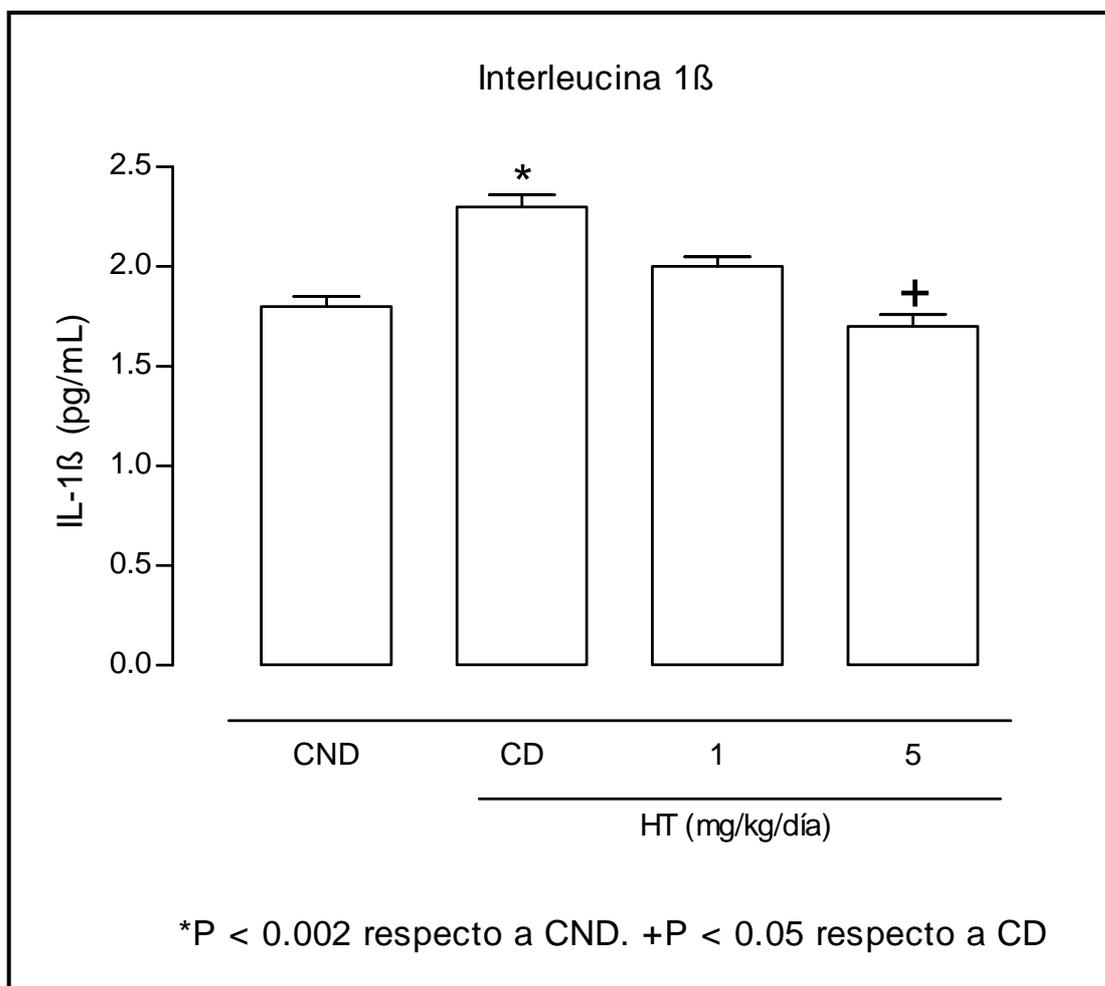


Figura 4.17. Valores medios de la concentración sérica de interleucina 6 al finalizar el periodo de seguimiento

## 6. DETERMINACIONES MORFOMÉTRICAS EN RETINA

En las Tablas 4.6. a 4.8. se muestran los valores medios (media  $\pm$  error estándar de la media) correspondientes a las principales variables morfométricas analizadas (longitud de las distintas capas celulares retinianas, contaje celular y tamaño celular), en los animales controles y en los diabéticos sin tratamiento y en aquellos tratados con hidroxitirosol (1 y 5 mg/kg/día p.o.) durante los dos meses de la diabetes experimental, iniciándose el tratamiento una semana antes del inicio de la diabetes.

En las Figuras 4.18 a 4.23 se representan gráficamente, en forma de histograma, estos resultados morfométricos, así como algunos ejemplos representativos de micrografías correspondientes a los distintos grupos de animales atendiendo a las variables antes mencionadas.

Tabla 4.6. Valores medios (media  $\pm$  SEM) de las longitudes ( $\mu\text{m}$ ) de cada una de las capas celulares retinianas en los distintos grupos experimentales.

<b>mg/kg/día p.o.</b>	<b>Grosor total</b>	<b>ONL</b>	<b>OPL</b>	<b>INL</b>	<b>IPL</b>
<b>CND</b>	75.8 $\pm$ 7.7	31.9 $\pm$ 4.5	6.8 $\pm$ 0.6	16.2 $\pm$ 1.4	16.4 $\pm$ 1.3
<b>CD</b>	105 $\pm$ 4.2*	27.3 $\pm$ 2.7	3.4 $\pm$ 0.4*	25.0 $\pm$ 2.9*	30.2 $\pm$ 3.0**
<b>HT – 1</b>	83.1 $\pm$ 1.7†	23.2 $\pm$ 1.3	5.5 $\pm$ 0.7††	14.4 $\pm$ 1.2††	24.1 $\pm$ 1.5
<b>HT – 5</b>	80.6 $\pm$ 6.8†††	28.7 $\pm$ 2.8	6.6 $\pm$ 0.8†††	13.3 $\pm$ 0.4†††	25.4 $\pm$ 1.7

\*P < 0.01, \*\*P < 0.005, respecto a CND. †P < 0.005, ††P < 0.05, †††P < 0.01, respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 1 y 5 mg/kg/día p.o.)

Grosor total: Distancia Membrana Limitante Interna - Membrana Limitante Externa

CNE: Capa nuclear o granular externa

CPE: Capa plexiforme externa

CNI: Capa nuclear o granular interna

CPI: Capa plexiforme interna

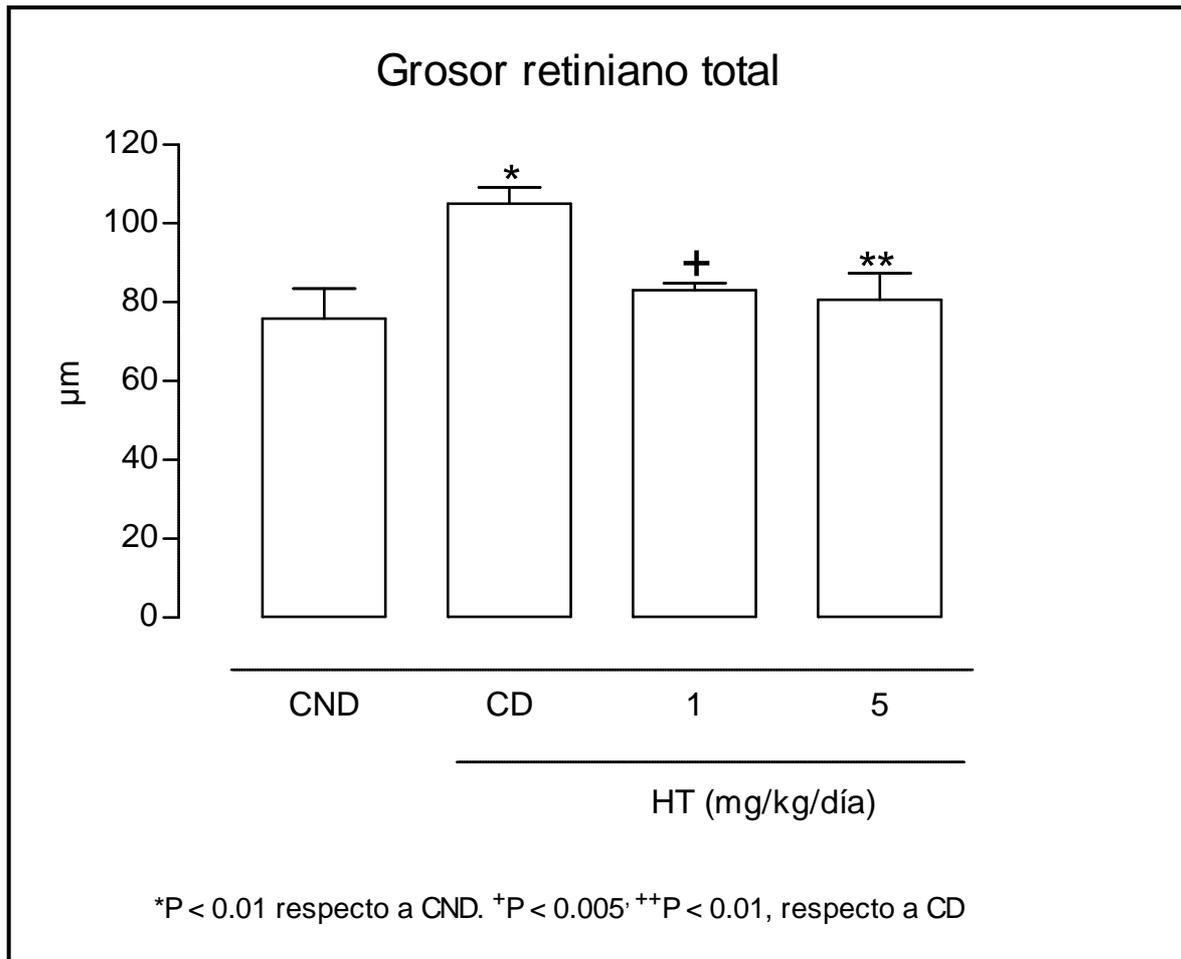


Figura 4.18. (A). Valores medios del grosor de las distintas capas celulares retinianas al finalizar el periodo de seguimiento

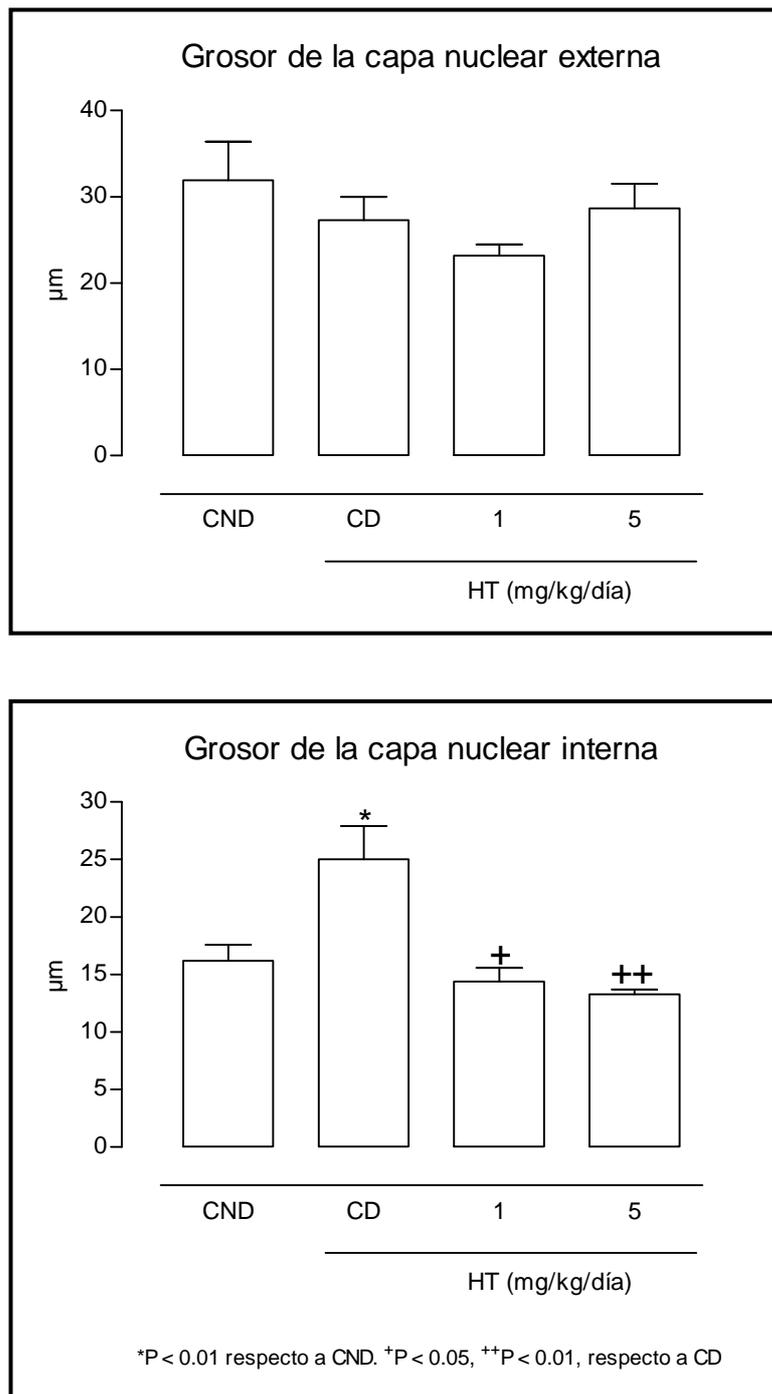


Figura 4.18. (B). Valores medios del grosor de las distintas capas celulares retinianas al finalizar el periodo de seguimiento

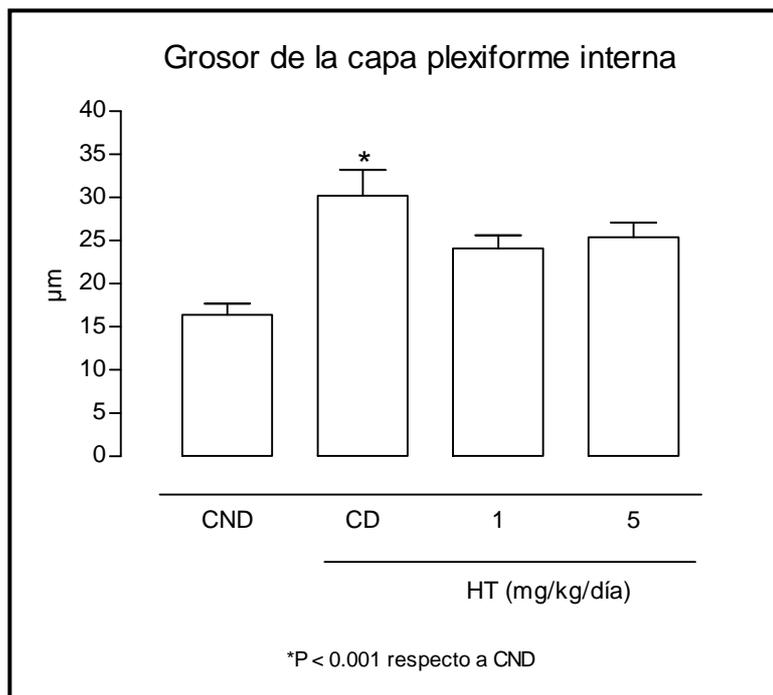
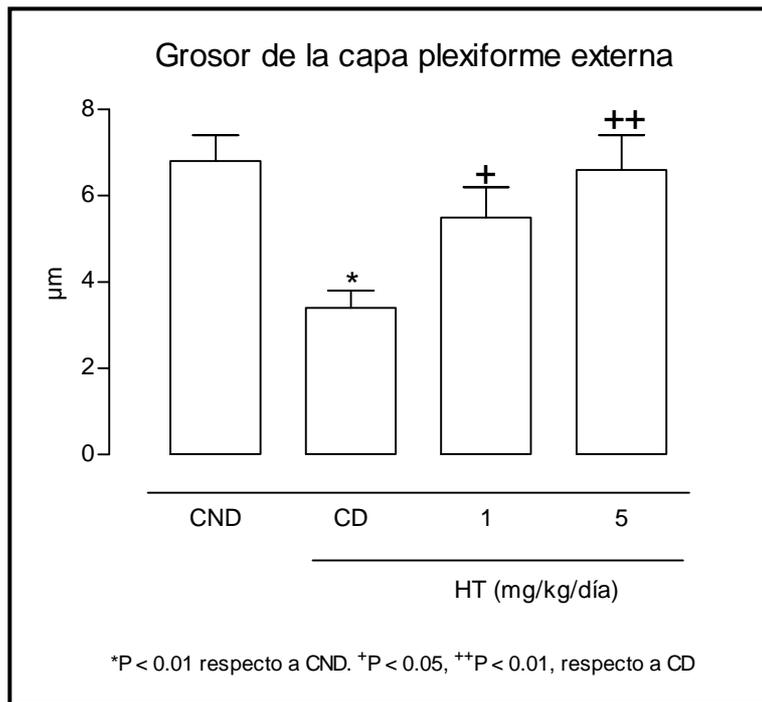
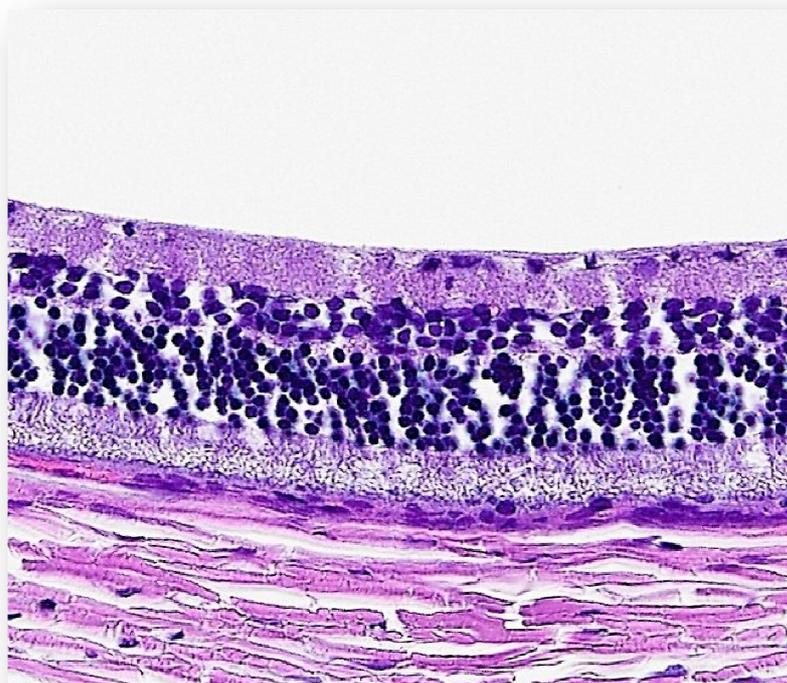
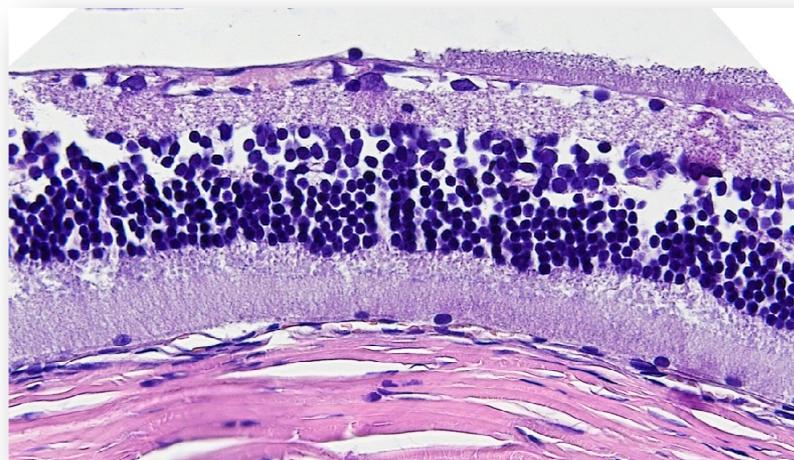


Figura 4.18. (C). Valores medios del grosor de las distintas capas celulares retinianas al finalizar el periodo de seguimiento

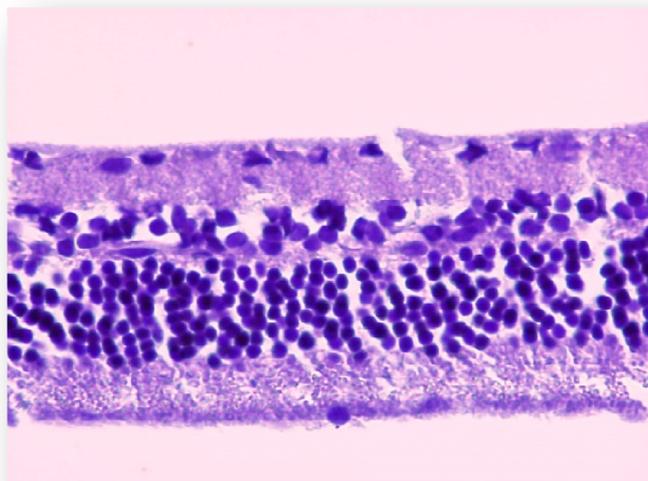


Control no diabético

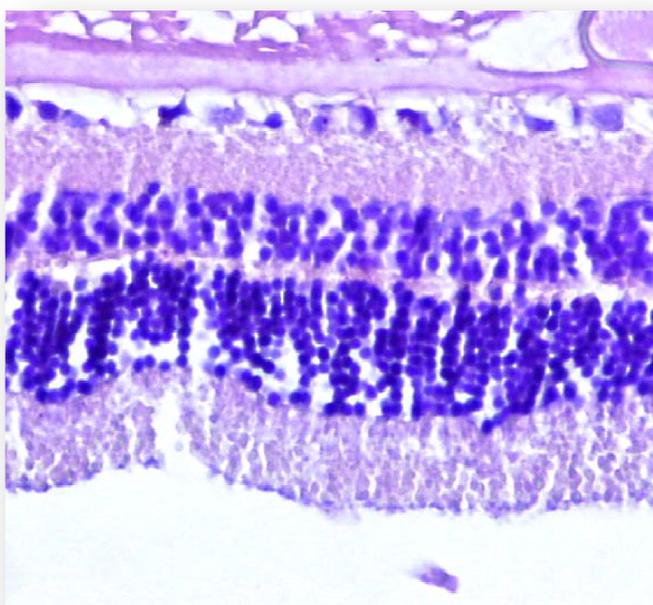


Control diabético

Figura 4.19. (A) Ejemplos representativos de cortes histológicos de retinas de animales del grupo control sano y control diabético (X40)



Hidroxitirosol 1 mg/kg/día



Hidroxitirosol 5 mg/kg/día

Figura 4.19. (B) Ejemplos representativos de cortes histológicos de retinas de animales diabéticos tratados con hidroxitirosol (X40)

Tabla 4.7. Valores medios (media  $\pm$  SEM) del contaje celular en la capa de células ganglionares (células por cada 100  $\mu\text{m}$ ), capa nuclear externa e interna (células por cada  $\mu\text{m}^2$ ), en los distintos grupos experimentales.

mg/kg/día p.o.	Células ganglionares	CNE	CNI
<b>CND</b>	16.4 $\pm$ 0.4	53.5 $\pm$ 0.6	22.5 $\pm$ 1.2
<b>CD</b>	9.2 $\pm$ 0.4*	44.6 $\pm$ 1.1**	27.4 $\pm$ 0.6***
<b>HT – 1</b>	10.8 $\pm$ 0.2†	47.0 $\pm$ 2.3†	23.5 $\pm$ 0.8†
<b>HT – 5</b>	14.9 $\pm$ 0.3††	56.8 $\pm$ 0.7††	25.2 $\pm$ 0.5

\*P < 0.0001, \*\*P < 0.002, \*\*\*P < 0.005, respecto a CND. †P < 0.05, ††P < 0.0001, respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 1 y 5 mg/kg/día p.o.)

CNE: Capa nuclear o granular externa

CNI: Capa nuclear o granular interna

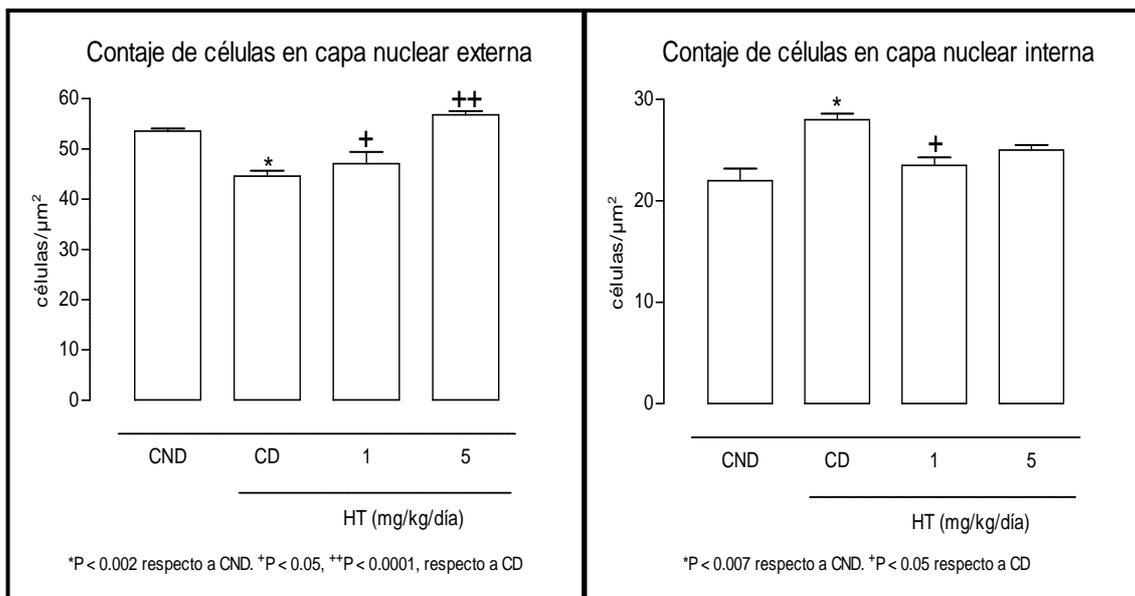
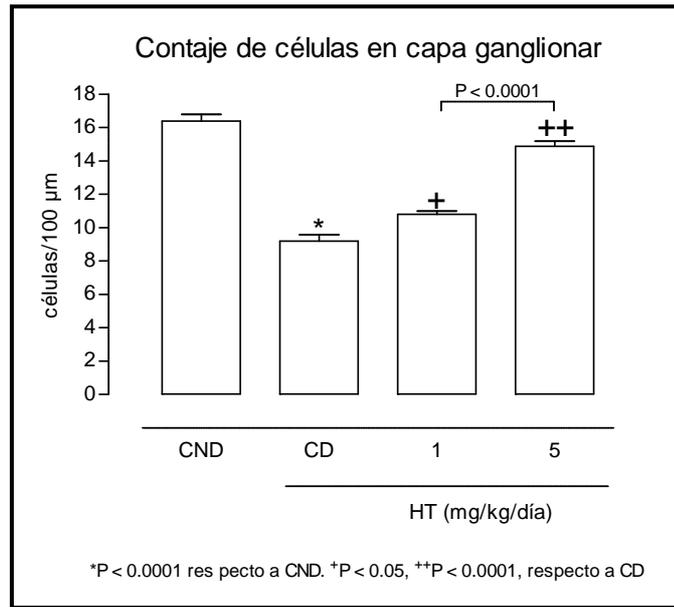
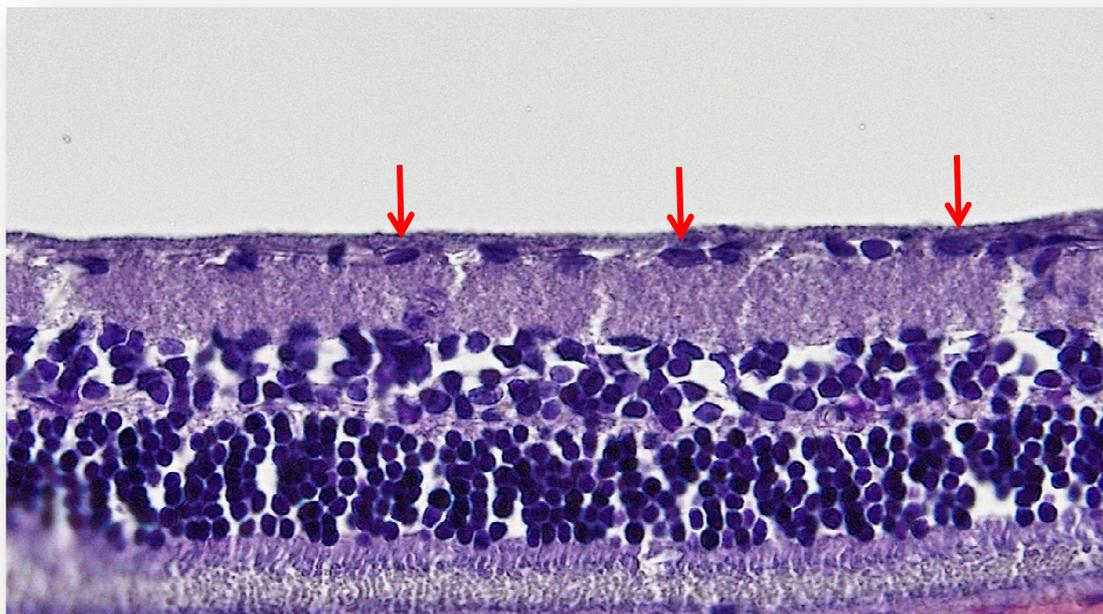
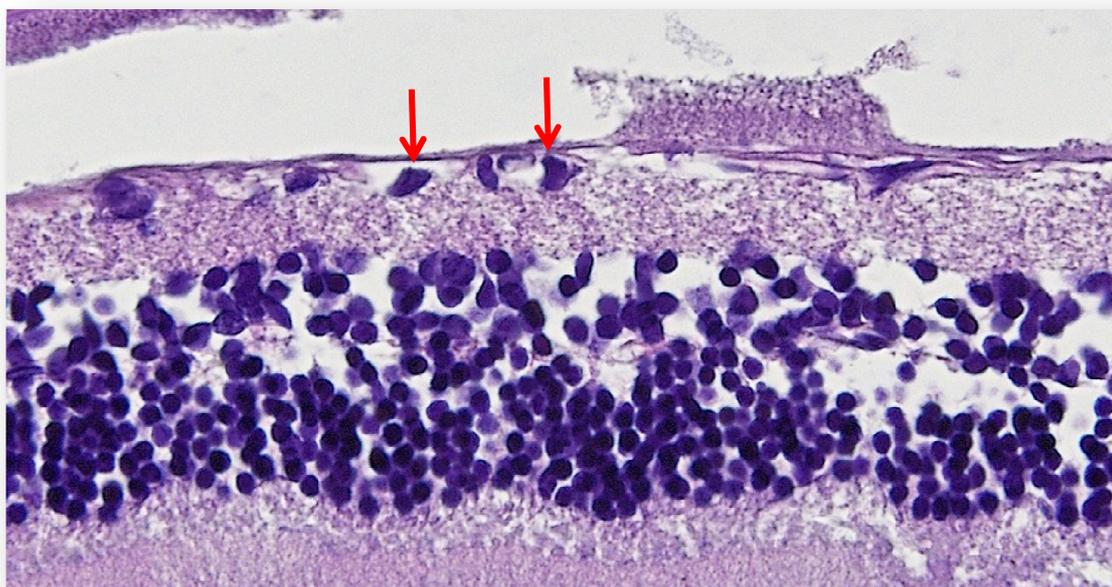


Figura 4.20. Valores medios del recuento de células de la capa ganglionar, nuclear externa y nuclear interna al finalizar el periodo de seguimiento

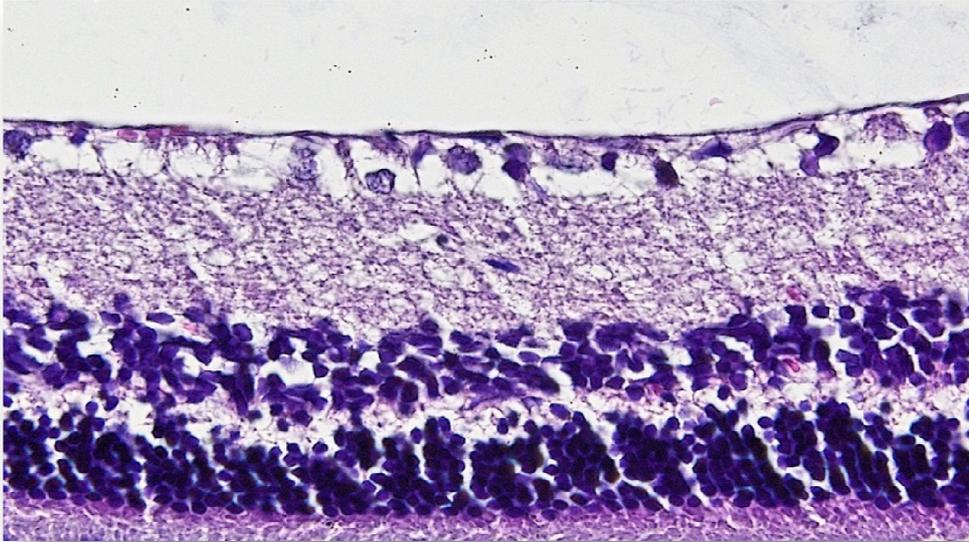


Control no diabético

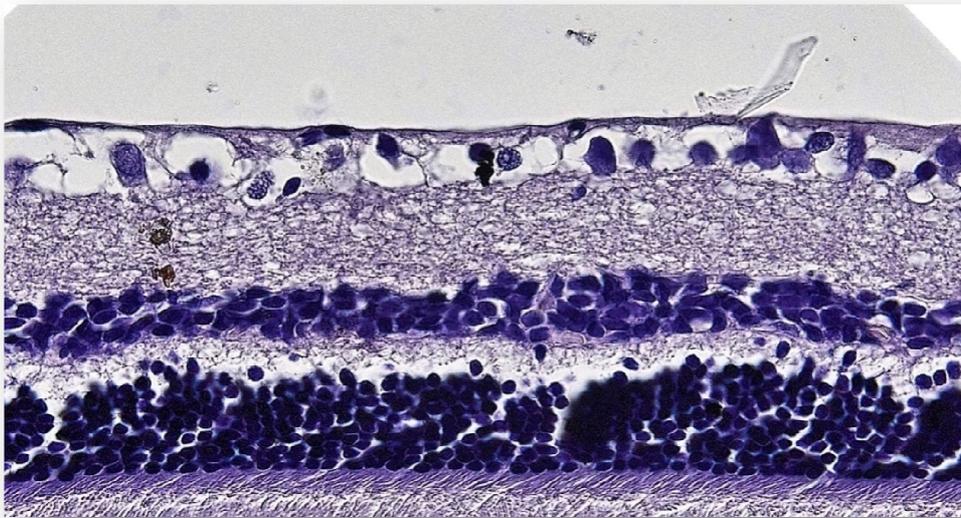


Control diabético

Figura 4.21. (A) Ejemplos representativos de la capa de células ganglionares (algunas se indican con flechas) de retinas de animales controles sanos y diabéticos (X40)



Hidroxitirosol 1 mg/kg/día



Hidroxitirosol 5 mg/kg/día

Figura 4.21. (B) Ejemplos representativos de la capa de células ganglionares (algunas se indican con flechas) de retinas de animales diabéticos tratados con hidroxitirosol (X40)

Tabla 4.8. Valores medios (media  $\pm$  SEM) del tamaño celular ( $\mu\text{m}^2$ ) en la capa nuclear externa e interna, en los distintos grupos experimentales.

<b>mg/kg/día p.o.</b>	<b>ONL</b>	<b>INL</b>
<b>CND</b>	8.6 $\pm$ 0.4	10.1 $\pm$ 0.6
<b>CD</b>	10.8 $\pm$ 0.4*	14.9 $\pm$ 0.3*
<b>HT – 1</b>	9.7 $\pm$ 0.5	12.6 $\pm$ 0.2†
<b>HT – 5</b>	9.6 $\pm$ 0.2	11.5 $\pm$ 0.6††

\*P < 0.0001, respecto a CND. †P < 0.0001, ††P < 0.002, respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 1 y 5 mg/kg/día p.o.)

ONL: Capa nuclear o granular externa

INL: Capa nuclear o granular interna

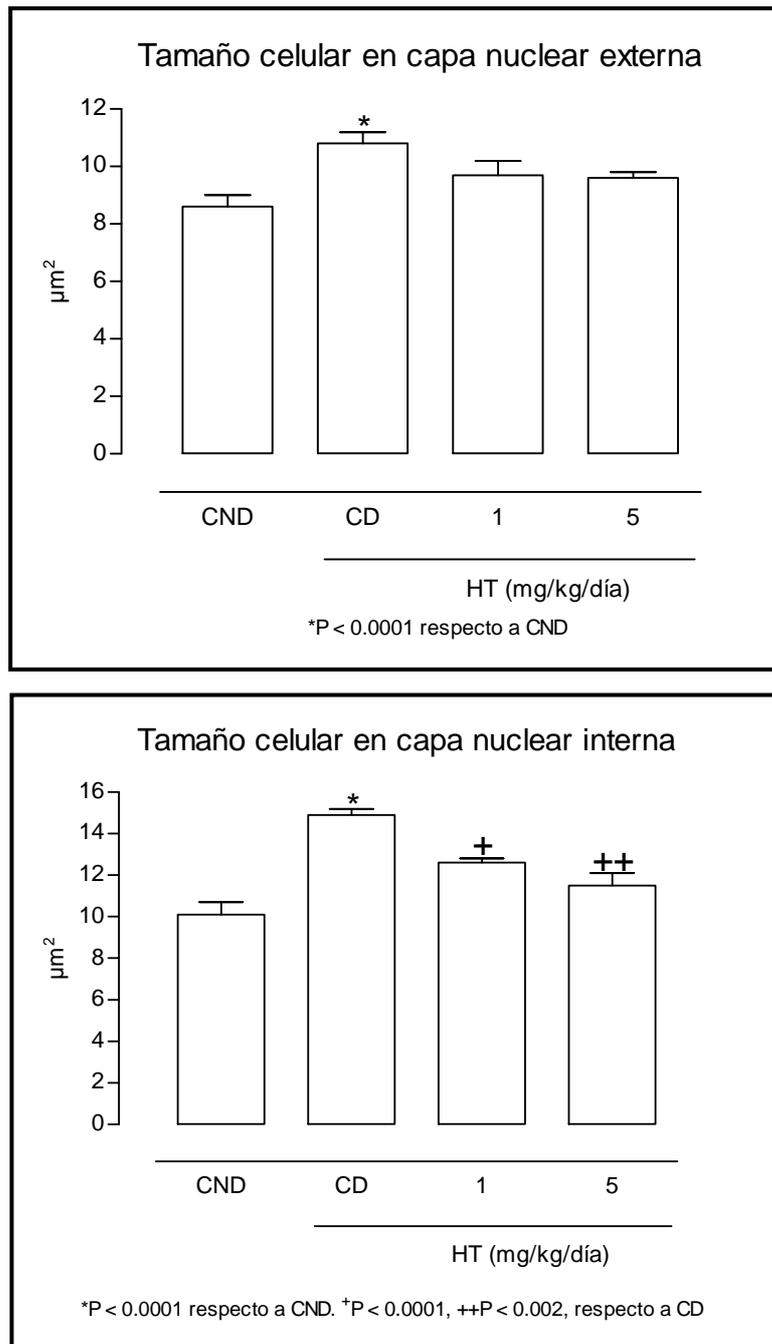
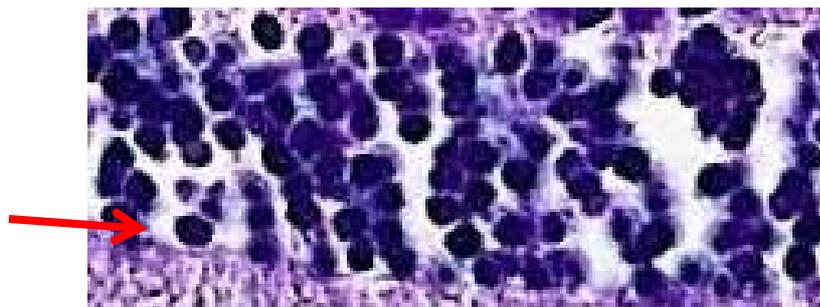
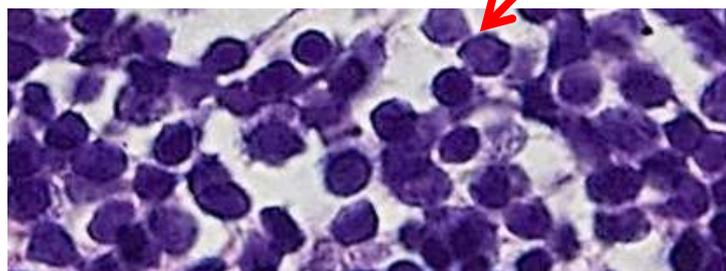


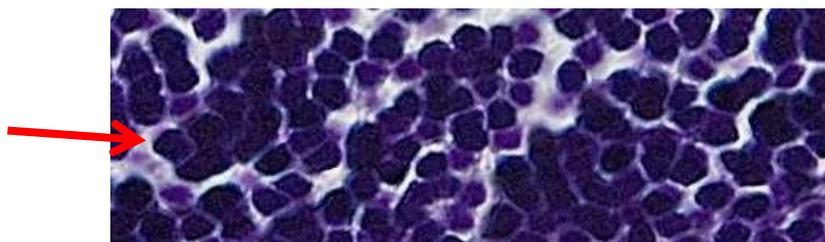
Figura 4.22. Valores medios del tamaño celular de las células de la capa nuclear externa y nuclear interna al finalizar el periodo de seguimiento



Control sano



Control diabético



Hidroxitirosol 1 mg/kg/día



Hidroxitirosol 5 mg/kg/día

Figura 4.23. Ejemplos representativos de la capa nuclear interna (algunas células se indican con flechas) de retinas de animales integrantes del estudio (X40)

## 7. CORRELACIÓN ENTRE ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA RETINA Y BIOMARCADORES A NIVEL VASCULAR

En la Tabla 4.9. se recogen los coeficientes de correlación y significación bilateral entre variables retinianas y biomarcadores vasculares. Las correlaciones más sólidas se han encontrado en relación con el conteo de células ganglionares (Figura 4.24.).

El análisis de regresión lineal múltiple (Tabla 4.10) identifica a la prostaciclina (6-keto-PGF<sub>1α</sub>) como la variable que influye de forma más importante en el conteo de células ganglionares. Por cada pg/mg de prostaciclina se incrementa el conteo de células ganglionares en 13.18 veces:

$$\text{ConctCelGangl (N)} = 13.18 \times (6\text{-keto-PGF}_{1\alpha})$$

Descartada esta variable, la intensidad máxima de agregación (Imax), la 3-nitrotirosina (3NTy) y la administración de 5 mg/Kg/días de hidroxitirosol (HTy5), influyen de manera significativa en el conteo de células ganglionares (Tabla 4.11.):

$$\text{ConctCelGangl (N)} = 13.24 - (0.19 \times 3\text{NTy}) - (0.086 \times \text{Imax}) + 3.44 (\text{HTy5})$$

El conteo de células ganglionares disminuye 0.19 veces por cada pg/mL de 3-nitrotirosina; disminuye 0.086 veces por cada ohmio de intensidad de agregación y aumenta 3.44 veces con la administración de una dosis al día de 5 mg de HT por Kg de peso.

Ejemplo: La predicción de número de células ganglionares para una rata en tratamiento con 5 mg/Kg/día de HT, sería  $13,24 - 0,17 - 1,72 + 3,44 = 14,79$ .

Tabla 4.9. Correlaciones bivariadas entre parámetros de morfología retiniana y biomarcadores de función plaquetaria, endotelial, estrés oxidativo e inflamación vascular (En la parte sombreada de la tabla se destaca las correlaciones a nivel del conteaje de células ganglionares a nivel retiniano).

		lmax	TxB2	Pgl2	Índice Tx/Pg	ON	3-nitrotirosina	TBARs	LDL_ox	VCAM	MPOxs
GrosorMLI	C de Pearson	,745	,669	-,638	,732	,574	,677	,713	,795	,751	,602
	Sig. (bilateral)	,001	,003	,006	,001	,016	,003	,001	,000	,001	,011
GrosorONL	C de Pearson	-,122	,071	,291	-,113	,008	-,186	-,101	-,093	-,084	,111
	Sig. (bilateral)	,640	,785	,257	,665	,976	,475	,700	,723	,748	,672
GrosorOPL	C de Pearson	-,713	-,705	,626	-,726	-,551	-,659	-,706	-,600	-,593	-,542
	Sig. (bilateral)	,001	,002	,007	,001	,022	,004	,002	,011	,012	,025
GrosorINL	C de Pearson	,824	,779	-,622	,778	,539	,724	,817	,789	,731	,661
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,008	,000	,026	,001	,000	,000	,001	,004
<b>GrosorIPL</b>	C de Pearson	,571	,441	-,704	,619	,556	,721	,349	,602	,658	,559
	Sig. (bilateral)	,017	,077	,002	,008	,020	,001	,170	,011	,004	,020
ContCelGangl	C de Pearson	-,868	-,672	,965	-,864	-,725	-,835	-,803	-,817	-,781	-,546
	Sig. (bilateral)	,000	,003	,000	,000	,001	,000	,000	,000	,000	,023

TamañoCelCNE	C de Pearson	,697	,488	-,693	,631	,413	,680	,646	,657	,668	,526
	Sig. (bilateral)	,002	,047	,002	,007	,100	,003	,005	,004	,003	,030
TamañoCelCNI	C de Pearson	,884	,679	-,842	,836	,611	,780	,818	,722	,783	,559
	Sig. (bilateral)	,000	,003	,000	,000	,009	,000	,000	,001	,000	,020
DensidadCelCNE	C de Pearson	-,672	-,694	,748	-,746	-,659	-,604	-,743	-,654	-,558	-,314
	Sig. (bilateral)	,003	,002	,001	,001	,004	,010	,001	,004	,020	,220
DensidadCelCNI	C de Pearson	,753	,671	-,599	,724	,478	,654	,705	,819	,804	,719
	Sig. (bilateral)	,000	,003	,011	,001	,052	,004	,002	,000	,000	,001

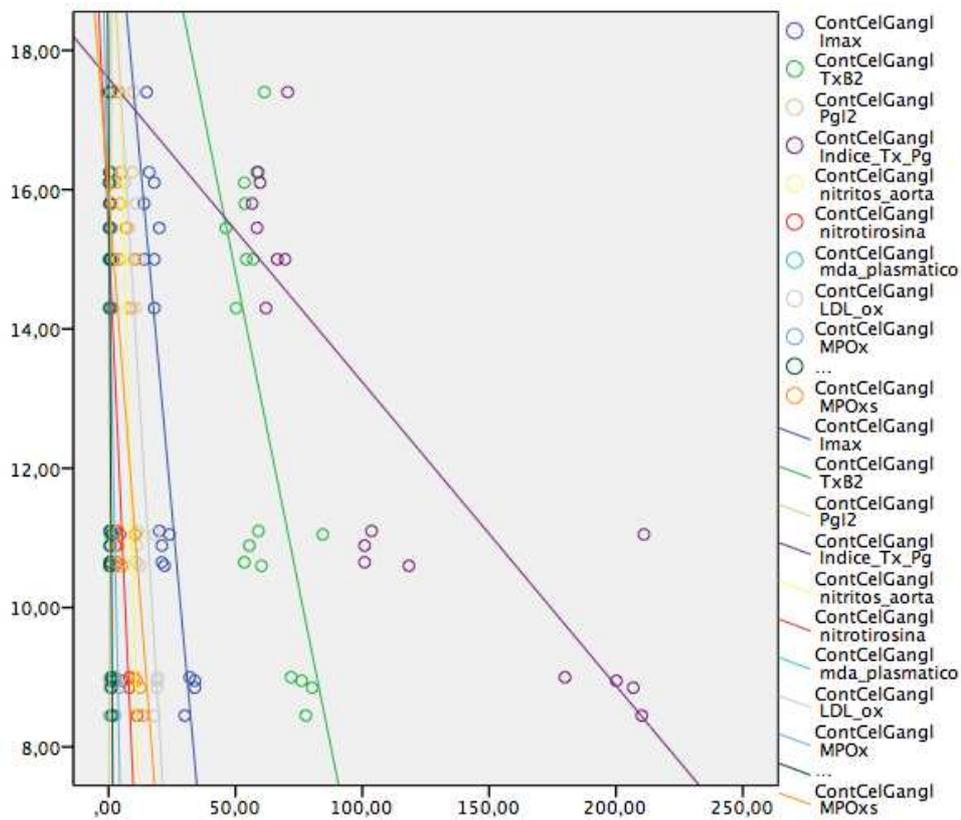


Figura 4.24. Gráfica de dispersión entre la variable histológica contaje de células ganglionares y los diferentes biomarcadores analizados a nivel vascular (función plaquetaria, endotelial, estrés oxidativo e inflamación vascular).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Tabla 4.10. Modelo de regresión lineal múltiple para la variable dependiente conteaje de células ganglionares en retina. Se han incluido en el modelo todos los biomarcadores analizados a nivel vascular (función plaquetaria, endotelial, estrés oxidativo e inflamación vascular).

**Coefficientes**

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	T	Sig.	Intervalo de confianza de 95,0% para B	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
	(Constante)	4,058	,636		6,379	,000	2,702	5,413
	PgI2	13,188	,926	,965	14,242	,000	11,214	15,162

Tabla 4.11. Modelo de regresión lineal múltiple para la variable dependiente conteaje de células ganglionares en retina. Se han incluido en el modelo todos los biomarcadores analizados a nivel vascular (función plaquetaria, endotelial, estrés oxidativo e inflamación vascular), excepto la prostaciclina.

Coeficientes								
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	T	Sig.	Intervalo de confianza de 95,0% para B	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
	(Constante)	13,240	,708		18,695	,000	11,638	14,843
	grupo4	3,444	,329	,644	10,467	,000	2,700	4,189
	nitrotirosina	-,191	,067	-,241	-2,838	,019	-,343	-,039
	Imax	-,086	,035	-,220	-2,476	,035	-,164	-,007



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**NÓ - SUCS - D**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

La retinopatía diabética reconoce una fisiopatología que podría ser común a cualquier proceso acontecido en la enfermedad cardiovascular macroangiopática, si bien se diferencia de ella en varios hechos fundamentales: los vasos sanguíneos retinianos poseen una capa de fibras musculares muy escasa, en relación a los de mayor calibre; en segundo lugar, presenta una capacidad proliferativa (formación de neovasos) mayor que las arterias de otras localizaciones; la capa de células endoteliales juegan un papel fundamental en la regulación fisiológica de la microvasculatura retiniana; por último, no hay que olvidar la gran interacción de estos vasos con los pericitos y la propia glía retiniana, es decir entre las células vasculares y las nerviosas (Yu et al., 2014).

A pesar de estas diferencias, es aceptado que la fisiopatología de la retinopatía diabética tiene muchos puntos en común con la de la vasculopatía en general de esta endocrinopatía. Obviamente la repercusión local en el tejido retiniano destaca algunas diferencias, las cuales comentaremos en su momento. Por eso plantearemos la estructura de este apartado intentando evaluar y comentar los cambios encontrados en las distintas variables determinadas, por el modelo experimental y tras la administración de hidroxitirosol, atendiendo a un cierto orden fisiopatológico reconocido en la vasculopatía diabética:

1. Influencia de la hiperglucemia mantenida.
2. Activación leucocitaria.
3. Estrés oxidativo y nitrosativo como ejes fundamentales del proceso.
4. Disfunción endotelial.
5. Activación del proceso inflamatorio.
6. Daño tisular retiniano.

Si bien es un esquema bastante didáctico, no está exento de realidad a nivel de los mecanismos de daño vascular y retiniano, obviamente basado en estudios publicados al respecto (Cohen & Gardner, 2016; De La Cruz et al., 2004). De forma resumida, el citado esquema fisiopatológico se iniciaría con un estado de hiperglucemia mantenida que originaría una activación del sistema de NADPH oxidasa y por ende una formación excesiva de radicales libres, los cuales iniciarían la expresión de moléculas adhesivas y

proinflamatorias, así como una activación de la adhesión y penetración de leucocitos en la pared arterial; la entrada paralela de colesterol LDL, junto a la formación de mediadores inflamatorios y de radicales libres, induce a la oxidación de dicha lipoproteína, formándose LDL oxidada; ésta, junto a los propios mediadores inflamatorios, producen un doble efecto: de una parte, hacia el espesor de la pared arterial inducen la proliferación de células de la capa muscular arterial (Komolafe et al., 2009) y, de otra, hacia el endotelio, originan un déficit del funcionalismo normal endotelial, destacando una disminución de su actividad antitrombótica. De esta forma, la pared arterial en su conjunto se convierte en un elemento susceptible de iniciar un proceso isquémico-trombótico que configure una vasculopatía diabética manifiesta.

## 1. INFLUENCIA DE LA HIPERGLUCEMIA MANTENIDA

Es indudable que la hiperglucemia mantenida en el tiempo es un punto clave en la comprensión de todo el proceso vasculopático posterior. Si no se controla esta hiperglucemia ningún tratamiento farmacológico podría tener alguna efectividad. La hiperglucemia modifica el equilibrio bioquímico intracelular, así como activa vías nucleares que inducen la formación, entre otros, de mediadores inflamatorios y componentes del estrés oxidativo intracelular. Como analizaremos posteriormente, todas las variables que están reconocidas como incidentes en la fisiopatología de la retinopatía diabética, se encuentran alteradas en el modelo experimental utilizado en nuestro estudio y, en primer lugar, la presencia de esa hiperglucemia se constata en todos los grupos experimentales tratados inicialmente con estreptozotocina (Tabla 4.1.). Por lo tanto, el efecto de una hiperglucemia mantenida se produce en este modelo experimental.

En primer lugar es necesario acotar el efecto observado tras la administración de hidroxitirosol al propio compuesto y no a un posible efecto directo sobre los niveles de glucosa en sangre, ya que es conocido que el control de la glucemia es un elemento clave para frenar las complicaciones de la diabetes mellitus. Por otra parte, algunos estudios han de mostrado que este polifenol podría mejorar el perfil glucémico en distintos modelos experimentales de diabetes tipo 2 (Cao et al., 2014; Jemai et al., 2009). Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que ninguna de las dosis

de hidroxitirosol utilizadas modifica los niveles de glucosa en sangre tras dos meses de tratamiento (Tabla 4.1. y Figura 4.1.). En los estudios en los que se postula un posible efecto antidiabético de hidroxitirosol, los animales mostraron niveles plasmáticos de glucosa alrededor de 280-300 mg/dL mientras que en nuestro estudio éstos alcanzaron valores de 470-507 mg/dL. Posiblemente estas cifras tan altas puedan ser un hándicap para ejercer un efecto reductor de la glucosa circulante. Por otra parte, este efecto “antidiabético” ha sido demostrado en modelos de diabetes tipo 2, en los cuales existe una desensibilización de los tejidos a la insulina, mientras que el modelo utilizado en nuestro estudio corresponde a la diabetes tipo 1, en el cual el eje fisiopatológico es un déficit de producción pancreática de insulina. No podemos descartar que hidroxitirosol pudiera tener algún efecto sobre la sensibilidad de los receptores de insulina ante esta hormona y no sobre la producción neta de insulina por las células  $\beta$  del páncreas (Murotomi et al., 2015).

Por lo tanto, sin descartar un posible efecto reductor de la glucemia, en nuestro estudio no se puede adjudicar una responsabilidad a este mecanismo en la interpretación global de los efectos de hidroxitirosol sobre los biomarcadores analizados.

## 2. ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA

Es preciso reseñar que la mayor parte de las alteraciones bioquímicas se producen casi coetáneamente y que éstas interaccionan entre sí constantemente, de ahí que un orden en estas alteraciones es algo artificial, pero sirve para evaluar el orden en el que se podría apreciar la evolución de los cambios globales acontecidos en la microangiopatía diabética. Este es el caso de la activación leucocitaria, la cual se identifica con los siguientes estímulos (Angeli et al, 2015; Carbone et al, 2015; Stulc et al, 2012):

- La propia hiperglucemia es un elemento activador de la actividad leucocitaria en general.
- El estrés oxidativo originado por la hiperglucemia mantenida puede activar a los leucocitos y, mediante el daño endotelial, facilitar la interacción entre leucocitos y endotelio.

- El estado inflamatorio vascular, influenciado fundamentalmente por hiperglucemia y estrés oxidativo, produce una activación leucocitaria y ésta, a su vez, induce el propio estado inflamatorio y pro-oxidante.

Sea de una forma u otra, se aprecia una activación leucocitaria en las primeras fases de la vasculopatía diabética. Bioquímicamente podemos definir y describir una activación leucocitaria inespecífica mediante la determinación de algunos mediadores tales como mieloperoxidasa (MPOx) o proteínas adhesivas tipo VCAM. En nuestro estudio hemos detectado un incremento de MPOx y VCAM-1 (Tabla 4.5. y Figura 4.14 y 4.15.), es decir, demostramos en el modelo experimental utilizado, una activación evidente de los leucocitos.

La expresión y formación endotelial de proteínas adhesivas, como la VCAM-1, es fundamental para explicar la primera fase de “acercamiento” e interacción de los leucocitos con el endotelio para posteriormente comenzar el complejo bioquímico inflamatorio vascular. Como hemos comentado anteriormente, la concentración sérica de VCAM-1 es significativamente superior en los animales diabéticos que en los normoglucémicos. La administración preventiva de hidroxitirosol redujo significativamente esta variable, llegando a normalizar sus niveles, ya que alcanzaron valores alrededor de los obtenidos en los animales no diabéticos. Este efecto ha sido previamente descrito en la bibliografía en experimentos *in vitro* en cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano inducidas con homocisteína o TNF $\alpha$  (Carluccio et al., 2007; Catalán et al., 2015; Dell’Agli et al., 2006). Es estos casos se postula que hidroxitirosol regula a la baja al factor nuclear NF $\kappa$ B, disminuyendo de esta forma la expresión de esta proteína adhesiva. Nuestro trabajo demuestra que en un modelo *in vivo* de diabetes mellitus, la administración preventiva de hidroxitirosol disminuye la producción de VCAM-1, posiblemente por su efecto regulador nuclear, si bien esta aseveración requiere un trabajo de investigación adicional.

Pero no solo hidroxitirosol disminuye la formación de proteínas que atraen leucocitos hacia el endotelio vascular, sino que también reduce de forma general la actividad de dichos leucocitos, como se puede observar al determinar una disminución de la concentración de MPOx, como índice inespecífico de activación leucocitaria. Algunos trabajos apuntan de forma indirecta hacia estos resultados, ya que la administración a ratas de *Lippiacitriodora* (aporta hidroxitirosol, entre otros

polifenoles) redujo casi un 75% los niveles de MPOx en neutrófilos circulantes (Quirantes-Piné et al., 2013). Respecto a estudios con hidroxitirosol como tal, se ha demostrado un descenso de MPOx en pared intestinal de ratones a los que se ha producido un estado de enfermedad inflamatoria intestinal con sulfato sódico dextrano (DSS) (Sánchez-Fidalgo et al., 2015).

Ambas variables, tal y como indicamos anteriormente, se imbrican en las primeras fases de la microangiopatía diabética, aunque también son índices del proceso de inflamación vascular, que analizaremos posteriormente. Sea como sea, la administración de hidroxitirosol reduce la activación endotelial para atraer leucocitos así como la propia actividad leucocitaria. La inhibición del estrés oxidativo posiblemente reduzca la estimulación de los radicales libres sobre los factores nucleares (tipo NfκB) que regulan la formación de proteínas adhesivas (tipo VCAM-1). Es decir, la administración de hidroxitirosol frena la fase inicial de las alteraciones microvasculares en el modelo experimental de diabetes utilizado en el presente estudio.

### 3. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO COMO EJES FUNDAMENTALES DEL PROCESO

Niveles altos de glucosa inducen un estado de estrés oxidativo intraendotelial, a través de una estimulación de la NADPH oxidasa, que se suma a la aparición de un estrés oxidativo general (Jansen et al., 2013; Shaw et al., 2014). Además, debido a la presencia de mediadores inflamatorios y de radicales libres, también se ha descrito un incremento en la expresión y función de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo cual originaría, en presencia de aniones superóxidos, un exceso de formación de radicales peroxinitritos (Di Pietro et al., 2013), hecho que demostramos mediante un incremento de la 3-nitrotirosina, los cuales son altamente reactivos y citotóxicos.

La formación de radicales libres condiciona la síntesis y activación de elementos inflamatorios, tales como VCAM-1, MPOx, interleucinas, radicales peroxinitritos, además de ser responsables de la oxidación de la LDL (Angeli et al., 2015). Este es un punto clave en la fisiopatología de la enfermedad vascular, ya que representa el centro de la influencia de los factores anteriormente citados, el fallo endotelial que produce la

entrada de LDL al interior del vaso sanguíneo y el conocido efecto de la LDL oxidada sobre el propio proceso inflamatorio, proliferativo y tóxico para la célula endotelial.

En el modelo experimental utilizado en el presente estudio se puede confirmar la presencia de un estrés oxidativo (incremento de TBARS y LDLox, así como una disminución de GSH) (Tabla 4.3. y Figuras 4.7., 4.8. y 4.9.) y nitrosativo (incremento de la concentración de 3-nitrotirosina) (Tabla 4.4. y Figura 4.13.). Es decir, la diabetes experimental, iniciando el proceso con un claro estado hiperglucémico, produce una estimulación leucocitaria que provocaría la interacción de leucocitos y células endoteliales, así como induce un estrés oxidativo y nitrosativo, favoreciendo la oxidación de la LDL y la alteración de la función endotelial.

En este contexto, la administración de hidroxitirosol reduce tanto el estrés oxidativo (TBARS, LDLox y niveles de GSH) como el nitrosativo (3-nitrotirosina). Es decir, de alguna manera frena la formación de los elementos nucleares del proceso microangiopático que generarán el desarrollo posterior de las alteraciones vasculares y retinianas.

El efecto antioxidante de hidroxitirosol ha sido ampliamente descrito en la bibliografía, tanto en modelos químicos como en biológicos (véase revisiones de Granados-Principal et al., 2010 y de Raederstorff, 2009). Asimismo, en estudios previos de nuestro grupo se ha descrito una ausencia de efecto antioxidante en tejido cerebral de rata sin inducción, mientras que este efecto se observó tras estimulación del estrés oxidativo de forma química o mediante un modelo de hipoxia-reoxigenación cerebral (Cabrerizo et al., 2013; Guerrero et al., 2012). En el modelo de diabetes experimental se observa una mayor concentración de peróxidos lipídicos que en los animales no diabético, por lo que se considera un modelo de estimulación y por ello el hidroxitirosol muestra un claro efecto antiperoxidativo lipídico.

Si consideramos la formación de estrés oxidativo el centro y uno de los pasos iniciales de la vasculopatía diabética, el hecho de inhibir su formación es un punto importante para explicar el efecto beneficioso de hidroxitirosol en la disfunción endotelial y en el propio desarrollo posterior de la vasculopatía (Storniolo et al., 2014). Pero además, nuestro estudio demuestra que en el modelo de diabetes experimental, la administración de hidroxitirosol también modifica algunos parámetros representativos

de activación leucocitaria, de importancia en las fases iniciales de la vasculopatía (Stulc et al., 2012).

En todos estos efectos, la inhibición del estrés oxidativo juega un papel fundamental en el esquema de acción de hidroxitirosol, ya que la formación de radicales libres condiciona la síntesis y activación de elementos inflamatorios, tales como VCAM-1, MPOx, citosinas o radicales peroxinitritos, además de ser responsables de la oxidación de la LDL (Angeli et al., 2015). En el modelo experimental utilizado en nuestro estudio se puede comprobar esta relación al observar el perfil de comportamiento de los grupos de animales respecto a estas variables. En este modelo experimental, la inhibición de los peróxidos lipídicos por hidroxitirosol pudiera condicionar (en el sentido de reducirla) la formación de LDLox, VCAM-1 y MPOx, pudiendo ejercer un efecto directo sobre la formación de peroxinitritos, independientemente de su efecto antioxidante, tal y como comentaremos posteriormente.

En primer lugar, hidroxitirosol reduce la concentración de LDLox, lo cual coincide con diversos estudios publicados en los que se demuestra que los polifenoles del aceite de oliva virgen previenen de la oxidación de la LDL en humanos, tanto sanos como aquellos con alguno de los factores de riesgo cardiovascular (Castañer et al., 2012; Covas et al., 2006, 2012). La oxidación de la LDL es un punto clave en la génesis y evolución de la enfermedad arterial, sea cual sea el origen de la misma (Rafieian-Kopaei et al., 2014), por lo que la protección de la LDL ante la oxidación se considera un efecto muy beneficioso en la prevención de la enfermedad cardiovascular, ya sea de forma directa o, posiblemente más óptimo, mediante una inhibición del estrés oxidativo (Tousoulis et al., 2013).

En segundo lugar, la formación de peroxinitritos se relaciona con la de óxido nítrico y la de aniones superóxidos, pero de forma paralela a una activación de la iNOS, la cual produce grandes cantidades de óxido nítrico. Asimismo estos peroxinitritos inducen la formación de nuevos mediadores inflamatorios. La activación de la iNOS se enmarca dentro de un ambiente pro-inflamatorio. La administración de hidroxitirosol produce una disminución de la producción de peroxinitritos. Dado que la producción de peroxinitritos está en directa relación con la producción de estrés oxidativo, no extraña un efecto sobre la producción de los mismos.

Respecto al efecto de hidroxitirosol sobre la formación de peroxinitritos, se ha demostrado previamente lo siguiente:

- No presenta un efecto directo sobre la actividad óxido nítrico sintasa constitutiva endotelial (eNOS) (Schmitt et al., 2007).

- Hidroxitirosol disminuye en tejido vascular la producción de radicales derivados del óxido nítrico y del daño producido por éstos (Rietjens et al., 2007).

- Hidroxitirosol capta especies reactivas de nitrógeno, pero solo en medio extracelular (de la Puerta et al., 2001).

- Hidroxitirosol previene la nitración de proteínas inducida por peroxinitritos (Deiana et al., 1999).

- Hidroxitirosol inhibe la expresión de enzimas inducibles (iNOS, COX-2) por mediadores inflamatorios en macrófagos (Richard et al., 2011; Zhang et al., 2009) y en células endoteliales humanas (Scoditti et al., 2012).

- Diversos compuestos fenólicos (resveratrol, flavonoides, ácidos hidroxibenzoicos, etc), son capaces de captar radicales peroxinitritos en relación con un efecto neuroprotector en diversos modelos animales, si bien no se puede concluir si este efecto se debe a un mecanismo directo sobre los radicales de nitrógeno o indirecto, sobre los mecanismos de control de la producción de los mismos (Chen et al., 2013). Este último análisis nos puede orientar hacia un efecto de hidroxitirosol sobre la formación de peroxinitritos, pero con independencia de su efecto antioxidante. Es decir, se trataría de un efecto independiente de su potencial antioxidante.

Por lo tanto, la administración de hidroxitirosol a los animales diabéticos actúa en las fases más primarias del daño vascular, así como en los estadios más nucleares del mismo, es decir, podríamos aventurar que debería al menos frenar la evolución de los siguientes pasos del proceso microangiopático retiniano.

#### 4. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La disfunción endotelial se puede cuantificar de diferentes formas, pero quizás la mejor es valorar sustancias endoteliales que definen una de sus principales funciones, la antitrombótica. Prostaciclina y óxido nítrico son dos mediadores reconocidos como fundamentales para explicar la capacidad del endotelio para frenar el fenómeno de la activación plaquetaria, la cual es el inicio de la trombosis arterial. No obstante, como indicamos anteriormente, la disfunción endotelial, al igual que el resto de estadios nombrados hasta ahora, se imbrica en un complejo bioquímico-funcional de interacciones de distintas vías. El resultado final es la falta o el déficit de función de las células endoteliales, pero los mecanismos de producción de dicha disfunción son múltiples: la propia hiperglucemia, el estrés oxidativo, los mediadores de adhesión leucocitaria y la propia inflamación de la pared vascular.

La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) se produce en el endotelio vascular a partir del ácido araquidónico libre y por intervención primaria de la enzima ciclooxigenasa. Estas características coinciden con la producción de tromboxano (TxA<sub>2</sub>) en la plaqueta, prostanoide de efectos contrarios a los de la prostaciclina en cuanto a la capacidad vasodilatadora (PGI<sub>2</sub>) o vasoconstrictora (TxA<sub>2</sub>) y antiagregante plaquetaria (PGI<sub>2</sub>) o proagregante plaquetaria (TxA<sub>2</sub>). Es por ello que clásicamente se utilice el cociente tromboxano/prostaciclina como índice indirecto del estado pro- o anti-trombótico en un medio vascular determinado.

Asimismo, la producción plaquetaria de tromboxano se encuentra elevada en la diabetes mellitus y concretamente en el modelo experimental utilizado en nuestro estudio (De La Cruz et al., 2012), posiblemente por un doble motivo: el efecto de la hiperglucemia sobre la función plaquetaria y en segundo lugar, como reacción ante el déficit bioquímico de defensa antitrombótica endotelial (al faltar la prostaciclina, la plaqueta puede estimularse con más facilidad).

Por todo ello, el cociente tromboxano/prostaciclina, si bien no es el único factor, representa con bastante aproximación el estado de activación trombótica dependiente de las plaquetas, hecho fundamental en el proceso isquémico tisular. Recordemos que el resultado de realizar este cociente en nuestro estudio ha sido el siguiente:

<b>Grupo</b>	<b>TxB<sub>2</sub> / 6-keto-PGF<sub>1α</sub></b>
<b>CND</b>	50.8 ± 6.8
<b>CD</b>	191 ± 16*
<b>HT-1</b>	126 ± 13†
<b>HT-5</b>	68.2 ± 5.9†

\*P < 0.0001 respecto a CND. †P < 0.0001 respecto a CD.

CND: control no diabético, CD: control diabético, HT: hidroxitirosol (la numeración se refiere a las dosis administradas: 1 y 5 mg/kg/día p.o.)

La diabetes experimental eleva este cociente, lo cual es debido a un incremento en la producción plaquetaria de tromboxano (Tabla 4.2. y Figura 4.4.) y a una disminución en la vascular de prostaciclina (Tabla 4.2. y Figura 4.5.). Los animales tratados con hidroxitirosol muestran una reducción de este cociente por un efecto doble: inhibición de la producción plaquetaria de tromboxano y freno en la caída de síntesis de prostaciclina debida a la diabetes, llegando a evitar esta disminución casi totalmente con la dosis de 5 mg/kg/día.

La importancia de la ciclooxigenasa en el mantenimiento y/o activación de la actividad plaquetaria en el ser humano viene dada por la propia fisiología de los prostanoïdes que se derivan de su intervención: el tromboxano es un potente agregante plaquetario, vasoconstrictor y estimulante de la proliferación de las fibras musculares vasculares, mientras que la prostaciclina es un potente agente inhibidor del funcionalismo plaquetario, vasodilatador e inhibidor de la proliferación celular vascular (FitzGerald y cols., 2000). Al proceder ambos prostanoïdes del mismo origen químico, el ácido araquidónico, se planteó el concepto de “balanza tromboxano/prostaciclina” como eje sobre el que giraba la fisiología, fisiopatología y farmacología de la interacción plaqueta-pared vascular y de los eventos trombóticos, hasta tal punto de concluir ya en trabajos clásicos (Bunting et al., 1983) que “un balance entre la cantidad de tromboxano A<sub>2</sub> formado en las plaquetas y de prostaciclina sintetizada en los vasos sanguíneos, es crítico en la formación de un trombo arterial”, afirmación válida hoy día en todas sus partes.

No obstante, este concepto de “balanza tromboxano/prostaciclina” es una simplificación del complejo proceso de la trombogénesis, ya que es solo un componente, aunque importante, de una intrincada, organizada y exquisita regulación de la bioquímica y fisiología vascular para mantener un correcto funcionalismo cardiovascular. Se han descrito y demostrado otros mecanismos que participan en ambos platillos de esta hipotética balanza, tanto en su vertiente antitrombótica (óxido nítrico, ADPasa, trombomodulina, proteoglicanos similares a la heparina, inhibidor de la vía del factor tisular y el activador tisular del plasminógeno) como en la protrombótica (trombina, ADP, factor tisular, inhibidor del activador del plasminógeno, factor de von Willebrand, colágeno y P-selectina) (Funk & FitzGerald, 2007). Por último, se ha demostrado que la producción de prostaciclina en el ser humano dependen en gran medida de la activación de la ciclooxigenasa-2 o inducible, la cual también es inhibida por hidroxitirosol.

Por todos estos motivos, respecto a hidroxitirosol, no quiere decir que la inhibición de la síntesis de tromboxano sea el único mecanismo por el que presente un potencial efecto antitrombótico *in vivo*, ya que, por ejemplo, se ha demostrado un efecto inhibidor de la expresión de proteínas de adhesión en la superficie endotelial, tales como ICAM-1 y VCAM-1 (Dell’Agli y cols., 2006).

Respecto a la prostaciclina, se acepta que en las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus existe un déficit en su síntesis, posiblemente por un doble mecanismo: la propia disfunción endotelial que reduce todas las funciones de este tipo celular y, de otra parte, el estrés oxidativo que disminuye claramente la actividad prostaciclina-sintetasa (Giacco&Brownlee, 2010; Tousoulis et al., 2013). La administración de hidroxitirosol a los animales diabéticos frena el descenso de la síntesis de prostaciclina observado en los animales no tratados. No se ha descrito un efecto estimulante de la actividad ciclooxigenasa por parte de hidroxitirosol, más bien lo contrario, tanto en experimentos *in vitro* (González-Correa et al., 2009) como tras su administración oral a animales sanos (González-Correa et al., 2008). Por ello pensamos que el efecto encontrado en el presente estudio se derive de su acción antioxidante, de forma que al inhibir la producción de radicales libres se reduce la influencia negativa de éstos sobre la síntesis de prostaciclina (Upmacis et al., 2006).

Por lo tanto, la administración de hidroxitirosol a animales diabéticos protege de la reducción de la síntesis de prostaciclina, lo cual añadido a la inhibición de la plaquetaria de tromboxano, ejerce un efecto beneficioso sobre el cociente tromboxano/prostaciclina, ayudando de esta forma a frenar parte de la disfunción endotelial y sus consecuencias, sobre todo la posibilidad de isquemia tisular, en nuestro caso la retiniana.

Otro factor relacionado con la disfunción endotelial es el déficit del óxido nítrico endotelial. En la disfunción endotelial descrita en la fisiopatología de la vasculopatía diabética, existe un desacoplamiento de la enzima eNOS (óxido nítrico sintasa constitutiva endotelial), debido fundamentalmente a la producción de estrés oxidativo intracelular, lo cual llevaría a una disminución en la síntesis de óxido nítrico (Triggle&Ding, 2010). No obstante, la existencia de un claro estatus inflamatorio origina la activación de enzimas inducibles, tales como la iNOS, la cual en presencia de óxido nítrico y radicales superóxidos, forma peroxinitritos (Di Pietro et al., 2013). En nuestro estudio hemos detectado un déficit en la producción de óxido nítrico, indicando de esta forma que se valora en gran medida el déficit de eNOS más que la influencia de la iNOS, sin descartar que en fases más avanzadas de la diabetes podría participar activamente este aspecto de la síntesis de óxido nítrico.

La administración de hidroxitirosol frena la caída de óxido nítrico, al igual que ocurría con la de prostaciclina, por lo que podríamos aseverar que el efecto antioxidante de este compuesto podría participar en ambas vías endoteliales, de forma que se preservarían en parte los principales mecanismos antitrombóticos endoteliales, pudiendo participar estos hechos en una posible reducción de la isquemia retiniana, tal y como se demostró previamente en este mismo modelo experimental a nivel de la circulación vascular retiniana tras la administración de diversos fármacos que modificaban estas vías bioquímicas (De La Cruz et al., 2004, 2012).

Como ya hemos comentado, una de las principales consecuencias de la vasculopatía, sea cual sea su origen, es el fallo en la capacidad antitrombótica del endotelio y en la transformación de la pared arterial en un material protrombogénico. Hasta este momento hemos analizado aquellas variables relacionadas con el funcionalismo de la pared arterial y hemos podido constatar que éstas se encuentran alteradas en el modelo experimental de diabetes, en el sentido de favorecer los

mecanismos de activación trombogénica. Asimismo estas vías son re-equilibradas en parte por la administración preventiva de hidroxitirosol.

Pero en la fisiopatología final del proceso trombótico se encuentra una activación de la función plaquetaria, que constituye el núcleo fundamental del trombo arterial. En la diabetes mellitus, la hiperglucemia crónica origina per se una activación plaquetaria y ésta se ve incrementada por la falta de respuesta antiplaquetaria endotelial (Santilli et al., 2015). En el mismo modelo experimental utilizado en nuestro estudio se ha demostrado que existe una activación plaquetaria desde los primeros periodos de evolución de la diabetes (De La Cruz et al., 2012; Moreno et al., 1995a). Este incremento de la agregabilidad plaquetaria unido al déficit prostaciclínico vascular, se relaciona con eventos isquémicos en este modelo experimental, tales como la isquemia retiniana (De La Cruz et al., 2004).

La administración preventiva de hidroxitirosol redujo la hiperactividad plaquetaria observada en los animales diabéticos, tanto en su aspecto más general como en la síntesis del principal mecanismo activador plaquetario, como es el tromboxano (Tabla 4.2. y Figuras 4.4. y 4.5.). Algunos compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen presentan unos efectos inhibidores del funcionalismo plaquetario y la producción de tromboxano, tales como el propio hidroxitirosol (Dell'Agli et al., 2008; Petroni et al., 1995), oleuropeína (Petroni y cols., 1997), compuestos fenólicos isocrománicos (Togna y cols., 2003), etc. Incluso la propia administración de aceite de oliva virgen a ratas o a conejos reduce significativamente la agregación de las plaquetas inducidas con colágeno (De la Cruz y cols., 2000; González-Correa y cols., 2006). Asimismo, en el mismo modelo experimental utilizado en el presente estudio, la administración de hidroxitirosol redujo significativamente la agregabilidad plaquetaria inducida con colágeno (López-Villodres et al., 2016).

Por lo tanto, podemos aseverar que, al menos desde un punto de vista bioquímico, la administración de hidroxitirosol reduce la disfunción endotelial producida en la evolución de la vasculopatía diabética, así como la tendencia trombogénica bioquímica producida por la propia diabetes mellitus.

## 5. ACTIVACIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO

Un aspecto relacionado con el estrés oxidativo es la participación de mediadores inflamatorios y citocinas en la aparición de la enfermedad vascular diabética. En las primeras etapas de la vasculopatía, el aumento de la adhesión de leucocitos al endotelio vascular induce un aumento en proteínas adhesivas tales como VCAM-1, tal y como comentamos en apartados anteriores. La mieloperoxidasa también indica la activación específica de estos leucocitos, y en este respecto se sabe que las interleucinas participan en el desarrollo y la evolución de la inflamación vascular (Tousoulis et al., 2013). Esta inflamación vascular sigue incrementando el proceso de “autoalimentación” bioquímica del daño microangiopático, ya que la presencia de los mediadores inflamatorios favorece más estrés oxidativo y nitrosativo, más disfunción endotelial y, por lo tanto, un mayor avance en la consecución de la microangiopatía morfológica diabética (Ahsan, 2015).

En el modelo experimental utilizado en nuestro estudio se cumple la aparición de un estado pro-inflamatorio, definido por los incrementos en los animales diabéticos de VCAM-1, MPOx e IL-1 $\beta$ .

La administración de hidroxitirosol también disminuye estos mediadores inflamatorios: a la reducción de VCAM-1 y MPOx, ya comentada anteriormente, se une un efecto reductor de los niveles de IL-1 $\beta$  (Tabla 4.5. y Figura 4.16.). Respecto a los dos primeros mediadores, ambas dosis de hidroxitirosol ejercen un efecto significativo, mientras que la producción de IL-1 $\beta$  solo se reduce significativamente con la dosis de 5 mg/kg/día.

Es conocido que este polifenol disminuye la producción de citoquinas y TNF $\alpha$  en diversos tejidos, fundamentalmente en macrófagos estimulados (Richard et al., 2011), suero de ratas hipercolesterolémicas (Taberner et al., 2014) y cultivo de células endoteliales humanas inducidas (Carluccio et al., 2007; Catalán et al., 2015; Dell'Agli et al., 2008) y se acepta que regula a la baja factores nucleares que modulan su síntesis (Rosillo et al., 2015). Con respecto a la producción de IL-1 $\beta$ , se ha demostrado que HT y tirosol reducen la concentración de esta interleucina en cortes de cerebro de rata en un modelo de hipoxia-reoxigenación (De La Cruz et al., 2015), probablemente debido al

efecto del mecanismo señalado anteriormente sobre la regulación negativa del factor nuclear NFκB (Killeen et al., 2014).

Por lo tanto, HT puede reducir el estado inflamatorio vascular tanto en las primeras etapas (activación leucocitaria) como durante la progresión de la enfermedad vascular (IL-1β). Si aceptamos la importancia de la inflamación vascular en el desarrollo de la microangiopatía retiniana, debemos aseverar que hidroxitirosol podría jugar un papel importante en la prevención de esta complicación ocular de la diabetes mellitus.

## 6. DAÑO TISULAR RETINIANO

De una forma didáctica hemos descrito el proceso de retinopatía diabética como una consecución temporal en la que ordenadamente participan los siguientes elementos:

Hiper glucemia → Daño bioquímico celular → Disfunción endotelial → Isquemia → Daño tisular retiniano

Asimismo hemos indicado en cada fase la naturaleza didáctica de este relato, ya que todas estas alteraciones se imbrican entre sí desde el inicio de todo el proceso. Lo único que está temporalmente demostrado es que todo se inicia con la hiper glucemia mantenida. A partir de ahí, las cifras altas de glucosa comienzan *per se* a modificar todos las demás vías y a su vez estas vías inician un proceso de estimulación recíproca que dibuja un esquema de evolución de la retinopatía hasta llegar a la ceguera, en caso de no aplicar las medidas preventivas adecuadas, comenzando, por supuesto, por un control de la glucemia adecuado (Arden & Sivaprasad, 2012).

Pero hay un hecho que, aunque simplista, puede orientar a la discusión de nuestros resultados: la hiper glucemia produce una vasculopatía en la microcirculación retiniana y eso induce un daño en el tejido retiniano, pero esta hiper glucemia también daña directamente al tejido nervioso y hay que recordar que la retina es un complejo vasculo-nervioso. La duda es ¿qué es antes?, ¿el daño vascular o el neuronal? (Villarrol et al., 2010; Zhang et al., 2013). Tal es la importancia del daño directo de la hiper glucemia sobre las células nerviosas retinianas, que algunos autores consideran la retinopatía diabética como un proceso neurodegenerativo en la evolución de la diabetes mellitus (Ozawa et al., 2011; Payne et al., 2014)

El daño vascular demostrado bioquímicamente en nuestro trabajo es evidente: se producen una serie de alteraciones en el ámbito vascular que evidencian un esquema de daño compatible con una vasculopatía (véase la discusión realizada en los apartados anteriores). Pero el daño neuronal también se evidencia a la vista de los resultados morfométricos obtenidos. Asimismo, en este mismo modelo experimental, nuestro grupo de trabajo demostró un daño neuronal en cortes cerebrales de rata, causado por una hiperglucemia mantenida (González-Correa et al., 2006; Reyes et al., 2016).

Sea de una forma u otra, los resultados de nuestro estudio muestran que a los dos meses de evolución de la diabetes experimental, ambos tipos de alteraciones (vasculares y neuronales) están presentes. En este trabajo no hemos realizado pruebas de vascularización retiniana ya que nos hemos centrado morfológicamente a nivel del tejido nervioso retiniano. En este sentido, los animales diabéticos presentaron las siguientes alteraciones:

- Modificación del grosor de la retina.
- Disminución clara de las células ganglionares y en menor medida de la capa nuclear externa.
- Incremento en el tamaño de las células integrantes de la capa nuclear interna y externa.

Estos resultados coinciden en gran medida con los ya aportados por otros grupos en la bibliografía, utilizando el mismo modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 (Ozawa et al., 2011; Szabadfi et al., 2012).

Respecto al grosor de la retina, llama la atención que en los animales diabéticos se produce una discordancia entre la medida realizada en el total de las capas retinianas y la suma del grosor de cada una de las capas (Figura 5.1.). Es más, el grosor total se incrementa, lo cual no coincide con los trabajos antes citados. Pensamos que puede ser debido a que la medición de cada capa se ajusta en gran medida a la presencia de células. Mientras que la medida total incluye el tejido intercelular y en este sentido se ha descrito que en este modelo experimental se produce un incremento en la permeabilidad de la barrera hemato-retiniana, produciéndose lo que en el ser humano corresponde con edemas retinianos (Abdouh et al., 2008). Esta podría ser una explicación simplista de estas diferencias en las mediciones y, sobre todo, del aumento del grosor total de la retina en los animales diabéticos, más aún cuando en el grupo de animales normoglucémicos no se observa esta diferencia..

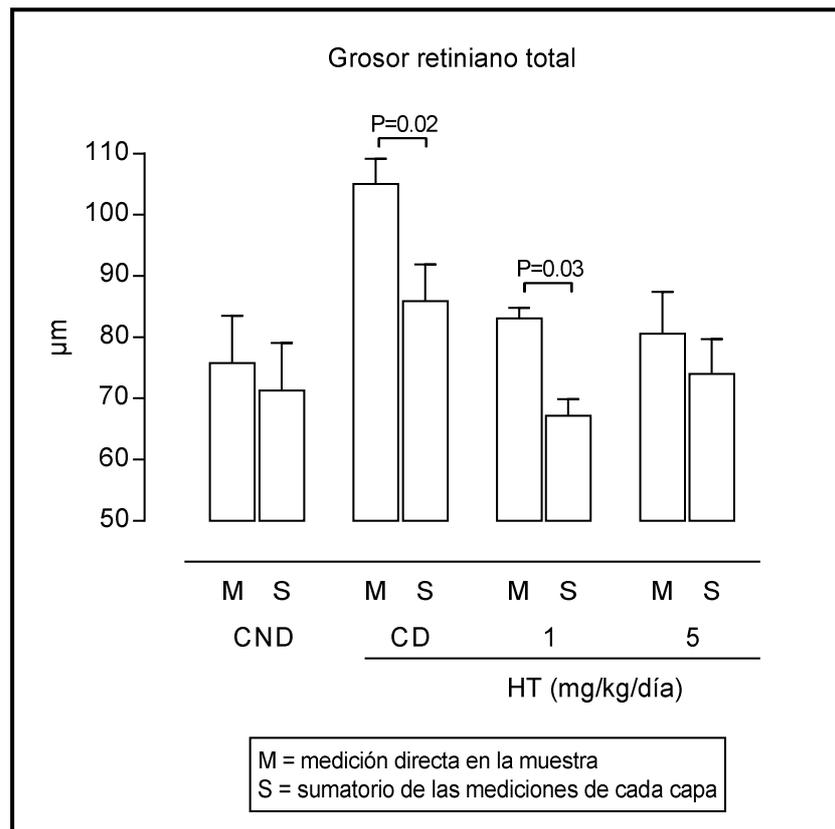


Figura 5.1. Diferencia entre la medición del grosor de retina total y la suma de cada una de sus capas en los distintos grupos de estudio.

Respecto al descenso del número de células ganglionares es la evidencia más clara de la neurotoxicidad de la diabetes mellitus, hecho también coincidente con los trabajos publicados al respecto (Ozawa et al., 2011; Szabadfi et al., 2012). El descenso en la densidad celular de otras capas no es sino la expresión del mismo daño neuronal.

Respecto al tamaño de las células que forman la capa nuclear interna y externa, recordemos que la capa nuclear interna está formada por los cuerpos de células bipolares y amacrinas y la capa nuclear externa la forma fundamentalmente los cuerpos celulares de los fotorreceptores. Un aumento del tamaño de estas células podría ser consecuencia del edema tisular descrito en la retinopatía diabética y que conllevaría a una disfunción de estos tipos celulares (Toyoda et al., 2016).

La administración de hidroxitirosol modifica la mayor parte de estos parámetros alterados en la diabetes experimental en el sentido de “normalizar” o al menos disminuir

los valores de estas variables. Ya comentamos anteriormente las modificaciones que hidroxitirosol inducía en los parámetros bioquímicos vasculares en el modelo experimental de diabetes. Pues bien, a nivel del tejido retiniano alterado también ejerce un efecto que, en términos generales, podríamos definir como neuroprotector. Las principales modificaciones han sido las siguientes:

- Reduce significativamente las alteraciones del grosor de la retina..
- Frena la disminución de las células ganglionares y de la capa nuclear externa, sobre todo con la dosis de 5 mg/kg/día.
- Reduce el tamaño de las células integrantes de la capa nuclear interna y externa, sobre todo de la primera.

Este efecto beneficioso de hidroxitirosol sobre las alteraciones retinianas en la diabetes experimental puede ser debido a un también efecto beneficioso sobre las alteraciones vasculares de la diabetes y a su efecto neuroprotector directo. Respecto a este segundo aspecto, existen algunos datos indirectos de citoprotección en modelos isquémicos en hígado (Pan et al., 2013) o en tejido cerebral (Cabrerizo et al., 2013; González-Correa et al., 2008). Asimismo en el modelo experimental de diabetes tipo 1 utilizado en nuestro estudio, se ha demostrado un efecto protector de las lesiones vasculares macroangiopáticas (López-Villodres et al., 2016) y neuroprotector en cortes cerebrales de rata (Reyes et al., 2016).

No encontramos datos en la bibliografía consultada sobre el efecto de hidroxitirosol en la retinopatía diabética. Por lo tanto nuestro trabajo aporta por primera vez el efecto neuroprotector de hidroxitirosol en retinas de animales diabéticos.

Respecto al tejido ocular, hemos encontrado algunos estudios que analizan el efecto de hidroxitirosol *in vitro* en cultivo de células epiteliales pigmentarias humanas inducidas con acroleína, demostrando un efecto antioxidante y citoprotector en estos cultivos (Liu et al., 2007; Zhu et al., 2010), demostrando que esta protección se debe a un efecto antioxidante derivado de la activación del sistema Nrf2 (Zou et al., 2012), al igual que ocurre por ejemplo, en tejido cardíaco (Bayram et al., 2012)

Un aspecto importante se refiere a la discrepancia entre las mediciones del grosor de la retina, antes comentado (Figura 5.1.). En este sentido, hidroxitirosol anula estas diferencias con la dosis de 5 mg/kg/día. Esto podría implicar a este compuesto en un efecto anti-edematoso, si aceptamos la hipótesis planteada anteriormente. Este efecto se ha demostrado en un modelo experimental de hemorragia subaracnoidea, en el que se reduce la intensidad del edema cerebral en relación directa a su efecto antioxidante (Zhong et al., 2016).

Obviamente no podemos atribuir un mecanismo de hidroxitirosol a nivel retiniano directamente, ya que no hemos realizado determinaciones bioquímicas en la retina. No obstante, analizando todos los resultados en su conjunto, pudimos realizar un análisis de regresión lineal múltiple (Tablas 4.9. a 4.11. y Figura 4.24.) y los resultados nos ofrecieron una relación directa de la pérdida de células ganglionares con variables eminentemente vasculares (agregabilidad plaquetaria, producción vascular de prostaciclina y formación de peroxinitritos). No podemos aseverar que son los únicos factores que condicionan la aparición de las lesiones retinianas en el modelo experimental de diabetes mellitus, pero tampoco podemos obviar que estas variables poseen un peso específico importante en dichas alteraciones oculares.

Respecto a la prostaciclina, en este mismo modelo experimental nuestro grupo de trabajo realizó una serie de trabajos farmacológicos en los que se demostró que la protección de la vascularización retiniana era proporcional al grado en el que los fármacos utilizados respetaban la producción vascular de prostaciclina (De La Cruz et al. 1997, 1998; Moreno et al., 1995a, 1995b). Asimismo se demostró en muestras sanguíneas de pacientes diabéticos con distintos tipos de retinopatía, la implicación de la prostaciclina y su efecto antiplaquetario en relación con la intensidad y evolución de estos pacientes (De La Cruz et al., 2001, 2012).

En relación con el tema de este trabajo, también nuestro grupo de trabajo realizó un estudio en el mismo modelo experimental en el que se administró aceite de oliva virgen a los animales y se demostró una relación entre su efecto protector de la síntesis de prostaciclina vascular y la prevención de la isquemia retiniana debida a la evolución de la diabetes (De La Cruz et al., 2010). En este sentido, un análisis sectorial del estudio PREDIMED en pacientes con diabetes mellitus demostró que la aplicación de una dieta tipo mediterránea enriquecida en aceite de oliva virgen reducía la incidencia de

retinopatía diabética, independientemente de si se añadía o no frutos secos a dicha dieta, es decir, adjudicaba al aceite de oliva virgen este efecto (Díaz-López et al., 2015).

Por lo tanto, podríamos postular que hidroxitirosol, al ejercer un efecto protector (al menos desde un punto de vista bioquímico) de la producción endotelial de prostaciclina, disminuye la posibilidad de fenómenos isquémicos vasculares retinianos y eso podría ayudar a la neuroprotección cuantificada en nuestro estudio.

En este ámbito también se encontraría la relación del efecto neuroprotector y antiagregante plaquetario de hidroxitirosol. Ya hemos comentado anteriormente que hidroxitirosol ha demostrado un efecto antiagregante plaquetario claro, por lo que podría facilitar aún más su acción preventiva de los fenómenos isquémicos retinianos. Este efecto podría ser indirecto, a través de la producción de prostaciclina, si bien se ha demostrado un efecto antiplaquetario directo en condiciones *in vitro*, en los que la producción de prostaciclina juega un papel muy limitado (González-Correa et al., 2009).

Respecto a la influencia de la 3-nitrotirosina, se conoce que la formación de peroxinitritos depende fundamentalmente de la activación de la iNOS (necesita un ambiente inflamatorio) y la formación de radicales libres (fundamentalmente el anión superóxido). También discutimos anteriormente el papel de hidroxitirosol sobre la producción de peroxinitritos, relacionándolo fundamentalmente a través de su efecto antioxidante y sobre la regulación a la baja de la iNOS. Respecto a la retina, se ha demostrado que la formación de peroxinitritos en diversos modelos de diabetes experimental constituye un factor importante en el daño neuro-vascular retiniano, fundamentalmente por una facilitación de la activación de mediadores inflamatorios en la retina (Liu et al., 2013), un desbalance entre el pro-factor de crecimiento nervioso (pro-NGF) y el NGF, que origina un efecto neurotóxico en las células nerviosas retinianas (Ali et al., 2011) o una regulación a la baja de factores como la poli(ADP-ribosa) polimerasa a nivel nuclear, produciendo un efecto neurotóxico en la retina (Pacher et al., 2005). No obstante, no hay que olvidar el efecto pro-oxidante de los peroxinitritos y su efecto inhibitorio directo de la actividad prostaciclina-sintetasa (Schildknecht&Ullrich, 2009) y estimulante de la tromboxano-sintetasa plaquetaria, activando de esta forma la agregabilidad de las plaquetas (Schildknecht et al., 2008), todo lo cual también ejerce un efecto sobre el “sector vascular” de la retinopatía diabética.

Por último, la influencia de la dosis de hidroxitirosol sobre el efecto protector de las alteraciones retinianas en el modelo experimental de diabetes, pueden relacionarse de nuevo con la dualidad de un posible efecto a nivel vascular o tisular, ya que en trabajos previos de nuestro grupo, en este mismo modelo experimental, se apreciaba una tendencia a un mayor efecto neuroprotector cerebral tras la administración de 5 mg/kg/día (Reyes et al., 2016) y un mayor efecto protector vascular con dosis de 1 mg/kg/día e incluso menores (López-Villodres et al., 2016). Se podría hipotetizar indirectamente a la luz de estos resultados que el efecto neuroprotector pudiera ser más importante que la influencia de hidroxitirosol a nivel vascular, si bien es una afirmación muy preliminar que necesitaría de nuevos trabajos que centraran su objetivo en la titulación de dosis sobre el efecto aludido.

#### 7. Consideraciones finales y limitaciones del estudio

El presente estudio demuestra que el principal polifenol presente en el aceite de oliva virgen, hidroxitirosol, ejerce un efecto protector retiniano a nivel bioquímico y morfológico en un modelo experimental de diabetes mellitus. Además, este efecto se puede constatar en todas las fases reconocidas de la fisiopatología de la retinopatía diabética. Por lo tanto, con independencia de la necesidad de estudios clínicos que lo demuestren, *a priori* podríamos pensar que los beneficios descritos a nivel cardiovascular en pacientes diabéticos de la dieta mediterránea y más concretamente del aceite de oliva virgen, podrían considerar al hidroxitirosol como uno (no el único) de los responsables de dicho efecto beneficioso.

Obviamente este estudio tiene una serie de limitaciones. Como hemos comentado anteriormente, nuestro análisis se centra en las vías bioquímicas de daño vascular, siendo necesarios estudios posteriores que demuestren un efecto en la consecuencia de este daño, es decir, en la microvasculatura retiniana y la capacidad de ésta para ser permeable a la circulación sanguínea. Asimismo, hemos utilizado un modelo experimental que se asemeja a lo acontecido en la diabetes tipo 1, siendo necesario el estudio de estas vías en un modelo experimental de diabetes tipo 2, ya que en este tipo también se describen lesiones retinianas en relación sobre todo con la extravasación de plasma (edema retiniano), no obstante este modelo es válido para conseguir un estado bioquímico-morfológico de inflamación vascular, el cual también se relaciona con el desarrollo de la microangiopatía diabética, proporcionalmente más

frecuente en la diabetes tipo 1. Por último, es necesario un estudio en el que todas las variables propuestas se realicen en el tejido retiniano, ya que en el presente estudio algunas se han determinado en dicho tejido (análisis morfométrico), pero otras a nivel circulatorio sistémico; la interpretación global no variaría, pero sería mucho más precisa y correcta.

Por último quisiéramos centrar nuestra atención en las dosis utilizadas. Los estudios que usan hidroxitirosol como tal, no incluido en el aceite de oliva virgen, lo hacen administrando dosis más altas de las que diariamente ingeriría un ser humano al seguir una dieta mediterránea. De hecho, la mayor parte de los trabajos citados en esta discusión administran dosis que oscilan entre 10 y 100 mg/kg/día. En nuestro estudio hemos demostrado que dosis de 1 y 5 mg/kg/día producen la mayor parte de las modificaciones descritas en cada uno de los mecanismos de daño vascular y retiniano en el modelo experimental de diabetes. Pero en último término no hay que olvidar que cuando se ingiere aceite de oliva virgen no solo se adquiere hidroxitirosol, sino otros polifenoles, secoroides, etc. Posiblemente exista un efecto sinérgico entre ellos y sea responsable del beneficio cardiovascular final.

Por último, sería necesario realizar un estudio temporal en el que se valorasen en conjunto las principales variables vasculares y nerviosas en la retina de estos animales, a fin de poder discriminar en lo posible el peso específico de los dos efectos de hidroxitirosol: vasculo-protector y neuroprotector. Asimismo es necesario realizar un estudio en el que se comparen las alteraciones retinianas acaecidas en un modelo de diabetes tipo 1 (relacionado en clínica con procesos isquémicos) y en uno que reproduzca la tipo 2 (con predominio edematoso en el ser humano), ya que existen evidencias indirectas que hidroxitirosol podría afectar a los principales mecanismos de ambos tipos de lesiones.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



SEMESTRE - 2020-2021



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Del análisis pormenorizado de los resultados obtenidos en el presente estudio, hemos extraído las siguientes conclusiones:

La administración oral de hidroxitirosol en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1:

1. Produce un efecto neuroprotector retiniano en los animales diabéticos.
2. Disminuye la activación plaquetaria, el estado bioquímico inflamatorio y el estrés oxidativo y nitrosativo de estos animales.
3. Modula positivamente la disfunción endotelial, acercando los valores bioquímicos endoteliales a nivel de los animales normoglucémicos.
4. El conteo de células ganglionares retinianas se correlaciona significativamente de forma directa con los niveles de prostaciclina y con la administración de 5 mg/kg/día de hidroxitirosol e inversamente con la agregometría plaquetaria y los niveles circulantes de peroxinitritos.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# BIBLIOGRAFÍA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of DM and its complications. Part 1: diagnosis and classification of DM provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*. 1998; 15(7): 539–553.
- Abdouh M, Talbot S, Couture R, Hasséssian HM. Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kininB(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol*. 2008;154:136-143.
- Ahsan H. Diabetic retinopathy--biomolecules and multiple pathophysiology. *Diabetes MetabSyndr*. 2015; 9: 51-54.
- Ali TK, Al-Gayyar MM, Matragoon S, Pillai BA, Abdelsaid MA, Nussbaum JJ, El-Remessy AB. Diabetes-induced peroxynitrite impairs the balance of pro-nerve growth factor and nerve growth factor, and causes neurovascular injury. *Diabetologia*. 2011;54:657-668.
- Andresen BT, Romero GG, Jackson EK. AT2 receptors attenuate AT1 receptor-induced phospholipase D activation in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004; 309(1): 425–431.
- Angeli F, Reboldi G, Poltronieri C, Lazzari L, Sordi M, Garofoli M, Bartolini C, Verdecchia P. Hyperglycemia in acute coronary syndromes: from mechanisms to prognostic implications. *TherAdvCardiovasc Dis*. 2015. doi: 1753944715594528
- Arden GB, Sivaprasad S. The pathogenesis of early retinal changes of diabetic retinopathy. *Doc Ophthalmol*. 2012;124:15-26.
- Aya U, Masanori H, Kazutoshi M, Yoshihiro N, Yasukazu Y. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. *Molecules*. 2016; 21(6): 708.
- Bayram B, Ozcelik B, Grimm S, Roeder T, Schrader C, Ernst IM, Wagner AE, Grune T, Frank J, Rimbach G. A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuvenation Res*. 2012;15:71-81.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1999; 51(8): 971–974.

## *Bibliografía*

- Bonafonte S, Arévalo F, García RA. Neovascularización del iris y glaucoma neovascular. *Retinopatía Diabética*. 2ª ed. Madrid: Elsevier España; 2006.
- Berkowitz BA, Grady EM, Khetarpal N, Patel, A, Roberts R. Oxidative Stress and Light-Evoked Responses of the Posterior Segment in a Mouse Model of Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015; 56(1): 606-615.
- Brewer J, Liu R, Lu Y, Scott J, Wallace K, Wallukat G, et al. Endothelin-1, oxidative stress, and endogenous angiotensin II: mechanisms of angiotensin II type I receptor autoantibody-enhanced renal and blood pressure response during pregnancy. *Hypertension*; 2013; 62(5): 886–892.
- Bunting S, Moncada S, Vane JR. The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications. *British Medical Bulletin*. 1983; 39(3): 271–276.
- Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2006; 290(1); E1–E8.
- Cabrerizo S, De La Cruz JP, López-Villodres JA, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *J NutrBiochem*. 2013; 24: 2152-2157.
- Cai S, Khoo J, Mussa S, Alp NJ, Channon KM. Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation. 2005; *Diabetologia*, 48(9): 1933–1940.
- Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Cruz-Teno C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, et al. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *The British Journal of Nutrition*. 2012; 108(3): 500–508.
- Cao K, Xu J, Zou X, Li Y, Chen C, Zheng A, Li H, Li H, Szeto IM, Shi Y, Long J, Liu J, Feng Z. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and

- attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic Biol Med*. 2014;67:396-407.
- Carbone F, Montecucco F. Inflammation in arterial diseases. *IUBMB Life*. 2015;67:18-28.
- Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distante A, Storelli C, De Caterina R. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H2344-H2354.
- Castañer O, Covas MI, Khymenets O, Nyssonen K, Konstantinidou V, Zunft HF, de la Torre R, Muñoz-Aguayo D, Vila J, Fitó M. Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:1238-1244.
- Catalán Ú, López de Las Hazas MC, Rubió L, Fernández-Castillejo S, Pedret A, de la Torre R, Motilva MJ, Solà R. Protective effect of hydroxytyrosol and its predominant plasmatic human metabolites against endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*. 2015. doi: 10.1002/mnfr.201500361.
- Chakrabarti S, Gan XT, Merry A. Augmented retinal endothelin-1, endothelin-3, endothelin A and endothelin B gene expression in chronic diabetes. *Curr Eye Res* 1998; **17**: 301–307.
- Chakrabarti S, Sima AAF. Endothelin-1 and endothelin-3 like immunoreactivity in the eyes of diabetic and non-diabetic BB/W rats. *Diabetes Res Clin Pract* 1997; **37**: 109–120.
- Chakravarthy U, Douglas AJ, Bailie R. Immunoreactive endothelin distribution in ocular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; **35**: 2448–2454.
- Chen XM, Chen HS, Xu MJ, Shen JG. Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34:67-77.

## Bibliografía

- Chistiakov, DA, Revin VV, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular endothelium: functioning in norm, changes in atherosclerosis and current dietary approaches to improve endothelial function. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2015; 15(4): 338–350.
- Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(2): 458–479.
- Cohen SR, Gardner TW. Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Dev Ophthalmol*. 2016;55:137-146.
- Conti V, Izzo V, Corbi G, Russomanno G, Manzo V, De Lise F, et al. Antioxidant Supplementation in the Treatment of Aging-Associated Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2016; 7: 24
- Covas MI, de la Torre R, Fitó M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *Br J Nutr*. 2015; 113 (Suppl 2): S19-S28.
- Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Bäumler H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J, Marrugat J; EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006; 145: 333-341.
- Cruz J, Licea M, Hernández P, Abraham E, Yanes M.. Estrés oxidativo y DM. *Rev Mex Patol Clin*. 2011; 58(1): 4–15.
- Dalli, E. Evaluación de la DE en pacientes con diabetes. *Diabetol*. 2005; 21(4): 292–301.
- D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, et al. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005 38(7): 908–919.
- Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacological Research*. 2007; 55(6): 498–510. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.016>

- da Silva R, Bach-Faig A, Raidó B, Buckland G, Vaz de Almeida MD, Serra-Majem L. Worldwide variation of adherence to the Mediterranean diet, in 1961–1965 and 2000–2003. *Public Health Nutrition*. 2009; 12 (Special Issue 9A): 1676–1684.
- Deiana M, Aruoma OI, Bianchi ML, Spencer JP, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Banni S, Dessi MA, Corongiu FP. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26:762-769.
- Dell'Agli M, Fagnani R, Mitro N, Scurati S, Masciadri M, Mussoni L, Galli GV, Bosisio E, Crestani M, De Fabiani E, Tremoli E, Caruso D. Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J Agric Food Chem*. 2006;54:3259-3264.
- Dell'Agli M, Maschi O, Galli GV, Fagnani R, Dal Cero E, Caruso D, Bosisio E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *Br. J. Nutr*. 2008; 99: 945–951.
- Díaz-López A, Babio N, Martínez-González MA, Corella D, Amor AJ, Fitó M, Estruch R, Arós F, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Basora J, Basterra-Gortari FJ, Zanon-Moreno V, Muñoz MÁ, Salas-Salvadó J; PREDIMED Study Investigators. Mediterranean Diet, Retinopathy, Nephropathy, and Microvascular Diabetes Complications: A Post Hoc Analysis of a Randomized Trial. *Diabetes Care*. 2015;38:2134-2141.
- Di Pietro N, Di Tomo P, Di Silvestre S, Giardinelli A, Pipino C, Morabito C, Formoso G, Marigliò MA, Pandolfi A. Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: potential role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKIIδ(2)). *Atherosclerosis*. 2013; 226: 88-94.
- De La Cruz J, González-Correa J, Guerrero A, de la Cuesta F. Pharmacological approach to diabetic retinopathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2004; 20(2): 91–113.
- De La Cruz JP, Jebrouni N, López-Villodres JA, Muñoz-Marín J, Guerrero A, González-Correa JA. Effects of terutroban, a thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, on retinal vascularity in diabetic rats. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2012; 28(2): 132–138.

## Bibliografía

- De La Cruz JP, Moreno A, Guerrero A, Sánchez de La Cuesta F. Antiplatelet effects of prostacyclin and nitric oxide in patients with type I diabetes and ischemic or edematous retinopathy. *Platelets*. 2001;12:210-217.
- De la Cruz JP, Moreno A, Muñoz M, García Campos JM, Sánchez de la Cuesta F. Effect of aspirin plus dipyridamole on the retinal vascular pattern in experimental diabetes mellitus. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280:454-459.
- De La Cruz JP, Moreno A, Ruiz-Ruiz MI, García Campos J, Sánchez de la Cuesta F. Effect of camonagrel, a selective thromboxane synthase inhibitor, on retinal vascularization in experimental diabetes. *Eur J Pharmacol*. 1998;350:81-85.
- De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, López-Villodres JA, Reyes J J, Espartero JL, et al. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015; 26(5): 549–555.
- De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martín-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thrombosis Research*. 2000; 100(4): 305–315.
- De la Fuente P, Chamorro P, Moreno M, Poza MA. Propiedades antioxidantes del hidroxitirosol procedente de la hoja de olivo (*Olea europaea* L.). *Revista de Fitoterapia*. 2004; 4(2): 139-147
- De la Puerta R, Martínez-Domínguez E, Ruíz-Gutiérrez V. Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Journal of Biosciences*. 2000;55(9-10): 814–819.
- De la Puerta R, Martínez ME, Ruíz-Gutiérrez V, Flavill JA, Houlst JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitric oxide neurotransmission. *Life Sciences*. 2001; 69(10): 1213–1222.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoute PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *British Journal of Pharmacology*. 2000;130(5): 963–974.
- Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA, Ibáñez-Hernández MÁ, Pascoe-Lira D, Guzmán-Greenfel, AM, Kumate-Rodríguez J. Aspectos moleculares del daño tisular

- inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta médica de México*. 2004; 140(4): 437-447.
- Di Pietro N, Di Tomo P, Di Silvestre S, Giardinelli A, Pipino C, Morabito C, et al. Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: potential role of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKIIδ(2)). *Atherosclerosis*. 2003; 226(1): 88–94.
- Domenico R. Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Current Pharmaceutical Design*. 2004; 10(14): 1667–1676.
- Donato AJ, Gano LB, Eskurza I, Silver AE, Gates PE, Jablonski K, Seals DR. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2009; 297(1): H425–432.
- Duan H, Huang J, Li W, Tang W. Protective effects of fufang xueshuantong on diabetic retinopathy in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013.
- Durham JT, Dulmovits BM, Cronk SM, Sheets AR, Herman IM. Pericyte Chemomechanics and the Angiogenic Switch: Insights Into the Pathogenesis of Proliferative Diabetic Retinopathy? *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005; 56(6): 3441-3459. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-13945>
- Engerman RL, Kern TS. Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes*. 1984; 33(1):97–100.
- Engerman RL, Kern TS. Hyperglycemia and development of glomerular pathology: diabetes compared with galactosemia. *Kidney International*. 1989;36(1):41–45.
- Engerman RL, Kern TS. Aldose reductase inhibition fails to prevent retinopathy in diabetic and galactosemic dogs. *Diabetes*. 1993;42(6):820–825.
- FitzGerald GA, Austin S, Egan K, Cheng Y, Pratico D. Cyclo-oxygenase products and atherothrombosis. *Ann Med*. 2000; 32 Suppl 1:21-6.
- Frank RN, Keirn RJ, Kennedy A, Frank KW. Galactose-induced retinal capillary basement membrane thickening: prevention by sorbinil. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1983;24(11):1519–1524

## Bibliografía

- Funk CD, FitzGerald GA. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2002 50(5): 470–479.
- Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012; 13(3): 3291–3340.
- Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. 2010; 107(9): 1058–1070.
- González-Correa JA, Arrebola MM, Cansino AL, Muñoz-Marín J, Ruiz-Villafranca D, Guerrero A, Sánchez de la Cuesta F, De La Cruz JP. Effects of hypoxia reoxygenation in brain slices from rats with type 1-like diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006;22:390-400.
- González-Correa JA, Arrebola MM, Guerrero A, Cañada MJ, Muñoz J, De la Cuesta F, De la Cruz JP. Antioxidant and antiplatelet effects of the alpha-tocopherol-aspirin combination in type 1-like diabetic rats. *Life Sciences*. 2006; 79(15): 1405–1412.
- González-Correa JA, López-Villodres JA, Asensi R, Espartero JL, Rodríguez-Gutiérrez G, De La Cruz JP. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Br J Nutr*. 2009; 101: 1157-1164.
- González-Correa JA, Navas MD, Lopez-Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL, De La Cruz JP. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neuroscience Letters*. 2008; 446(2-3): 143–146.
- González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J Agric Food Chem*. 2008; 56: 7872-7876.
- Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev*. 2010; 68: 191-206.

- Guerrero A, De la Cruz JP, Muñoz-Marín J, López-Villodres JA, Madrona A, Espartero JL, González-Correa JA. Neuroprotective effect of alkyl hydroxytyrosyl ethers in rat brain slices subjected to a hypoxia-reoxygenation model. *Food Chemistry*. 2012; 134(4): 2176–2183.
- Goodwill AG, James ME, Frisbee JC. Increased vascular thromboxane generation impairs dilation of skeletal muscle arterioles of obese Zucker rats with reduced oxygen tension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2008; 295(4): H1522-H1528.
- Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2009; 180(3): 421–432.
- Hsueh WA, Jackson S, Law RE. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24(2): 392–397.
- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006; 29(6): 1420-1432.
- Jansen F, Yang X, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, et al. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovascular Research*. 2013; 98(1): 94–106.
- Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*. 2008; 176(2-3): 88–98.
- Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(19): 8798–8804.
- Kador PF, Akagi Y, Takahashi Y, Ikebe H, Wyman M, Kinoshita JH. Prevention of retinal vessel changes associated with diabetic retinopathy in galactose-fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Archives of Ophthalmology*. 1990;108(9):1301–1309.

## Bibliografía

- Kador PF, Akagi Y, Terubayashi H, Wyman M, Kinoshita JH. Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillaries of galactose-fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Archives of Ophthalmology*.1988;106(8):1099–1102.
- Killeen MJ, Linder M, Pontoniere P, Crea R. NF- $\kappa$ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today*, 2014; 19(4): 373–378.
- King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 1996; 25(2): 255–270.
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(1): 160–169.
- Kracht M, Saklatvala J. Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine*. 2012;20(3): 91–106.
- Li W, Wang G, Lu X, Jiang Y, Xu L, Zhao X. Lycopene ameliorates renal function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014;7(8): 5008-5015.
- Liu H, Huang H, Li B, Wu D, Wang F, Zheng X, et al. Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause. *Clinical Interventions in Aging*. 2012; 9: 2087–2095.
- Killeen MJ, Linder M, Pontoniere P, Crea R. NF- $\kappa$ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discov Today*. 2014;19:373-378.
- Kim S, Kim J, Kim C, Kim N, Kim J. KIOM-79 Prevents Methylglyoxal-Induced Retinal Pericyte Apoptosis in Vitro and in Vivo. *J Ethnopharmacol*. 2010; 129 (3), 285-292.
- Komolafe OA, Adeyemi DO, Adewole OS, Obuotor EM, Abiodun AA. Morphological and morphometric studies of the aorta, pulmonary trunk, and heart of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Folia Morphol (Warsz)*.2009;68:207-214.

- Liu Q, Li J, Cheng R, Chen Y, Lee K, Hu Y, Yi J, Liu Z, Ma JX. Nitrosative stress plays an important role in Wnt pathway activation in diabetic retinopathy. *AntioxidRedoxSignal*. 2013; 18: 1141-1153.
- López-Villodres JA, Abdel-Karim M, De La Cruz JP, Rodríguez-Pérez MD, Reyes JJ, Guzmán-Moscoso R, Rodríguez-Gutierrez G, Fernández-Bolaños J, González-Correa JA. Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus. *J NutrBiochem*. 2016;37:94-100.
- Marques-Vidal P, Bastardot F, von Känel R, Paccaud F, Preisig M, Waeber G, Vollenweider P. Association between circulating cytokine levels, diabetes and insulin resistance in a population-based sample (CoLaus study). *Clinical Endocrinology*. 2013; 78(2): 232–241.
- Miranda M, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Araiz J, Romá J, Romero FJ. Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental: tratamiento con antioxidantes. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*. 2004; 79(6): 289–294.
- Miranda M, Muriach M, Roma J, Bosch-Morell F, Genovés JM, Barcia J, et al. Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental II: utilidad de agentes secuestrantes de peroxinitritos. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*. 2006;81(1): 27–32.
- Mohammad SO, Mohammed MA, Rehan A, Hatem MA, Salim SA, Abdullah SA. Neuroprotective Effects of Rutin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Retina. *J Mol Neurosci*. 2015; 56:440–448.
- Mokhtar SS, rasool AHG. Role of Endothelium-Dependent Hyperpolarisation and Prostacyclin in Diabetes. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*. 2015; 22(2): 8-17.
- Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; 2015;9(13); 1319–1330.
- Moreno A, De La Cruz JP, Garcia Campos J, Sanchez De La Cuesta F. Prostacyclin-thromboxane balance and retinal vascular pattern in rats with experimentally induced diabetes. *Can J Ophthalmol*. 1995a;30:117-123.

- Moreno A, De La Cruz JP, Mérida F, García Campos J, Sánchez de la Cuesta F. Effects of ditazolone on the vascular retinal pattern in experimental diabetes in rats. *Haemostasis*. 1995b;25:166-171.
- Muñoz-Marín J, De La Cruz JP, Guerrero A, López-Leiva I, López-Villodres JA, Reyes JJ, et al. Cytoprotective effect of hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives after oral administration to rats in a model of glucose-oxygen deprivation in brain slices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60(31): 7659–7664.
- Muñoz-Marín J, De la Cruz JP, Reyes JJ, López-Villodres JA, Guerrero A, López-Leiva I, et al. Hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives inhibit platelet activation after oral administration to rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013; 58: 295–300.
- Murotomi K, Umeno A, Yasunaga M, Shichiri M, Ishida N, Koike T, Matsuo T, Abe H, Yoshida Y, Nakajima Y. Oleuropein-Rich Diet Attenuates Hyperglycemia and Impaired Glucose Tolerance in Type 2 Diabetes Model Mouse. *J Agric Food Chem*. 2015;63:6715-6722.
- Nakahata N. Thromboxane A<sub>2</sub>: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008; 118(1): 18–35.
- Ohlstein EH, Douglas SA. Endothelin-1 modulates vascular smooth muscle structure and vasomotion: implications in cardiovascular pathology. *Drug Dev Res*. 1993; 29: 188–228.
- Ola MS, Ahmed MM, Ahmad R, Abuhashish HM, Al-Rejaie SS, Alhomida AS. Neuroprotective Effects of Rutin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Retina. *Journal of molecular neuroscience*. 2015 Jun; 56(2):440-8. doi: 10.1007/s12031-015-0561-2.
- Owen RW, Haubner R, Würtele G, Hull E, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2004; 13(4): 319–326.
- Oppermann M, Suvorava T, Freudenberger T, Dao VT, Fischer JW, Weber M, Kojda G (2011) Regulation of vascular guanylyl cyclase by endothelial nitric oxide-

- dependent posttranslational modification. *Basic Res Cardiol.* 2011; 106:539–549.
- Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, Ban N, Yuki K, Kubota S, Tsubota K. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model. *Exp Diabetes Res.* 2011; Article ID: 108328.
- Pacheco ME, Beltrán A, Redondo J, Manso AM, Alonso MJ, Salaices M. High glucose enhances inducible nitric oxide synthase expression. Role of protein kinase C-betaII. *European Journal of Pharmacology.* 2006; 538(1-3): 115–123.
- Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem.* 2005;12:267-275.
- Palacios, E. *Disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus. Interacción entre inflamación e hiperglucemia.* (Tesis Doctoral). Universidad autónoma de Madrid, Madrid; 2011.
- Pan S, Liu L, Pan H, Ma Y, Wang D, Kang K, et al. Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2013; 57(7): 1218–1227.
- Pannirselvam M, Verma S, Anderson TJ, Triggle CR. Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db -/-) mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability. *Br J Pharmacol.* 2012; 136:255–263.
- Park Y, Capobianco S, Gao X, Falck JR, Dellsperger KC, Zhang C. Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295:H1982–H1988.
- Pauwels E. The protective effect of the Mediterranean diet: Focus on cancer and cardiovascular risk. *Med. Princ. Pract.* 2008;20: 103–111.
- Payne AJ, Kaja S, Naumchuk Y, Kunjukunju N, Koulen P. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina. *Int J Mol Sci.* 2014;15:1865-1886.

- Pe'er J, Folberg R, Itin A, Gnessin H, Hemo I, Keshet E. Vascular endothelial growth factor upregulation in human central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*. 1998; 105(3): 412-416.
- 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: 151–160.
- Petroni A, Blasevich M, Papini N, Salami M, Sala A, Galli C. Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Thrombosis Research*. 1997; 87(3): 315–322.
- Pfister F, Riedl E, Wang Q, vom Hagen F, Deinzer M, Conrad Harmsen M, et al. Oral Carnosine Supplementation Prevents Vascular Damage in Experimental Diabetic Retinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2011; 28:125-136
- Quirantes-Piné R, Herranz-López M, Funes L, Borrás-Linares I, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of Lippiacitriodora in rats. *Phytomedicine*. 2013; 20:1112-1118.
- Raederstorff D. Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*. 2009; 79(3): 152–165.
- Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J PrevMed*. 2014; 5: 927-946.
- Ramírez-Tortose M, Pulido-Moran M, Granados S, Gaforio JJ, Quiles JL. Hydroxytyrosol as a Component of the Mediterranean Diet and Its Role in Disease Prevention. En: Preedy VR. *The Mediterranean Diet*. San Diego: Elsevier; 2015.
- Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metabolism*. 2013; 17(1): 20–33.
- Reyes JJ, Villanueva B, López-Villodres JA, De La Cruz JP, Romero L, Rodríguez-Pérez MD, Rodríguez-Gutiérrez G, Fernández-Bolaños J, González-Correa

- JA. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol In Experimental Diabetes Mellitus. *J Agric Food Chem.* 2016. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02945.
- Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Med.* 2011; 77:1890-1897.
- Rietjens SJ, Bast A, de Vente J, Haenen GR. The olive oil antioxidant hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NObullet response of isolated rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292:H1931-1936.
- Roberts AC, Porter KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & Vascular Disease Research.* 2013; 10(6): 472–482.
- Rodríguez-Morató J, Xicota L, Fitó M, Farré M, Dierssen M, de la Torre R. Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2015; 20(3): 4655–4680.
- Rojas S, Saucedo A. *Retina y vitreo.* 2ª ed. Mexico: El Manual Moderno; 2012.
- Rosado-Pérez J, Mendoza-Núñez VM. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la DM. *Bioquímica.* 2007; 32(2): 58–69.
- Ros E, Martínez-González MA, Estruch R, Salas-Salvadó J, Fitó M, Martínez JA, Corella D. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Advances in Nutrition.* 2014; 5(3): 330S-6S
- Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, González-Benjumea A, Fernández-Bolaños JG, Lubberts E, Alarcón-de-la-Lastra C. Preventive effects of dietary hydroxytyrosol acetate, an extra virgin olive oil polyphenol in murine collagen-induced arthritis. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2015; 59 (12): 2537–2546
- Ruiz E, Redondo S, Padilla E, Gordillo-Moscoso A, Salaices M, Balfagón G, Tejerina T. Importance of intracellular Angiotensin II in vascular smooth muscle cell apoptosis: Inhibition by the Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan. *European Journal of Pharmacology.* 2007; 567(3): 231–239.

## Bibliografía

- Ruiz, M. *Importancia de los grupos hidroxilos en el efecto antioxidante y neuroprotector de algunos derivados de los polifenoles del aceite de oliva*. (Tesis Doctoral). Universidad de Málaga, Málaga; 2007
- Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sánchez E, Corral-San Laureano F, Fernández-Fernández I. La DM en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. *Gaceta Sanitaria*. 2006; 20: 15–24.
- Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Aparicio-Soto M, Cárdeno A, Rosillo MÁ, González-Benjumea A, et al. Effects of dietary virgin olive oil polyphenols: hydroxytyrosyl acetate and 3, 4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015;26(5): 513–520.
- Santilli F, Simeone P, Liani R, Davì G. Platelets and diabetes mellitus. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015; 120: 28-39.
- Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Martines G, De Caterina R, Carluccio MA. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Arch Biochem Biophys*. 2012; 527:81-89.
- Schildknecht S, van der Loo B, Weber K, Tiefenthaler K, Daiber A, Bachschmid MM. Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A2 formation and aggregation in human platelets. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:512-520.
- Schildknecht S, Ullrich V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2009;484:183-189.
- Schmitt CA, Handler N, Heiss EH, Erker T, Dirsch VM. No evidence for modulation of endothelial nitric oxide synthase by the olive oil polyphenol hydroxytyrosol in human endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2007; 195:58-64
- Sena CM, Pereira AM, Seiça R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2013;1832(12): 2216–2231.
- Servili M, Sordini B, Esposito S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, et al. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*. 2013; 3(1): 1–23.

- Shaw A, Doherty MK, Mutch NJ, MacRury SM, Megson IL. Endothelial cell oxidative stress in diabetes: a key driver of cardiovascular complications?. *Biochem Soc Trans.* 2014;42:928-933.
- Storniolo CE, Roselló-Catafau J, Pintó X, Mitjavila MT, Moreno JJ. Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biol.* 2014;2C:971-977.
- Stulc T, Ceska R, Marinov I, Skrha J. The effect of simvastatin and fenofibrate on the expression of leukocyte adhesion molecules and lipopolysaccharide receptor CD14 in type 2 diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett.* 2012;33 (Suppl 2):73-77.
- Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Reglodi D, Szabo A, Kovacs K, Szalontai B, Setalo G Jr, Banki E, Csanaky K, Tamas A, Gabriel R. Protective effects of the neuropeptide PACAP in diabetic retinopathy. *Cell Tissue Res.* 2012;348:37-46.
- 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 and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association.* 2006; 44(7): 903–915.
- Stulc T, Ceska R, Marinov I, Skrha J. The effect of simvastatin and fenofibrate on the expression of leukocyte adhesion molecules and lipopolysaccharide receptor CD14 in type 2 DM. *Neuro Endocrinology Letters.* 2012; 33 (suppl 2): 73–77.
- Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation Part I. *Circulation.* 2003; 108(16): 1917–1923.
- Taberero M, Sarriá B, Largo C, Martínez-López S, Madrona A, Espartero JL, Bravo L, Mateos R. Comparative evaluation of the metabolic effects of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives (hydroxytyrosyl acetate and ethyl hydroxytyrosyl ether) in hypercholesterolemic rats. *Food Funct.* 2014;5:1556-1563.
- Tan ALY, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007;27:130-43

## Bibliografía

- Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmology*, 2013.
- Taher MM, Garcia JG, Natarajan V. Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993; 303(2): 260–266.
- Terzuoli E, Donnini S, Giachetti A, Iñiguez MA, Fresno M, Melillo G, Ziche M. Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2010; 16(16): 4207–4216.
- The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent DM. The Diabetes Control and Complications Trial. (1995). *Archives of Ophthalmology*, 113(1), 36–51.
- The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent DM. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993). *The New England Journal of Medicine*, 329(14), 977–986.
- Togna GI, Togna AR, Franconi M, Marra C, Guiso M. Olive oil isochromans inhibit human platelet reactivity. *J. Nutr.* 2003; 133: 2532–2536.
- Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, Stefanadis C. DM-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013; 62(8): 667–676.
- Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Research*. 2011; 34(1): 5-14.
- Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, Stefanadis C. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J Am CollCardiol*. 2013;62:667-676.
- Toyoda F, Tanaka Y, Shimmura M, Kinoshita N, Takano H, Kakehashi A. Diabetic Retinal and Choroidal Edema in SDT Rats. *J Diabetes Res*. 2016; ID:2345141.

- Tresserra-Rimbau A, Rimm EB, Medina-Remón A, Martínez-González MA, de la Torre R, Corella D, et al. Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*. 2014; 24(6): 639–647.
- Triggle CR, Ding H. A review of endothelial dysfunction in diabetes: a focus on the contribution of a dysfunctional eNOS. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH*. 2010; 4(3): 102–115.
- Upmacis RK, Deeb RS, Hajjar DP. Oxidative alterations of cyclooxygenase during atherogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2006;80:1-14.
- Urpi-Sarda M, Casas R, Chiva-Blanch G, Romero-Mamani ES, Valderas-Martínez P, Arranz S, et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacological Research*. 2012;65(6): 577–583.
- Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney International*. 2006;70(5): 840–853.
- Villarroel M, Ciudin A, Hernández C, Simó R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World J Diabetes*. 2010;1:57-64.
- Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, Caruso D. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *The Journal of Nutrition*. 2006; 133(8): 2612–2615.
- Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 58(6):955–965.
- Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher SJ, Kisanuki YY, et al. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003; 111(9): 1373-1380.
- Vossen P. Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. *HortScience*. 2007; 42(5): 1093–1100.

## Bibliografía

- Wang H, Li H, Hou Z, Pan L, Shen X, Li G. Role of oxidative stress in elevated blood pressure induced by high free fatty acids. *Hypertension Research*. 2009; 32(2): 152-158.
- Wang Q, Pfister F, Dorn-Beineke A, Hagen F, Lin J, Feng Y, Hammes HP. Low-dose erythropoietin inhibits oxidative stress and early vascular changes in the experimental diabetic retina. *ResearchGate*. 2010; 53(6): 1227-38.
- Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2013; 36(1): 166–175.
- Warboys CM, Toh HB, Fraser PA. Role of NADPH oxidase in retinal microvascular permeability increase by RAGE activation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009; 50(3): 1319-1328.
- Watanabe S, Tagawa T, Yamakawa K, Shimabukuro M, Ueda S. Inhibition of the renin-angiotensin system prevents free fatty acid-induced acute endothelial dysfunction in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25(11): 2376-2380.
- Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*. 2007; 12(4): 331–342.
- Widyantoro B, Emoto N, Nakayama K, Anggrahini DW, Adiarto S, Iwasa N, et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation*. 2010;121(22): 2407–2418.
- Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998; 97(17): 1695–1701.
- Wong MS, Vanhoutte PM. COX-mediated endotheliumdependent contractions: from the past to recent discoveries. *Acta Pharmacol Sin*. 2010; 31:1095–1102.
- World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of DM and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of DM. Retrieved January 30, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>

- Yu DY, Yu PK, Cringle SJ, Kang MH, Su EN. Functional and morphological characteristics of the retinal and choroidal vasculature. *Prog Retin Eye Res.* 2014;40:53-93.
- Zhang H, Zhang J, Ungvari Z, Zhang C Resveratrol improves endothelial function: role of TNF $\alpha$  and vascular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:1164-1171.
- Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2009; 379: 581-586.
- Zhang X, Wang N, Barile GR, Bao S, Gillies M. Diabetic retinopathy: neuron protection as a therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45:1525-1589.
- Zhong YW, Wu J, Hu HL, Li WX, Zhong Y. Protective effect 3,4-dihydroxyphenylethanol in subarachnoid hemorrhage provoked oxidative neuropathy. *Exp Ther Med.* 2016;12:1908-1914.
- Zhu L, Liu Z, Feng Z, Hao J, Shen W, Li X, Sun L, Sharman E, Wang Y, Wertz K, Weber P, Shi X, Liu J. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J Nutr Biochem.* 2010;21:1089-1098.
- Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P, Fu Y, Liu J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem.* 2012;23:994-1006.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# A N E X O S





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

Abdel-Karim M, Rodriguez MD, Pozo M, López-Villodres J, Márquez L, González-Correa JA. Efecto de hidroxitirosol sobre biomarcadores vasculares en la diabetes mellitus experimental. VI REUNIÓN DE JÓVENES FARMACÓLOGOS DE ANDALUCÍA. Comunicación. Málaga 31/05/2016.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA