



Programa de Doctorado Biomedicina

Efecto del aceite de oliva en la evolución del modelo de encefalomyelitis autoinmune experimental: papel del redox del glutatión.

Effect of olive-oil on evolution of experimental autoimmune encephalomyelitis model: role of glutathione redox

Tesis para optar al Grado de Doctor presentada por

Dña. Cristina Conde Gavilán

Tesis Doctoral realizada bajo la dirección del
Prof. Dr. D. Isaac Túnez Fiñana (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, España)

y la codirección del
Prof. Dr. D. Rafael Lillo Roldán (Departamento de Ciencias Morfológicas y Sociosanitarias de la Universidad de Córdoba, España).

Córdoba, 2 de Julio de 2020

TITULO: *EFEECTO DEL ACEITE DE OLIVA EN LA EVOLUCIÓN DEL MODELO DE ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL: PAPEL DEL REDOX DEL GLUTATION*

AUTOR: *Cristina Conde Gavilán*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

**TÍTULO DE LA TESIS:**

Efecto del aceite de oliva en la evolución del modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental: papel del redox del glutati6n

DOCTORANDO/A:

Cristina Conde Gavilán

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará menci6n a la evoluci6n y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis doctoral desarrollada y realizada que aquí se presenta ha sido llevada a término por Da. Cristina Conde Gavilán bajo mi codirecci6n y en los laboratorios correspondientes al grupo GE-01 Neuroplasticidad y estrés oxidativo del Instituto Maim6nides de Investigaci6n Biomédica de C6rdoba (IMIBIC).

La doctoranda ha realizado una gran dedicaci6n en el aprendizaje no solo de conocimiento sino de destrezas en el manejo tanto de los animales utilizados para estudios de investigaci6n biomédica, así como en el modelo sobre el que se desarrolla su tesis y las técnicas bioquímica y moleculares necesarias para alcanzar los objetivos planteados.

Adicionalmente, ha participado en una formaci6n continuada a traves de los programas de formaci6n tanto de la Universidad de C6rdoba como del IMIBIC, así como con su participaci6n activa en la divulgaci6n y discusi6n de los resultados foros nacionales e internacionales.

Fruto del trabajo desarrollado que culminará con la presentaci6n, exposici6n y de la presente tesis doctoral han sido la elaboraci6n y publicaci6n de dos trabajos originales en revista indexadas en el Journal Citation Report con indices de impacto que las catalogan en los niveles Q1 de sus áreas de conocimiento, permitiendo con ello cubrir los indices de calidad establecidos y requeridos para la presentaci6n de tesis en la Universidad de C6rdoba. Estos mismos estudios, han permitido al grupo realizar la propuesta de un ensayo de intervenci6n nutricional con aceite de oliva en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR).

Por todo ello, se autoriza la presentaci6n de la tesis doctoral.

C6rdoba, 08 de Mayo de 2020

Firma del director

Fdo.: Isaac Tnez Fiñana

Efecto del aceite de oliva en la evolución del modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental: papel del redox del glutatión.



TÍTULO DE LA TESIS:

Efecto del aceite de oliva en la evolución del modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental: papel del redox del glutatión

DOCTORANDO/A:

Cristina Conde Gavilán

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral referenciada ha sido elaborada por Dña. Cristina Conde Gavilán bajo mi codirección, empleando para su labor investigadora los laboratorios adscritos al grupo GE-01 del IMIBIC.

A mi juicio la doctoranda ha mostrado en todo el desarrollo de su Tesis una altísima implicación, dedicación y muy adecuada captación – asimilación de las competencias necesarias para el manejo de animales destinados a estudios de investigación biomédica. Igualmente ha demostrado su capacidad para el diseño y ejecución de modelos experimentales, así como de cualificación para la metodología investigadora e integridad científica.

En el ámbito de su aprendizaje la doctoranda, ha participado con alto aprovechamiento, en los programas de formación de la Universidad de Córdoba y del IMIBIC, divulgando los resultados obtenidos en relevantes foros nacionales e internacionales.

De igual modo deseo hacer constar la elaboración y publicación de dos trabajos originales en revistas indexadas en Journal Citation Report con índices de impacto Q1, alcanzando de este modo los índices de calidad requeridos para la presentación y defensa de su Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba. Hemos de señalar que estas publicaciones han servido de base a nuestro grupo para la propuesta de un ensayo de intervención nutricional con aceite de oliva en enfermos diagnosticados de esclerosis múltiple recurrente-remitente.

En base a todo lo expuesto, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral motivo del presente informe.

En Universidad de Córdoba a 8 de Mayo de 2020

Firma del director

Fdo.: Prof. Dr. Rafael Lillo Roldán

“Yo soy yo y mi circunstancia”

Ortega y Gasset

En memoria del Dr. Fernando Sánchez López

Efecto del aceite de oliva en la evolución del modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental: papel del redox del glutati6n.

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido en la construcción de este trabajo y de cada una de ellas he aprendido algo valioso, que me ha servido para crecer tanto a nivel profesional como personal.

Mi agradecimiento más sincero a mis directores de tesis. Al Dr. Isaac Túnez, Catedrático de Bioquímica de la Universidad de Córdoba y Secretario General de Investigación, Desarrollo e Innovación de la Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía. Gracias por ese momento en que aceptó la propuesta de incluir a una neuropsicóloga como parte de su equipo. Gracias por transmitirme su conocimiento, por difuminar poco a poco fronteras en este campo que parecía tan alejado de mi especialidad y por transmitirme su pasión y hacerme sentir emoción con los resultados de nuestras investigaciones. Al Dr. Rafael Lillo, Profesor Titular de Psiquiatría de la Universidad de Córdoba y codirector de esta tesis. Por cogerme de la mano y guiarme desde el cariño y el buen hacer. Por enseñarme el valor de la colaboración entre diferentes disciplinas y reforzar ese sentimiento de pertenencia al grupo, que me ha hecho sentir en casa. Por transmitirme su conocimiento a través del perfecto uso que hace del lenguaje. Gracias a ambos por vuestra confianza e implicación en el camino hacia la consecución de mis objetivos académicos y sobre todo, gracias por el cariño mostrado en todo momento.

Al Dr. Eduardo Agüera, por permitir desarrollarme como profesional en todos los niveles. Por invitarme a explorar, por contar conmigo para sus proyectos y por contestar a las miles de preguntas que le he hecho durante todos estos años. Pero sobre todo, gracias por seguir apostando por nuestro grupo en los momentos más difíciles, por seguir a nuestro lado cuando tuvimos que decir adiós antes de tiempo.

A D. Manuel Latorre, trabajador incansable donde los haya. Mi guía en el animalario y en el laboratorio. La persona que me ha ayudado a realizar los procedimientos que me resultaban más difíciles. Sin duda alguna, sin su apoyo, este proyecto no hubiera sido posible. Su forma de reír hace que el trabajo sea mucho más agradable.

A Dña. Ana Isabel Giraldo, mi persona de referencia en el equipo para todo. Siempre positiva, siempre con un “sí” por respuesta. Gracias por ser mi cómplice y gracias por tratarme de una forma tan bonita y tan cercana. No existen palabras de agradecimiento.

Al Dr. Javier Caballero, por ayudarme con su planificación rigurosa y su gran capacidad de análisis del detalle. Gracias por su motivación y ayuda desinteresadas, por su constancia en el trabajo y por regalarme tiempo, un bien tan preciado que me ha ofrecido siempre sin reparo. No sabré como agradecer su apoyo y lo que ha supuesto para mi a nivel emocional. Usted es el broche final de este trabajo.

A la Dra. Begoña Escribano, por ser la pieza fundamental para la publicación de los trabajos realizados en esta tesis doctoral. Por compartir conmigo sus reflexiones acerca de los resultados encontrados. Por su transparencia y su calidad humana.

Al Dr. Jos6 Pe6a, por su generosidad, empatía y simpatía. Por darme tranquilidad con sus consejos en cada momento que lo he necesitado. He podido comprobar que el cari6n, la admiraci6n y el respeto con el que hablan de usted, es m6s que merecido.

A todo el grupo de investigaci6n en neuroplasticidad y estr6s oxidativo del Instituto Maim6nides de Investigaci6n Biom6dica de C6rdoba (IMIBIC) y al Servicio de Neurología del Hospital Universitario Reina Sofía, en especial a mis compa6eros del Centro de Especialidades Carlos Castilla del Pino. Gracias por el día a día y por ser m6s amigos que compa6eros.

A la Almazara de Luque Sociedad Cooperativa Andaluza, Olivarera Nuestra Se6ora del Rosario, por la confianza y la ayuda depositada en el proyecto desde el principio. En especial a D. Santiago Baena, por emplear su fuerza en la ayuda a los dem6s y en especial al barrio de su Parroquia, San Jos6 Obrero, al que estoy orgullosa de pertenecer. Usted forma parte de la historia de mi vida y de la de mi familia. Gracias por tanto.

Con una menci6n especial, gracias al Dr. Fernando S6nchez, por saber leer mis inquietudes y necesidades, y empujarme a comenzar este trabajo. Porque ese impulso es el que me ha acompa6ado en cada minuto empleado en esta tesis. No imaginaría hasta qu6 punto. Gracias por sacarme de mi zona de confort y exigirme esfuerzo, pero sobre todo, gracias por haberlo hecho siempre desde el cari6n. Sus chascarrillos me acompa6an y continúan sacándome una sonrisa.

Por último, agradecer a mi familia, a mi pareja y a mis amigos, quererme de forma incondicional y estar siempre ahía para apoyarme en todo, aunque eso suponga robarles tiempo para estar juntos. En especial a mis padres por la educaci6n que me han dado, facilitándome los medios y dándome la suficiente libertad para desarrollarme como persona.

Efecto del aceite de oliva en la evolución del modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental: papel del redox del glutati6n.

Abreviaturas.....	1
Resumen y abstract	3
1. Introducción	5
1.1 Esclerosis Múltiple	7
1.1.1 Epidemiología	7
1.1.2 Fisiopatología y etiopatogenia.....	9
1.1.2.1 Respuesta inmunitaria en la EM.....	9
1.1.2.2 Estrés oxidativo y nitrosativo	11
1.1.2.3 Desmielinización y remielinización	12
1.1.2.4 Patología oligodendroglial.....	13
1.1.2.5 Gliosis	14
1.1.2.6 Daño axonal.....	14
1.1.3 Manifestaciones clínicas de la Esclerosis Múltiple.....	14
1.1.4 Estrategias terapéuticas	16
1.1.4.1 Tratamientos modificadores de la enfermedad	16
1.1.4.2 Tratamientos sintomáticos	17
1.2 Modelos de estudio	18
1.2.1 Modelos experimentales.....	18
1.2.2 Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental.....	18
1.2.2.1 Cambios sintomáticos y evolución.....	19
1.2.2.2 Cambios estructurales y moleculares.....	19
1.3 Nutrición y esclerosis múltiple.....	21
1.3.1 Dieta mediterránea	21
1.3.1.1 Aceite de oliva.....	21
1.3.1.2 Ácido oleico.....	22
1.3.1.3 Hidroxitirosol	22
1.3.2 Microbiota y Esclerosis Múltiple	23
2. Hipótesis de trabajo.....	25
3. Objetivos.....	29
4. Material y métodos	33

4.1	Diseño	33
4.2	Animales	33
4.3	Tratamiento y procedimiento experimental	33
4.4	Variables analizadas	36
4.4.1	Evaluación clínica.....	36
4.4.2	Biomarcadores de daño oxidativo.....	37
4.4.3	Parámetros inflamatorios	37
4.4.4	Lipopolisacáridos.....	37
4.4.5	Proteínas de unión a los lipopolisacáridos.....	37
4.4.6	Análisis estadístico.....	37
5.	Resultados.....	39
6.	Discusión	57
7.	Conclusiones.....	65
8.	Bibliografía	69
9.	Indicios de calidad	79
9.1	Artículos publicados	81

Abreviaturas

anti-MOG = anti-glucoproteína mielínica oligodendrocitaria

AO = Ácido oleico

AOVE = Aceite de oliva virgen extra

ARE = Elemento reactivo antioxidant

BHE = Barrera hematoencefálica

CMH = Complejo mayor de histocompatibilidad

CPA = Célula presentadora de antígeno

CD = Células dendríticas

CIS = Síndrome clínico aislado

EAE = Encefalomiелitis autoinmune experimental

EDSS = Escala expandida del estado de discapacidad

ELS = *Enzo Life Sciences*

EM = Esclerosis múltiple

EMRR = Esclerosis múltiple remitente recidivante

EMPP = Esclerosis múltiple primaria progresiva

EMSP = Esclerosis múltiple secundaria progresiva

EROs = Especies reactivas de oxígeno

ERNs = Especies reactivas de nitrógeno

GPx = Glutatióн peroxidasa

GR = Glutatióн reductasa

GST = Glutathion s-transferasa

GSH = Glutatióн reducido

GSSG = Glutatióн oxidado

HT = Hidroxitirosol

HVZ = Virus del herpes varicela zoster

IFN γ = Interferón gamma

IL1 = Interleucina 1

LAL = Lisado de Limulus Amoebocytes

LBP = Proteína transportadora de lipopolisacáridos.

LPO = Lipoperóxidos

LPS = Lipopolisacárido bacteriano

MOG = Glucoproteína oligodendrocítica de mielina

MUFA = Ácidos grasos monoinsaturados

NFkB-p65 = Factor de necrosis tumoral kB

NrF2 = Factor nuclear tipo 2

ON = Óxido nítrico (*Nitric oxide*)

PC = Proteínas carboniladas

PBM = Proteína básica de mielina

RM = Resonancia Magnética

SAEX = Servicio de Experimentación Animal

SD = Desviación estándar

SNC = Sistema nervioso central

t-BOOH = t-butyl hydroperóxido

Th1 = Linfocitos T colaboradoras tipo 1

Th2 = Linfocitos T colaboradoras tipo 2

TLR = *Toll Like Receptor*

TNF- α = Factor de necrosis tumoral α

TNF α/β = Factor de necrosis tumoral alfa/beta

T-reg = Células T reguladoras

VEB = Virus de Epstein- Barr

VHS = Virus del herpes simple

Resumen

La esclerosis mltiple (EM), es una enfermedad degenerativa, de naturaleza autoinmune y carcter desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC). Es la principal causa de discapacidad no traumtica en adultos j6venes. Su etiologfa no es del todo conocida, aunque se acepta que su origen radicaría en una predisposici6n genética y la interacci6n del individuo con ciertos agentes ambientales. Actualmente, no existe un tratamiento curativo, pues los recursos terapéuticos tan s6lo detienen o ralentizan el avance de la enfermedad. Por esta raz6n, se han ensayado numerosos tratamientos.

En cuanto a los efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y antioxidantes relacionados con la ingesta oral de aceite de oliva virgen, tal elemento caracterfstico de la dieta mediterránea ha sido empleado en el abordaje terapéutico de ciertas patologfas, como la arteriosclerosis y la osteoporosis, entre otras. En este sentido, el presente estudio propone examinar el efecto de la ingesta de aceite de oliva virgen extra en un modelo experimental de EM: la encefalomiелitis autonimune esperimental (EAE).

El objetivo de este estudio fue conocer el impacto de la administraci6n oral de aceite de oliva virgen extra (AOVE), hidroxitirosol (HT) o ácido oleico (AO), en la rata enferma de EAE. Para ello se evaluaron los efectos del AOVE, HT o AO a nivel clfnico segun una escala de movilidad validada, se analizaron cambios bioquímicos concernientes a estrés oxidativo e inflamaci6n, tanto en sangre periférica como en diversos tejidos, incluyendo: sistema nervioso (encéfalo y médula), coraz6n, riñ6n, hfgado, intestino delgado e intestino grueso. Por último, se identificaron relaciones de los aludidos parámetros bioquímicos entre sí, así como influencia de éstos con la severidad y evoluci6n clfnica de la EAE.

La administraci6n oral de AOVE, al igual que el HT y el AO, muestran un efecto antiinflamatorio y antioxidante en la rata con EAE, que se relaciona con: 1) mejorfa en la evoluci6n clfnica; 2) disminuci6n de parámetros bioquímicos de inflamaci6n y de estrés oxidativo, tanto en sangre como en tejido nervioso; 3) minimizaci6n del daño oxidativo en los principales 6rganos no nerviosos (intestino delgado y grueso, hfgado, riñ6n y coraz6n), así como un descenso de endotoxinas bacterianas intestinales; y 4) correlaci6n positiva entre el descenso de endotoxinas bacterianas en sangre, tejido nervioso e intestino (delgado y grueso), con una mejora clfnica, acompañada de un menor estrés oxidativo. En sangre y tejido nervioso se observa además una disminuci6n de los niveles de factores inflamatorios.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a degenerative disease, autoimmune and demyelinating. MS affects the central nervous system (CNS). It is the leading cause of nontraumatic disability in young adults. The etiology is not entirely known, although it is accepted that origin would lie in a genetic predisposition and the interaction of the individual with certain environmental agents. Currently, there is no curative treatment. Therapeutic resources only stop or slow down the progression of the disease. For this reason, various treatments have been tried.

Virgin olive oil is a characteristic element of the Mediterranean diet. Its intake have anti-inflammatory, immunomodulatory and antioxidant effects. Virgin olive oil has been used in the therapeutic approach of some diseases, such as arteriosclerosis and osteoporosis, among others. In this respect, the present study proposes to examine the effect of oral intake of extra virgin olive oil in an experimental model of MS: experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

The aim of this study was to determine the impact of the oral administration of extra virgin olive oil (EVOO), hydroxytyrosol (HT) or oleic acid (OA), in the rat with EAE. It was evaluated the effects of EVOO, HT or AO at a clinical level according to a validated mobility-scale and was analyzed the biochemical changes of concern to oxidative stress and inflammation, both in peripheral blood and in various tissues, including: nervous system (brain and spinal cord), heart, kidney, liver, small bowel and large bowel. Finally, it was identified the relationships of the biochemical parameters with each other, as well as the influence of these parameters with the severity and clinical evolution of the EAE.

Oral administration of EVOO, like HT and AO, shows anti-inflammatory and antioxidant effects in the rat with EAE, which relates to: 1) clinical evolution improvement; 2) increased protection against inflammation and oxidative stress, both in blood and in nervous tissue; 3) minimization of oxidative damage in the main non-nervous organs (small and large bowel, liver, kidney and heart) and a decrease of intestinal bacterial endotoxins; and 4) positive correlation between lowering bacterial endotoxins in blood, nervous tissue and bowel, with a clinical improvement along with lower oxidative stress. A decrease in levels of inflammatory biomarkers is also observed in blood and nervous tissue.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Esclerosis Múltiple

Desde que Charcot describiera la Esclerosis Múltiple (EM) en 1816 como una enfermedad caracterizada por la presencia de zonas escleróticas en el Sistema Nervioso Central (SNC) intercaladas con tejido normal, han sido numerosas y relevantes las contribuciones realizadas a propósito de dicha enfermedad en lo concerniente a su conocimiento, diagnóstico y tratamiento. Tales contribuciones han supuesto los cuantiosos avances que ha experimentado esta entidad a lo largo de su devenir histórico, los cuales han permitido una mejor aproximación diagnóstica y terapéutica a los enfermos afectados, como veremos a continuación.

La EM es una enfermedad inflamatoria crónica de base autoinmune, que incide en el SNC, produciendo una afectación degenerativa de la mielina a diversos niveles.

Es la principal causa de deterioro neurológico no traumático en adultos jóvenes, entre los 20 y 35 años de edad. En consecuencia, supone la primera causa de discapacidad en esta franja etaria en países desarrollados (excluyendo las patologías secundarias a traumatismos).

La etiología de la EM no es del todo conocida a fecha de hoy, pese a que se han identificado algunos factores causales. Una de las teorías más aceptadas es que la EM aparece debido a la interacción entre algunos agentes ambientales con ciertos perfiles genéticos (que conferirían al individuo una mayor susceptibilidad a padecer esta enfermedad). Así, cuando un determinado factor ambiental se presenta, se produce una respuesta inmunitaria que produciría la inflamación, la cual juega un papel preponderante en la injuria al tejido nervioso, fundamentada en la degeneración de las vainas de mielina en dicho tejido. Como consecuencia, se desencadenaría una desmielinización progresiva de los axones neuronales, que a su vez provocaría la formación de áreas esclerosadas (cicatriciales) a modo de placas y lesiones focales en la sustancia blanca.

1.1.1 Epidemiología

Los estudios sobre la frecuencia de la EM en términos de prevalencia e incidencia según diversos enclaves geográficos, etnias, edades y género, han ayudado a un mejor conocimiento de esta patología y, sobre todo, de los factores ambientales implicados.

Kurtzke (1995) planteó una clasificación, basada en un “gradiente norte-sur”, con la que establecía zonas geográficas de alto, medio y bajo riesgo de presentar EM. Las zonas de alta prevalencia se situarían en Canadá, el norte de Estados Unidos, la mayor parte del norte europeo, Nueva Zelanda y la zona sudeste de Australia. Las zonas de riesgo medio incluirían el sur de Europa, el sur de Estados Unidos y el norte de Australia. Y, por último, las zonas de baja prevalencia incluirían Asia, la mayor parte de África y América del Sur (Fig. 1).

En la actualidad, esta gradación de frecuencias según la distribución norte-sur está perdiendo nitidez al estar produciéndose paulatinamente un aumento de la prevalencia e incidencia de esta enfermedad a nivel global. Tal hecho podría seguir estando relacionado con

factores de riesgo ambientales, solo que éstos tendrían una mayor difusión geográfica mundial (y no concentrarse en áreas específicas), además de que el mejor conocimiento de la EM ha supuesto una aproximación diagnóstica y terapéutica más efectiva (redundando en una mayor frecuencia de EM) (Fernández, 2014).

Figura 1. Distribución de la EM en 1987.



Las áreas coloreadas en negro son las de alta frecuencia, las punteadas representan las de frecuencia media y las sombreadas en gris, las de baja frecuencia. Tomada de Kurtzke JF, 1995.

Estos estudios, además de señalar la distribución geográfica de la enfermedad, han expuesto la importancia de determinados factores en su génesis y desarrollo, tales como la vitamina D, la obesidad, el consumo de tabaco y los hábitos alimenticios (Caballero-Villarraso J y cols., 2019).

La vitamina D, se ha perfilado como un factor relevante en la aparición y evolución de la EM. Su déficit se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer EM (Munger y cols., 2006; Salzer y cols., 2012), lo cual estaría en sintonía con las teorías epidemiológicas relacionadas con la latitud geográfica. Ésta determinaría la duración e intensidad de horas de exposición a la radiación ultravioleta de la luz solar, la cual es un factor determinante en la síntesis de dicha vitamina (Ascherio y Munger, 2016).

La obesidad ha sido otro factor que se ha relacionado con el riesgo de desarrollar EM, habiéndose apuntado el impacto que la obesidad pediátrica tiene en posteriores edades de la vida. Este elemento podría a su vez estar influido con los menores niveles de vitamina D circulantes que poseen los individuos obesos respecto de los que no lo son (Ascherio y Munger, 2016).

El consumo de tabaco también ha sido ampliamente estudiado en relación al desarrollo de EM. En este sentido, la duración e intensidad del tabaquismo parecen estar relacionadas directamente con el riesgo de padecer EM, independientemente de la edad de comienzo de este hábito. Dicho riesgo parece disminuir con el cese del tabaquismo, estando en relación inversa con el tiempo transcurrido desde el abandono del consumo (Hedström, 2013).

Asimismo, en los últimos años los estudios han atribuido relevancia a los hábitos alimenticios en el inicio y evolución de la EM. La predisposición genética junto a la microbiota intestinal influirían en el desarrollo de las diferentes comunidades microbianas y de las relaciones bilaterales de éstas con el sistema inmune. El eje microbiota-intestino-cerebro debe poseer un equilibrio entre las partes. De este modo, la “disbiosis” (o alteración de dicho equilibrio) podría dar lugar a enfermedades autoinmunes de diversa naturaleza y manifestaciones, yendo de

patologías netamente digestivas (como la enfermedad inflamatoria intestinal), a patologías metabólicas (como la diabetes mellitus) y hasta enfermedades neurodegenerativas (Ochoa-Repáraz y cols., 2011; Escribano, 2017; Caballero-Villarraso y cols., 2017).

1.1.2 Fisiopatología y etiopatogenia

La EM es una enfermedad de naturaleza inflamatoria y origen autoinmune, de carácter crónico, que da lugar a un proceso desmielinizante continuado y progresivo asociado a una reacción glial, que desencadena una disfunción neurológica a diferentes niveles.

Los fenómenos inflamatorios se caracterizan por la presencia de un infiltrado de linfocitos T y B, macrófagos y células de la microglía, todo ello asociado a una respuesta de los astrocitos, que a su vez producen la aparición de lesiones características. Dichas lesiones se pueden desencadenar a lo largo de todo el SNC, siendo fácilmente identificables concretamente en la sustancia blanca. De hecho, la presencia de tales lesiones son uno de los dos criterios diagnósticos de la EM (junto a las típicas manifestaciones clínicas).

La evaluación de la enfermedad en su forma activa, ha permitido identificar diferencias en los patrones de desmielinización, que se relacionan con las manifestaciones clínicas de la EM (Lucchinetti y cols., 2000; Reich y cols., 2018). Después de dicha fase de desmielinización, las lesiones tienden a cronificarse en función del mayor o menor equilibrio de los procesos de inflamación/remielinización y otros mecanismos aún desconocidos. Se han identificado diferentes tipos de lesiones: a) lesiones caracterizadas por axones remielinizados; b) axones remielinizados con procesos inflamatorios en remisión; y c) lesiones con inflamación cronificada asociada a degeneración lenta de la mielina (Reich y cols., 2018).

La sustancia gris también sufre cierto grado de desmielinización, habiéndose observado que el daño cortical acontece desde etapas tempranas de la enfermedad (Lucchinetti y cols., 2011; Reich y cols., 2018).

Aunque en modelos experimentales y observaciones clínicas los mecanismos fisiopatológicos íntimos tienen muchos aspectos por dilucidar, se puede considerar que los relacionados con aspectos inmunitarios han sido los más estudiados hasta la actualidad.

1.1.2.1 Respuesta inmunitaria en la EM

La inmunidad en la EM ha sido relacionada fundamentalmente con la respuesta inmune celular adaptativa, concretamente con las células T. Las células T autorreactivas serían activadas por un factor desconocido que ejercería su acción a través de mecanismos de mimetismo celular o a través de superantígenos virales o bacterianos. En el primer caso, se trataría de la activación de las células contra péptidos o antígenos compartidos por la mielina y determinados microorganismos; en el segundo caso, proteínas bacterianas o víricas que se unirían a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de las células presentadoras de antígeno (CPA) fuera de la hendidura de unión con el antígeno (Fernández y cols., 2011; Sospedra y Martín, 2016).

Una vez producida este proceso de reconocimiento o interacción molecular, estas células T con capacidad autorreactiva, atravesarían la barrera hematoencefálica (BHE). El paso a través de la BHE se produce gracias a la liberación de citocinas proinflamatorias, como la interleucina 1 (IL-1), interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral alfa/beta (TNF α/β), que inducen un aumento de la expresión de moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina), junto con la expresión de moléculas de adhesión en células T y la protólisis de la membrana basal del endotelio vascular (De Andrés, 2003).

Ya habiendo penetrado en el SNC, los linfocitos T activados se unirán al antígeno mediante el receptor de la célula. Dicho antígeno será presentado por su célula presentadora (CPA) mediante la molécula del CMH clase II, gracias a las moléculas coestimuladoras (Fernández y cols., 2011). Los linfocitos T CD4 colaboradores o linfocitos T *helper* tipo I (L Th1) inician una respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria se pondría en marcha a partir de la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, las cuales facilitan la producción de células T. Esta respuesta se lleva a cabo mediante el reclutamiento de otras células inmunitarias (monocitos, linfocitos T CD8, linfocitos B y mastocitos), además de la activación de macrófagos, astrocitos y células de la microglía. Asimismo, los linfocitos Th-17 también movilizan macrófagos y células gliales. Por otro lado, existe una acción antiinflamatoria, mediada por los linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2) y por las células T reguladoras (T-reg), por medio de la liberación de citocinas (IL-4, IL-10, TGF) que disminuyen el estatus proinflamatorio. Igualmente inducen la proliferación de células B, las cuales sintetizan anticuerpos. La acción de las diferentes citocinas regula la respuesta inmune (Fernández y cols., 2011; Hemmer y cols., 2002).

Los linfocitos T CD8 son citotóxicos y reconocen los antígenos presentados por moléculas CMH clase I. Los linfocitos T CD8 activados atacarían a los oligodendrocitos, neuronas y sus axones de forma directa.

La inmunidad humoral está, del mismo modo, implicada en la patogenia de la EM. Cuando se inicia el proceso inflamatorio, las células B y otros elementos como anticuerpos y sistema de complemento, cruzan la BHE y contribuyen en la respuesta inflamatoria. Existen diferentes tipos de anticuerpos: anti-glucoproteína oligodendrocítica de la mielina (anti-MOG), contra otros componentes de la mielina (PBM, PLP, MAG, 2'-3' cíclico nucleótido 3'fosfodiesterasa), contra proteínas inmunosupresoras o contra proteínas axonales. Estos anticuerpos parecen estar implicados en fases tardías de la enfermedad, ya que aparecen una vez que la remielinización está instaurada. Por otro lado, las células B activadas contribuyen a la neuromodulación, remielinización y neuroprotección en general (Fernández y cols., 2011).

Los linfocitos B también denominados células B antígeno-específicas, realizan la función de célula presentadora de antígeno (CPA) para las células T autorreactivas. Activan las células T de la misma especificidad antigénica más eficientemente que el resto de los linfocitos B o los monocitos y con menores concentraciones de antígeno. De igual forma, las células B parecen tener un papel importante en el daño cortical cerebral. Esto es inferido por la presencia de clones

ectópicos de células B en las meninges y su proximidad a las lesiones desmielinizantes subpiales (Fernández y cols., 2011).

El sistema inmunitario innato, también interacciona con el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa y participa de forma activa. Las células dendríticas (CD) secretan citocinas como IL-12 e IL-18, que movilizan células proinflamatorias e inducen la activación sostenida de la microglía en el SNC. La activación de la microglía inicia la respuesta inflamatoria aguda en el SNC y en la eliminación del tejido dañado, e interviene en el daño tisular junto a los macrófagos (Fernández y cols., 2011).

La activación de los macrófagos y la microglía esta mediada por sus receptores tipo *Toll Like Receptor* (TLR) y por los linfocitos T (Fernández y cols., 2011).

Los aludidos monocitos y los macrófagos que producen moléculas que inducen el daño tisular serían: proteasas, lipasas, citocinas citotóxicas, excitotoxinas y especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs). Las EROs y los radicales de óxido nítrico (ON) además de dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, alteran la función mitocondrial. Este daño energético en las células es especialmente nocivo para los axones (Fernández y cols., 2011).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que la microbiota intestinal juega un papel fundamental en el equilibrio inmunitario entre la actividad proinflamatoria y antiinflamatoria, lo que sugiere que la alteración microbiana puede contribuir o prevenir el desarrollo de la enfermedad (Lee y cols., 2011; Caballero-Villarraso y cols., 2017).

1.1.2.2 Estrés oxidativo y nitrosativo

Las reacciones químicas que realizan las células para su supervivencia dan lugar a la liberación de radicales libres. Los radicales libres son especies químicas (átomos o moléculas) que contienen, al menos, un electrón desapareado; tal característica les hace ser altamente inestables y reactivos (Van Horssen y cols., 2011; Phaniendra, 2015). Como se ha comentado anteriormente, dichos radicales libres se denominan especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y fisiológicamente pueden suponer efectos beneficiosos importantes para el organismo pero, paradójicamente, a altas concentraciones pueden causar daño a diversas biomoléculas (Phaniendra, 2015).

Los EROs y ERNs son eliminados o neutralizados por los sistemas antioxidantes que poseen algunas células y con ello, el propio organismo mantiene de forma equilibrada sus niveles en los rangos de normalidad evitando la oxidación indeseada. Cuando se da un desequilibrio entre las EROs/ERNs y los sistemas antioxidantes del organismo, se producen los conocidos como fenómenos de estrés oxidativo y estrés nitrosativo, que pueden afectar a diversas moléculas, traduciéndose en cambios conformacionales de éstas, pudiendo llegar a la alteración e incluso pérdida de sus funciones fisiológicas (Witherick y cols., 2011).

Estudios de nuestro grupo han puesto de manifiesto cómo existe un alto grado de daño oxidativo en el tejido cerebral de animales con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE),

modelo murino que reproduce un cuadro similar a la EM en humanos. Este daño oxidativo se caracteriza por un incremento en los biomarcadores de estrés oxidativo y decremento en los sistemas antioxidantes, estableciendo correlaciones con los cambios objetivados en los perfiles moleculares en plasma y el estado clíиico del animal (Tasset y cols., 2012a,b). En esta misma línea, estudios realizados en muestras sanguíneas de pacientes con Esclerosis Múltiple Recurrente Remitente (EMRR) revelaron un paralelismo entre los datos obtenidos en estos pacientes y los hallados en el modelo de EAE. Adicionalmente y por primera vez, en estos estudios se postuló la hipótesis de que el desequilibrio oxidativo en las células presentes en el torrente circulatorio puede preceder a la activaci3n de la respuesta inflamatoria que conduce a la aparici3n de una recaída o brote (Tasset y cols., 2012a,b).

La dieta mediterránea y en concreto el aceite de oliva como elemento fundamental de dicha dieta, ejerce un poderoso efecto antioxidante a nivel cerebral, incluso pudiendo restaurar la situaci3n previa a la inducci3n de estrés oxidativo. Se presume que tal efecto se debe a algunos micronutrientes propios de dicho aceite de oliva (Tasset y cols., 2011).

1.1.2.3 Desmielinizaci3n y remielinizaci3n

Las fibras nerviosas mielíиicas son las que están rodeadas por una vaina de mielina, como sugiere su nombre. Los responsables de la formaci3n de las vainas de mielina en el SNC alrededor de los axones son los oligodendrocitos. La membrana plasmática del oligodendrocito envuelve el ax3n, determinando el espesor de la vaina de mielina.

Las vainas de mielina son capas discontinuas e interrumpidas a intervalos regulares por los nodos de Ranvier. Los nodos de Ranvier son el lugar donde la célula puede ser estimulada, gracias a que los iones pueden pasar libremente a través de la membrana plasmática entre el líquido extracelular y el axoplasma, ya que la mielina sirve como aislante. El potencial de acci3n es más rápido en las fibras mielinizadas o mielíиicas que en las no mielinizadas o amielíиicas y se produce a modo de saltos de un nodo al siguiente, lo que es denominado “conducci3n saltatoria”.

La desmielinizaci3n de fibras nerviosas propia de la EM provoca como consecuencia un enlentecimiento (e incluso bloqueo) en la conducci3n del impulso nervioso, lo cual explicaría los sítиomas transitorios y permanentes de la enfermedad. Este bloqueo podría ser explicado por varias vías: a) los factores humorales asociados al edema subsiguiente a la inflamaci3n pueden contribuir a la intensificaci3n y distribuci3n de la reacci3n inflamatoria y al proceso de desmielinizaci3n; b) el TNF- α , directamente relacionado con el proceso de destrucci3n de la mielina y los oligodendrocitos; c) el efecto citot3xico del óxido nítrico, producido por los macrófagos y microglía, puede suponer una interferencia importante en la conducci3n del impulso, ya que los oligodendrocitos y los axones son vulnerables a esta citotoxicidad; y iv) la liberaci3n de los productos por células inmunitarias como citocinas y moléculas de adhesi3n asociadas a la remielinizaci3n (Pivneva y cols., 2009; Rodríguez, 2007). En la actualidad, existen estudios que relacionan los fenómenos de inflamaci3n y remielinizaci3n en la EM con un estado

de disbiosis neuroencefálica, demostrando la presencia de bacterias en la sustancia blanca de pacientes con esta enfermedad (Branton y cols., 2016). Asimismo, la influencia microbiana en la mielinización, se ve apoyada por estudios en animales libres de gérmenes (como los ratones libres de gérmenes o *'germ free mice'*) que muestran cambios en la expresión de genes relacionados con la mielinización y la existencia de axones hipermielinizados en la corteza prefrontal. Tales hechos pueden incluso revertirse tras una nueva colonización bacteriana en determinadas ventanas temporales (Hoban y cols., 2016). Esta disbiosis neuroencefálica ha sido extrapolada a un ámbito más amplio del organismo, desde que se comenzó a hablar del “eje intestino-cerebro” y, más allá, del “eje microbiota-intestino-cerebro”. Los diferentes perfiles de especies microbianas y la respuesta inmune inherente a su presencia, tendrían un papel determinante en el origen y/o persistencia de ciertas enfermedades neurodegenerativas, como la EM (Caballero-Villarraso y cols., 2017).

Inmediatamente después de la desmielinización se pondrían en marcha los procesos de remielinización, que vuelven a revestir el axón con finas vainas de mielina. Estos procesos son heterogéneos y dependen principalmente de la migración de las células progenitoras del oligodendrocito al lugar de la lesión y a su diferenciación en oligodendrocitos mielinizantes (Rahmanzadeh y cols., 2018).

1.1.2.4 Patología oligodendroglial

El sistema nervioso está compuesto por neuronas y células gliales. Las neuronas son las células que transmiten la información y las células gliales son las encargadas de regular el medio en el tejido nervioso y ayudar en estos procesos de comunicación. Del mismo modo, las células gliales desempeñan otras funciones como propiciar la nutrición de las neuronas, participar en los mecanismos de defensa inmunológica y en la reparación tisular después de una posible injuria en el sistema nervioso, entre otras. Las células gliales son de naturaleza muy diversa, en el SNC podemos encontrar: astrocitos, microglía y oligodendrocitos. Los oligodendrocitos son células gliales que presentan unas prolongaciones que pueden producir varios internodos de mielina de forma simultánea, lo que permite a un único oligodendrocito mielinizar varios segmentos de un mismo axón o a axones diferentes.

La destrucción de oligodendrocitos es un hecho característico de los procesos citológicos de la EM. Los oligodendrocitos pueden ser dañados por efectores moleculares dependientes o independientes del receptor. Los mecanismos moleculares independientes del receptor son: el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, las proteasas y el sistema perforina/granzima.

La muerte de oligodendrocitos por mecanismos de necrosis o apoptosis puede explicar el proceso de desmielinización característico de la EM. Estudios recientes sugieren que la anteriormente aludida presencia de bacterias o componentes de éstas en el cerebro, podrían ejercer efectos sobre los oligodendrocitos (Branton y cols., 2016; Hoban y cols., 2016).

Diferentes estudios sugieren una oligodendropatía primaria en las lesiones propias de la EM, siendo el daño de los oligodendrocitos el evento inicial en la formación de dichas lesiones y

que los procesos inmunopatológicos podrían ser secundarios a dicha oligodendropatía (Rahmanzadeh y cols., 2018). En los últimos años se han propuesto diferentes mecanismos patológicos de los procesos cito-histológicos de las etapas incipientes de la EM, aunque los mecanismos íntimos por los que se producirían son actualmente bien conocidos.

1.1.2.5 Gliosis

El término gliosis engloba a una serie de mecanismos secundarios a una respuesta de las células gliales del SNC acontecida tras una noxa concreta, que conlleva la aparición de lo que se denomina “cicatrices gliales”. En la EM está presente el fenómeno de la gliosis desde etapas tempranas de la enfermedad, lo que contribuye a la progresión de ésta y a la incapacidad para la remielinización efectiva del tejido dañado.

Estudios recientes indican que factores microbiológicos (tanto a nivel local, en el propio SNC, como en un entorno más amplio que podría ser el eje microbiota-intestino-cerebro) regulan de forma fisiológica la maduración y función de la microglía. Además, tales elementos microbiológicos podrían tener una acción directa o indirecta sobre otras células del SNC tales como los astrocitos (Erny y cols., 2015)

1.1.2.6 Daño axonal

La evolución del conocimiento de la fisiopatología y etiopatogenia de la EM ha llevado a cambios en el planteamiento del desarrollo de la neurodegeneración. Con ello, pasaríamos de considerar la afectación de la mielina como causa exclusiva de la enfermedad, a centrar la atención en la afectación neuroaxonal pese a una posible ausencia de desmielinización (Rahmanzadeh y cols., 2018).

La degeneración axonal puede ser atribuida directa o indirectamente a los procesos inflamatorios. Esta inflamación podría lesionar directamente el axón mediante la secreción de enzimas, citocinas y radicales libres que afectan a la cadena respiratoria mitocondrial. Todo ello induciría la expresión de neurotransmisores y sus receptores, mediante citotoxicidad mediada por células T CD8 y mediante la reducción del flujo de sangre a las neuronas por la aparición de un edema secundario. Por otro lado, a medida que la enfermedad evoluciona se produce una disminución del apoyo neurotrófico de oligodendrocitos y mielina, lo que contribuye a su vez al aumento de la neurodegeneración. La degeneración axonal conduce a la muerte de la neurona, originando la formación crónica de placas (Rahmanzadeh y cols., 2018).

1.1.3 Manifestaciones clínicas de la Esclerosis Múltiple.

Las manifestaciones clínicas de la EM pueden variar dentro de un amplio abanico de presentaciones, que puede ir desde las formas larvadas hasta las formas más severas y/o rápidamente progresivas. El debut de la mayoría de los pacientes consiste en un inicio súbito de ciertos síntomas y signos y, posteriormente, se instaura el estatus crónico dentro del cual pueden registrarse episodios agudos (a modo de recidivas); otra posibilidad es que se produzca un avance insidioso de dichas manifestaciones clínicas y con ello, una progresión gradual hacia la

incapacidad; y por último, cabe la posibilidad de que la enfermedad progrese de una forma mixta o intermedia (combinación entre brotes y avance insidioso) (Fernández y cols., 2011; Lublin, 2014).

Morfológicamente las lesiones pueden producirse en cualquier lugar a lo largo de todo el SNC. Es común que estas lesiones se muestren más frecuentemente en zonas periventriculares, nervio óptico, quiasma óptico, tronco del encéfalo, pedúnculos cerebelosos y médula espinal, dando lugar a una sintomatología más o menos característica. Dichas lesiones serían el sustrato anatómico-patológico que puede originar los diversos síntomas y signos, a consecuencia de la afectación funcional subsiguiente al daño morfológico. Las alteraciones motoras (paraparesia asimétrica y hemiparesia), las sensitivas (parestias e hipoestesia) y las cerebelosas (ataxia, disartria, temblor intencional e inestabilidad) son las más frecuentes. A este cortejo sintomático se pueden añadir alteraciones cognitivas, trastornos visuales, disfunciones sexuales y de esfínteres, neuralgias, trastornos del sueño, depresión y fatiga.

La aparición de estos episodios neurológicos de forma aguda, se denomina brote o recidiva, pudiendo surgir con una frecuencia variable. Pueden aparecer y remitir de forma rápida. El incremento del número de brotes se suele asociar a un peor pronóstico. El proceso de recuperación puede atribuirse a la resolución del edema del tejido nervioso, cambios en el pH, reducción de infiltrados inflamatorios y fenómenos de neuroplasticidad local. Por otro lado, la recuperación a largo plazo requiere además de la reparación de la propagación del impulso nervioso mediante el aumento de los canales de Na^+ internodales y, con ello, la formación de nuevas vías nerviosas alternativas.

Las diferentes formas clínicas se catalogan según la evolución de la enfermedad, es decir, según el inicio y el curso de ésta. En este sentido, recientemente Lublin (2014) ha realizado una nueva clasificación de los subtipos de EM en función de la progresión de la enfermedad. De este modo las formas clínicas de esta enfermedad se clasificarían del siguiente modo:

- Remitente-recidivante (EMRR). La enfermedad se caracteriza por eventos clínicos denominados brotes o recaídas, seguidas de un periodo de estabilización y de una fase de recuperación completa o parcial. A medida que se repiten los brotes, éstos van dejando secuelas funcionales neurológicas, pero entre ellos el paciente se encuentra clínicamente estable. Dentro de esta forma clínica se pueden englobar los siguientes:
 - Síndrome clínico aislado (CIS). El paciente presenta un evento clínico.
 - CIS activo. Aparición de un evento clínico junto a una nueva lesión radiológica (lesiones captantes de gadolinio (Gd^+) en la resonancia magnética (RM) o lesiones nuevas/ampliadas en T2.
 - CIS no activo. En ausencia de cambio radiológico.
 - EM remitente-recidivante (EMRR). CIS con evidencia morfológica en la RM con diseminación en espacio así como lesiones Gd^+ y no intensas en T2 en RM y/o

un evento posterior. Asimismo, en un periodo de 6-12 meses (a criterio del clíиico) se cataloga en:

- EMRR activa. Presencia de lesiones captantes de gadolinio en RM o lesiones nuevas/ampliadas en T2.
 - EMRR no activa. Ausencia de evento radiolóгico.
- Enfermedad progresiva. Puede ser primaria (EMPP) o secundaria (EMSP). La EMPP se caracteriza por una progresi3n gradual de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad. La EMSP se da en pacientes con EMRR con una progresi3n gradual de la discapacidad. Asimismo, presenta cuatro formas de expresi3n clíиica, ya sea EMPP o EMSP:
- Activa con progresi3n. Presencia de brotes y empeoramiento progresivo (clíиico y/o radiolóгico).
 - Activa sin progresi3n. Presencia de brotes dentro de un determinado marco temporal.
 - No activa con progresi3n. No presenta brotes pero empeora gradualmente a nivel clíиico.
 - No activa sin progresi3n. Presenta estabilidad o situaci3n quiescente.

La importancia de distinguir entre diferentes subtipos radica en que la respuesta al tratamiento puede ser diferente segúи la forma o estatus clíиico (Lublin, 2014).

1.1.4 Estrategias terapéuticas

En la actualidad no existe ningúи tratamiento curativo para la EM, por lo que el tratamiento de la enfermedad est3 orientado a la reducci3n de la progresi3n de la misma (tratamientos modificadores de la enfermedad) y a paliar la sintomatologíа (tratamiento sintomático).

1.1.4.1 Tratamientos modificadores de la enfermedad

Los tratamientos modificadores de la enfermedad tienen como objetivo enlentecer la progresi3n de la misma evitando posibles nuevos brotes y lesiones desmielinizantes. Este tipo de terapias se encuentran aprobadas para formas de EMRR y EMSP. Los recursos farmacol3gicos actualmente al uso en la pr3ctica clíиica asistencial se pueden clasificar en: 1) inmunosupresores, como la cladribina; 2) anticuerpos monoclonales, tales como alemtuzumab, daclizumab, natalizumab, ocrelizumab; 3) inmunomoduladores, como dimetilfumarato, fingolimod, interfer3n beta (1A, y 1B), teriflunomida e interfer3n beta 1A pegilado. La elecci3n del tratamiento adecuado para cada paciente hace necesaria una estimaci3n rigurosa del riesgo-beneficio considerando los efectos secundarios de los tratamientos aprobados m3s recientemente para, de esta forma, establecer la adecuaci3n o personalizaci3n del aludido tratamiento.

Estas terapias son calificadas como tratamientos de primera línea y segunda línea. Esta denominación no hace del todo referencia al orden en el que se realiza la prescripción médica, tal y como su nombre podría sugerir, sino que serían administrados a un paciente u otro de forma individualizada a criterio del neurólogo. El natalizumab es el tratamiento que ha presentado mejores resultados en cuanto a reducción de progresión de la enfermedad (Cadavid y cols., 2013; Wickstrom y cols., 2013) y mejora de la función cognitiva (Mattioli F y cols., 2011). El natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que bloquea la entrada de linfocitos al SNC mediante la inhibición selectiva de las moléculas de adhesión y, como consecuencia, impidiendo el acceso de los citados linfocitos a través de la barrera hematoencefálica. Con ello se logra la reducción de brotes en los pacientes. Un estudio de nuestro grupo con pacientes en tratamiento con natalizumab, muestra una reducción del nivel de proteínas carboniladas (biomarcador indicativo de daño oxidativo) presentando un efecto más intenso en pacientes con un mayor grado de discapacidad, evaluado según la escala EDSS (Escala Expandida del Estado de Discapacidad, por su siglas en inglés, '*Expanded Disability Status Scale*') (Tasset y cols., 2012; Tasset y cols., 2013).

1.1.4.2 Tratamientos sintomáticos

Los síntomas secundarios que experimentan estos pacientes son muy heterogéneos. Por un lado, nos encontramos con síntomas motores y musculares, tales como los relacionados con la marcha, la espasticidad y las alteraciones esfinterianas; y por otra, con síntomas denominados "invisibles", como la fatiga y el deterioro cognitivo, entre otros. Para su tratamiento se precisa una intervención multidisciplinar que permita el abordaje integral de esta sintomatología siendo frecuente el uso de tratamientos farmacológicos específicos, como por ejemplo el nabiximol para la espasticidad. Asimismo, el uso de la neurorrehabilitación tanto fisioterápica como psicológica y cognitiva, está cobrando cada vez más importancia habida cuenta de que la discapacidad precisa de estrategias preventivas y no estrictamente paliativas (se tiende más a ralentizar el avance, en lugar de abordar éste cuando la discapacidad está instaurada).

En relación al tratamiento de la sintomatología aguda (brotes) el tratamiento por excelencia es el farmacológico, concretamente con corticoides intravenosos u orales, según el caso, pretendiendo controlar el proceso inflamatorio subyacente.

1.2 Modelos de estudio

1.2.1 Modelos experimentales

Las limitaciones de los estudios clínicos en enfermedades neurológicas (tanto por las limitaciones en la obtención de muestras tisulares así como los condicionantes éticos), hacen que la investigación en EM se fundamente en gran medida en la realización de estudios en modelos animales. La EM es una enfermedad difícil de reproducir en modelos animales y los existentes se logran mediante métodos de inducción con protocolos diferentes. Esto hace que existan diversos modelos *'in vivo'* en función de la forma de obtención. Existen dos formas: 1ª) tras inducción activa de la enfermedad; y 2ª) tras la obtención de líneas transgénicas que la desarrollan de forma espontánea, los cuales están muy en auge actualmente.

La mayor parte de los modelos de EM corresponderían al primer tipo (inducción activa) ya sea mediante infecciones virales, procesos de inmunización, o por transferencia de células patogénicas del sistema inmune.

Los modelos de desmielinización inflamatoria mediada por virus se llevan a cabo por medio de protocolos de infección, a sabiendas de que la infección viral está implicada en la patogénesis de la enfermedad. En la actualidad se acepta que en la etiopatogenia de la EM podrían estar implicados varios tipos de virus, como el Epstein- Barr (VEB), herpes simple (VHS) o herpes varicela zoster (HVZ), en relación a una susceptibilidad genética del individuo enfermo (Gilden, 2002). La importancia de estos modelos estriba en la posibilidad de realizar un seguimiento de las lesiones desmielinizantes. Uno de los más destacados es el de encefalomiелitis murina de Theiler, que sirve para explicar los mecanismos infecciosos subyacentes a la desmielinización, mediante la infección de oligodendrocitos o macrófagos (García-Díaz y cols., 2008). Otro de los modelos mediados por virus es el de la cepa JHM del virus de la hepatitis murina (coronavirus) mediante la infección de oligodendrocitos (García-Díaz y cols., 2008).

Estos modelos presentan claros inconvenientes debidos a la dificultad técnica que conllevan, además de su difícil extrapolación a la enfermedad en humanos, ya que no se han aislado estos virus en pacientes afectados de EM.

1.2.2 Modelo de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

La Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) es un modelo murino que reproduce muchas de las características clínicas, neuropatológicas e inmunológicas de la EM. Encuentra su origen en los experimentos de Koritschoner y Schweinburg en 1925, seguidos de las investigaciones de Hurst en 1932 sobre los efectos neurológicos de las vacunas para la rabia que llevaron a observar los efectos de la inoculación de emulsiones de cerebro o médula espinal en roedores (García-Díaz y cols., 2008). Fue consolidado en 1933 por T. Rivers, quien mediante la inmunización del tejido nervioso consiguió una reacción inflamatoria con desmielinización y demostró que esto se producía debido a contaminantes tisulares presentes en las vacunas (García-Díaz y cols., 2008).

Olitsky y Yager (1949) fueron los pioneros en la realización de la inducción de EAE a una rata, tal y como se conoce hoy en día, representando el punto de partida para su uso, hasta llegar a convertirse en el principal modelo animal en EM (García-Díaz y cols., 2008).

Existen diferentes modelos de EAE que se diferencian en el grado y el momento de aparición de las reacciones inmunológicas, así como en el proceso inflamatorio del SNC (Pérez-Nievas y cols., 2010). El curso de la enfermedad y la presencia o no de procesos desmielinizantes depende de la especie, cepa y péptido inductor. Todos estos factores determinarán la posibilidad de desarrollo e inducción de poblaciones de linfocitos T autorreactivos, y por tanto, las características del modelo reproducido.

Como ha sido indicado se pueden utilizar diferentes proteínas para el desarrollo del modelo experimental, tales como como la Proteína Básica de Mielina (PBM) o la Glucoproteína Oligodendrocítica de Mielina (MOG). Asimismo, en algunas especies la respuesta de las células T no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad y requieren la generación de anticuerpos específicos contra mielina por los linfocitos B (Constantinescu y cols., 2011)

La variabilidad en las respuestas tras la aplicación de protocolos diferentes, hizo que se considerara la etiología de la enfermedad como una reacción alérgica a las diferentes secuencias peptídicas. La investigación de esta hipótesis propició el desarrollo de nuevas técnicas, que permitieron la propagación *in vitro* de las células T específicas para un antígeno determinado, lo que dio origen al “modelo de transferencia adoptiva de EAE”. Diversos experimentos demostraron la base autoinmune de esta enfermedad.

En 1951 con la introducción de inmunopotenciadores o adyuvantes, en concreto el de Freund, se logró el desarrollo de la enfermedad con una única inoculación (Gold y cols., 2006) en contraposición a los modelos de inoculaciones múltiples que se utilizaban anteriormente. Por otra parte y gracias a la toxina de la tosferina (producida por la *Bordetella pertusis*) se potenció la inducción de la enfermedad y el número de colonias linfocitarias reactivas. Estos hechos dieron como resultado la consolidación del modelo de EAE.

1.2.2.1 Cambios sintomáticos y evolución

Tal como se ha comentado anteriormente, el curso de la enfermedad puede ser variado y se puede caracterizar por fases agudas de inflamación en alternancia con episodios clínicos, o progresión de la sintomatología. Ambas formas evolutivas pueden coexistir al mismo tiempo. Tras la inducción los animales presentan edema y falta de apetito con disminución de la ingesta (tanto de alimento como de agua) y, a medida que va progresando la enfermedad, presentan de forma secuencial debilidad en la cola y en las patas traseras y parálisis de las mismas, hasta llegar a una parálisis de las cuatro extremidades, seguida del deceso del animal (Pérez-Nievas y cols., 2010)

1.2.2.2 Cambios estructurales y moleculares

Los cambios anatomopatológicos característicos de la EAE consisten en un infiltrado inflamatorio en la sustancia blanca fundamentalmente a expensas de linfocitos y macrófagos,

desmielinizaci2n, p2rdua axonal, gliosis y remielinizaci2n parcial, al igual que en la EM (Gold y cols., 2006; Constantinescu y cols., 2011). Asimismo ha sido detectada la presencia de inmunoglobulinas en el SNC y l2quido cefalorraqu2deo.

Este proceso desencadena lesiones en el SNC diferenciadas seg2n la ubicaci2n y cronolog2a de aparici2n localizadas principalmente en tallo cerebral y m2dula espinal. Estas lesiones son sobre todo perivasculares.

Es amplia la literatura cient2fica que pone en estrecha relaci2n a la microbiota intestinal y al sistema nervioso tanto perif2rico como central. La situaci2n de equilibrio o desequilibrio entre ambos elementos (microbiota y hu2sped) pueden condicionar, respectivamente, el estatus neurol2gico fisiol2gico o patol2gico (Berer y cols., 2012; Tomassello y cols., 2016; Wekerle y cols., 2013; Caballero-Villarraso y cols., 2017). Recientes estudios desarrollados por el grupo del Prof. T2nez muestran en el modelo de EAE una correlaci2n entre la evoluci2n de procesos neuroinflamatorios y cambios en determinados biomarcadores como el lipopolisac2rido bacteriano (LPS) y la prote2na transportadora de LPS (LBP), tanto en sangre perif2rica como en tejido cerebral de la rata (Escribano y cols., 2017). En estos mismos estudios, dicho grupo evidenci2 el mismo patr2n en muestras sangu2neas de pacientes con EMRR tratados con Natalizumab.

De forma an2loga la implicaci2n de las EROs ha sido propuesta como mediadora de la desmielinizaci2n y del da2o axonal en la EM (Das, 2012; Escribano y cols., 2017). Estudios desarrollados en el modelo de EAE en rata *Dark Agouti* han mostrado que existe un importante da2o oxidativo en tejido nervioso. Tal da2o se corresponder2a con incrementos (en sangre y tejido nervioso) de productos de lipoperoxidaci2n (LPO) y prote2nas carboniladas (PC), as2 como la reducci2n del glutati2n reducido (GSH) y/o incremento en los niveles de glutati2n oxidado (GSSG), con la consiguiente reducci2n del cociente GSH/GSSG (Bahamonde y cols., 2014; Melamud y cols., 2012; Miller y cols., 2012; Tasset y cols., 2012)

1.3 Nutrición y esclerosis múltiple

1.3.1 Dieta mediterránea

El concepto de dieta mediterránea fue acuñado en 1948 por el epidemiólogo Leland G. Allbaugh a raíz de un estudio comparativo entre la población estadounidense y la griega, el cual desarrolló en la isla de Creta (Minelli y Montinari, 2019). Ancel Keys en 1960, tras otro estudio epidemiológico conocido como “el estudio de los 7 países”, demostró que en enclaves como Grecia e Italia existía una menor incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Otros autores han seguido esta línea de investigación, lo que ha desembocado en el reconocimiento de la dieta mediterránea como el perfil dietético ideal para mantener un buen estado de salud y prevenir ciertas enfermedades crónicas, especialmente las relacionadas con el sistema inmune, procesos inflamatorios crónicos y estrés oxidativo (Aparicio-Soto y cols., 2016; Ferreira y cols., 2015; Sofi y cols., 2013).

La dieta mediterránea presenta variaciones que dependen de factores tanto sociales, como políticos y económicos, aunque de forma general se caracteriza por un consumo relevante de productos vegetales (tales como frutas, verduras, legumbres y frutos secos), pan y otros cereales (considerándose el trigo un alimento opcional), el vinagre y el vino (en cantidades moderadas). Junto a esto ha de estar indefectiblemente presente el aceite de oliva como grasa principal. Cabe destacar el papel preponderante de este último al habersele atribuido numerosos efectos saludables, habida cuenta de que es una fuente importante de antioxidantes (Minelli y Montinari, 2019).

1.3.1.1 Aceite de oliva

El aceite de oliva es un producto milenario tradicional fruto del olivo e inherente a la cultura española. El origen del olivo se localiza en Palestina, Líbano, Siria, Chipre y Creta y posteriormente se fue extendiendo por toda la cuenca mediterránea. En España bajo el imperio romano, se produjo un importante crecimiento agrícola, decayendo su uso con la caída de este imperio y volviéndose a recuperar gracias a la presencia árabe. La fragmentación entre la España cristiana y la árabe provocó en la población una división en el consumo de aceite que duró hasta bien entrado el S. XX, continuando el consumo en el sur y absteniéndose del mismo el norte y las Islas Canarias (Martínez, 2005).

El número de variedades de cultivo del olivo es amplio existiendo en España unas 260 variedades diferentes. El aceite de oliva virgen extra (AOVE) está compuesto por 2 fracciones (Aparicio soto y cols., 2016; Zhu y cols., 2010):

- Glicerol, fracción mayoritaria o fracción saponificable (90-99% de la composición total). Se compone de ácidos grasos monoinsaturados, ácido oleico, siendo este su principal componente; ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido linoleico; y ácidos grasos saturados, mayoritariamente ácido palmítico. Su composición puede variar principalmente debido a las condiciones de cultivo.

- Fracci6n minoritaria (1-2 % de la composici6n total). Sufre variaciones dependiendo del cultivo, el clima, la madurez de las aceitunas en las cosechas y el sistema de procesamiento para producirlo. Est6 compuesta a su vez por:
 - o Fracci6n insaponificable. Hidrocarburos (escualeno), alcoholes alif6ticos y triterp6nicos (eritrodiool y uvaol), esteroles (brassicasterol, 5-avenasterol, campesterol, estigmasterol), vitaminas (α , β , y γ tocoferoles), fitoesteroles, pigmentos y compuestos vol6tiles, entre otros.
 - o Fracci6n fen6lica. El contenido fen6lico depende del cultivo de la aceituna, de su etapa de maduraci6n, factores ambientales, y de las condiciones de extracci6n y almacenamiento. Son principalmente 6cidos fen6licos, pero tambi6n bioactivos como hidroxitirosol (HT), oleurope6na u oleaceina, entre otros.

La literatura cient6fica sugiere que el consumo de aceite de oliva con altos niveles de 6cidos grasos monoinsaturados, principalmente 6cido oleico y componentes fen6licos, como el hidroxitirosol, aporta importantes beneficios a la salud disminuyendo el riesgo de determinadas enfermedades, fundamentalmente la arteriosclerosis y fen6menos con 6sta relacionados, tales como dislipemias y otros trastornos cardiometab6licos (Cano-Europa y cols., 2016; De Lau y cols., 2005; Morris y cols., 2003; Stoneham y cols., 2000). M6s all6 de tales entidades, en la 6ltima d6cada se ha profundizado en patolog6as de diferente 6ndole tales como enfermedades metab6licas 6seas, patolog6as neopl6sicas y neurodegenerativas, entre otras (Quiles y cols., 2006; Stoneham y cols., 2000; Tasset y cols., 2011; Ferreira y cols., 2015; Fern6ndez-Fern6ndez y cols., 2011

1.3.1.2 6cido oleico

Los 6cidos grasos monoinsaturados (MUFA), como el 6cido oleico (AO) son beneficiosos para la salud y reguladores de la actividad y funci6n de componentes del sistema inmune. Han sido numerosos los estudios dedicados a investigar el rol de este componente del aceite de oliva, para as6 dilucidar su utilidad en la inmunomodulaci6n, tratamiento y prevenci6n de diferentes enfermedades como las cardiovasculares o las autoinmunes (Quiles y cols., 2006; Sales-Campos y cols., 2013). Asimismo, se ha descrito que reduce el estr6s oxidativo celular y se ha asociado a una mayor longevidad y menor grado de deterioro cognitivo relacionado con la edad (Quiles y cols., 2006).

1.3.1.3 Hidroxitirosol

El hidroxitirosol (HT) es uno de los componentes fen6licos del aceite de oliva y proviene de la hidr6lisis de la oleurope6na. Se ha demostrado que esta mol6cula tiene importantes beneficios, como su efecto protector sobre la citotoxicidad mediante la eliminaci6n de radicales libres y el fomento de la inmunidad innata (Goya y cols., 2007; Granados-Principal y cols., 2010; Hashimoto y cols., 2004; Mart6n y cols., 2010; Rietjens y cols., 2007; Schaffer y cols., 2010). Su consumo se ha asociado al decremento en la oxidaci6n lip6dica y la inflamaci6n (Konstantinidou y cols., 2010; Granados y cols., 2010). Mart6n y cols., en 2010, observaron que el tratamiento

con HT atenuaba las lesiones inducidas por t-butyl hydroperóxido (t-BOOH) aumentando la expresión y la actividad de tres enzimas relacionadas: glutatión peroxidasa (GPx); glutatión reductasa (GR) y glutatión s-transferasa. (GST). Del mismo modo, demostraron que estos efectos reguladores se ejercían mediante la acción del HT, el cual induce la translocación nuclear del Nrf2.

Diferentes estudios han mostrado que los componentes fenólicos del aceite de oliva tienen efecto antioxidante basado en la activación de enzimas citoprotectoras. La regulación de estas enzimas detoxificantes y antioxidantes ha sido asociada al factor de transcripción nuclear tipo 2 (Nrf2).

El Nrf2 está inhibido en el citosol mediante su unión a la proteína Keap 1. La acción de un estímulo capaz de liberar el Nrf2 puede permitir la unión de éste al elemento reactivo antioxidante (ARE) en el núcleo, lo que interferirá la expresión de los genes de las enzimas reguladoras (Martín y cols., 2010).

1.3.2 Microbiota y Esclerosis Múltiple

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos del tracto gastrointestinal que no solo habitan en éste, sino que interaccionan con nuestro organismo. Las funciones de la microbiota son variadas, incluyendo acciones metabólicas, reguladoras e inmunitarias, lo que le atribuye una gran importancia en los estados de salud y enfermedad. En relación a la función inmunitaria se considera que la adquisición de una microbiota adecuada en edades precoces de la vida, tiene efectos inmunitarios incluso a largo plazo, aunque la interacción entre el sistema inmune y la microbiota se mantiene a lo largo de toda la vida (Lee y cols., 2011; Erny y cols., 2015).

En los últimos años en el marco conceptual de la interacción entre la microbiota y diversos órganos de la economía, se ha evidenciado el impacto del microbioma en el SNC. Se ha dado a conocer en la literatura como el eje intestino-cerebro, habida cuenta de la conexión anatómica entre las asas intestinales y el encéfalo a través del nervio vago (X para craneal). De esta forma, un desequilibrio (o disbiosis) entre microbiota y huésped puede suponer una injuria capaz de ascender de forma retrógrada por el nervio vago hasta alcanzar el cerebro. Esta es la razón por la que posteriormente se ha instaurado el concepto de eje microbiota-intestino-cerebro, a fin de describir la íntima relación entre estos tres elementos de una forma más completa (Caballero-Villarraso y cols., 2017).

En esta línea ha cobrado especial relevancia el estudio del impacto de la microbiota en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (EM), señalando la disbiosis microbiota huésped como un factor protagonista en la etiopatogenia de la enfermedad y/o la aparición de brotes. Asimismo, en modelos animales se han obtenido resultados que apoyan estos hechos. Estudios de nuestro grupo detectaron que tanto en el modelo murino como en pacientes afectados de EM, existe un incremento significativo en los niveles de lipopolisacáridos bacterianos (LPS; componentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas,

presentes en la microbiota intestinal) y en prote6nas transportadoras de lipopolisac6ridos (LBP); tal incremento es objetivable en cerebro, m6dula espinal y sangre (en ratas con EAE) y en sangre de pacientes con EM (Escribano y cols., 2017). Por otro lado, se ha encontrado que, en animales libres de g6rmenes, disminuye la producci6n de citocinas proinflamatorias y aumentan las c6lulas T reguladoras e incluso les hace altamente resistentes al desarrollo de la enfermedad (Lee y cols., 2011)

La microbiota intestinal contiene productos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios, por lo que puede llegar a alterar el equilibrio inmunitario y producir efectos en el desarrollo o progresi6n de enfermedades neurodegenerativas tales como la EM. Aunque el genoma microbiano es la base de las caracter6sticas de la microbiota (conoci6ndose este perfil gen6tico como 'microbioma'), 6sta puede ser modulada por ciertos condicionantes ambientales. Entre 6stos, los m6s influyentes son los h6bitos alimentarios, capaces de incidir en el metabolismo celular y regular la inflamaci6n. Por ello, los patrones diet6ticos pueden suponer un recurso para mantener el equilibrio microbiota-hu6sped (Lee y cols., 2011; Riccio, 2011).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. Hip6tesis de trabajo

Hip6tesis conceptual

El AOVE tiene efectos beneficiosos en el enfermo afecto de EM y, de forma an6loga, tambi6n en la EAE (modelo murino equivalente), debido al potencial antioxidante del AOVE.

Hip6tesis operativa

La administraci6n de una dieta rica en AOVE en animales con EAE supone un impacto positivo en t6rminos de atenuaci6n de las manifestaciones cl6nicas y enlentecimiento de su progresi6n, as6 como la reducci6n del estr6s oxidativo subyacente a la enfermedad tanto a nivel plasm6tico como en tejido nervioso y otros tejidos no nerviosos (mioc6rdico, renal, hep6tico e intestinal).

OBJETIVOS

3. Objetivos

Objetivo general

- Conocer el impacto de la administración oral AOVE, HT o AO, en la rata enferma de EAE.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar los efectos del AOVE, HT o AO a nivel clínico según una escala de movilidad validada.
- 2) Analizar los cambios bioquímicos producidos tras la ingesta de AOVE, HT o AO en ratas con EAE, a nivel de estrés oxidativo e inflamación en sangre y tejido nervioso.
- 3) Determinar las variaciones moleculares surgidas tras la administración oral de AOVE, HT o AO en animales afectos de EAE a nivel de órganos no nerviosos: corazón, riñón, hígado, intestino delgado e intestino grueso.
- 4) Identificar posibles relaciones de los aludidos parámetros bioquímicos entre sí, de éstos con la severidad clínica de la EAE y observar cómo influye la administración oral de AOVE, HT o AO sobre estas relaciones.

MATERIAL Y METODOS

4. Material y métodos

4.1 Diseño

Estudio experimental *in vivo*: longitudinal, prospectivo, con intervención. Se realizó un seguimiento de los diferentes grupos de animales durante 65 días.

4.2 Animales

Se utilizaron 5 grupos de 5 animales, suponiendo un total de 25 ratas macho *Dark Agouti* de 2 meses de edad, con un peso comprendido entre 190 y 220 g, procedentes del Servicio de Experimentación Animal (SAEX) de la Universidad de Córdoba. Los animales fueron alojados en el animalario de la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad de Córdoba en unas condiciones estándar de temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad (encendiéndose las luces a las 7:00 h) y con acceso libre a agua y alimento.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba, llevándose a cabo de acuerdo con la normativa de 24 de noviembre de 1986 (86/609/CE), aprobado por el Consejo de las Comunidades Europeas y el Real Decreto 53/2013 aprobado por el Ministerio de la Presidencia de España (BOE 8 de febrero de 2013).

4.3 Tratamiento y procedimiento experimental

Los animales (n=25) fueron asignados aleatoriamente a 5 grupos de estudio: 1) grupo control, que no fue sometido a ninguna inducción ni ningún tratamiento; 2) grupo EAE, constituido por ratas a las que se les indujo EAE y no fueron tratadas; 3) grupo EAE + AOVE, en el que a los animales se les indujo EAE y fueron tratados con una sustitución dietética con AOVE; 4) grupo EAE + HT, constituido por ratas con inducción de la enfermedad que recibieron una suplementación alimenticia con HT; y 5) grupo EAE + AO, formado por ratas sometidas a una sustitución de un porcentaje de la dieta mediante AO.

El modelo de EAE fue inducido inyectando subcutáneamente en la base dorsal de la cola 100 μ l de solución que contiene 150 μ g de glucoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) (Fragmento 35-55; Sigma-Aldrich®, Madrid, España) en una emulsión salina tamponada de fosfato 1:1 con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EEUU). Para completar este adyuvante se añadieron 400 μ g de 400 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, DIFCO®, Detroit, MI, EEUU) inactivado mediante calor.

El grupo control y el de EAE fueron alimentados con una dieta estándar (AIN93G). La ingesta de calorías se calculó en función del peso (energía bruta 3,8 Kcal/g de la dieta diaria estándar). Los 3 grupos restantes recibieron los diferentes tratamientos dietéticos mediante sonda gástrica durante 51 días.

El AOVE que se administró al grupo 3 fue “Los Montes de Luque”, producido en la Almazara S.C.A, Olivarera Nuestra Señora del Rosario®, D.O.P. Baena (Luque, Córdoba,

España). Este AOVE es una marca blanca del aceite Albenzaide, D.O.P (Almazara de Luque S.C.A). El HT fue facilitado por Seprox Biotech® S.L. (Madrid, España).

El grupo EAE + AOVE recibió el 10 % de la ingesta calórica total en AOVE; el grupo EAE + AO el 4% de la ingesta calórica total (calculadas ambas en función del peso). En el grupo EAE + HT, por el contrario, se llevó a cabo una suplementación alimenticia de 2,5 mg/Kg del peso corporal. Tal protocolo de sustitución *versus* suplementación fue realizado a tenor de los estudios de Tasset y cols. (2011) quienes encontraron que el AOVE y la HT reducen la peroxidación lipídica y bloquean el glutatiόν reducido (GSH) provocada por el ácido 3-nitropropiónico en el cerebro en ratas Wistar. Por otra parte, Fki y cols. administraron una dosis de 2,5 mg/kg de peso de hidroxitirosol que redujo significativamente los niveles en suero de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad, mientras que aumentaron los niveles en suero de lipoproteínas de alta densidad, logrando atenuar el proceso de peroxidación lipídica y aumentando la actividad enzimática antioxidante.

A los 65 días del inicio del estudio, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de Ketamina 75 mg/Kg (Imalgene® 100 mg/ml, Merial Laboratorios, Barcelona, España) y posteriormente sacrificados por decapitación. A continuación se obtuvo sangre del tronco vascular cervical que fue vertida en tubos con EDTA-3K⁺. Dichos tubos fueron centrifugados durante 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C, procediendo inmediatamente a la separación del plasma, el cual fue congelado y almacenado en alícuotas a -85°C.

Bajo control de temperatura, se extrajeron el cerebro, la médula espinal, el corazón, el hígado, los riñones, el intestino delgado y el intestino grueso. Éstos fueron pesados y se realizó inmediatamente un homogenado de cada uno de ellos con un homogeneizador mecánico (Tempest Virtis®). El homogenado fue suspendido en un tampón Tris (20 mM) de pH 7,4.

4.4 Variables analizadas

4.4.1 Evaluación clínica

Las ratas fueron evaluadas a los 14 días en los cinco grupos (post-inducción de EAE en los grupos 2, 3, 4 y 5) y a los 65 días (después de 51 días de administración de AOVE, HT y AO en los grupos 3, 4 y 5 respectivamente).

Dicha evaluación consistió en observar la afectación motriz, estableciéndose un grado de afectación en relación a la siguiente escala (o *score*) de movilidad: 0 (sin afectación motriz), 1 (parálisis de la cola), 2 (debilidad en las patas traseras), 3 (parálisis en las patas traseras), 4 (parálisis en las patas traseras y debilidad en las patas delanteras), 5 (cuadripléjico), 6 (fallecimiento antes de completar el periodo de estudio) (Pérez-Nievas y cols., 2010). Fueron registrados los resultados según esta escala de movilidad en ambos momentos de evaluación (días 14 y 65), así como la diferencia de puntuación entre ambos momentos, a fin de medir la progresión de la afectación motriz según los tratamientos empleados y su evolución cronológica.

4.4.2 Biomarcadores de daño oxidativo

Se midieron los biomarcadores de daño oxidativo en plasma, así como en los diferentes órganos y tejidos: productos de peroxidación lipídica (LPO, en nmol/mg), proteínas carboniladas (PC, en nmol/g, mediante el Método Levine), glutatión total (tG, en nmol/mg), glutatión reducido (GSH, en nmol/mg) glutatión oxidado (GSSG, en nmol/mg), glutatión peroxidasa (GPx, en nmol/mg, mediante el método de Flohé y Gunzler) y la ratio GSH/GSSG. Se analizaron mediante espectrofotometría con reactivos Bioxytech S.A. (Oxis Internacional®; Portland, OR, EEUU) y con un Espectrofotómetro Shimadzu (UV 1603; Kyoto, Japón), siendo los kits de reactivos LPO 586 (LPO), GSH 420 (tG), GSH 400 (GSH) y GSH 412 (GSSG). Para la determinación de la GPx (E.C.:1.11.1.12) se utilizó el método Flohé y Gunzler (1984).

4.4.3 Parámetros inflamatorios

Se midió el óxido nítrico (ON) indirectamente a través del nitrito total (nitrito + nitrato) mediante el Método Griess (Rocartt-Jane y cols., 2002). Los nitratos totales se redujeron a nitrito, y luego se determinó el nitrito total mediante un espectrofotómetro Shimadzu (UV-1603; Kioto, Japón) a una longitud de onda de 540 nm con. Las unidades de medida empleadas fueron $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas en cerebro y médula espinal y $\mu\text{mol/mg}$ en plasma (en función de la hemoglobina sanguínea).

Se determinó el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por ELISA (Invitrogen Corporation # KH00371 por NF-kB065 y Max Discovery # 2203 por TNF- α). Las unidades de medida fueron pg/mg de proteínas en cerebro y médula espinal y en pg/mg en plasma (en función de la hemoglobina sanguínea).

4.4.4 Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) se determinaron empleando un kit "Pierce" proporcionado por Thermo Científica (EEUU), consistente en un Lisado de Limulus Amoebocytes (LAL) para cuantificación de endotoxina cromógena. El LPS cataliza la activación de una proenzima en la LAL, la cual cataliza a su vez la separación de p-nitroanilina (pNA). El rango de activación es proporcional a la concentración de endotoxinas en la muestra. El pNA liberado se mide por espectrofotometría a 405-410 nm. Las unidades de medida son endotoxinas/mg de proteínas totales (en tejido) o endotoxinas/mg de hemoglobina (en sangre).

4.4.5 Proteínas de unión a los lipopolisacáridos

La determinación de las proteínas transportadoras de lipopolisacáridos (LBP) se realizó mediante un Kit de ELISA LBP (Enzo®, Enzo Life Sciences (ELS), NY, EEUU). Las unidades de medida fueron pg/mg de proteínas totales (en tejido) o pg/g de hemoglobina (en sangre).

4.4.6 Análisis estadístico

Se empleó el paquete estadístico SPSS (SPSS INC. Versión 15 para Windows). Los resultados para cada variable cuantitativa continua se expresaron como media aritmética \pm desviación estándar (SD). Primero, se realizó una bondad de ajuste (prueba de Shapiro-Wilk para $n < 40$) a fin de valorar si los valores seguían una distribución normal. A las variables que no seguían una distribución normal, se les realizó una transformación logarítmica.

Para comparar el grupo EAE con el grupo de control, se realizó la prueba t de Student para variables independientes. Para EAE y EAE + AOVE con el resto de los grupos (EAE + AOVE, EAE + HT, y EAE + AO), se realizó un test ANOVA *one-way*. Para determinar las diferencias específicas entre los distintos grupos, se realizó la prueba post hoc de Bonferroni. Se realizaron pruebas de correlación de Pearson entre diversas variables cuantitativas continuas. Se consideró un nivel de significación estadística del 95% (es decir, que los resultados eran estadísticamente significativos si $p < 0.05$).

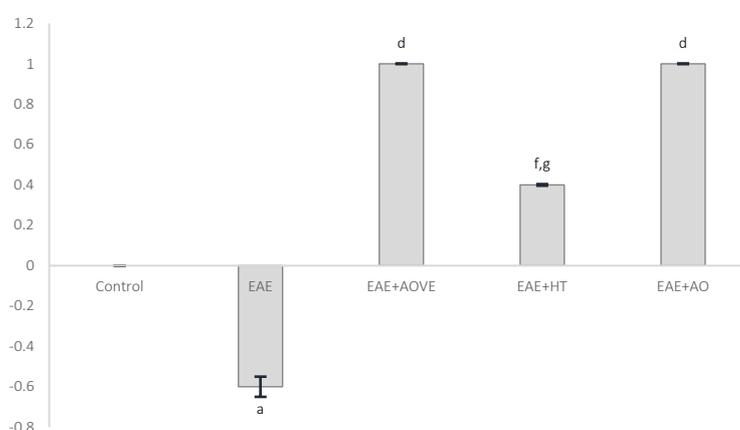
RESULTADOS

5. Resultados

Los resultados revelan que los grupos EAE tratados con AOVE, AO e HT, presentaron una mejoría en la puntuación de la escala de valoración clínica, mostrando a los 65 días un decremento de puntuación respecto a la obtenida el día 14 (Fig. 2). El efecto producido en el grupo tratado con AOVE fue significativamente mayor en relación al grupo EAE+HT.

Este descenso refleja una mejoría en el curso de la enfermedad en estos grupos, en contraposición a lo que ocurrió en los animales con EAE sin tratamiento, en los que se observó un empeoramiento clínico, que se tradujo en un aumento de puntuación.

Figura 2. Efectos de MOG, AOVE, HT y AO en la puntuación en la escala clínica a 14 días menos la puntuación a los 65 días.



La valoración se realizó de acuerdo a la siguiente escala de gravedad: 0: sin signos; 1: parálisis de la cola; 2: parálisis de la pata trasera; 3: parálisis parcial de la pata trasera; 4: parálisis de las patas traseras con debilidad en las delanteras; 5: cuadripléjico. Los valores negativos representan el aumento de la puntuación debido al empeoramiento de la enfermedad, mientras que los valores positivos representaron la disminución en la puntuación. Los datos representan la media \pm desviación estándar. ^ap <0,001 vs control, ^bp <0,001 vs EAE; ^cp <0,05 vs. EAE; ^dp <0,001 vs EAE + AOVE. Todo esto se llevó a cabo para los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. MOG= glucoproteína oligodendroclítica de mielina; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitirosol; AO = ácido oleico.

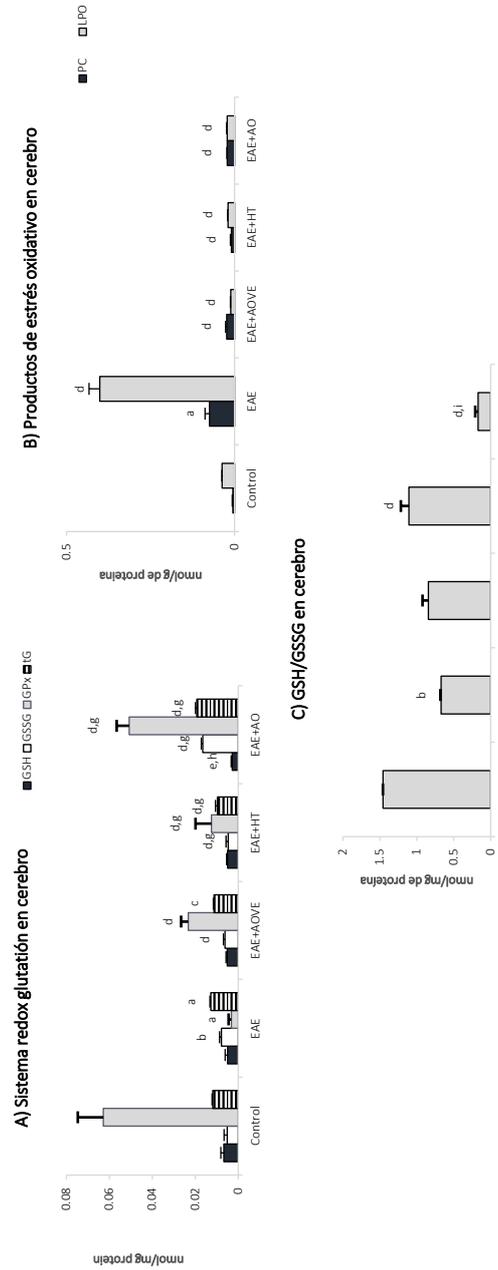
En cerebro (Fig. 3 A-C), el grupo EAE presentó un aumento significativo en GSSG (p <0.01), tG, LPO y PC (p <0.001) y una disminución en la ratio GSH/GSSG (P <0.01) y en GPx (p <0.001) con respecto al grupo control. El uso de AOVE desencadenó una caída significativa en GSSG, PC, LPO (p <0.001) y tG (p <0.01) y un aumento significativo en GPx (p <0.001) respecto al grupo EAE. El HT también produjo una disminución significativa en GSSG (p <0.001) y tG (p <0.001) con respecto a los grupos EAE y EAE + AOVE y un aumento significativo en GPx (p <0.001) en comparación con el grupo EAE, pero con un nivel más bajo respecto al grupo EAE + AOVE (p <0.001). También disminuyeron significativamente PC y LPO (p <0.001) y la ratio GSH/GSSG aumentó significativamente en el grupo HT en relación al grupo EAE. Se observó una disminución significativa en GSH (p <0.01) y un aumento en GSSG, tG y GPx (p <0.001) en el grupo HT frente al grupo EAE + AO. En el grupo HT también fueron más bajos los niveles de GSH (p <0.01), pero los de GSSG, tG y GPx (p <0.001) fueron más altos que los alcanzados en el grupo EAE + AOVE. La ratio GSH/GSSG se redujo significativamente en el grupo AO con

respecto a los grupos EAE ($p < 0.001$) y EAE + AOVE ($p < 0.05$). PC y LPO disminuyeron significativamente ($p < 0.001$) en el grupo EAE + AO en comparación con el grupo EAE.

LPS ($p < 0.001$) y LBP ($p < 0.01$) (Fig. 4 A y B) mostraron concentraciones más altas en el grupo EAE con respecto al control. El uso de AOVE, AO e HT en ratas con EAE produjo una reducción significativa en los niveles de LPS y LBP en relación al grupo EAE no tratado.

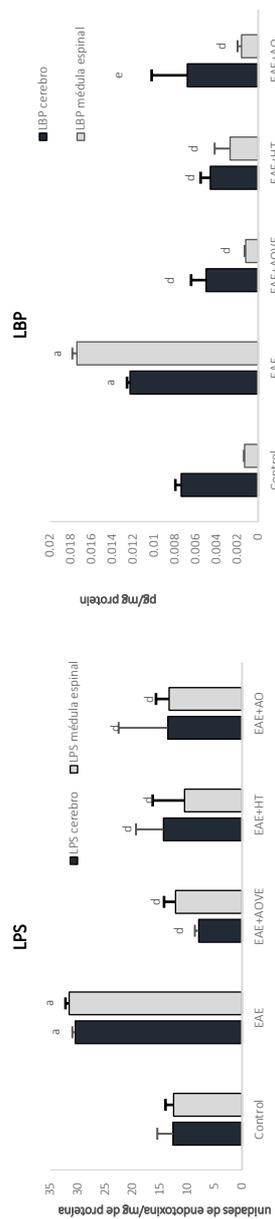
TNF- α y NF-kB aumentaron significativamente en EAE con respecto al grupo control ($p < 0.001$). La administración de estos tres tratamientos (AOVE, AO y HT) hizo disminuir notablemente los niveles de ambos parámetros en comparación con el grupo EAE (Tabla 1).

Figura 3. Efectos de MOG, AOVE, HT y AO en el sistema glutatión reducido (A), en productos de estrés oxidativo (B) y en GSH/GSSG en cerebro (C)



(A): Media \pm desviación estándar en cerebro para glutatión reducido (GSH; nmol/mg de proteína), glutatión oxidado (GSSG; nmol/mg de proteína), glutatión peroxidasa (GPx; nmol/mg de proteína) y glutatión total (tG; nmol/mg de proteína) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. ^ap <0.001 vs. control; ^bp <0.01 vs. EAE; ^cp <0.001 vs. EAE; ^dp <0.01 vs. EAE; ^ep <0.001 vs. EAE + AOVE; ^fp <0.001 vs. EAE + HT; ^gp <0.001 vs. EAE + AO. (B): media \pm desviación estándar en cerebro para productos de peroxidación lipídica (LPO; nmol/mg de proteína) y PC (nmol/g de proteína) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. ^ap <0.001 vs. control; ^bp <0.001 vs. EAE; ^cp <0.001 vs. EAE + HT; ^dp <0.001 vs. control; ^ep <0.001 vs. EAE + AOVE; ^fp <0.001 vs. EAE + HT; ^gp <0.001 vs. control; ^hp <0.001 vs. EAE; ⁱp <0.05 vs. EAE + AOVE. MOG= glucoproteína oligodendrocítica de mielina; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitoloso; AO = ácido oleico.

Figura 4. Efectos de MOG, AOVE, HT y AO en LPS (A) y en LBP (B).



(A) Media \pm desviación estándar en el cerebro y la médula espinal para los lipopolisacáridos bacterianos (LPS; unidades de endotoxina/mg de proteína) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. ^ap <0.001 vs. control; ^bp <0.001 vs. EAE; (B) Media \pm desviación estándar en el cerebro y la médula espinal para la proteína de lipopolisacárido bacteriano (LBP pg/mg de proteína) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + Aceite de Oliva Virgen Extra, EAE + HT y EAE + AO. ^ap <0.001 vs. control; ^bp <0.01 vs. control; ^cp <0.001 vs. control; ^dp <0.001 vs. control; ^ep <0.001 vs. control. EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitrosol; AO = ácido oleico

El óxido nítrico (ON) aumentó significativamente en el grupo EAE con respecto al control ($p < 0.001$). El empleo de AOVE y AO hizo disminuir significativamente los niveles de ON en relación a los de las ratas enfermas de EAE. El tratamiento con HT no causó ningún cambio con respecto a dicho grupo EAE (Tabla 1).

Tabla 1. Factores de inflamación

	Control	EAE	EAE+AOVE	EAE+HT	EAE+AO
Cerebro					
ON ($\mu\text{mol/mg}$ de prot.)	339,00 \pm 8,00	419.00 \pm 25.05 ^a	365.00 \pm 14.09 ^e	421.00 \pm 10.00 ^h	368.07 \pm 22.00 ^f
NFKB-p65 (pg/mg de prot.)	0.83 \pm 0.14	2.00 \pm 0.19 ^a	0.53 \pm 0.01 ^d	0.62 \pm 0.02 ^d	0.42 \pm 0.12 ^d
TNF- α (pg/mg de prot.)	3.00 \pm 0.10	5.00 \pm 0.03 ^a	4.00 \pm 0.04 ^f	4.00 \pm 0.04 ^f	2.00 \pm 0.10 ^{e,j}
Médula espinal					
ON ($\mu\text{mol/mg}$ de prot.)	357,00 \pm 14,00	413.02 \pm 20.00 ^c	364.00 \pm 24.00 ^d	391.00 \pm 23.05	363,00 \pm 32,00
NFKB-p65 (pg/mg de prot.)	0.335 \pm 0.029	2.438 \pm 0.09 ^a	0.6925 \pm 0.013 ^d	0.528 \pm 0.073 ^{d,e}	1.0125 \pm 0.09 ^{d,e}
TNF- α (pg/mg de prot.)	2.00 \pm 0.06	3.00 \pm 0.11 ^a	2.00 \pm 0.19 ^d	1.00 \pm 0.10 ^{d,i}	2.00 \pm 0.18 ^f
Sangre					
ON ($\mu\text{mol/mg}$ de Hb)	0.28 \pm 0.01	0.46 \pm 0.08 ^c	0.30 \pm 0.13 ^d	0.32 \pm 0.13 ^d	0.28 \pm 0.01
NFKB-p65 (pg/mg de Hb)	0.68 \pm 0.07	6.00 \pm 1.00 ^a	2.00 \pm 0.18 ^d	2.08 \pm 0.34 ^d	2.00 \pm 1.00 ^d
TNF- α (pg/mg de Hb)	2.00 \pm 0.05	4.00 \pm 1.09 ^b	2.07 \pm 0.18 ^e	4.07 \pm 0.61 ^h	3.00 \pm 0.31 ^{d,g}

^a $p < 0.001$ vs. control; ^b $p < 0.01$ vs. control; ^c $p < 0.05$ vs. control; ^d $p < 0.001$ vs. EAE; ^e $p < 0.01$ vs. EAE; ^f $p < 0.05$ vs. EAE; ^g $p < 0.001$ vs. EAE + AOVE; ^h $p < 0.01$ vs. EAE + AOVE; ⁱ $p < 0.05$ vs. EAE + AOVE. EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitirosol; AO = ácido oleico

Los niveles de LPS y LBP mostraron correlaciones positivas estadísticamente significativas con los de PC ($p < 0.001$), LPO ($p < 0.001$), así como con la puntuación de la valoración clínica obtenida el día 14 menos la del día 65 ($p < 0.01$). Además, se observaron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre los marcadores de inflamación (TNF- α , NFKB-p65 y ON) con los niveles de LPO ($p < 0.001$), de PC ($p < 0.001$), de LPS ($p < 0.001$), de LBP ($p < 0.001$) y con la puntuación obtenida en la escala clínica.

En médula espinal, las concentraciones de GSH, PC y LPO ($p < 0.001$) y tG ($p < 0.05$) estaban más elevados, mientras que GPx y la ratio GSH/GSSG ($p < 0.001$) estaban significativamente más bajos en el grupo EAE con respecto al control (Fig. 5 A–C). Los tres tratamientos (AOVE, HT y AO) produjeron una disminución en la ratio GSH/GSSG y en los niveles de LPO y PC ($p < 0.001$) en comparación con el grupo EAE. Dicha disminución fue mayor para los niveles de PC en el grupo del AO ($p < 0.01$), así como en la ratio GSH/GSSG para grupos HT y AO ($p < 0.001$), en comparación con el grupo EAE + AOVE. La GSH disminuyó en la médula espinal con los tres tratamientos (AOVE, HT y AO) con respecto al grupo EAE. La disminución más marcada fue con HT y con AO, mostrando diferencias significativas en comparación con el grupo EAE + AOVE.

En el grupo HT, los niveles de tG disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) con respecto a EAE. En las ratas tratadas con AO, los niveles de tG, GSSG y GPx se incrementaron de forma significativa ($p < 0.001$) en relación al grupo EAE. En el caso del grupo EAE + AOVE, las concentraciones de GSSG fueron significativamente más altas ($p < 0.001$) que en el grupo EAE.

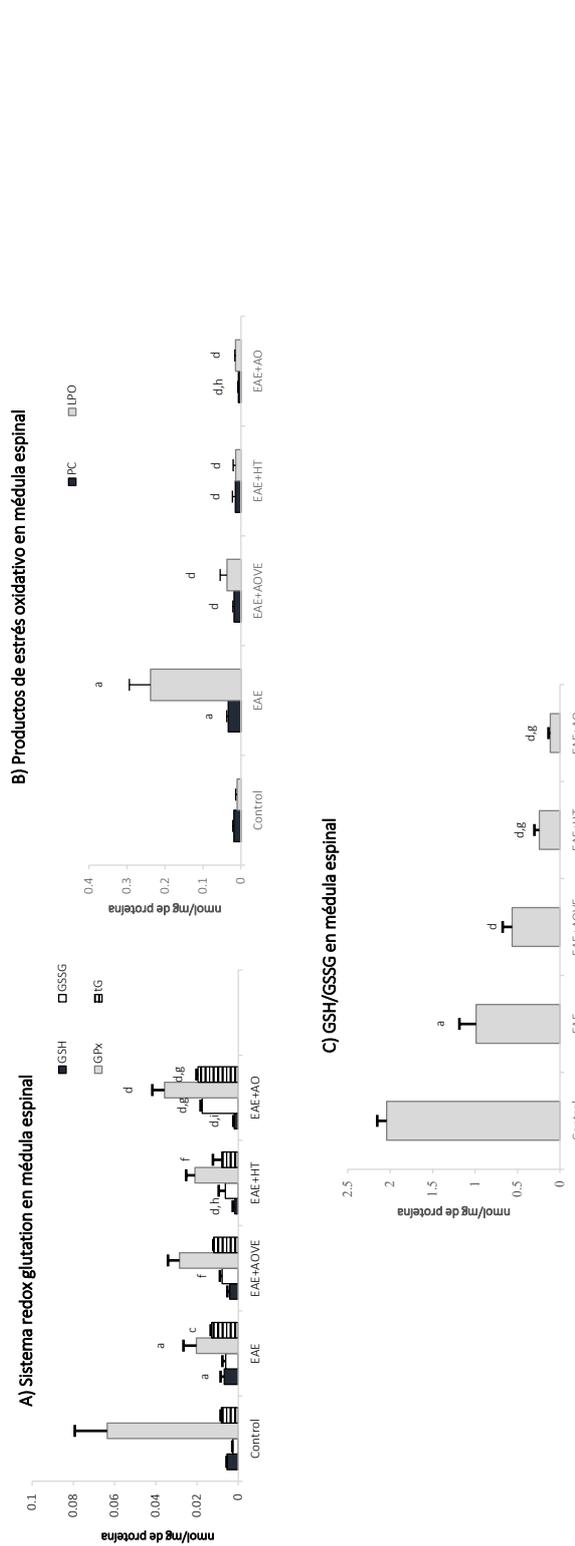
Los niveles de LPS y de LBP (Fig. 4 A y B) aumentaron significativamente ($p < 0.001$) en ratas con EAE respecto al grupo control, mientras que al usar cualquiera de los tres tratamientos

(AOVE, AO o HT) se reducían significativamente ambas variables con respecto al grupo EAE ($p < 0.001$).

TNF- α , NFkB-p65 y ON aumentaron significativamente en ratas con EAE. Con cualquiera de los tres tratamientos (AOVE, HT y AO) se reducían significativamente los parámetros de inflamación TNF- α y NFkB-p65; sin embargo, en el caso de ON solo el AOVE tuvo ese efecto (Tabla 1).

Mediante correlación de Pearson se observó una relación significativamente positiva entre PC ($p < 0.001$), LPO ($p < 0.001$) y la evolución de la puntuación clínica ($p < 0.01$) y los niveles de LPS y LBP. De forma similar, TNF- α , NFkB-p65 y NO se correlacionaron significativa y positivamente con PC, LPO, LPS, LBP y la evolución de la puntuación clínica.

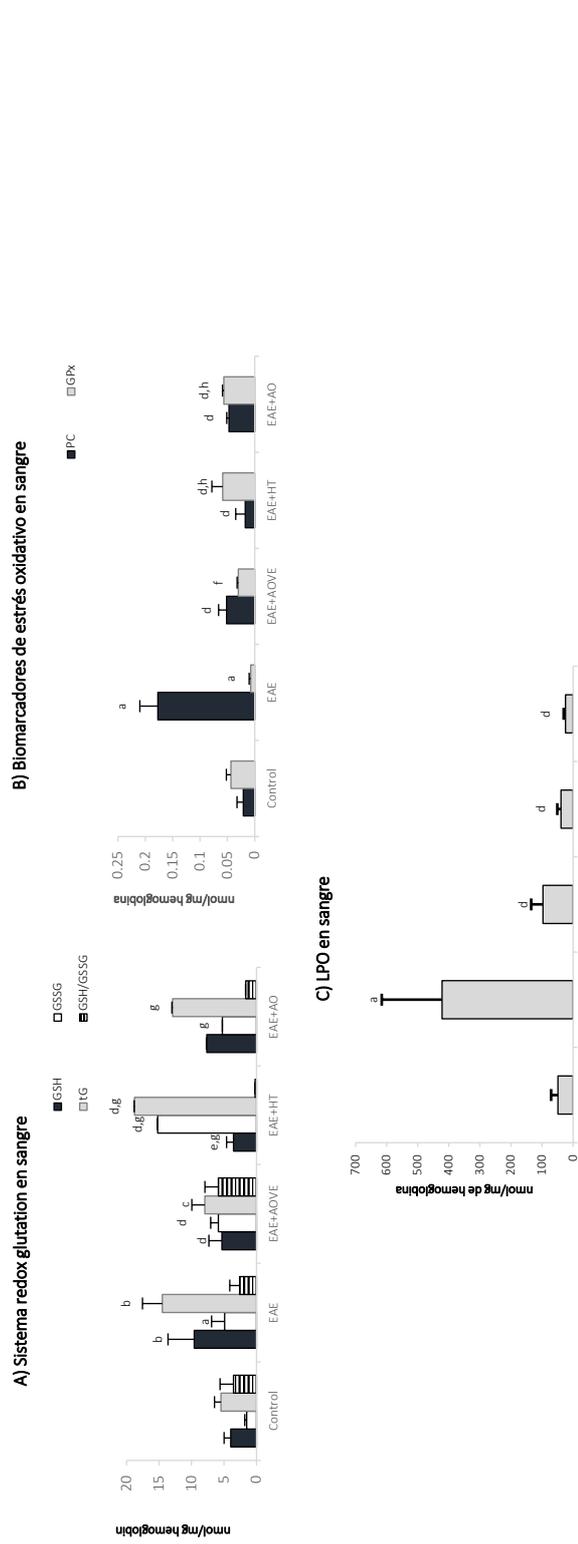
Figura 5. Efectos de MOG, AOVE, HT y AO sobre el sistema glutatión redox (A), en productos de estrés oxidativo en la médula espinal (B) y en GSH/GSSG en la médula espinal (C).



(A): Media \pm desviación estándar en la médula espinal para glutatión reducido (GSH; proteína nmol/mg), glutatión oxidado (GSSG; proteína nmol/mg), glutatión peroxidasa (GPx; proteína nmol/mg) y glutatión total (IG; proteína nmol/mg) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. *p < 0.05 vs. control; **p < 0.01 frente a EAE; ***p < 0.001 frente a EAE; ****p < 0.0001 frente a EAE. (B): Media \pm desviación estándar para productos de peroxidación lipídica (LPO; proteína nmol/mg) y PC (proteína nmol/mg) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. *p < 0.05 vs. control; **p < 0.01 frente a EAE; ***p < 0.001 vs. EAE + AOVE. (C): Media \pm desviación estándar para reducir el cociente de glutatión (GSH; proteína nmol/mg) / glutatión oxidado (GSSG nmol/mg de proteína) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. MOG = glucoproteína oligodendroclítica de mielina; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitiloso; AO = ácido oleico.

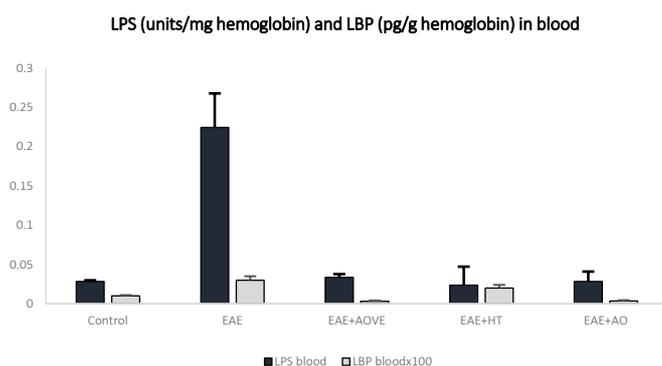
En sangre, los niveles de GSH ($p < 0.01$), GSSG ($p < 0.001$), tG ($p < 0.01$), PC ($p < 0.001$) y LPO ($p < 0.001$) aumentaron significativamente en el grupo EAE con respecto al grupo control control, mientras que GPx disminuy6 ($p < 0.001$) (Fig. 6 A-C). AOVE y HT causaron una disminuci6n significativa en GSH que fue m6s marcada con HT que mostr6 diferencias significativas con AOVE. Los niveles de GSSG y tG disminuyeron significativamente al tratar con AOVE o con AO, respecto al grupo EAE, mientras que dichos niveles aumentaron con HT. Tambi6n se observaron diferencias entre el grupo EAE + AOVE y el grupo EAE. PC y LPO disminuyeron significativamente en los tres grupos de tratamiento (AOVE, HT y AO) respecto al grupo EAE. GPx se increment6 significativamente en los tres grupos de tratamiento, en comparaci6n con el EAE y ese aumento fue a6n m6s marcado con los tratamientos HT y AO, que mostraron diferencias significativas respecto al grupo EAE + AOVE ($p < 0.01$).

Figura 6. Efectos de MOG, AOVE, HT y AO en el sistema de glutatión redox (A), sobre el biomarcadores de estrés oxidativo (B) y en LPO en sangre (C).



(A): Media \pm desviación estándar en sangre para glutatión reducido (GSH; nmol/mg de hemoglobina), glutatión oxidado (GSSG; nmol/mg de hemoglobina), glutatión total (tG; nmol/mg de hemoglobina) y cociente de glutatión reducido (GSH; nmol / mg de proteína) / glutatión oxidado (GSSG nmol/mg de hemoglobina) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. *p <0.01 vs. control; †p <0.001 vs. EAE; ‡p <0.001 vs. EAE + AOVE. (B) Media \pm desviación estándar en sangre de glutatión peroxidasa (GPx; nmol/mg de hemoglobina) y PC (nmol/mg de hemoglobina) en los diferentes grupos de tratamiento: control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. †p <0.001 vs. control; ‡p <0.001 frente a EAE; †p <0.05 vs. EAE; ‡p <0.01 vs. EAE + AOVE. (C): Media \pm desviación estándar en sangre para productos de peroxidación lipídica (LPO; nmol/mg de hemoglobina) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. †p <0.001 vs. control; ‡p <0.001 vs. EAE. MOG= glucoproteína oligodendrocítica de mielina; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitiroso; AO = ácido oleico.

Figura 7. Efectos de MOG, AOVE, HT y AO en LPS y LBP.



Media \pm desviación estándar en sangre para los lipopolisacáridos bacterianos (LPS; unidades de endotoxina/mg de hemoglobina) y la proteína de transporte de lipopolisacáridos bacterianos (LBP \times 100 pg/g de hemoglobina) en los diferentes grupos de tratamiento: Control, EAE, EAE + Aceite de oliva virgen extra (EAE + AOVE), EAE + HT y EAE + AO. ^ap <0.001 vs. control; ^bp <0.001 frente a EAE; ^cp <0.001 vs. EAE + AOVE. MOG= glucoproteína oligodendroclítica de mielina; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitirosol; AO = ácido oleico.

Las ratas con EAE tenían significativamente más elevados los niveles de LPS ($p < 0.001$) y LBP (Fig. 7), mientras que con el uso de cualquiera de los tres tratamientos (AOVE, AO y HT) se redujeron significativamente ambas variables con respecto al grupo de EAE. El HT disminuyó los valores de LPS y aumentó la LBP en comparación con el grupo EAE + AOVE.

TFN- α , NFkB-p65 y ON estaban significativamente aumentados en ratas con EAE. Si bien el uso de AOVE, HT y AO redujeron significativamente NFkB-p65 y ON en comparación con el grupo EAE, los niveles de TFN- α solo disminuyeron significativamente con respecto al grupo EAE con el uso de AOVE y AO (Tabla 2).

Se observaron correlaciones positivas significativas para LPS y LBP con PC ($p < 0.001$), con LPO ($p < 0.001$) y con la evolución de la puntuación clínica (del día 14 al 65 de tratamiento) ($p < 0.01$). También se establecieron correlaciones significativas positivas entre los factores de inflamación (TFN- α , NFkB-p65 y ON) con LPO, PC, LPS, LBP y con la evolución de la puntuación clínica.

En corazón, en EAE mostraron un incremento en tG and GPx ($p < 0.001$), PC ($p < 0.001$) y LPO ($p < 0.001$) (Tabla 2). En los grupos de tratamiento con AOVE y HT, tG y GPx se observó una disminución significativa ($p < 0.001$) con respecto a EAE. El AO provocó un incremento significativo en tG ($p < 0.001$) y una reducción en GPx ($p < 0.001$) con respecto a EAE. tG y GPx se mostraron significativamente más bajos en los grupos de HT and AO ($p < 0.001$) respecto al grupo tratado con AOVE (Tabla 2). La ratio GSH/GSSG se incrementó con AOVE con respecto a EAE ($p < 0.001$), mientras los valores de la ratio GSH/GSSG en el grupo HT se mostraron significativamente disminuidos con respecto al grupo AOVE ($p < 0.001$) y no difirieron significativamente de los obtenidos en el grupo EAE ($p < 0.001$) (Tabla 2).

En riñón, en EAE disminuyó ($p < 0.001$) la GSH and GSSG con respecto al grupo control, mientras que los niveles de PC ($p < 0.001$) y LPO ($p < 0.001$) aumentaron significativamente (Tabla 3). Sólo el AO incrementó significativamente el nivel de GSSG ($p < 0.001$) con respecto a EAE, mientras que AOVE y HT reducen significativamente ($p < 0.001$) sus valores. En cuanto a GSH, en los grupos AOVE y AO estaban aumentados significativamente ($p < 0.001$) sus valores

con respecto a los grupos EAE, mientras el tratamiento con HT ($p < 0.001$) los disminuye. En general, las concentraciones de GSH y GSSG en los grupos tratados con HT o con AO son significativamente más bajas ($p < 0.001$) a los observados con AOVE (Tabla 2). En el grupo de AOVE, la ratio GSH/GSSG se vio incrementada con respecto al grupo EAE ($p < 0.001$), mientras que los valores de dicha ratio en los grupos tratados con HT ó AO disminuyeron significativamente con respecto al grupo con AOVE ($p < 0.001$) y no se obtuvieron diferencias significativas respecto al grupo EAE ($p < 0.001$) (Tabla 2).

En hígado, en el grupo EAE, los niveles de PC ($p < 0.001$) y LPO ($p < 0.001$) se incrementaron significativamente (Tabla 4). La ratio GSH/GSSG se incrementó en el grupo tratado con AOVE respecto al grupo EAE ($p < 0.001$), mientras que con HT y AO, dicha ratio disminuyó significativamente en comparación con el grupo tratado con AOVE ($p < 0.001$) sin diferir significativamente de los niveles del grupo EAE ($p < 0.001$) (Tabla 2).

En intestino delgado, en el grupo EAE descendió significativamente ($p < 0.001$) los niveles de tG, GSH y GSSG (Fig. 8). También disminuyó la ratio GSH/GSSG (Fig 9), mientras que las concentraciones de LPO y PC se incrementaron de forma significativa en el grupo EAE (Fig. 10 A). En el grupo EAE + AOVE se observó un incremento significativo de tG ($p < 0.001$) con respecto a EAE, mientras que con el AO aumentó significativamente no solo tG ($p < 0.001$), sino también GSH ($p < 0.001$) y GSSG ($p < 0.001$) con respecto a EAE. Por el contrario, el HT disminuyó significativamente tG ($p < 0.001$), GSH ($p < 0.05$) y GSSG ($p < 0.001$) con respecto a los valores del grupo EAE (Fig. 8). La ratio GSH/GSSG se incrementó de manera significativa con HT y AO con respecto a EAE (Fig. 9). Los valores medios obtenidos para tG, GSH, GSSG y la ratio GSH/GSSG en lo grupo tratados con HT y con AO se mostrarán significativamente diferentes a los obtenidos con AOVE (Fig. 8A y 9).

En intestino grueso, en el grupo EAE se produjo un aumento significativo de tG, GSH y GSSG ($p < 0.001$) junto a una disminución significativa de la GPx ($p < 0.001$) (Fig. 8 B). En GSH/GSSG se observó un descenso (Fig. 9) junto a un incremento de LPO y PC, ambos significativos (Fig. 10 B). El tratamiento con AOVE, HT y AO (Fig. 8 B), produjo una reducción ($p < 0.001$) significativa de los valores de tG, GSH and GSSG con respecto al grupo EAE. Solo el grupo AO presentó aumentos significativos en la GPx ($p < 0.001$) y GSH/GSSG (Fig. 8) con respecto a EAE. Los valores medios de GSH ($p < 0.0019$), GSSG ($p < 0.001$) y GSH/GSSG ($p < 0.001$) en los grupo tratados con HT y con AO se mostraron significativamente distintos a los observados en el grupo tratado con AOVE, así como los niveles de tG ($p < 0.001$) en el grupo tratado con HT en comparación con el grupo tratado con AOVE (Fig. 8 B y 9).

Las concentraciones de LPO ($p < 0.001$) y PC ($p < 0.001$) son significativamente más bajas en los grupos tratados con AOVE, con HT y con AO en todos los órganos no nerviosos.

Tabla 2. Sistema redox glutatión en corazón, riñón e hígado.

	Control	EAE	EAE+AOVE	EAE+HT	EAE+AO
CORAZÓN					
tG	0.01086±0.00019	0.01180±0.00074 ^a	0.01088±0.00057 ^d	0.00377±0.00025 ^{d,e}	0.02201±0.00131 ^{d,e}
GSH	0.00580±0.00031	0.00597±0.00035	0.00804±0.00112 ^d	0.00166±0.00005 ^{d,e}	0.00609±0.00215 ^e
GSSG	0.00506±0.00031	0.00583±0.00105	0.00283±0.00075 ^d	0.00211±0.00029 ^d	0.01592±0.00121 ^{d,e}
GSH/GSSG	1.152±0.308	1.062±0.235	3.069±1.000 ^d	0.802±0.386 ^e	0.391±0.552 ^{d,e}
GPx	0.01326±0.02017	0.11050±0.02344 ^a	0.03539±0.02955 ^d	0.00616±0.00126 ^{d,e}	0.01283±0.00190 ^{d,e}
RIÑÓN					
tG	0.01827±0.00015	0.01170±0.00047	0.01135±0.00061	0.00305±0.00059	0.01970±0.00161
GSH	0.00618±0.00089	0.00473±0.00128 ^a	0.00866±0.00057 ^d	0.00106±0.00032 ^{d,e}	0.00749±0.00073 ^{d,e}
GSSG	0.01209±0.00095	0.00698±0.00152 ^a	0.00270±0.00097 ^d	0.00199±0.00033 ^d	0.01221±0.00136 ^{d,e}
GSH/GSSG	0.518±0.240	0.737±0.137	3.000±1.000 ^d	0.533±0.230 ^e	0.619±0.087 ^e
GPx	0.04728±0.00149	0.04170±0.01636	0.05123±0.02927	0.05620±0.02231	0.05642±0.02262
HÍGADO					
tG	0.01078±0.00025	0.03050±0.04167	0.01121±0.00031	0.00473±0.00048 ^d	0.02200±0.00049
GSH	0.00773±0.00128	0.00470±0.00039	0.03236±0.04630	0.00154±0.00019 ^{d,e}	0.00782±0.00034 ^e
GSSG	0.00305±0.00123	0.02580±0.04174	0.02116±0.04628	0.00319±0.00052	0.01418±0.00066
GSH/GSSG	3.000±2.000	0.868±0.343	5.000±7.081 ^d	0.494±0.240 ^e	0.553±0.047 ^e
GPx	0.09980±0.00756	0.03595±0.02465	0.08238±0.01286	0.19775±0.05116	0.26600±0.07108

Glutatión total (tG; nmol/mg de proteína), glutatión reducido (GSH; nmol/mg de proteína) y glutatión oxidado (GSSG; nmol/mg de proteína); glutatión peroxidasa (GPx; nmol/mg de proteína) y ratio GSH/GSSG, en los siguientes grupos de estudio: Control, EAE (inducido por MOG), EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. ^ap <0.001 EAE vs. control; ^bp <0.001 frente a EAE; ^cp <0.001 vs. EAE + AOVE. MOG= glucoproteína oligodendroclítica de mielina; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitirosol; AO = ácido oleico.

Los niveles de LPS y LBP se correlacionaron positivamente con los de LPO y PC tanto en intestino delgado como en grueso (Tabla 4). Además, LPS y LBP se incrementaron significativamente en el grupo EAE (Fig. 11 A y B).

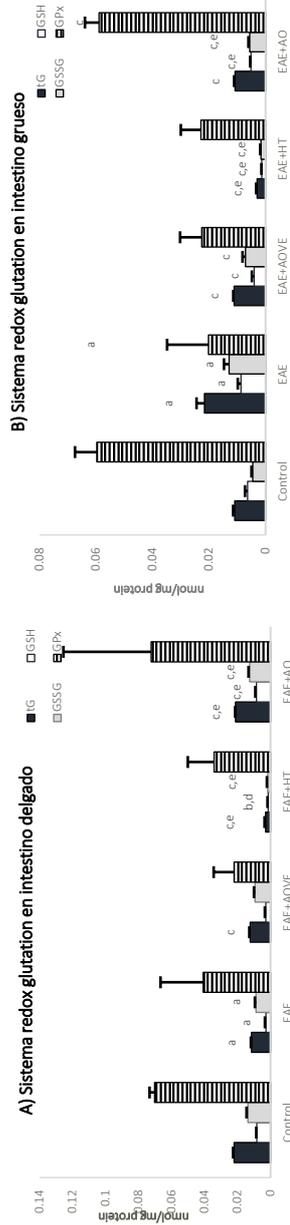
En los grupos en tratamiento con AOVE, HT y AO, los niveles de LPS (p <0.001) y LBP (p <0.001) mostraron disminuciones significativas con respecto al grupo EAE. Los valores medios obtenidos con HT para LBP fueron menores a los observados con AOVE en intestino delgado (p <0.001) e intestino grueso (p <0.05) (Fig. 11 A y B).

Tabla 3. Productos de peroxidación lipídica (LPO; nmol/mg de proteína) y proteínas carboniladas (PC; nmol/g de proteína) en el grupo control, EAE (inducido por MOG), EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO.

	Control	EAE	EAE+AOVE	EAE+HT	EAE+AO
Corazón					
LPO	0.11158±0.02087	0.41875±0.00000 ^a	0.09625±0.02918 ^d	0.00769±0.00065 ^d	0.02064±0.00496 ^{d,e}
PC	0.03420±0.00388	0.41875±0.02344 ^a	0.02249±0.00986 ^d	0.00616±0.00126 ^{d,e}	0.01283±0.00190 ^d
Riñón					
LPO	0.19280±0.03422	0.45750±0.01063 ^a	0.08875±0.01001 ^d	0.00683±0.00111 ^{d,e}	0.01867±0.00159 ^{d,e}
PC	0.00743±0.00112	0.08493±0.02702 ^a	0.02920±0.01707 ^d	0.00326±0.00039 ^d	0.01989±0.00181 ^d
Hígado					
LPO	0.11140±0.02013	0.40250±0.07214 ^a	0.10663±0.00616 ^f	0.00826±0.00189 ^{d,e}	0.02768±0.00533 ^{d,e}
PC	0.01076±0.00220	0.09568±0.02642 ^a	0.03815±0.01375 ^d	0.00660±0.00083 ^{d,h}	0.03332±0.00207 ^d

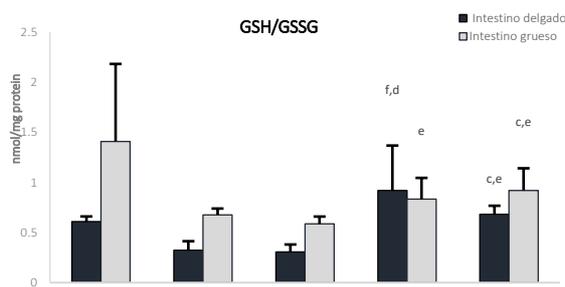
^ap <0.001 EAE vs. control; ^dp <0.001 vs. EAE; ^ep <0.05 vs. EAE; ^fp <0.001 vs. EAE + AOVE; ^hp <0,01 vs. EAE + AOVE. MOG= glucoproteína oligodendroclítica de mielina; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitirosol; AO = ácido oleico.

Figura 8. Efectos de MOG, AOVE, HT y AO en el sistema redox glutatión en intestino delgado (A), sistema redox glutatión en intestino grueso (B).



(A) media \pm desviación estándar en glutatión total (nmol/mg de proteína), glutatión reducido (GSSH; nmol/mg de proteína), glutatión oxidado (GSSG; nmol/mg de proteína), glutatión total (IG; nmol/mg de proteína), glutatión reducido (GSSH; nmol/mg de proteína), glutatión oxidado (GSSG; proteína) y glutatión peroxidasa (GPx; nmol/mg de proteína) en los siguientes grupos de estudio: control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO; *p < 0.05 vs. EAE; #p < 0.001 vs. EAE; %p < 0.01 vs. EAE; &#p < 0.001 vs. EAE + AOVE; (B) media \pm desviación estándar en glutatión total (nmol/mg de proteína), glutatión reducido (GSSH; nmol/mg de proteína), glutatión oxidado (GSSG; nmol/mg de proteína), glutatión total (IG; nmol/mg de proteína), glutatión reducido (GSSH; nmol/mg de proteína), glutatión oxidado (GSSG; proteína) y glutatión peroxidasa (GPx; nmol/mg de proteína) en los siguientes grupos de estudio: control, EAE, EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. *p < 0.001 vs. control; #p < 0.05 vs. EAE; %p < 0.01 vs. EAE; &#p < 0.001 vs. EAE + AOVE; MOG= glucoproteína oligodendroclítica de mielina; EAE = encefalomielitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitirosol; AO = ácido oleico.

Figura 9. Relación GSH/GSSG en el intestino delgado y grueso



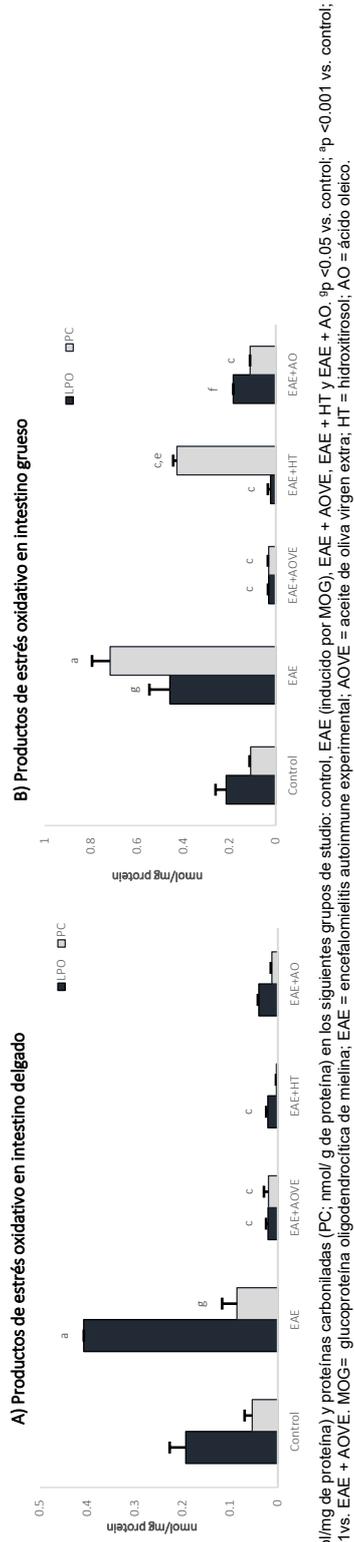
Relación glutatión reducido/glutatión oxidado en los siguientes grupos de estudio: control, EAE (inducido por MOG), EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. *p <0.01 vs. EAE; †p <0.001 vs. EAE; ‡p <0.01 vs. EAE + AOVE; §p <0.001 vs. EAE + AOVE. MOG= glucoproteína oligodendroclítica de mielina; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitirosol; AO = ácido oleico.

Tabla 4. Correlación de Pearson

	LPO	PC
Intestino delgado		
LPS	0.636 (0.001)	0.542 (0.008)
LBP	0.816 (0.000)	0.777 (0.000)
Intestino grueso		
LPS	0.759 (0.000)	0.581 (0.004)
LBP	0.703 (0.000)	0.747 (0.000)

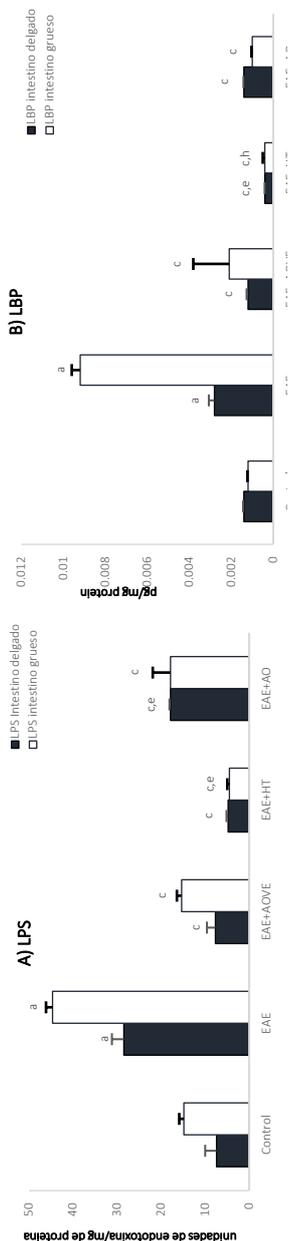
La correlación de Pearson entre el lipopolisacárido (LPS) de la pared externa de bacterias gram negativas y la proteína transportadora de lipopolisacárido (LBP) con los productos de peroxidación lipídica (LPO) y las proteínas carboniladas (PC) en el intestino delgado y grueso. valor r y (valor p).

Figura 10. Productos de estrés oxidativo en intestino delgado e intestino grueso



Productos de peroxidación lipídica (LPO; nmol/mg de proteína) y proteínas carboniladas (PC; nmol/g de proteína) en los siguientes grupos de estudio: control, EAE (inducido por MOG), EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. *p < 0.05 vs. control; †p < 0.001 vs. control; ‡p < 0.001 vs. control; §p < 0.01 vs. EAE; †p < 0.001 vs. EAE; ††p < 0.05 vs. control; ‡‡p < 0.001 vs. control; §§p < 0.01 vs. EAE; ¶¶p < 0.001 vs. EAE.

Figura 11. Lipopolisacáridos (A) y proteínas de unión a los lipopolisacáridos (B) en intestino delgado e intestino grueso



Lipopolisacáridos (A) y proteínas de unión a los lipopolisacáridos (B) en intestino delgado e intestino grueso en los siguientes grupos: control, EAE (inducido por MOG), EAE + AOVE, EAE + HT y EAE + AO. *p <0,001 vs. Control; †p <0,05 vs. EAE + AOVE; †p <0,001 vs. EAE + AOVE. MOG= glucoproteína oligodendroclítica de mielina; EAE = encefalomiелitis autoinmune experimental; AOVE = aceite de oliva virgen extra; HT = hidroxitrosol; AO = ácido oleico.

DISCUSIÓN

6. Discusión

A la luz de los resultados del presente estudio, se denota el impacto beneficioso de la administración AOVE con altos niveles de MUFA y componentes fenólicos en la EAE. Los beneficios de este producto se observan en el SNC y en otros órganos tales como corazón, riñón, hígado, intestino delgado e intestino grueso.

El potencial efecto del AOVE con altos niveles de MUFA y componentes fenólicos, está descrito en la literatura científica, en la que numerosos estudios demuestran que este producto juega un papel relevante en la prevención y mejoría de diferentes enfermedades. Este efecto potencialmente beneficioso del AOVE está mediado por diferentes mecanismos, entre los que se consideran esenciales: **1)** Capacidad antioxidante, especialmente la de sus componentes fenólicos; **2)** Estimulación del factor Nrf2 con la posterior estimulación de proteínas antioxidantes citoprotectoras; y **3)** Influencia en la biogénesis induciendo una mayor actividad mitocondrial (aumento de la expresión del factor de transcripción mitocondrial A, la proteína desacoplante 2 y los complejos mitocondriales) con la subsiguiente producción de ATP.

Respecto a los efectos beneficiosos del AOVE, el HT es uno de los alcoholes fenólicos más abundantes y representativos en este aceite de oliva (Granados-Principal y cols., 2010; Kitsati y cols., 2016). Kitsati y cols. (2016) en un estudio han sugerido que los efectos protectores ejercidos por el HT antagonizando el daño celular inducido por el estrés oxidativo, están relacionados con la capacidad de éste para inducir cambios en la homeostasis intracelular del hierro lábil. En dicho estudio se observó una fuerte correlación entre la capacidad de HT para descender el nivel de hierro lábil intracelular y ejercer una protección contra el daño del ADN inducido por el H₂O₂ y la apoptosis. Se ha sugerido que el HT puede actuar como un eliminador de radicales libres reactivos y así proteger las células sometidas a estrés oxidativo (Kitsati y cols., 2016; Hashimoto y cols., 2004; Goya y cols., 2007; Rietjens y cols., 2007; Schaffer y cols., 2010). Además, el HT puede inducir la expresión de enzimas antioxidantes a través de la translocación de Nrf2 (Kitsati y cols., 2016; Martín, M. A. y cols., 2010) y reduce la expresión de las moléculas de adhesión celular (Kitsati y cols., 2016).

Por otro lado, los MUFA, como el AO se han relacionado con una mayor longevidad y un alto grado de protección contra el deterioro cognitivo asociado a la edad en humanos (Quiles y cols., 2006). Hallazgos recientes, han demostrado que el alto consumo de MUFA y ácidos grasos poliinsaturados n-6 (PUFA), puede proteger contra la enfermedad de Alzheimer, mientras que la ingesta de grasas saturadas o trans-insaturadas podría aumentar el riesgo de dicha enfermedad (Morris y cols., 2003). Además, en el denominado “estudio de Rotterdam”, después de un tiempo promedio de seguimiento de 6 años, los niveles de MUFA y PUFA fueron significativamente relacionados con un menor riesgo de enfermedad de Parkinson (De Lau y cols., 2005). Quiles y cols. (2006) han aportado numerosas evidencias sobre la efectividad dietética del AOVE para fortalecer las membranas mediante el aumento de su resistencia a la modificación inducida por los radicales libres. Por este motivo, el AOVE se convierte en un componente clave en las

intervenciones dietéticas destinadas a modificar parcialmente la estructura y, en consecuencia, las características de las membranas biológicas, actuando como antagonistas de los radicales libres y del daño inducido por el estrés oxidativo.

La administración dietética de AOVE rico en polifenoles, contrarresta a largo plazo las disfunciones relacionadas con la edad en la coordinación motora y aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en algunas regiones como la corteza cerebral y el cerebelo (Pitozzi y cols., 2012 ; Angeloni y cols., 2017). Asimismo, como se ha comentado anteriormente, el efecto del AOVE en la prevención y mejoría de diferentes enfermedades como diabetes tipo 1 (Cano-Europa y cols., 2016), enfermedades cardiovasculares (Quiles y cols., 2006), diversos tipos de cáncer (Quiles y cols., 2006, Stoneham y cols., 2000), enfermedad de Huntington (Tasset y cols., 2011, Ferreira y cols., 2015) y Alzheimer (Fernández-Fernández y cols., 2011), está ampliamente descrito en la literatura científica.

En relación a la EM, algunos estudios epidemiológicos atribuyen a la dieta mediterránea propiedades neuroprotectoras y otros beneficios (Berer y cols., 2012). Aun así, hasta ahora las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del aceite de oliva junto con varios de sus componentes, no habían sido evaluadas en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Escribano y cols., 2017; Melamud y cols., 2011; Miller y cols., 2012; Tasset y cols., 2012; Bahamonde y cols., 2014).

Las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno, tienen un papel destacado en la etiopatogenia de la EM. En este sentido, la desregulación de la homeostasis del glutatión y las alteraciones en las actividades enzimáticas dependientes del glutatión, están implicadas en la inducción y progresión de la EM (Escribano y cols., 2017).

El glutatión reducido (GSH) es uno de los agentes más importantes del sistema de defensa antioxidante endógeno (Tasset y cols., 2011) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Tasset y cols., 2010) es una enzima que utiliza el GSH para reducir los hidroperóxidos productores de agua y GSSG (una forma oxidada de glutatión). Sin embargo, los lipoperóxidos (LPO) y las proteínas carboniladas (PC) son productos resultantes del estrés oxidativo, suponiendo un estrés lipídico y estrés proteico, respectivamente, en el tejido donde se localicen (Escribano y cols., 2017, Tasset y cols., 2011).

En nuestro estudio, con el uso de los 3 tratamientos (AOVE, HT y AO), se observaron significativamente disminuidos LPO y PC, así como la GPx incrementada, tanto en sangre como en tejido nervioso (cerebro y médula espinal), lo que demuestra el poder antioxidante del aceite de oliva virgen extra y sus principales ingredientes.

El poder antiinflamatorio del AOVE se demuestra por una reducción en los niveles de los factores proinflamatorios (TNF- α , NFkB-p65 y NO) en cerebro, médula espinal y sangre, con respecto al grupo EAE.

En el presente trabajo, se observa que existe una correlación positiva entre la presencia de ciertos productos de la microbiota intestinal (lipopolisacáridos bacterianos -LPS- y las

proteínas de transporte de los lipopolisacáridos -LBP-) y el estrés oxidativo (en términos de elevación de LPO y PC) en el modelo EAE. Este hecho, reforzaría la hipótesis establecida por Escribano y cols. (2017), de que los cambios en la biota bacteriana intestinal, podrían desencadenar la aparición de inflamación subaguda debido a la migración hacia el SNC y otros tejidos orgánicos, de algunos productos de dicha microbiota (LPS y LBP) como consecuencia de un aumento en la permeabilidad intestinal. Este proceso implicaría la presencia de daño oxidativo sistémico, que produciría la activación periférica del sistema inmune. Los LPS regulan positivamente la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión a las células vasculares-1 (VCAM-1), por lo que los cambios en la expresión de estas moléculas promueven la inflamación vascular cerebral, la alteración de la barrera hematoencefálica y el edema vascular cerebral (Riccio, 2011; Lee y cols., 2011). Todo esto facilitaría la migración de leucocitos al SNC y la aparición del fenómeno neuroinflamatorio. Esto último podría revertirse mediante el uso de AOVE, AO e HT ya que, en nuestro estudio, el consumo de esos productos redujo los niveles de LPS y LBP y, al mismo tiempo, el estrés oxidativo y los factores inflamatorios (TFN- α , NFkB-p65 y NO) y todos estos parámetros se correlacionaron entre sí.

En una reciente publicación, nuestro grupo demostró que los niveles de LPS and LBP en cerebro, médula espinal y sangre de ratas con EAE, estaban elevados junto a otros parámetros representativos de estrés oxidativo. Los tratamientos con natalizumab, N-acetil cisteína y dimetil fumarato disminuyeron los niveles de LPS y LBP, así como el daño oxidativo presente en la EAE y la EM (Escribano y cols., 2017). La introducción en la dieta de AOVE, HT y AO también han logrado consecuencias similares en cerebro, médula espinal y sangre. En el citado estudio, los LPS and LBP mostraron correlación positiva con todos los parámetros indicadores de estrés oxidativo. Se observó que al menos parte de los efectos oxidativos apreciados en tejido nervioso y en sangre estuvieron asociados a los cambios acontecidos en LPS y LBP, lo que podría ser reflejo de ciertas modificaciones en la microbiota intestinal. Estos hechos estarían refrendados por datos previos de nuestro grupo investigador así como por otros estudios hallados en la literatura, que señalan la relación existente entre la microbiota intestinal y el SNC, en el marco conceptual del conocido como eje intestino-microbiota-cerebro.

Una posible explicación de estos hechos en el eje intestino-microbiota-cerebro los encontramos en un trabajo de Buscarinu y cols. (2017), en el que se pone de manifiesto que una alteración en la permeabilidad intestinal es relativamente frecuente EMRR, lo que a su vez podría estar condicionado a influencias genéticas que determinen dichos cambios de permeabilidad intestinal (como se ha observado en investigaciones desarrolladas en gemelos); estos cambios incluyen un déficit del mecanismo activo de absorción en la luz intestinal. Los hallazgos sugieren que la relación entre la composición de la microbiota intestinal y el huésped, pueden diferir entre niños con y sin EM (Tremlett y Waubant, 2018), lo que sostiene la teoría del aumento de permeabilidad intestinal en la génesis de esta enfermedad. Estos resultados corroboran que el intestino podría ostentar un papel determinante en el desarrollo de EM.

Nuestro estudio revela el poder neuroprotector del AOVE, HT y AO en cerebro, m6dula espinal y sangre, por su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Sin embargo, este poder antioxidante no haba sido demostrado hasta ahora en otros 6rganos corporales del sujeto afecto de EAE, aunque es sabido que el AOVE puede ser ampliamente distribuido por todo el organismo. Algunos autores han observado c6mo el hidroxitirosol ¹⁴C radioactivo medido en diferentes tejidos, muestra una amplia distribuci6n, llegando hasta el m6sculo esquel6tico, ri6n, h6gado, coraz6n, pulm6n y cerebro (D'Angelo y cols., 2001; Angeloni y cols. 2017).

En nuestro estudio, en el modelo EAE se observan variaciones moleculares en 6rganos no nerviosos como respuesta a una presencia notoria de estr6s oxidativo, lo que nos sugiere la posibilidad de que algo similar est6 aconteciendo en personas que sufren EM. Este hecho, se encuentra indirectamente avalado por estudios previos de nuestro grupo, que muestran c6mo en el modelo EAE existen unos cambios en biomarcadores de estr6s oxidativo e inflamaci6n en sangre, que son similares a los acontecidos en la sangre de personas con EMRR (Escribano y cols., 2017).

Diversos autores han reportado diferentes patrones de expresi6n de la prote6na surfactante A (SP-A) en el SNC de la rata, as6 como su papel en la modulaci6n de la respuesta inflamatoria propia de la EAE. Otros resultados de investigaciones in vitro, evidencian que el tratamiento de astrocitos humanos y microglia con LPS promueven la expresi6n de SP-A de forma dosis-dependiente (Yang y cols., 2017); de hecho, sus niveles est6n m6s bajos en el l6quido cefalorraqu6deo de pacientes con EM (Luo y cols., 2004; Schob y cols., 2013). La prote6na SP-A disminuye significativamente la expresi6n del receptor Toll-like 4 y del factor nuclear $\kappa\beta$, reduciendo los niveles de interleucina-1 β y el TNF- α (Yang y cols., 2017).

Dicha prote6na SP-A, no solo est6 presente en el SNC sino tambi6n en tejidos no nerviosos. As6, varios autores identificaron su presencia en pulm6n, donde ejerce un papel fundamental en la homeostasis pulmonar y en la respuesta inflamatoria; tambi6n est6 en varios tejidos extrapulmonares, entre los que se incluye la mucosa del intestino delgado y el colon (Rubio y cols., 1995; Snyder y cols., 2008; Schob y cols., 2013; Yang y cols., 2017). Tales antecedentes nos indujeron a plantear que la inflamaci6n y el estr6s oxidativo que acompa6an a la EM y EAE tambi6n podr6an estar presentes en otros tejidos no nerviosos, donde la prote6na SP-A podr6a estar expresada.

De hecho as6 sucede en nuestros resultados. Las concentraciones de LPO y PC (indicadoras de da6o oxidativo), est6n incrementadas en coraz6n, ri6n, h6gado, intestino delgado e intestino grueso como consecuencia del desarrollo de EAE, tal y como observamos previamente que suced6a en sangre y tejido nervioso. El sistema redox glutati6n, tambi6n se muestra alterado respecto al grupo control, en todos los 6rganos estudiados en el modelo EAE. Ello corrobora que el estr6s oxidativo estar6a producido en estos 6rganos no nerviosos, tanto por la producci6n de especies reactivas de ox6geno (ROS) como por la alteraci6n de las defensas antioxidantes corporales.

Adicionalmente nuestro trabajo también demuestra por primera vez el efecto protector del AOVE y de sus componentes en órganos no nerviosos (corazón, riñón, hígado, e intestino delgado y grueso) afectados por el daño oxidativo. En nuestro estudio, el AOVE generalmente tiende a revertir el impacto negativo que supone la EAE a nivel de GSH, GSSG, ratio GSH/GSSG, tG and GPx en corazón, riñón, hígado, intestino delgado y grueso. Con la administración de HT y AO se aprecia un efecto similar. Por otra parte, el AOVE, el HT y el AO muestran la misma efectividad en la reducción de productos del metabolismo oxidativo (como PC y LPO), en todos los órganos estudiados.

LPS y LBP aparecen incrementadas en la EAE y se correlacionan positivamente con el estrés oxidativo en intestino delgado e intestino grueso. Dichas endotoxinas de la microbiota intestinal podrían desplazarse y alcanzar, no solo al SNC (por el aumento de permeabilidad intestinal de la EM) (Buscarinu y cols., 2018), sino también a otros órganos, siendo las responsables del subsiguiente fenómeno inflamatorio y daño oxidativo hallados en este estudio. La regulación positiva de ICAM-1 y VCAM-1 y los cambios en la expresión de estas moléculas en los vasos sanguíneos cerebrales por la LPS, ya han sido previamente comunicados (Dietrich, 2002; Lee y cols., 2017). Estas alteraciones endoteliales serían las responsables de la diapédesis de las células inmunes y del fenómeno inflamatorio cerebral responsable del daño oxidativo durante la EAE y la EM.

Por otra parte, el estrés oxidativo estimula la adhesión de monocitos al endotelio vascular y modifica la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de forma que se puede producir estrés oxidativo periférico intenso en pacientes con EMRR (Tasset y cols., 2012). Por tanto, este fenómeno inflamatorio podría repetirse de la misma manera, en cada uno de los órganos afectados por la EAE que hemos considerado en nuestro estudio. De hecho hay indicios de que la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal producido por la microbiota intestinal, puede ocurrir como resultado de una mayor permeabilidad de la barrera intestinal y un estado proinflamatorio propiciado por la microbiota (de Punder & Pruimboom, 2015; Farzi y cols., 2018).

El tratamiento con AOVE, HT y AO redujo significativamente los valores de LPS and LBP en tejido intestinal demostrando su efectividad contra las endotoxinas bacterianas en la EAE (mediante una correlación positiva entre los niveles de PC y LPO con los de LPS y LBP). Se observa una repercusión similar en corazón, hígado y riñón, donde AOVE, HT y AO demuestran un efecto positivo antagonizando el estrés oxidativo.

Quizás podría elucubrarse que al igual que sucede en cerebro, las endotoxinas bacterianas procedentes de la disbiosis en la microbiota intestinal se desplazan por el torrente vascular, no solo a los vasos cerebrales sino a otros tejidos no nerviosos, donde son responsables del fenómeno inflamatorio y el estrés oxidativo de la EAE, al producir una alteración en la permeabilidad vascular. AOVE, HT y AO no solo mejoran el fenómeno inflamatorio por su demostrada actividad sobre las gelatinasas (mediante la alteración de la permeabilidad vascular) sino que actúan sobre el estrés oxidativo, secuestrando radicales libres como conocidos inhibidores de la ciclooxigenasa, Fe^{2+} y NO (Angeloni y cols., 2017).

Cabe destacar que el AOVE, el HT y el AO, inducen una mejoría a nivel clínico, puesta de manifiesto en la disminuci6n de la puntuaci6n en la escala clínica a los 65 días. Tal mejoría en la evoluci6n clínica tambi6n estaría en correspondencia con la disminuci6n de estr6s oxidativo.

Todos estos resultados nos llevan a plantear que es necesario estudiar de forma específica y pormenorizada los complejos mecanismos moleculares por los que actúan estos compuestos.

Es interesante comentar que nuestro estudio presenta una serie de debilidades como no haber abordado de forma específica la relaci6n entre la disbiosis intestinal de la microbiota y el aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal y hematoencefálica en la rata con EAE. Del mismo modo, sería interesante realizar estudios clínicos para corroborar en pacientes con EM los fenómenos hallados en nuestro modelo de EAE. Por otro lado, no se llega a identificar si los mecanismos íntimos de acci6n molecular observados en tejido nervioso en la EAE ocurren de forma idéntica en otros tejidos extra-nerviosos; tampoco se identifica cómo son las acciones que el AOVE, el HT y el AO ejercen sobre las propias endotoxinas bacterianas y los fenómenos inflamatorios y de estr6s oxidativo que ésta desencadena.

Sin embargo, es indiscutible el valor que tiene evidenciar la existencia de estr6s oxidativo en 6rganos no nerviosos durante la EAE, sobre todo en el tejido intestinal al observar un aumento de las endotoxinas bacterianas. Tambi6n es relevante demostrar la correlaci6n existente entre los niveles de LPS y los productos derivados del estr6s oxidativo (LPO y PC) en intestino. Es igualmente de inter6s evidenciar la neta mejoría que la administraci6n de AOVE, HT y AO inducen sobre dicho estr6s oxidativo (gracias a su papel reductor sobre las aludidas endotoxinas bacterianas) y que todos estos cambios a nivel bioquímico se corresponden con una mejoría en la evoluci6n clínica de la enfermedad.

CONCLUSIONES

7. Conclusiones

A tenor de los resultados del presente estudio y de los objetivos inicialmente establecidos, podemos afirmar que la administraci6n oral de AOVE, al igual que el HT y el AO, muestran un efecto antiinflamatorio y antioxidante en la rata enferma de EAE, que se traduce en:

- 1) Una mejoría en la evoluci6n a nivel clínico, reflejada en la disminuci6n de la puntuaci6n en una escala clínica propia de EAE.
- 2) Un aumento en la protecci6n contra el daño secundario al estrés oxidativo, en términos de aumento de la GPx y de disminuci6n del grado de oxidaci6n de LPO y PC, así como una reducci6n de los niveles de LPS y LBP. Del mismo modo, se produce una mejoría a nivel inflamatorio, caracterizada por una disminuci6n de los factores de inflamaci6n en sangre y tejido nervioso.
- 3) Una minimizaci6n del daño oxidativo en los principales 6rganos corporales no nerviosos (intestino delgado, intestino grueso, hígado, riñ6n y coraz6n), entendida como un descenso en los niveles de LPO y PC, así como una reducci6n de las concentraciones de endotoxinas bacterianas en el intestino.
- 4) Una correlaci6n positiva entre el descenso en los niveles de endotoxinas bacterianas en sangre, tejido nervioso e intestino (delgado y grueso), con una mejora sustancial, tanto en el estrés oxidativo, como en la evoluci6n clínica de la enfermedad. En sangre y tejido nervioso se observa que a todo lo anterior, además se añaade una disminuci6n de los niveles de factores inflamatorios.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

- Angeloni, C., Malaguti, M., Barbalace, M. C., & Hrelia, S. (2017). Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2230.
- Aparicio-Soto, M., Sánchez-Hidalgo, M., Rosillo, M. Á., Castejón, M. L., & Alarcón-de-la-Lastra, C. (2016). Extra virgin olive oil: a key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food & function*, 7(11), 4492-4505.
- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2016, April). Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention—an update. In *Seminars in neurology* (Vol. 36, No. 02, pp. 103-114). Thieme Medical Publishers.
- Bahamonde, C., Conde, C., Agüera, E., Lillo, R., Luque, E., Gascón, F., Feijóo M., Cruz A.H., Sánchez-López F. & Túnez, I. (2014). Elevated melatonin levels in natalizumab-treated female patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship to oxidative stress. *European journal of pharmacology*, 730, 26-30.
- Berer, K., & Krishnamoorthy, G. (2012). Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta neuropathologica*, 123(5), 639-651.
- Branton, W. G., Lu, J. Q., Surette, M. G., Holt, R. A., Lind, J., Laman, J. D., & Power, C. (2016). Brain microbiota disruption within inflammatory demyelinating lesions in multiple sclerosis. *Scientific reports*, 6, 37344.
- Buscarinu, M. C., Romano, S., Mechelli, R., Umeton, R. P., Ferraldeschi, M., Fornasiero, A., Reniè, R.; Cerasoli, B.; Morena, E.; Romano, C., Loizzo, N. D., Umeton, R., Salvetti, M [N. D. Loizzo](#) & Ristori, G. (2018). Intestinal permeability in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, 15(1), 68-74.
- Caballero-Villarraso, J., Galvan, A., Escribano, B. M., & Tunez, I. (2017). Interrelationships among gut microbiota and host: paradigms, role in neurodegenerative diseases and future prospects. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 16(8), 945-964.
- Cadavid, D., Jurgensen, S., & Lee, S. (2013). Impact of natalizumab on ambulatory improvement in secondary progressive and disabled relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS one*, 8(1), e53297.
- Cano-Europa, E., Ortiz-Butron, R., Camargo, E. M., Esteves-Carmona, M. M., Oliart-Ros, R. M., Blas-Valdivia, V., & Franco-Colin, M. (2016). A canola oil-supplemented diet prevents type I Diabetes-Caused Lipotoxicity and renal dysfunction in a rat model. *Journal of medicinal food*, 19(11), 1041-1047.
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*, 164(4), 1079-1106.

D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., Pontoni, G., Galletti, P. & Zappia, V. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(11), 1492-1498.

Das, U. N. (2012). Is multiple sclerosis a proresolution deficiency disorder? *Nutrition*, 28(10), 951-958.

De Andr6s, C. (2003). Inter6s de los brotes en la esclerosis m6ltiple. Fisiopatolog6a y tratamiento. *Rev neurol*, 36(11), 1058-1064.

De Lau, L. M. L., Bornebroek, M., Witteman, J. C. M., Hofman, A., Koudstaal, P. J., & Breteler, M. M. B. (2005). Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. *Neurology*, 64(12), 2040-2045.

de Punder, K., & Pruijboom, L. (2015). Stress induces endotoxemia and low-grade inflammation by increasing barrier permeability. *Frontiers in immunology*, 6, 223.

Dietrich, J. B. (2002). The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *Journal of neuroimmunology*, 128(1-2), 58-68.

Escribano, B. M., Medina-Fern6ndez, F. J., Aguilar-Luque, M., Ag6era, E., Feijoo, M., Garcia-Maceira, F. I., Lillo, R., Vieyra-Reyes P., Giraldo A.I., Luque E., Drucker-Col6n R. & T6nez I. (2017). Lipopolysaccharide binding protein and oxidative stress in a multiple sclerosis model. *Neurotherapeutics*, 14(1), 199-211.

Escribano, B. M., T6nez, I., Requena, F., Rubio, M. D., De Miguel, R., Montilla, P., Tovar, P. & Aguera, E. I. (2010). Effects of an aerobic training program on oxidative stress biomarkers in bulls. *Veterinarni medicina*, 55(9), 422-428.

Erny, D., de Angelis, A. L. H., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mhlahkoi, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Uterm6hlen, O., Chun, E., Garret W. S., McCoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I. & Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature neuroscience*, 18(7), 965.

Farzi, A., Fr6hlich, E. E., & Holzer, P. (2018). Gut microbiota and the neuroendocrine system. *Neurotherapeutics*, 15(1), 5-22.

Fern6ndez-Fern6ndez, L., Sol6, M., Bolea, I., Valente, T., Serrano, J. C., Jov6, M., Ramirez, B., Angl6s, N., Reguant, J., Morell6, J.R., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Unzeta, M. (2015). The Antioxidant Effect of LMN Diet, Rich in Polyphenols and Polyunsaturated Fatty Acids, in Alzheimer's Disease. In *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline* (pp. 847-857). Academic Press.

Fern6ndez, 6. (2014). Retos futuros de la esclerosis m6ltiple. *Medicina Cl6nica*, 143, 44-47.

Fern6ndez-Fern6ndez, O., 6lvarez-Cerme6o, J. C., Arbizu-Urdiain, T., Arroyo-Gonz6lez, R., Arnal-Garc6a, C., Casanova-Estruch, B., Calles-Hern6ndez, M., Coret-Ferrer, F., Comabella-

- López, M., García-Merino, J.A., de las Heras, V., Izquierdo, G., Meca-Lallana, J.E., Muñoz-García, D., Olascoaga, J., Oreja-Guevara, C., Prieto J., M., Rodríguez-Antigüedad, A., Tintoré, M & Montalban X. (2011). Revisión de las novedades presentadas en el XXVI Congreso del Comité Europeo para el Tratamiento e Investigación en Esclerosis Múltiple (ECTRIMS)(I). *Rev Neurol*, 52(4), 227-238.
- Fernández, Ó., Fernández, V., Guerrero, M. (2011). *Esclerosis Múltiple*. Madrid, España: McGraw-Hill.
- Fernández, O. F., & Sánchez, V. F. (2007). Esclerosis múltiple. Concepto. Etiopatogenia. Fisiopatología. Manifestaciones clínicas. Investigaciones paraclínicas. Diagnóstico. Historia natural. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 9(76), 4867-4877.
- Fki, I., Sahnoun, Z., & Sayadi, S. (2007). Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 624-631.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 114-120). Academic Press.
- García-Díaz, B., & Estivill-Torrús, G. (2008). Modelos de experimentación animal para la investigación en esclerosis múltiple. *Revista Española de Esclerosis Múltiple*, 7, 5-19.
- Gilden, D. H. (2002). Multiple sclerosis exacerbations and infection. *The Lancet Neurology*, 1(3), 145.
- Gold, R., Linington, C., & Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129(8), 1953-1971.
- Goya, L., Mateos, R., & Bravo, L. (2007). Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. *European Journal of Nutrition*, 46(2), 70-78.
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P., & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition reviews*, 68(4), 191-206.
- Hashimoto, T., Ibi, M., Matsuno, K., Nakashima, S., Tanigawa, T., Yoshikawa, T., & Yabe-Nishimura, C. (2004). An endogenous metabolite of dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(5), 555-564.
- Hedström, A. K., Hillert, J., Olsson, T., & Alfredsson, L. (2013). Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *European journal of epidemiology*, 28(11), 867-874.
- Hemmer, B., Archelos, J. J., & Hartung, H. P. (2002). New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(4), 291.
- Hoban, A. E., Stilling, R. M., Ryan, F. J., Shanahan, F., Dinan, T. G., Claesson, M. J., Clarke, G.

& Cryan, J. F. (2016). Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Translational psychiatry*, 6(4), e774.

Kitsati, N., Mantzaris, M. D., & Galaris, D. (2016). Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox biology*, 10, 233-242.

Konstantinidou, V., Covas, M. I., Muñoz-Aguayo, D., Khymenets, O., de la Torre, R., Saez, G., G, Tormos M.C., Toledo E., Marti A., Ruiz-Gutiérrez V., Ruiz Mendez M.V. & Fito, M. (2010). In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *The FASEB Journal*, 24(7), 2546-2557.

Kurtzke, J. F. (1995). MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurologica Scandinavica*, 91(S161), 23-33

Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Consejería de Sanidad y Consumo (2005), *El aceite de oliva y la dieta mediterránea* Fecha de consulta: 18 de Enero de 2020. URL: http://rafael.delrosal.com/sites/default/files/field/files/el_aceite_de_oliva_y_la_dieta_mediterranea_1.pdf

Lee, B. K., Lee, W. J., & Jung, Y. S. (2017). Chrysin attenuates VCAM-1 expression and monocyte adhesion in lipopolysaccharide-stimulated brain endothelial cells by preventing NF-κB signaling. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1424.

Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., & Mazmanian, S. K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4615-4622.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., & Lenz, A. G. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 464-478).

Lucchinetti, C. F., Popescu, B. F., Bunyan, R. F., Moll, N. M., Roemer, S. F., Lassmann, H., Brück, W., Parisi, J.E., Scheithauer, B.W., Giannini, C., Weigand, S.D., Mandrekar, J., & Ransohoff, R.M. (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2188-2197.

Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassman, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology*, 47(6), 707-717.

Lublin, F. D. (2014). New multiple sclerosis phenotypic classification. *European neurology*, 72(Suppl. 1), 1-5.

Luo, J. M., Wan, Y. S., Liu, Z. Q., Wang, G. R., Floros, J., & Zhou, H. H. (2004). Regularity of distribution of immunoreactive pulmonary surfactant protein A in rat tissues. *International journal of molecular medicine*, 14(3), 343-351.

- Martín, M. A., Ramos, S., Granado-Serrano, A. B., Rodríguez-Ramiro, I., Trujillo, M., Bravo, L., & Goya, L. (2010). Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Molecular nutrition & food research*, 54(7), 956-966.
- Mattioli, F., Stampatori, C., & Capra, R. (2011). The effect of natalizumab on cognitive function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: preliminary results of a 1-year follow-up study. *Neurological sciences*, 32(1), 83-88.
- Melamud, L., Golan, D., Luboshitzky, R., Lavi, I., & Miller, A. (2012). Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 314(1-2), 37-40.
- Miller, E., Walczak, A., Saluk, J., Ponczek, M. B., & Majsterek, I. (2012). Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical Biochemistry*, 45(1-2), 26-30.
- Minelli P, Montinari MR. (2019) The Mediterranean Diet And Cardioprotection: Historical Overview And Current Research. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 27 (12), 805-815.
- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Aggarwal, N., Schneider, J. & Wilson, R. S. (2003). Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 60(2), 194-200.
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*, 296(23), 2832-2838.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Begum-Haque, S., & Kasper, L. H. (2011). Gut, bugs, and brain: role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease. *Annals of neurology*, 69(2), 240-247.
- Pérez-Nievas, B. G., García-Bueno, B., Madrigal, J. L., & Leza, J. C. (2010). Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: mechanisms implicated. *Journal of neuroinflammation*, 7(1), 60.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Pitozzi, V., Jacomelli, M., Catelan, D., Servili, M., Taticchi, A., Biggeri, A., Dolara, P. & Giovannelli, L. (2012). Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress. *Rejuvenation research*, 15(6), 601-612.
- Pivneva, T. A. (2009). Mechanisms underlying the process of demyelination in multiple sclerosis. *Neurophysiology*, 41(5), 365-373.
- Quiles, J. L., Barja, G., Battino, M., Mataix, J., & Solfrizzi, V. (2006). Role of olive oil and

monounsaturated fatty acids in mitochondrial oxidative stress and aging. *Nutrition reviews*, 64(suppl_4), S31-S39.

Rahmanzadeh, R., Brück, W., Minagar, A., & Sahraian, M. A. (2018). Multiple sclerosis pathogenesis: missing pieces of an old puzzle. *Reviews in the neurosciences*.

Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 378, 169-180

Ricart-Jane, D., Llobera, M., & Lopez-Tejero, M. D. (2002). Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide*, 6(2), 178-185.

Riccio, P. (2011). The molecular basis of nutritional intervention in multiple sclerosis: a narrative review. *Complementary therapies in medicine*, 19(4), 228-237.

Rietjens, S. J., Bast, A., & Haenen, G. R. (2007). New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(18), 7609-7614.

Rodriguez, M. (Ed.). (2007). *Advances in multiple sclerosis and experimental demyelinating diseases* (Vol. 318). Springer Science & Business Media.

Rubio, S., Lacaze-Masmonteil, T., Chailley-Heu, B., Kahn, A., Bourbon, J. R., & Ducroc, R. (1995). Pulmonary surfactant protein A (SP-A) is expressed by epithelial cells of small and large intestine. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 12162-12169.

Salzer, J., Hallmans, G., Nyström, M., Stenlund, H., Wadell, G., & Sundström, P. (2012). Vitamin D as a protective factor in multiple sclerosis. *Neurology*, 79(21), 2140-2145.

Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., De Sanctis, P., Giovannini, C., D'Archivio, M., & Masella, R. (2018). Anti-inflammatory activity of extra virgin olive oil polyphenols: which role in the prevention and treatment of immune-mediated inflammatory diseases? *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 18(1), 36-50.

Schaffer, S., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological research*, 62(4), 322-327.

Schob, S., Schicht, M., Sel, S., Stiller, D., Kekulé, A., Paulsen, F., Maronde, E. & Bräuer, L. (2013). The detection of surfactant proteins A, B, C and D in the human brain and their regulation in cerebral infarction, autoimmune conditions and infections of the CNS. *PLoS one*, 8(9).

Snyder, G. D., Oberley-Deegan, R. E., Goss, K. L., Romig-Martin, S. A., Stoll, L. L., Snyder, J. M., & Weintraub, N. L. (2008). Surfactant protein D is expressed and modulates inflammatory responses in human coronary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(5), H2053-H2059.

- Stoneham, M., Goldacre, M., Seagroatt, V., & Gill, L. (2000). Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *Journal of Epidemiology & Community Health*, *54*(10), 756-760.
- Tasset, I., Agüera, E., Gascon, F., Giraldo, A. I., Salcedo, M., Cruz, A. H., Sánchez, F., & Tünez, I. (2012). Natalizumab and reduction of carbonylated proteins in patients with multiple sclerosis. *Revista de neurología*, *54*(8), 449-452.
- Tasset, I., Pontes, A. J., Hinojosa, A. J., De la Torre, R., & Tünez, I. (2011). Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like rat model. *Nutritional neuroscience*, *14*(3), 106-111.
- Tomasello, G., Mazzola, M., Leone, A., Sinagra, E., Zummo, G., Farina, F., Damiani P, Cappello F, GergesGeagea A, Jurjus A, Bou Assi T, Messina M & Carini F. (2016). Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, *160*(4), 461-466.
- Tremlett, H., & Waubant, E. (2018). The gut microbiota and pediatric multiple sclerosis: recent findings. *Neurotherapeutics*, *15*(1), 102-108.
- Ferreira, D. A. S., Santamaría, A., Escribano, B. M., Luque, E., & Tünez, I. (2015). Olive Oil and huntington's disease. In *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline* (pp. 719-731). Academic Press.
- Sofi, F., Macchi, C., Abbate, R., Gensini, G. F., & Casini, A. (2013). Mediterranean diet and health. *Biofactors*, *39*(4), 335-342.
- Sospedra, M., & Martin, R. (2016, April). Immunology of multiple sclerosis. In *Seminars in neurology* (Vol. 36, No. 02, pp. 115-127). Thieme Medical Publishers.
- Tasset, I., Agüera, E., Gascon, F., Giraldo, A. I., Salcedo, M., Cruz, A. H., Sánchez, F. & Tünez, I. (2012). Natalizumab and reduction of carbonylated proteins in patients with multiple sclerosis. *Revista de neurología*, *54*(8), 449-452.
- Tasset, I., Agüera, E., Sánchez-López, F., Feijóo, M., Giraldo, A. I., Cruz, A. H., Gascón & Tünez, I. (2012). Peripheral oxidative stress in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Clinical biochemistry*, *45*(6), 440-444.
- Tasset, I., Bahamonde, C., Agüera, E., Conde, C., Cruz, A. H., Pérez-Herrera, A., Gascón, F., Giraldo, A.I., Ruiz, M.C., Lillo, R., Sánchez-López, F. & Tünez, I. (2013). Effect of natalizumab on oxidative damage biomarkers in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Pharmacological Reports*, *65*(3), 624-631.
- Van Horssen, J., Witte, M. E., Schreibelt, G., & De Vries, H. E. (2011). Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1812*(2), 141-150.
- Wekerle, H., Berer, K., & Krishnamoorthy, G. (2013). Remote control—Triggering of brain

autoimmune disease in the gut. *Current opinion in immunology*, 25(6), 683-689.

Wickström, A., Nyström, J., & Svenningsson, A. (2013). Improved ability to work after one year of natalizumab treatment in multiple sclerosis. Analysis of disease-specific and work-related factors that influence the effect of treatment. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(5), 622-630.

Witherick, J., Wilkins, A., Scolding, N., & Kemp, K. (2011). Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Diseases*, 2011.

Yang, X., Yan, J., & Feng, J. (2017). Surfactant protein A is expressed in the central nervous system of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis, and suppresses inflammation in human astrocytes and microglia. *Molecular medicine reports*, 15(6), 3555-3565.

Zhu, L., Liu, Z., Feng, Z., Hao, J., Shen, W., Li, X., Sun, L., Sharman, E., Wang, Y, Weber, P., Shi, X. & Liu, J. (2010). Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(11), 1089-1098.

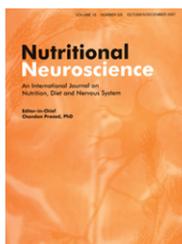
INDICIOS DE CALIDAD

9. Indicios de calidad

9.1 Artículos publicados

- Título: *Extra-virgin olive oil modifies the changes induced in non-nervous organs and tissues by experimental autoimmune encephalomyelitis models.*
Nombre de la revista: *Nutrients*
Año de publicaci6n: 2019
Journal Citation Report: Q1

- Título: *The protective effect of extra-virgin olive oil in the experimental model of multiple sclerosis in the rat.*
Nombre de la revista: *Nutritional neuroscience*
Año de publicaci6n: 2018
Journal Citation Report: Q2



Nutritional Neuroscience
An International Journal on Nutrition, Diet and Nervous System

ISSN: 1028-415X (Print) 1476-8305 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/yyns20>

The protective effect of extra-virgin olive oil in the experimental model of multiple sclerosis in the rat

C. Conde, B.M. Escribano, E. Luque, M. Aguilar-Luque, M. Feijóo, J.J. Ochoa, M. LaTorre, A.I. Giraldo, R. Lillo, E. Agüera, A. Santamaría & I. Túnez

To cite this article: C. Conde, B.M. Escribano, E. Luque, M. Aguilar-Luque, M. Feijóo, J.J. Ochoa, M. LaTorre, A.I. Giraldo, R. Lillo, E. Agüera, A. Santamaría & I. Túnez (2018): The protective effect of extra-virgin olive oil in the experimental model of multiple sclerosis in the rat, *Nutritional Neuroscience*, DOI: [10.1080/1028415X.2018.1469281](https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1469281)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1469281>



Published online: 05 May 2018.



[Submit your article to this journal](#)



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=yyns20>

The protective effect of extra-virgin olive oil in the experimental model of multiple sclerosis in the rat

C. Conde ^{1,2*}, B.M. Escribano^{2,3*}, E. Luque^{2,4}, M. Aguilar-Luque^{2,5}, M. Feijóo^{2,5}, J.J. Ochoa¹, M. LaTorre^{2,5}, A.I. Giraldo^{2,5}, R. Lillo^{2,6}, E. Agüera^{1,2}, A. Santamaría⁷, I. Túnez^{2,5,8}

¹Neurology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, ²Maimonides Institute for Research in Biomedicine of Cordoba, (IMIBC), Cordoba, Spain, ³Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, Spain, ⁴Department of Morphological Sciences, Histology Section, Faculty of Medicine and Nursing, University of Cordoba, Spain, ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine and Nursing, University of Cordoba, Spain, ⁶Department of Socio-sanitary Sciences and Radiology and Physical Medicine, Psychiatry Section, Faculty of Medicine and Nursing, University of Cordoba, Spain, ⁷Neurology and Neurosurgery National Institute, Mexico City, Mexico, ⁸Cooperative Research Thematic Network on Aging and Frailty (RETICEF)

This study has evaluated the effect of EVOO (Extra-Virgin olive oil), OA (oleic acid) and HT (hydroxytyrosol) in an induced model of MS through experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Dark Agouti 2-month old rats (25 males) were divided into five groups: (i) control group, (ii) EAE group, (iii) EAE+EVOO, (iv) EAE+HT, and (v) EAE+OA. At 65 days, the animals were sacrificed and the glutathione redox system and bacterial lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein (LBP) products of the microbiota in brain, spinal cord, and blood were evaluated.

Gastric administration of EVOO, OA, and HT reduced the degree of lipid and protein oxidation, and increased glutathione peroxidase, making it a diet-based mechanism for enhancing protection against oxidative damage. In addition, it reduced the levels of LPS and LBP, which appeared as being increased in the EAE correlated with the oxidative stress produced by the disease.

Keywords: Bacterial lipopolysaccharide, Experimental autoimmune encephalomyelitis, Extra-virgin olive oil, Hydroxytyrosol, Glutathione redox system, multiple sclerosis

Abbreviations in order of appearance: MS: multiple sclerosis; CNS: central nervous system; EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis; LPS: bacterial lipopolysaccharide; LBP: LPS-binding protein; EVOO: extravirgin olive oil; OA: oleic acid; HT: hydroxytyrosol; MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; GSH: reduced glutathione; LPO: lipid peroxidation; tG: total glutathione; GSSG: oxidized glutathione; GPx: glutathione peroxidase; PC: carbonylated proteins; NO: Nitric oxide; NF-kBp65: Nuclear Factor-kappa B p065; TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α .

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, disabling disease of the central nervous system (CNS) that has an autoimmune component. This disease is characterized by chronic neuroinflammation with lymphocyte infiltration into the CNS.^{1–3} The inflammatory process seen is due to an excessive production of pro-inflammatory cytokines that leads to an increased secretion of reactive oxygen species, and reduction in antioxidant defense mechanisms.^{4–6}

Recent findings in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the most widely used animal model for human MS, suggest that altering certain bacterial populations present in the gut may lead to a pro-inflammatory condition that could result in the development of MS. In fact, Ochoa-Repáraz *et al.*⁷ demonstrated that modification of the bacterial populations of the gut alters the clinical outcome of EAE in mice. Also, treatment of mice

*These persons have participated on an equal basis.
Correspondence to: B.M. Escribano, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, Campus de Rabanales, Cordoba 14071, Spain. E-mail address: am1esdub@uco.es. Isaac Túnez, Department Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine and Nursing, Av. Menéndez Pidal s/n. Cordoba 14004. Spain. E-mail: fm2tufii@uco.es.

with a broad spectrum of antibiotics not only induced significant changes in the regulatory T cell populations of the gut-associated lymphoid tissues and peripheral lymphoid organs but reduced the susceptibility to EAE.⁸

Recently, Escribano *et al.*³ found a significant increase in bacterial lipopolysaccharide (LPS; components of the outer membrane of Gram-negative bacteria, the most abundant ones in the gut microbiota, capable of inducing a strong immune response) and in the LPS-binding protein (LBP), in brain, spinal cord, and blood of rats with EAE and in blood of patients with MS. Diverse treatments, Natalizumad, *N*-acetyl cysteine, and Dimethyl fumarate, not only demonstrated their effectiveness against the typical oxidative stress of both diseases, but also lowered LPS and LBP levels. Both variables, LPS and LBP, were correlated with the oxidative stress produced in EAE and MS. All the above seems to reinforce the role of gut microbiota in the induction of EAE and MS, corroborating the existence of the gut-brain axis.

Diet can have a profound effect on the composition of the microbiome. Indeed, different dietary habits among various human populations led to changes in the composition of their microbiota.^{9,10} Tomasello *et al.*¹¹ reported that 'Mediterranean' and vegetarian diets that include abundant fruit, vegetables, olive oil, and oily fish are known for their anti-inflammatory effects and could prevent dysbiosis (alteration in the gut microbiota), which has been related to MS.^{12,13}

Olive oil constitutes a major component of this Mediterranean dietary regime and its beneficial effects on human health are mainly related to its polyphenols content.^{14,15} Some of our group's previous results showed the important antioxidant role of extra-virgin olive oil (EVOO) for itself and for one of its isolated components, hydroxytyrosol (HT), in brain oxidative stress in a 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like model in Wistar rats.¹⁶

Based on these antecedents, this study aimed: (i) to evaluate the effect of EVOO on the oxidative stress caused by EAE; (ii) to go deeper into the relation of oxidative stress with the dysbiosis represented by LPS and LBP levels in brain, spinal cord, and blood; (iii) to observe the role of EVOO in the microbiota-oxidative stress-EAE relationship. Additionally, and in order to examine more closely the action of EVOO, the effects of the OA (monounsaturated fatty acid) and HT (phenolic alcohol) as its fundamental compounds were analyzed.

Methods

Animals

Animals from the Animal Experimentation Center (Córdoba University) were housed under standard

colony conditions: 12:12 light/darkness cycle (lights on at 7:00 a.m.), controlled room temperature (22±2 °C), with free access to food and water. The protocols were approved by the Bioethics Committee at the university and carried out according to the guidelines of the Directive of 24 November 1986 (86/609/ECC) approved by the European Communities Council and RD 53/2013 approved by Presidency Minister of Spain (BOE 8 February 2013).

Treatments

The present study was designed to evaluate the effects of EVOO on changes in EAE experimental model. A total of 25 male Dark Agouti rats (2 months old, weight 190–220 g) were used since this strain bears the closest clinical and pathologic resemblance to MS.¹⁷ The experiment included the following study groups (*n*=5 animals per group):

- Control group
- EAE group
- EAE+EVOO
- EAE+hydroxytyrosol group (HT)
- EAE+oleic acid group (OA)

The first group, called *Control*, was not manipulated. EAE induction was performed by injecting subcutaneously, at the dorsal base of the tail, 100 µl of a solution containing 150 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) (fragment 35–55; Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) in phosphate buffered saline emulsified 1:1 in complete Freund's adjuvant (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA), during 14 days. To complete the adjuvant, 400 µg of heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, DIFCO, Detroit, MI, USA) was added. The EAE-model rat is a widely used animal model of MS induced by CNS-restrictive antigens.¹⁸ For this study, the EAE-inductor agent chosen was MOG. MOG-induction shows several similarities to MS, such as a relapsing-remitting disease course, demyelination, and axonal degeneration.^{2,19}

Control and EAE groups were fed with AIN-93G diet (standard daily diet).²⁰ The composition of the diet (g/kg weight) was as follows: casein, 200; maize starch, 367.5; dextrose, 132; sucrose, 100; cellulose, 50; fat, 70; L-cysteine, 3; choline bitartrate, 2.5; AIN-93G mineral mixture, 35 and AIN-93G vitamin mixture, 10.^{16,21,22} The calorie intake in weight terms was calculated (Gross Energy Kcal/g 3.80 in standard daily diet) in the rats (total calorie intake).

The olive oil administered in this study was Los Montes de Luque EVOO (composition in Table 1), obtained from Almazara de Luque S.C.A., Olivarrera Nuestra Señora del Rosario®, D.O.P. Baena (Luque, Córdoba, Spain). This EVOO is a white brand of Albenzaide EVOO D.O.P (Almazara de Luque S.C.A. at the above address). HT was purchased

Table 1 Energy value and components of the olive oil "Los Montes de Luque (EVOO)" administered in this study and obtained from Almazara de Luque S.C.A., Olivarera Nuestra Señora del Rosario[®], D.O.P. Baena (Luque, Córdoba, Spain).

		% DRA
Energy value	900 Kcal/3389 KJ	45%
Proteins	0 g	0%
Carbohydrates	0 g	0%
Fats	100 g	22%
Monounsaturated	78 g	
Polyunsaturated	9 g	
Saturated	13 g	10%
Trans	0 g	
Cholesterol	0 mg	0%
Dietary fiber	0 g	0%
Sodium	0 g	0%
Vitamin E	22 mg	183.7%

Data for a bottle of 5 liters. DRA=Daily Recommended Amount.

from Seprox Biotech S.L. (Madrid, Spain) and OA from Merck (Darmstadt, Germany).

EVOO, OA, and HT were administered for 51 days with a gastric catheter. In the group given EVOO the latter represented 10% of the calorie intake (in weight terms) of the total calorie intake, after restricting proportionally the amount of food, in terms of energy, provided by the standard daily diet (90% of the calorie intake),¹⁶ while OA corresponded to 4% of total calorie intake (the acidity of the EVOO was of 0.17% OA/0.5 L EVOO). Both EVOO and OA were dietary substitutions. The HT group received a dose of 2.5 mg/kg body weight of hydroxytyrosol.^{16,23} The administration protocol of EVOO (modification of that followed by 21 and 22) and HT has already been assayed by Tasset *et al.*¹⁶ who found that EVOO and HT reduced lipid peroxidation product levels and blocked the reduced glutathione (GSH) depletion prompted by 3-nitropropionic acid in brain in Wistar rats. On the other hand, Fki *et al.*²³ administered a dose of 2.5 mg/kg of body weight of hydroxytyrosol that significantly lowered the levels of serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol, while it increased the serum levels of high-density lipoprotein cholesterol and slowed down the lipid peroxidation process and enhanced antioxidant enzyme activity.

Sample collection and processing

At 65 days, the animals were sacrificed by decapitation having been previously anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine 75 mg/kg (Imalgene[®] 100 mg/ml, MerialLaboratorios). The blood obtained from the neck vascular trunk was collected in tubes with EDTA-K3. Tubes were centrifuged during 15 minutes at 3000 rpm at 4°C, proceeding immediately to the collection of plasma, which was frozen and stored in aliquots at -85°C.

Then, and under controlled temperature conditions, it was proceeded to extract and weigh the brain and spinal cord and to immediately prepare the corresponding homogenates with a mechanical homogenizer (Tempest Virtis). The buffer used for homogenization was Tris (20 mM) at pH 7.4.

Variables analyzed

The following parameters were analyzed:

Clinical score evaluation: The animals were monitored at 14 (animals developing EAE) and 65 days (after 51 days they had been administered EVOO, HT, and OA) and scored in accordance with the following severity scale; 0: no signs, 1: tail paralysis, 2: weakness in hind legs, 3: paralysis in hind legs, 4: paralysis in hind legs and weakness in front legs, 5: quadriplegic.² The score at 14 days minus the score at 65 days/rat (clinical score at 14 days—score at 65 days) was established in the EAE, EAE+EVOO, EAE+HT, and EAE+OA as a clinical score evaluation.

Oxidative damage biomarkers in blood, brain, and spinal cord: lipid peroxidation products (LPO; nmol/mg hemoglobin – blood – or protein – brain or spinal cord-), total glutathione (tG; nmol/mg hemoglobin – blood – or protein – brain or spinal cord-), reduced glutathione (GSH; nmol/mg hemoglobin – blood – or protein – brain or spinal cord-), oxidized glutathione (GSSG; nmol/mg hemoglobin – blood – or protein – brain or spinal cord-), glutathione peroxidase (GPx; nmol/mg hemoglobin – blood – or protein – brain or spinal cord-) and the ratio between GSH/GSSG were all analyzed by spectrophotometry with Bioxytech S.A. reagents (Oxis International; Portland, OR, USA) and with a Shimadzu spectrophotometer (UV 1603; Kyoto, Japan), the reagent kits being LPO 586 (LPO), GSH 420 (tG), GSH 400 (GSH) and GSH 412 (GSSG). For the determination of the GPx (E.C.:1.11.1.12) the Flohé and Gunzler²⁴ method was used.

Carbonylated proteins (PC) were measured (nmol/g hemoglobin – blood – or protein – brain or spinal cord-) as an indicator of protein oxidative stress. The carbonyl content was evaluated using the Levine *et al.*²⁵ method in a Shimadzu spectrophotometer (UV-1603; Kyoto, Japan) at wavelength 360 nm.

Inflammation factors: Nitric oxide: Total nitrite (nitrite+nitrate; NO) was measured as a NO production marker and analyzed following the Griess method.²⁶ All nitrates were reduced to nitrite, and then total nitrite was determined spectrophotometrically at wavelength 540 nm with a Shimadzu spectrophotometer (UV-1603; Kyoto, Japan). The values were presented in $\mu\text{mol/mg}$ protein in brain and spinal cord and in $\mu\text{mol/mg}$ hemoglobin in blood.

C. Conde et al. The protective effect of extra-virgin olive oil

The Nuclear Factor-kappa B p065 (NF-kBp65) and the Rat Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) were determined by ELISA (Invitrogen Corporation #KH00371 by NF-kB065 and Max Discovery #2203 by TNF- α). The values were measured in both parameters in pg/mg protein in brain and spinal cord and in pg/mg hemoglobin in blood.

LPS: LPS was assessed using the Pierce Limulus Amoebocytes Lysate (LAL) Chromogenic endotoxin quantification kit provided by Thermo Scientific (USA). LPS catalyzed the activation of a proenzyme in the modified LAL, which then catalyzed the splitting of p-Nitroaniline (pNA). The activation rate was proportional to the sample endotoxin concentration. The released pNA was photometrically measured at 405–410 nm. Data are expressed as endotoxin units/mg protein (brain and spinal cord) or mg hemoglobin (blood).

LBP: LBP assessment was performed using Elisa Kit soluble LBP (Enzo®, Enzo Life Sciences (ELS), NY, USA). The amount of LBP was measured in an Elisa reader. The values are presented as pg/mg protein (brain and spinal cord) or pg/g hemoglobin (blood).

Statistics

The statistical study was performed with the SPSS application (SPSS INC. Version 15 for Windows). The results were expressed as arithmetic mean

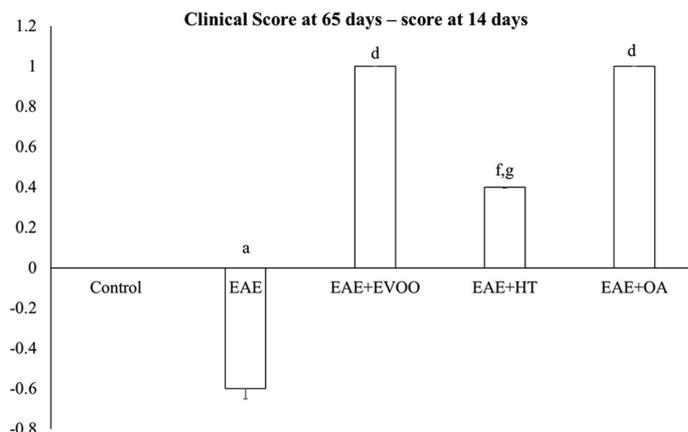
\pm standard deviation (SD). First, exploratory analyses (Shapiro–Wilk’s test for $n < 40$) showed the distribution of most observations to be Gaussian; non-Gaussian distributions were transformed using the natural logarithm. A student *t*-test for independent variables was conducted to compare the EAE group with the control group. For EAE and EAE+EVOO with the rest of the groups (EAE+EVOO, EAE+HT, and EAE+OA), a hypothesis contrast of each of the variables in the different groups established was performed by applying a one-way analysis of variance. To determine the concrete differences between the groups, a Bonferroni *post hoc* test was performed.

A Pearson correlation between the variables LPO, PC, and clinical score evaluation (score at 14 days –score at 65 days), with LPS and LBP in brain, spinal cord, and blood were carried out.

The minimum significance level was 95% ($P < 0.05$).

Results

The clinical data reveal that EAE supplemented with EVOO, OA and HT signifies an improvement in the clinical evaluation score, manifesting a drop in the score at 65 days with respect to the score at 14 days in accordance with the severity scale of Perez-Nievas *et al.*² (Fig. 1). This was depicted as a score at 14 days minus the score at 65 days. The decline in the 65 days’ score with respect to 14 days in the animals treated with EVOO, HT, and OA, was depicted with



autoimmune encephalomyelitis.

glycoprotein; EAE=experimental

positive values in the graphic, manifesting an improvement in the course of the disease, whereas the increase in scoring at 65 days in the animals with EAE with respect to 14 days was represented with negative values as an example of the worsening of the clinical symptoms.

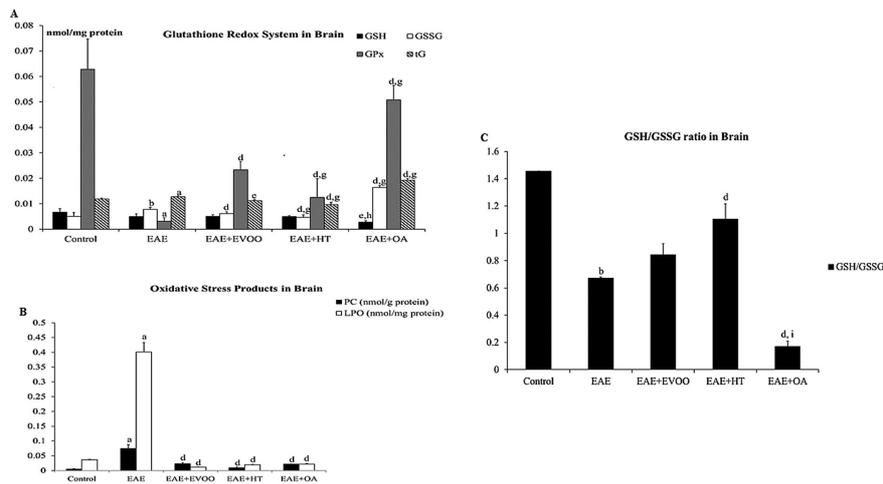
In brain (Fig. 2A–C), EAE caused a significant increase in GSSG ($P<0.01$), tG, LPO, and PC ($P<0.001$) and a decline in the GSH/GSSG ratio ($P<0.01$) and in GPx ($P<0.001$) with respect to the control group. The use of EVOO triggered a significant drop in GSSG, PC, LPO ($P<0.001$), and tG ($P<0.01$), and a significant rise in GPx ($P<0.001$) compared to the EAE group. HT also produced a significant decrease in GSSG ($P<0.001$) and tG ($P<0.001$) with respect to the EAE and EAE +EVOO groups, and a significant increase in GPx ($P<0.001$) compared to the EAE group but reaching a lower level than that with the treatment with EAE +EVOO ($P<0.001$). PC and LPO ($P<0.001$) diminished significantly and the GSH/GSSG ratio increased significantly with HT with respect to the EAE group. A significant decrease in GSH ($P<0.01$)

and an increase in GSSG, tG, and GPx ($P<0.001$) vs. the EAE group was seen with OA. The GSH values ($P<0.01$) were lower and those of GSSG, tG, and GPx ($P<0.001$) higher than those reached in the EAE+EVOO group. The GSH/GSSG ratio was significantly reduced with OA with respect to the EAE ($P<0.001$) and EAE+EVOO groups ($P<0.05$). PC and LPO decreased significantly ($P<0.001$) with the EAE+OA treatment compared to the EAE group.

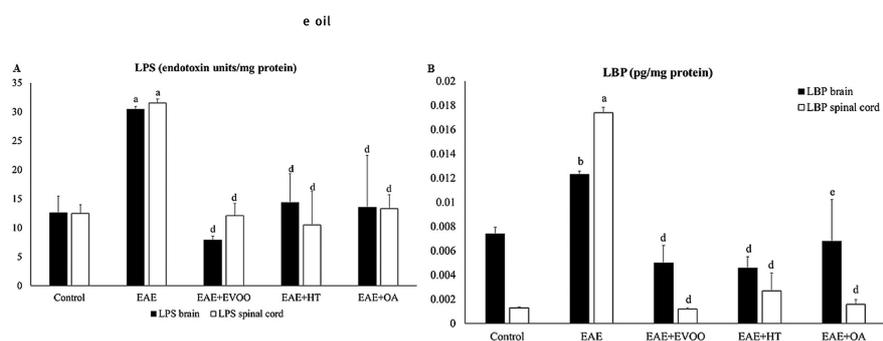
LPS ($P<0.001$) and LBP ($P<0.01$) (Fig. 3A and B) increased in EAE with respect to the control. The use of EVOO, OA, and HT in rats with EAE produced a significant reduction in LPS and LBP levels with respect to the untreated EAE group.

TNF- α and NF-kBp65 were significantly increased in EAE with respect to the control ($P<0.001$). The use of these three treatments (EVOO, OA, and HT) notably diminished the values of both parameters compared to the EAE group (Table 2).

NO significantly increased with EAE with respect to the control ($P<0.001$). The employment of EVOO and OA significantly decreased the NO values in relation to those of the rats with EAE. The treatment with



ephalomyelitis. ^b $P<0.01$ vs. control; ^d $P<0.001$ vs. EAE; ^e $P<0.05$ vs. EAE+EVOO.



HT did not cause any changes with respect to the EAE group (Table 2).

Significant positive correlations were established for LPS and LBP with PC ($P < 0.001$), LPO ($P < 0.001$), and the clinical score at 14–score at 65 days ($P < 0.01$). Also, positive significant correlations were established between the inflammation markers (TNF- α , NF-kBp065, and NO) with LPO ($P < 0.001$), PC (0.001), LPS ($P < 0.001$), LBP ($P < 0.001$), and the clinical score at 14– score at 65 days.

In spinal cord, GSH, PC, and LPO ($P < 0.001$) and tG ($P < 0.05$) were increased whereas GPx and the GSH/GSSG ratio ($P < 0.001$) declined significantly in the EAE group with respect to the control (Fig. 4A–C). The three treatments (EVOO, HT, and OA) produced a diminution in

the quotients GSH/GSSG and in LPO and PC ($P < 0.001$) as compared to the EAE group. That diminution was greater in the case of OA ($P < 0.01$) for the PCs and for HT and OA groups for the GSH/GSSG ratio ($P < 0.001$) when comparing them to the EAE+EVOO group. GSH was significantly decreased in spinal cord with the three treatments (EVOO, HT, and OA) with respect to the EAE group, the drop being more marked with HT and OA since those groups showed significant differences as opposed to the EAE+EVOO group. tG ($P < 0.05$) was significantly decreased with HT with respect to the EAE group, while tG, GSSG, and GPx ($P < 0.001$) were increased in the OA group compared to the EAE group, and in the EAE+EVOO group only in the case of GSSG and tG ($P < 0.001$).

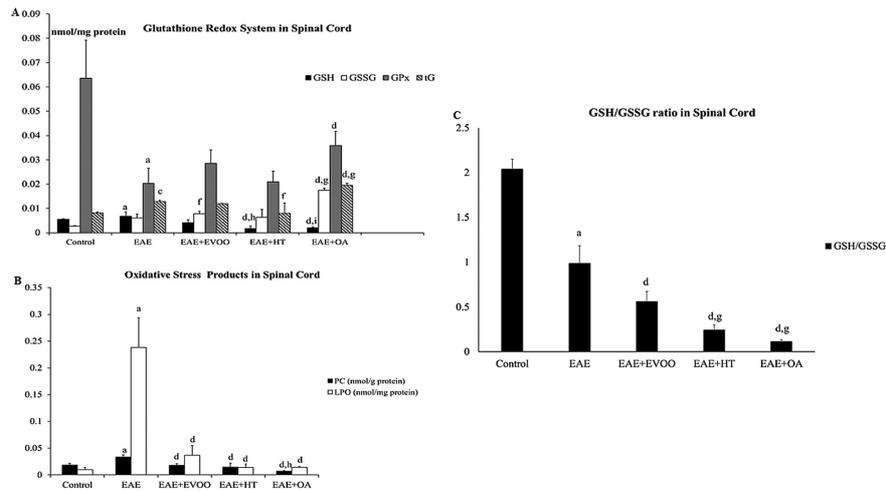


Figure 4 (A) Effects of MOG, EVOO, HT, and OA on Glutathione Redox System in Spinal Cord: Mean±Standard Deviation in spinal cord for reduced glutathione (GSH; nmol/mg protein), oxidized glutathione (GSSG; nmol/mg protein), glutathione peroxidase (GPx; nmol/mg protein), and total glutathione (tG; nmol/mg protein) in the different treatment groups: Control, EAE, EAE+Extra Virgin Olive Oil (EAE+EVOO), EAE+HT, and EAE+OA. MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; EAE=experimental autoimmune encephalomyelitis. ^a*P*<0.001 vs. control; ^c*P*<0.05 vs. control; ^d*P*<0.001 vs. EAE; ^f*P*<0.05 vs. EAE; ^g*P*<0.001 vs. EAE+EVOO; ^h*P*<0.01 vs. EAE+EVOO; ⁱ*P*<0.05 vs. EAE+EVOO. (B) Effects of MOG, EVOO, HT, and OA on Oxidative Stress Products in Spinal Cord: Mean±Standard Deviation in spinal cord for lipid peroxidation products (LPO; nmol/mg protein) and PC (nmol/g protein) in the different treatment groups: Control, EAE, EAE+Extra Virgin Olive Oil (EAE+EVOO), EAE+HT, and EAE+OA. MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; EAE=experimental autoimmune encephalomyelitis. ^a*P*<0.001 vs. control; ^b*P*<0.001 vs. EAE; ^h*P*<0.01 vs. EAE+EVOO. (C) Effects of MOG, EVOO, HT, and OA on GSH/GSSG ratio in Spinal Cord: Mean±Standard Deviation in spinal cord for reduced glutathione quotient (GSH; nmol/mg protein)/oxidized glutathione (GSSG nmol/mg protein) in the different treatment groups: Control, EAE, EAE+Extra Virgin Olive Oil (EAE+EVOO), EAE+HT, and EAE+OA. MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; EAE=experimental autoimmune encephalomyelitis. ^a*P*<0.001 vs. control; ^b*P*<0.001 vs. EAE; ^g*P*<0.001 vs. EAE+EVOO.

The levels of LPS (*P*<0.001) and of LBP (Fig. 3A and B) were significantly increased in rats with EAE, whereas the use of the three treatments (EVOO, OA, and HT) significantly reduced both variables with respect to group EAE.

TNF- α , NF-kBp065, and NO were significantly increased in rats with EAE. EVOO, and HT and OA significantly reduced the inflammation parameters for TNF- α and NF-kBp065, whereas, in the case of NO, only EVOO had that effect (Table 2).

A Pearson correlation established a significant positive relationship between PC (*P*<0.001), LPO (*P*<0.001), and the clinical score at 14 days—score at 65 days (*P*<0.01) and LPS and LBP. TNF- α , NF-kBp065, and NO were significantly and positively correlated with PC, LPO, LPS, LBP, and clinical score at 14 days—score at 65 days.

In blood, GSH (*P*<0.01), GSSG (*P*<0.001), tG (*P*<0.01), PC (*P*<0.001), and LPO (*P*<0.001) were significantly increased in the EAE group with respect to the control whereas GPx was decreased (*P*<0.001) (Fig. 5A–C). EVOO and HT caused a significant

decline in GSH that was more marked with HT that showed significant differences with EVOO. GSSG and tG were significantly decreased with respect to the EAE group in the EVOO and OA treatments, while they were increased with HT, with differences also being established with the EAE+EVOO group as well as with the EAE group. PC and LPO were significantly decreased in the three treatment groups (EVOO, HT, and OA) compared to the EAE group. GPx was significantly increased in the three groups compared to the EAE one and that increase was still more marked with the HT and OA treatments, which showed significant differences with the EAE+EVOO group (*P*<0.01).

The LPS levels (*P*<0.001) and LBP (Fig. 6) were significantly incremented in rats with EAE, while the use of the three treatments (EVOO, OA, and HT) significantly reduced both variables with respect to the EAE group. The HT treatment diminished the LPS values and increased the LBP levels compared to the EAE+EVOO group.

TNF- α , NF-kBp065, and NO were significantly increased in rats with EAE. While the use of EVOO,

C. Conde et al. The protective effect of extra-virgin olive oil

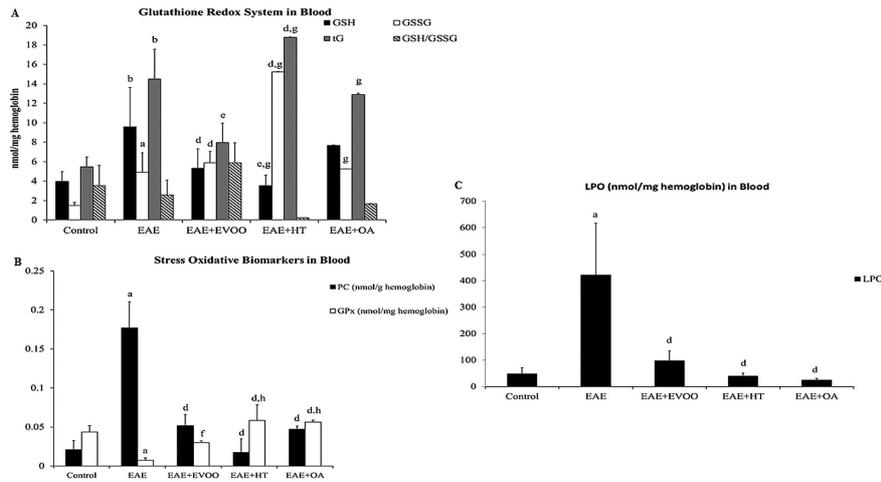
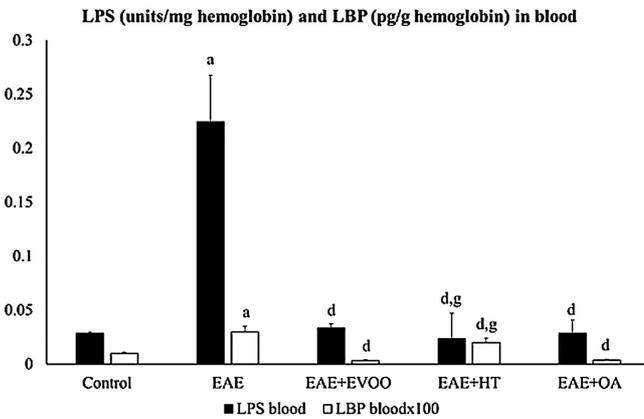


Figure 5 (A) Effects of MOG, EVOO, HT, and OA on Glutathione Redox System in Blood: Mean±Standard Deviation in blood for reduced glutathione (GSH; nmol/mg hemoglobin), oxidized glutathione (GSSG; nmol/mg protein), total glutathione (tG; nmol/mg hemoglobin), and reduced glutathione quotient (GSH; nmol/mg protein)/oxidized glutathione (GSSG nmol/mg hemoglobin) in the different treatment groups: Control, EAE, EAE+Extra Virgin Olive Oil (EAE+EVOO), EAE+HT, and EAE+OA, MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; EAE=experimental autoimmune encephalomyelitis. ^a*P*<0.001 vs. control; ^b*P*<0.01 vs. control; ^d*P*<0.001 vs. EAE; ^e*P*<0.01 vs. EAE; ^f*P*<0.001 vs. EAE+EVOO. (B) Effects of MOG, EVOO, HT, and OA on Oxidative Stress Biomarkers in Blood: Mean±Standard Deviation in blood for glutathione peroxidase (GPx; nmol/mg hemoglobin) and PC (nmol/mg hemoglobin) in the different treatment groups: Control, EAE, EAE+Extra Virgin Olive Oil (EAE+EVOO), EAE+HT, and EAE+OA. MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; EAE=experimental autoimmune encephalomyelitis. ^a*P*<0.001 vs. control; ^b*P*<0.001 vs. EAE; ^c*P*<0.05 vs. EAE; ^d*P*<0.01 vs. EAE+EVOO. (C) Effects of MOG, EVOO, HT, and OA on LPO in Blood: Mean±Standard Deviation in blood for lipid peroxidation products (LPO; nmol/mg hemoglobin) in the different treatment groups: Control, EAE, EAE+Extra Virgin Olive Oil (EAE+EVOO), EAE+HT, and EAE+OA. MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein; EAE=experimental autoimmune encephalomyelitis. ^a*P*<0.001 vs. control; ^d*P*<0.001 vs. EAE.



^d*P*<0.001 vs. EAE; ^e*P*<0.001 vs. EAE+EVOO.

vs. control;

HT, and OA significantly reduced NF-kBp065 and NO compared to the EAE group, TFN- α was only significantly diminished with respect to the EAE group with the use of EVOO and OA (Table 2).

Significant positive correlations were established for LPS and LBP with PC ($P < 0.001$), LPO ($P < 0.001$), and clinical score at 14–score at 65 days ($P < 0.01$). Significant and positive correlations were also established between the inflammation factors (TFN- α , NF-kBp065, and NO) and LPO, PC, LPS, LBP, and the clinical score.

Discussion

Some epidemiologic studies attribute beneficial and neuroprotective properties to the Mediterranean diet in the lesser prevalence of MS.^{10,18} In fact, the scientific literature on the Mediterranean diet suggests that olive oil, with its high levels of monounsaturated fatty acids (MUFA) and phenolic compounds, plays a role in the prevention or improvement of diseases, among which are: fatty liver,¹⁵ inflammatory bowel diseases,¹¹ Type I-Diabetes,²⁷ cardiovascular diseases,^{28,29} several types of cancer,^{29,30} and even neurodegenerative diseases like Huntington's^{16,31} or Alzheimer's.³² However, up until now, the antioxidant and anti-inflammatory properties of olive oil, along with several of their compounds, had not been evaluated in EAE, the MS model.

ROS/reactive nitrogen species have a relevant function in MS pathogenesis.^{3,33–36} Dysregulation of glutathione homeostasis and alterations in glutathione-dependent enzyme activities are implicated in the induction and progression of MS.^{3,6}

GSH is one of the most important agents of the endogenous antioxidant defense system.^{6,16} GPx,^{37,38} is an enzyme which uses GSH to reduce water-producing hydroperoxides and GSSG (an oxidized form of glutathione). However, LPO and PC are the products resulting from oxidative stress representing lipid stress and protein stress, respectively, in the tissues.^{3,16}

Our paper shows that the LPO and PC levels were reduced with the use of the three treatments (EVOO, HT, and OA), in the three tissues studied (brain, spinal cord, and blood), which demonstrates the antioxidant power of EVOO and its principal ingredients. This was also corroborated by the significant increase in GPx in the EAE+EVOO; EAE+OA; and EAE+HT groups with respect to the EAE group, in brain, spinal cord, and blood. The anti-inflammatory power of EVOO was demonstrated by a reduction in the levels of the anti-inflammatory factors TFN- α , NF-kBp065, and NO in brain, spinal cord, and blood with respect to the EAE group.

In agreement with previous reports, the potentially beneficial effect of EVOO is mediated by different pathways^{39,40} and especially: (1) despite its antioxidant

capacity, especially that of its phenolic compounds; (2) through stimulation of the Nrf2 factor in the nucleus with subsequent stimulation of the system of phase 2 cytoprotective antioxidant proteins; and (3) by influencing biogenesis, inducing better mitochondrial visibility (increasing protein expression of mitochondrial transcription factor A, uncoupling protein 2 and mitochondrial complexes) and the subsequent production of ATP.

In consideration of the beneficial effects of EVOO, HT was evaluated and obtained similar results to those presented by the former. HT is considered to be one of the most abundant and representative phenolic alcohols in olive oil.^{41–43} Kitsati *et al.*⁴³ suggested that the protective effects exerted by HT against oxidative stress-induced cell damage are linked to their ability to influence changes in the intracellular labile iron homeostasis. A strong correlation was observed between the ability of HT to mitigate intracellular labile iron level and the protection offered against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis.⁴³ It has been suggested that HT can act as a scavenger of reactive free radicals and thus protect cells under oxidative stress conditions.^{43–47} Moreover, it can induce the expression of antioxidant enzymes via Nrf2 translocation^{43,48–51} and it reduces expression of cell adhesion molecules.^{43,52}

Finally, MUFAs (such as OA) have been associated with greater longevity and a high degree of protection against an age-related cognitive decline in humans.²⁹ Recent findings have shown that high intakes of MUFA and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) may protect against Alzheimer's disease, whereas the intake of saturated or trans-unsaturated fats could increase disease risk.⁵³ Also, in the Rotterdam Study, after an average follow-up period of 6.0 years of intakes of total fat, MUFA, and PUFA were significantly associated with a lower risk of Parkinson's disease.⁵⁴ In fact, high MUFA intake has been significantly associated with a better cognitive performance over time. Quiles *et al.*²⁹ accumulated a good deal of evidence on the effectiveness of dietary virgin olive oil in strengthening membranes by increasing their resistance to free radical-induced modification. This may be due to EVOO consumption thus being a key component of successful dietary manipulations aimed at partially modifying the structure, and, consequently, the features, of biological membranes in the daily struggle against free radicals and oxidative stress-induced damage.

In our work, it was also shown that there was a positive correlation between the microbiota products (LPS and LBP) and the oxidative stress in the EAE. The latter increased the LPS and LBP levels. This could reinforce the hypothesis established by Escribano *et al.*³ that changes in bacterial flora gut could

C. Conde et al. The protective effect of extra-virgin olive oil

trigger the onset of subacute inflammation due to the migration of the microbiota products LPS and LBP through an increase in gut permeability toward the CNS and other organic tissues. This process would entail the presence of systemic oxidative damage, which would produce peripheric activation of the immune system. LPS upregulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1, and changes in the expression of these molecules promote cerebral vascular inflammation, blood-brain barrier disruption, and vasogenic edema.^{55–57} All this would facilitate the transmigration of white cells to the CNS and the appearance of the neuroinflammatory phenomenon. The latter could be reversed by the use of EVOO, OA, and HT since, in our study, the consumption of those products reduced LPS and LBP levels and, at the same time, oxidative stress and inflammatory factors (TFN- α , NF-kBp065, and NO) and all these parameters were correlated with each other.

It is of interest to note that now this study could have a series of weaknesses such as the impossibility of demonstrating the gut-dysbiosis of the microbiota and the increased intestinal and hematoencephalic barrier permeability in the EAE-rat, but it could be a future perspective in other experiments. Similarly, it would be important to carry out some clinical studies to corroborate the same phenomena in patients with neuroinflammatory processes, especially those with MS, in order to verify the repetition of the facts reported in this study in the EAE model, in MS patients, and enable the establishment of target mechanisms with them in neurodegenerative phenomena.

Conclusions

In summary, these results agree with previous findings in other neurodegenerative disorders, showing the anti-inflammatory and antioxidant effects of EVOO, OA, and HT. Gastric administration of EVOO, OA, and HT reduces the degree of lipid and protein oxidation, and increases GPx, making it a natural mechanism for enhancing protection against oxidative damage, at the same time as reducing the negative power of the microbiota products (LPS and LBP) in the neuroinflammation in EAE rats.

All the above strengthens the role of the Mediterranean diet in the maintenance of human health by preventing oxidative stress-related diseases, the latter being exemplified in the results obtained with one of its basic compounds, olive oil and its principal constituents. This paper has demonstrated that EVOO has been fundamental in the neuroprotection exerted against EAE due to the relevance of its use in the reversal of the oxidative and inflammatory effects caused by the disease. Likewise, it reinforces the recommendability of nutritional intervention

studies in patients with MS in order to be able to establish the role of EVOO and its constituents, OA and HT, at least with a view to a possible slowing-down of the disease's evolution.

Acknowledgements

The working group wishes to express its gratitude to D. Badder for her assistance with the editing of the work.

Disclaimer statements

Contributors None.

Funding This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflicts of interest None.

Ethics approval None.

ORCID

C. Conde  <http://orcid.org/0000-0003-3633-1146>

References

- McQualter JL, Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem* 2007;100(2):295–306.
- Perez-Nievas BG, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Leza JC. Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: mechanisms implicated. *J Neuroinflammation* 2010;7:7–60. doi:10.1186/1742-2094-7-60
- Escribano BM, Medina-Fernández FJ, Aguilar-Luque M, Agüera E, Feijoo M, García-Maceira FI, Lillo R, Viegara-Reyes P, Giraldo AI, Luque E, Drucker-Colín R, Túnez I. Lipopolysaccharide binding protein and oxidative stress in a multiple sclerosis model. *Neurotherapeutics* 2017;14(1):199–211. doi:10.1007/s13311-016-0480-0
- Van Horsen J, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(2):141–50. doi:10.1016/j.bbdis.2010.06.011
- Das UN. Is multiple sclerosis a proresolution deficiency disorder? *Nutrition* 2012;28(10):951–8. doi:10.1016/j.nut.2011.12.016
- Sorto-Gomez TE, Ortiz GG, Pacheco-Moises FP, Torres-Sanchez ED, Ramirez-Ramirez V, Macias-Islas MA, De La Rosa AC, Velázquez-Brizuela IE. Effect of fish oil on glutathione redox system in multiple sclerosis. *Am J Neurodegener Dis* 2016;5(2):145–51.
- Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Ditrío LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, Kasper LH. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009;183(10):6041–50. doi:10.4049/jimmunol.0900747
- Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Haque-Begum S, Kasper LLH. Induction of a regulatory B cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora. *Gut Microbes* 2010;1:103–8.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(33):14691–6. doi:10.1073/pnas.1005963107
- Berer K, Krishnamoorthy G. Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol* 2012;123(5):639–51. doi:10.1007/s00401-012-0949-9
- Tomasello G, Mazzola M, Leone A, Sinagra E, Zummo G, Farina F, Damiani P, Cappello F, GergesGeagea A, Jurjus A, Bou Assi T, Messina M, Carini F. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ*

- Palacky Olomouc Czech Repub 2016;160(4):461–66. doi:10.5507/bp.2016.052
- 12 Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Begum-Haque S, Kasper LH. Gut, bugs, and brain: role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease. *Ann Neurol* 2011;69(2):240–7. doi:10.1002/ana.22344
 - 13 Wekerle H, Berer K, Krishnamoorthy G. Remote control-triggering of brain autoimmune disease in the gut. *Curr Opin Immunol* 2013;25(6):683–9. doi:10.1016/j.coi.2013.09.009
 - 14 Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci* 2010;11(2):458–79. doi:10.3390/ijms11020458
 - 15 Lama A, Pirozzi C, Mollica MP, Trinchese G, Di Guida F, Cavaliere G, Calignano A, Raso GM, Canani RB, Meli R. Polyphenol-rich virgin olive oil reduces insulin resistance and liver inflammation and improves mitochondrial dysfunction in high fat diet fed rats. *Mol Nutr Food Res* 2017;61(3):1600418. doi:10.1002/mnfr.201600418
 - 16 Tasset I, Pontes AJ, Hinojosa AJ, De La Torre R, Túniz I. Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced huntington's disease-like rat model. *Nutr Neurosci* 2011;14(3):106–11. doi:10.1179/1476830511Y.0000000005
 - 17 Stosic-Grujicic S, Ramic Z, Bumbasirevic V, Harhaji L, Mostarica-Stojkovic M. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clin Exp Immunol* 2004;136(1):49–55.
 - 18 Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun* 2014;38:1–12. doi:10.1016/j.bbi.2013.12.015
 - 19 Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. Rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. *Science* 1946;104(2703):362–3.
 - 20 Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939–51.
 - 21 Diaz RJ, Yago MD, Martínez-Victoria E, Naranjo JA, Martínez MA, Mañas M. Comparison of the effects of dietary sunflower oil and virgin oil on rat exocrine pancreatic secretion in vivo. *Lipids* 2003;38(11):1119–26.
 - 22 Yago MD, Diaz RJ, Ramirez R, Martínez MA, Mañas M, Martínez-Victoria E. Dietary-induced changes in the fatty acid profile of rat pancreatic membranes are associated with modifications in acinar cell function and signalling. *Br J Nutr* 2004;91(2):227–34. doi:10.1079/BJN20031044
 - 23 Fki I, Sahnoun Z, Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem* 2007;55(3):624–31. doi:10.1021/jf0623586
 - 24 Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114–21.
 - 25 Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464–78.
 - 26 Ricart-Jane D, Llobera M, Lopez-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 2002;6(2):178–85.
 - 27 Cano-Europa E, Ortiz-Butron R, Camargo EM, Esteves-Carmona MM, Oliart-Ros RM, Blas-Valdivia V, Franco-Colin M. A canola oil-supplemented diet prevents type I Diabetes-Caused Lipotoxicity and renal dysfunction in a rat model. *J Med Food* 2016;19(11):1041–47.
 - 28 Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 1970;41:201–11.
 - 29 Quiles JL, Barja G, Battino M, Mataix J, Solfrizzi V. Role of olive oil and monounsaturated fatty acids in mitochondrial oxidative stress and aging. *Nutr Rev* 2006;64:S31–9. doi:10.1111/j.1753-4887.2006.tb00261.x
 - 30 Stoneham M, Goldacre M, Scagroatt V, Gill L. Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J Epidemiol Community Health* 2000;54(10):756–60.
 - 31 Sampaio Ferreira DA, Santamaria A, Escibano BM, Luque E, Túniz I. Olive Oil and huntington's disease. In: Diet and nutrition in dementia and cognitive decline; CR Martin, VR Preedy (Eds). London: Elsevier Inc. 2015; pp. 719–32.
 - 32 Fernández-Fernández L, Solé M, Bolea I, Valente T, Serrano JCE, Jové M, Ramirez B, Anglés N, Reguán J, Morelló JR, Pamplona R, Portero-Otin M, Unzeta M. The antioxidant effect of LMN diet, rich in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, in Alzheimer's disease. In: Diet and nutrition in dementia and cognitive decline; CR Martin, VR Preedy (Eds), London: Elsevier Inc. 2015; pp. 847–58.
 - 33 Melamed L, Golan D, Luboshitzky R, Lavi I, Miller A. Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2012;314(1–2):37–40. doi:10.1016/j.jns.2011.11.003
 - 34 Miller E, Walczak A, Saluk J, Ponczek MB, Majsterek, I. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Biochem* 2012;45(1–2):26–30. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.09.021
 - 35 Tasset I, Aguera E, Gascon F, Giraldo AI, Salcedo M, Cruz AH, Sanchez F, Túniz I. Natalizumab and reduction of carbonylated proteins in patients with multiple sclerosis. *Rev Neurol* 2012;54(8):449–52.
 - 36 Bahamonde C, Conde C, Agüera E, Lillo R, Luque E, Gascón F, Feijóo M, Cruz AH, Sánchez-López F, Túniz I. Elevated melatonin levels in natalizumab-treated female patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship to oxidative stress. *Eur J Pharmacol*. 2014;730:26–30. doi:10.1016/j.ejphar.2014.02.020
 - 37 Kirschvink N, De Moffarts M, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J* 2008;177(2):178–91.
 - 38 Escibano BM, Túniz I, Requena F, Rubio MD, De Miguel R, Montilla P, Tovar P, Agüera EI. Effects of an aerobic training program on oxidative stress biomarkers in bulls. *Vet Med (Praha)* 2010;55:422–8.
 - 39 Konstantinidou V, Covas MI, Muñoz-Aguayo D, Khymenets O, de la Torre R, Saez G, Tormos MC, Toledo E, Marti A, Ruiz-Gutiérrez V, Ruiz Mendez MV, Fito M. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the fatty acid of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *FASEB J* 2010;24(7):2546–57. doi:10.1096/fj.09-148452
 - 40 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 system in retinal pigment epithelial cells. *J Nutr Biochem* 2010;21(11):1089–98. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.09.006
 - 41 Blekas G, Vassilakis C, Harizanis C, Tsimidou M, Boskou DG. Biophenols in table olives. *J Agric Food Chem* 2002;50(13):3688–92.
 - 42 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(4):191–206. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x
 - 43 Kitsati N, Mantzaris MD, Galaris D. Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biol* 2016;10:233–42. doi:10.1016/j.redox.2016.10.006
 - 44 Hashimoto T, Ibi M, Matsuno K, Nakashima S, Tanigawa T, Yoshikawa T, Yabe-Nishimura C. An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radic Biol Med* 2004;36:555–64.
 - 45 Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tertbutyl hydroperoxide. *Eur J Nutr* 2007;46(2):70–8.
 - 46 Rietjens SJ, Bast A, Haenen GR. New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem* 2007;55(18):7609–14.
 - 47 Schaffer S, Muller WE, Eckert GP. Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res* 2010;62(4):322–7. doi:10.1016/j.phrs.2010.06.004
 - 48 Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 2004;37(4):433–41.
 - 49 Martín MA, Ramos S, Granado-Serrano AB, Rodríguez-Ramiro I, Trujillo M, Bravo L, Goya L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxifying enzymes and Nrf2 translocation by extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res* 2010;54(7):956–66. doi:10.1002/mnfr.200900159
 - 50 Zrelli H, Matsuoka M, Kitazaki S, Araki M, Kusunoki M, Zarrouk M, Miyazaki H. Hydroxytyrosol induces proliferation and cytoprotection against oxidative injury in vascular endothelial cells: role of Nrf2 activation and HO-1 induction. *J Agric Food Chem* 2011;59(9):4473–82. doi:10.1021/jf104151d

C. Conde et al. The protective effect of extra-virgin olive oil

- 51 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(8):994–1006. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.05.006
- 52 Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, D'Amico 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(4):H2344–54.
- 53 Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Schneider J, Wilson RS. Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003;60(2):194–200.
- 54 De Lau ML, Bornebroek M, Witteman JCM, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: The Rotterdam Study. *Neurology* 2005;64(12):2040–5.
- 55 Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 2002;128(1–2):58–68.
- 56 Riccio P. The molecular basis of nutritional intervention in multiple sclerosis: a narrative review. *Complement Ther Med* 2011;19(4):228–37. doi:10.1016/j.ctim.2011.06.006
- 57 Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(Suppl 1):4615–22. doi:10.1073/pnas.1000082107



Article

Extra-Virgin Olive Oil Modifies the Changes Induced in Non-Nervous Organs and Tissues by Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Models

Cristina Conde ^{1,2,†}, Begoña M. Escribano ^{1,3,*,†}, Evelio Luque ^{1,4}, Montserrat Feijóo ^{1,5}, Javier Caballero-Villarraso ^{1,6,7}, Manuel E. Valdelvira ¹, Juan J. Ochoa-Sepúlveda ^{1,2}, Rafael Lillo ^{1,8}, Elier Paz ⁹, Abel Santamaría ¹⁰, Eduardo Agüera ^{1,2}  and Isaac Túnez ^{1,7,11,*}

¹ Instituto Maimonides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBC), Av. Menendez Pidal, 14004 Cordoba, Spain; cristinaconde84@gmail.com (C.C.); cm1lucae@uco.es (E.L.); monfey@hotmail.com (M.F.); bc2cavij@uco.es (J.C.-V.); mevaldelviradiaz@gmail.com (M.E.V.); ochoasepulveda@gmail.com (J.J.O.-S.); mdlilior@uco.es (R.L.); doctoredu@gmail.com (E.A.)

² Servicio de Neurología, Hospital Universitario Reina Sofía, 14004 Cordoba, Spain

³ Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba Campus of Rabanales, 14071 Cordoba, Spain

⁴ Departamento de Ciencias Morfológicas, Sección de Histología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad de Córdoba, 14004 Cordoba, Spain

⁵ Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad de Córdoba, 14004 Cordoba, Spain

⁶ Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Reina Sofía, 14004 Cordoba, Spain

⁷ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad de Córdoba, Av. Menendez Pidal, 14004 Cordoba, Spain

⁸ Departamento de Ciencias Socio-sanitarias u Radiología y Medicina Física, Sección de Psiquiatría, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad de Córdoba, 14004 Cordoba, Spain

⁹ Canvax Biotech S.L., 14014 Cordoba, Spain; e.paz@canvaxbiotech.com

¹⁰ Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City 14269, Mexico; absada@yahoo.com

¹¹ Cooperative Research Thematic Excellent Network on Brain Stimulation (REDESTIM), Ministry for Economy, Industry and Competitiveness, 28046 Madrid, Spain

* Correspondence: am1esdub@uco.es (B.M.E.); fm2tufi@uco.es (I.T.)

† The two authors contributed equally for the manuscript.

Received: 15 September 2019; Accepted: 10 October 2019; Published: 14 October 2019



Abstract: This study reveals the existence of oxidative stress (reactive oxygen species (ROS)) in non-nervous organs and tissues in multiple sclerosis (MS) by means of a model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rats. This model reproduces a similar situation to MS, as well as its relationship with intestinal microbiota starting from the changes in bacterial lipopolysaccharide levels (LPS) in the outer wall of the gram-negative bacteria. Finally, the administration of extra-virgin olive oil (EVOO), hydroxytyrosol (HT), and oleic acid (OA) exert beneficial effects. Twenty-five Dark Agouti two-month-old male rats, weighing around 190 g, were distributed into the following groups: Control, EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis group), EAE + EVOO, EAE + HT, and EAE + OA. The glutathione redox system with the EAE was measured in heart, kidney, liver, and small and large intestines. The LPS and the correlation with oxidative stress in the small and large intestines were also investigated. The results showed that (1) the oxidative damage in the EAE model affects non-nervous organs and tissues; (2) The LPS is related to inflammatory phenomena and oxidative stress in the intestinal tissue and in other organs; (3) The administration of EVOO, HT, and OA reduces the LPS levels at the same time as minimizing the oxidative damage; (4) EVOO, HT, and OA improve the disease's clinical score; and (5) on balance, EVOO offers a better neuroprotective effect.

In view of these antecedents, the main objective of this study was to establish the fact that the EAE model, which reproduces a similar clinical picture to RR-MS, triggers effects in extra-nervous organs and tissues, and our secondary objectives were (1) to analyze the effects of EVOO and two of its components, HT and OA, on the organs studied during the course of the EAE; (2) to verify if the LPS, a reflection of the intestinal microbiota status, is correlated with EAE oxidative stress and whether it could be responsible for the oxidative damage in organs different from the CNS, and (3) to prove if EVOO, HT, and OA modify the microbial LPS levels.

2. Material and Methods

2.1. Animals

On the basis of the guidelines of the Directive of 24 November 1986 (86/609/ECC) approved by the European Communities Council and RD 53/2013 (BOE, 8 February, 2013), the Bioethics Committee approved the protocols (number project 07/11/2018/157).

A total of 25 Dark Agouti male rats (2 months old, weighing around 190 g) from the Animal Experimentation Center (Córdoba University) were used. All of them were housed under standard colony conditions: 12:12 light/darkness cycle (lights on at 07:00), controlled room temperature (22 ± 2 °C), with free access to food and water.

2.2. Experimental Protocol

On the basis of previous studies [25], this study included the following study groups ($n = 5$ animals per group): control group (not manipulated); EAE group; EAE + extra-virgin olive oil (EVOO); EAE + hydroxytyrosol group (HT); and EAE + oleic acid group (OA).

EAE induction was performed by injecting subcutaneously, at the dorsal base of the tail, 100 μ L of a solution containing 150 μ g of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) (fragment 35–55; Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) in phosphate buffered saline (PBS) emulsified 1:1 in complete Freund's adjuvant (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, MO, USA) completed with 400 μ g of heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, DIFCO, Detroit, MI, USA); dietary treatments began 14 days after injection.

The EVOO used in the present work was “Los Montes de Luque” gifted by Almazara de Luque S.C.A. (Olivarera Nuestra Señora del Rosario®, D.O.P. Baena; Luque, Cordoba, Spain). This EVOO (900 kcal/3389 KJ for a bottle of 5 L) is an own-label oil of Albenzaide EVOO D.O.P (Almazara de Luque S.C.A. at the above address). HT was purchased from Seprox Biotech S.L. (Madrid, Spain) and OA from Merck (Darmstadt, Germany). In the group given EVOO, the latter represented 10% of their calorie intake (in terms of weight) [25] in the total standard daily diet of rats AIN-93G [37], while OA (the acidity of the EVOO was of 0.17% OA/0.5 L EVOO) corresponded to 4% of the calorie intake. Both EVOO and OA were dietary substitutes. The HT group received 2.5 mg/kg body weight [25]. EVOO, OA, and HT were administered for 51 days with a gastric catheter. The administration started after 14 days, in other words, after the induction of EAE and the first evaluation of the scores.

2.3. Sample Preparation and Study

At 65 days, the animals were sacrificed by decapitation, having been previously anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine 75 mg/kg (Imalgene® 100 mg/mL, Merial Laboratorios).

Then, and under controlled temperature conditions, the heart, liver, kidney, and small and large intestines were extracted and weighed to immediately prepare the corresponding homogenates with a mechanical homogenizer (Tempest Virtis). The samples were homogenized in Tris (20 mM) at pH 7.4.

The analyses were performed in duplicate. Oxidative damage biomarkers in heart, liver, kidney, and small and large intestines were all analyzed by spectrophotometry with Bioxytech S.A. reagents (Oxis International; Portland, OR, USA) and with a Shimadzu spectrophotometer (UV 1603; Kyoto, Japan). The monitored biomarkers included lipid peroxidation products (LPO; nmol/mg protein) and those from the glutathione redox system: total glutathione (tG; nmol/mg protein), reduced glutathione (GSH; nmol/mg protein) and oxidized glutathione (GSSG; nmol/mg protein). For the determination of the glutathione peroxidase (GPx; nmol/mg protein), the Flohé and Gunzler [38] method was used. Carbonylated proteins (CP) were measured (nmol/g protein) using the Levine et al. [39] method. The GSH/GSSG ratio was also found.

LPS was assessed using the Pierce data are expressed as endotoxin units/mg protein. LBP assessment was performed using the Elisa Kit soluble LBP (Enzo®, Enzo Life Sciences (ELS), NY, USA). The amount of LBP was measured in an Elisa reader. The values are presented as pg/mg protein.

2.4. Clinical Score Evaluation

The animals were monitored at 14 and 65 days and scored in accordance with the following severity scale: (0) no signs, (1) tail paralysis, (2) weakness in hind legs, (3) paralysis in hind legs, (4) paralysis in hind legs and weakness in front legs, and (5) quadriplegic [25,40]. The difference (increase) between the score at 65 days and the score at 14 days was established.

2.5. Statistics

The statistical study was performed with the SPSS application (SPSS INC. Version 15 for Windows, Armonk, NY, USA). The data were expressed as mean \pm SD. All groups showed a normal distribution so that a one-way ANOVA corrected with Bonferroni's post-hoc test was used. The Pearson correlation coefficient was applied to assess the relationship between LPS and LBP with LPO and CP in the small and large intestines. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Oxidative Stress in Different Body Organs

In the heart, with EAE, tG and GPx increased ($p < 0.001$) while in the kidney, the GSH and GSSG diminished ($p < 0.001$) with respect to the control (Table 1). In EAE, CP ($p < 0.001$) and LPO ($p < 0.001$) significantly increased in the heart, kidney, and liver (Table 2).

In the small intestine, EAE produced a significant decline ($p < 0.001$) in the tG, GSH, and GSSG (Figure 1A), whereas in the large intestine, on the contrary, there was a significant increase ($p < 0.001$) in them, together with a significant decrease in the GPx ($p < 0.001$) (Figure 1B). In both intestines, the GSH/GSSG ratio significantly decreased (Figure 2) and LPO and CP were significantly increased (Figure 3A,B).

Table 1. Glutathione redox system in the heart, kidney, and liver.

Glutathione Redox System						
Heart						
	tG (nmol/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	CSSG (nmol/mg protein)	GSH/CSSG	GPx (nmol/mg protein)	
Control	0.01086 ± 0.00019	0.00580 ± 0.00031	0.00506 ± 0.00031	1.152 ± 0.308	0.01326 ± 0.02017	
EAE	0.01180 ± 0.00074 ^a	0.00597 ± 0.00035	0.00583 ± 0.00105	1.062 ± 0.235	0.11050 ± 0.02344 ^a	
EAE + EVOO	0.01088 ± 0.00057 ^d	0.00804 ± 0.00112 ^d	0.00283 ± 0.00075 ^d	3.069 ± 1.000 ^d	0.03539 ± 0.02955 ^d	
EAE + HT	0.00377 ± 0.00025 ^{d,g}	0.00166 ± 0.00005 ^{d,g}	0.00211 ± 0.00029 ^d	0.802 ± 0.386 ^g	0.00616 ± 0.00126 ^{d,g}	
EAE + OA	0.02201 ± 0.00131 ^{d,g}	0.00609 ± 0.000215 ^g	0.01592 ± 0.00121 ^{d,g}	0.391 ± 0.552 ^{d,g}	0.01283 ± 0.00190 ^{d,g}	
Kidney						
	tG (nmol/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	CSSG (nmol/mg protein)	GSH/CSSG	GPx (nmol/mg protein)	
Control	0.01827 ± 0.00015	0.00618 ± 0.00089	0.01209 ± 0.00095	0.518 ± 0.240	0.04728 ± 0.00149	
EAE	0.01170 ± 0.00047	0.00473 ± 0.00128 ^a	0.00698 ± 0.00152 ^a	0.737 ± 0.137	0.04170 ± 0.01636	
EAE + EVOO	0.01135 ± 0.00061	0.00866 ± 0.00057 ^d	0.00270 ± 0.00097 ^d	3.000 ± 1.000 ^d	0.05123 ± 0.02927	
EAE + HT	0.00305 ± 0.00059	0.00106 ± 0.00032 ^{d,g}	0.00199 ± 0.00033 ^d	0.533 ± 0.230 ^g	0.05620 ± 0.02231	
EAE + OA	0.01970 ± 0.00161	0.00749 ± 0.00073 ^{d,g}	0.01221 ± 0.00136 ^{d,g}	0.619 ± 0.087 ^g	0.05642 ± 0.02262	
Liver						
	tG (nmol/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	CSSG (nmol/mg protein)	GSH/CSSG	GPx (nmol/mg protein)	
Control	0.01078 ± 0.00025	0.00773 ± 0.00128	0.00305 ± 0.00123	3.000 ± 2.000	0.09980 ± 0.00756	
EAE	0.03050 ± 0.004167	0.00470 ± 0.00039	0.02580 ± 0.004174	0.868 ± 0.343	0.03595 ± 0.02465	
EAE + EVOO	0.01121 ± 0.00031	0.03236 ± 0.04630	0.02116 ± 0.04628	5.000 ± 7.081 ^d	0.08238 ± 0.01286	
EAE + HT	0.00473 ± 0.00048 ^d	0.00154 ± 0.00019 ^{d,g}	0.00319 ± 0.00052	0.494 ± 0.240 ^g	0.19775 ± 0.05116	
EAE + OA	0.02200 ± 0.00049	0.00782 ± 0.00034 ^g	0.01418 ± 0.00066	0.553 ± 0.047 ^g	0.26600 ± 0.07108	

Total glutathione (tG; nmol/mg protein), reduced glutathione (GSH; nmol/mg protein), and oxidized glutathione (CSSG; nmol/mg protein); glutathione peroxidase (GPx; nmol/mg protein) and GSH/CSSG ratio, in the following study groups: control group (not manipulated); EAE group (experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)); EAE + extra-virgin olive oil (EVOO); EAE + hydroxytyrosol group (HT); and EAE + oleic acid group (OA). ^a $p < 0.001$ EAE vs. control; ^d $p < 0.001$ vs. EAE; ^g $p < 0.001$ vs. EAE + EVOO.

Table 2. Oxidative stress products in the heart, kidney, and liver.

Oxidative Stress Products		
Heart		
	LPO (nmol/mg protein)	CP (nmol/g protein)
Control	0.11158 ± 0.02087	0.03420 ± 0.00388
EAE	0.41875 ± 0.00000 ^a	0.41875 ± 0.02344 ^a
EAE + EVOO	0.09625 ± 0.02918 ^d	0.02249 ± 0.00986 ^d
EAE + HT	0.00769 ± 0.00065 ^d	0.00616 ± 0.00126 ^{d,g}
EAE + OA	0.02064 ± 0.00496 ^{d,g}	0.01283 ± 0.00190 ^d
Kidney		
	LPO (nmol/mg protein)	CP (nmol/g protein)
Control	0.19280 ± 0.03422	0.00743 ± 0.00112
EAE	0.45750 ± 0.01063 ^a	0.08493 ± 0.02702 ^a
EAE + EVOO	0.08875 ± 0.01001 ^d	0.02920 ± 0.01707 ^d
EAE + HT	0.00683 ± 0.00111 ^{d,g}	0.00326 ± 0.00039 ^d
EAE + OA	0.01867 ± 0.00159 ^{d,g}	0.01989 ± 0.00181 ^d
Liver		
	LPO (nmol/mg protein)	CP (nmol/g protein)
Control	0.11140 ± 0.02013	0.01076 ± 0.00220
EAE	0.40250 ± 0.07214 ^a	0.09568 ± 0.02642 ^a
EAE + EVOO	0.10663 ± 0.00616 ^f	0.03815 ± 0.01375 ^d
EAE + HT	0.00826 ± 0.00189 ^{d,g}	0.00660 ± 0.00083 ^{d,h}
EAE + OA	0.02768 ± 0.00533 ^{d,g}	0.03332 ± 0.00207 ^d

Lipid peroxidation products (LPO; nmol/mg protein) and carbonylated proteins (CP; nmol/g protein) in the following study groups: control group (not manipulated); EAE group (experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)); EAE + extra-virgin olive oil (EVOO); EAE + hydroxytirosol group (HT); and EAE + oleic acid group (OA). ^a $p < 0.001$ EAE vs. control; ^d $p < 0.001$ vs. EAE; ^f $p < 0.05$ vs. EAE; ^g $p < 0.001$ vs. EAE + EVOO; ^h $p < 0.01$ vs. EAE + EVOO.

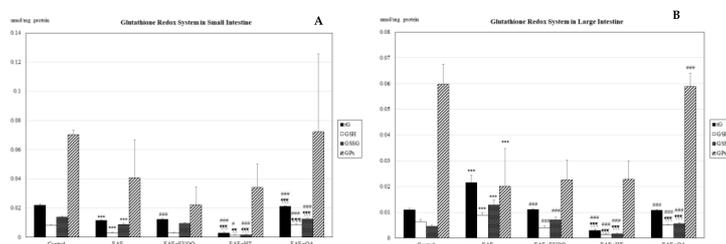


Figure 1. Glutathione redox system in the small intestine (A) and large intestine (B): total glutathione (tG; nmol/mg protein), reduced glutathione (GSH; nmol/mg protein), oxidized glutathione (GSSG; nmol/mg protein), and glutathione peroxidase (GPx; nmol/mg protein) in the following study groups: control group (not manipulated); EAE group (experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)); EAE + extra-virgin olive oil (EVOO); EAE + hydroxytirosol group (HT); and EAE + oleic acid group (OA). *** $p < 0.001$ vs. control; # $p < 0.05$ vs. EAE; ### $p < 0.001$ vs. EAE; ¶¶ $p < 0.01$ vs. EAE + EVOO; ¶¶¶ $p < 0.001$ vs. EAE + EVOO.

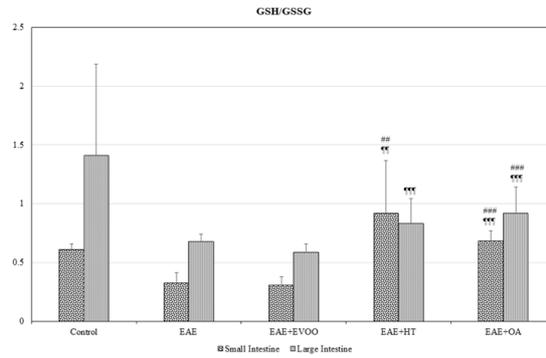


Figure 2. GSH/GSSG ratio in small and large intestine: reduced glutathione/oxidized glutathione ratio in the following study groups: control group (not manipulated); EAE group (experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)); EAE + extra-virgin olive oil (EVOO); EAE + hydroxytirosol group (HT); and EAE + oleic acid group (OA). ## <math>p < 0.01</math> vs. EAE; ### <math>p < 0.001</math> vs. EAE; #### <math>p < 0.0001</math> vs. EAE; ##### <math>p < 0.00001</math> vs. EAE; EVOO: # <math>p < 0.05</math> vs. EAE; EVOO: ## <math>p < 0.01</math> vs. EAE; EVOO: ### <math>p < 0.001</math> vs. EAE; EVOO: #### <math>p < 0.0001</math> vs. EAE; EVOO: ##### <math>p < 0.00001</math> vs. EAE; HT: # <math>p < 0.05</math> vs. EAE; HT: ## <math>p < 0.01</math> vs. EAE; HT: ### <math>p < 0.001</math> vs. EAE; HT: #### <math>p < 0.0001</math> vs. EAE; HT: ##### <math>p < 0.00001</math> vs. EAE; HT; OA: # <math>p < 0.05</math> vs. EAE; OA: ## <math>p < 0.01</math> vs. EAE; OA: ### <math>p < 0.001</math> vs. EAE; OA: #### <math>p < 0.0001</math> vs. EAE; OA: ##### <math>p < 0.00001</math> vs. EAE; OA.

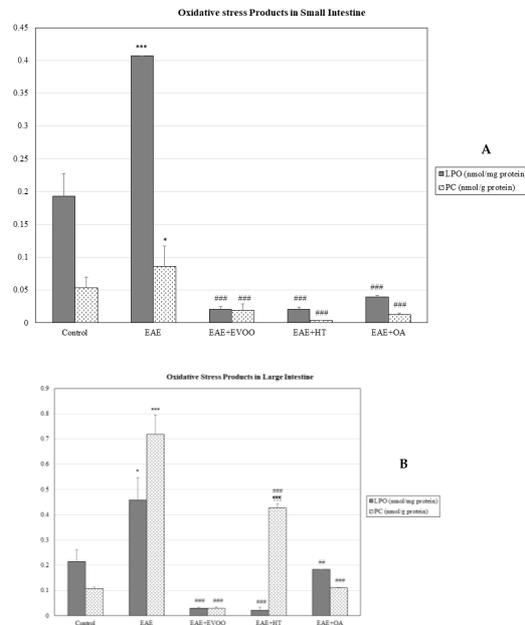


Figure 3. Oxidative stress products in the small intestine (A) and large intestine (B): lipid peroxidation products (LPO; nmol/mg protein) and carbonylated proteins (CP; nmol/g protein) in the following study groups: control group (not manipulated); EAE group (experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)); EAE + extra-virgin olive oil (EVOO); EAE + hydroxytirosol group (HT); and EAE + oleic acid group (OA). * $p < 0.05$ vs. control; *** $p < 0.001$ vs. control; ## <math>p < 0.01</math> vs. EAE; ### <math>p < 0.001</math> vs. EAE; #### <math>p < 0.0001</math> vs. EAE; ##### <math>p < 0.00001</math> vs. EAE; EVOO: # <math>p < 0.05</math> vs. EAE; EVOO: ## <math>p < 0.01</math> vs. EAE; EVOO: ### <math>p < 0.001</math> vs. EAE; EVOO: #### <math>p < 0.0001</math> vs. EAE; EVOO: ##### <math>p < 0.00001</math> vs. EAE; HT: # <math>p < 0.05</math> vs. EAE; HT: ## <math>p < 0.01</math> vs. EAE; HT: ### <math>p < 0.001</math> vs. EAE; HT: #### <math>p < 0.0001</math> vs. EAE; HT: ##### <math>p < 0.00001</math> vs. EAE; HT; OA: # <math>p < 0.05</math> vs. EAE; OA: ## <math>p < 0.01</math> vs. EAE; OA: ### <math>p < 0.001</math> vs. EAE; OA: #### <math>p < 0.0001</math> vs. EAE; OA: ##### <math>p < 0.00001</math> vs. EAE; OA.

3.2. EVOO, HT, and OA against the Oxidative Stress of EAE

In the small intestine, the EVOO produced a significant increase in tG ($p < 0.001$) with respect to the EAE, whereas OA significantly augmented not only tG ($p < 0.001$), but also GSH ($p < 0.001$) and GSSG ($p < 0.001$) with respect to EAE. Conversely, HT significantly diminished tG ($p < 0.001$), and so did GSH ($p < 0.05$) and GSSG ($p < 0.001$) with respect to the EAE values (Figure 1A). The GSH/GSSG ratio significantly increased with HT and OA with respect to EAE (Figure 2). The mean values obtained for tG, GSH, GSSG, and the GSH/GSSG ratio with HT and OA are seen to be significantly different from those obtained with EVOO (Figures 1A and 2).

In the large intestine (Figure 1B), EVOO, HT, and OA significantly reduced the tG, GSH, and GSSG values with respect to EAE rats. Only OA produced significant increases in the GPx ($p < 0.001$) and GSH/GSSG ratio (Figure 2) with respect to EAE. The mean values for GSH ($p < 0.0019$), GSSG ($p < 0.001$), and the GSH/GSSG ratio ($p < 0.001$) with HT and OA are seen to be different from those observed with EVOO, and also tG ($p < 0.001$) for HT in comparison with EVOO (Figures 1B and 2).

In the heart, tG and GPx underwent a significant decrease ($p < 0.001$) with EVOO and HT with regard to EAE animals. OA caused a significant increase in tG ($p < 0.001$) and a reduction in GPx ($p < 0.001$) with respect to EAE animals. The tG and GPx for HT and OA were significantly different ($p < 0.001$) from the mean values obtained with EVOO (Table 1).

In the kidney, only OA significantly increased GSSG ($p < 0.001$) with respect to EAE, whereas EVOO and HT significantly reduced its values ($p < 0.001$). With regard to GSH, EVOO and OA significantly increased ($p < 0.001$) its values with respect to EAE, and HT ($p < 0.001$) reduced them. In general, the mean GSH and GSSG values with HT and OA were significantly different ($p < 0.001$) from those observed with EVOO (Table 1).

The GSH/GSSG ratio was increased with EVOO in the heart, kidney, and liver with respect to EAE ($p < 0.001$), whereas the ratio values with HT and OA were seen to be significantly diminished with respect to EVOO ($p < 0.001$) and did not significantly differ from those obtained with EAE, except in the heart for OA ($p < 0.001$) (Table 1).

LPO ($p < 0.001$) and CP ($p < 0.001$) values were significantly reduced with EVOO, HT, and OA in all the organs studied (heart, kidney, liver, and small and large intestines) (Table 2 and Figure 3A,B).

3.3. Correlation of LPS and LBP with LPO and CP

LPS and LBP were positively correlated with LPO and CP in both the small and large intestines (Table 3). Furthermore, LPS and LBP were significantly increased with EAE (Figure 4A,B).

Table 3. Pearson's correlation between lipopolysaccharide (LPS) of the external gram-negative bacteria wall and the lipopolysaccharide binding protein (LBP) with lipid peroxidation products (LPO) and carbonylated proteins (CP) in the small and large intestine. r -value and (p -value).

Pearson's Correlation		
Small Intestine		
	LPO	CP
LPS	0.636 (0.001)	0.542 (0.008)
LBP	0.816 (0.000)	0.777 (0.000)
Large Intestine		
	LPO	CP
LPS	0.759 (0.000)	0.581 (0.004)
LBP	0.703 (0.000)	0.747 (0.000)

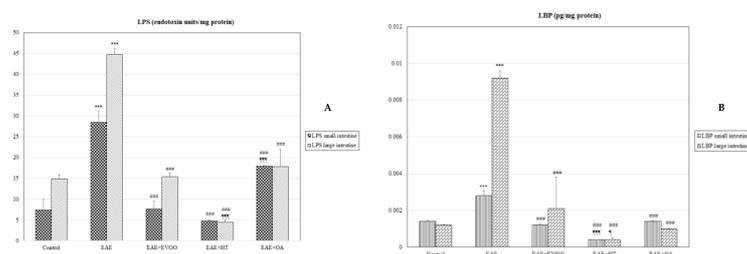


Figure 4. LPS (endotoxin units/mg protein (A) and LBP (pg/mg protein (B) in the small and large intestines: lipopolysaccharide (LPS) of the outside wall of the gram-negative bacteria and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in the following study groups: control group (not manipulated); EAE group (experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)); EAE + extra-virgin olive oil (EVOO); EAE + hydroxytirosol group (HT); and EAE + oleic acid group (OA). *** $p < 0.001$ vs. control; ### $p < 0.001$ vs. EAE; ¶ $p < 0.05$ vs. EAE + EVOO; ¶¶¶ $p < 0.001$ vs. EAE + EVOO.

3.4. EVOO, HT, and OA against the Microbiota

LPS ($p < 0.001$) and LBP ($p < 0.001$) were significantly reduced with EVOO, HT, and OA with respect to the EAE group. The mean values obtained with HT for LBP were lower than those observed with EVOO in the small ($p < 0.001$) and large intestines ($p < 0.05$) (Figure 4A,B).

3.5. Clinical Score at 65 Days minus 14 Days and Correlation with LPS, LBP, LPO, and CP

EVOO ($p < 0.001$), HT ($p < 0.05$), and OA ($p < 0.001$) produced a decrease in the clinical score at 65 days compared to the score given at 14 days, the opposite to what happened in the EAE group in which there was an increase ($p < 0.001$) in the clinical score with respect to the control. This diminution was greater with EVOO and OA, the effects produced by the HT being significantly different from those caused by EVOO ($p < 0.001$) (Figure 5).

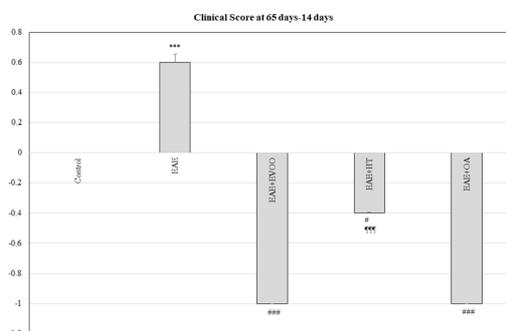


Figure 5. Clinical Score at 65 days less 14 days: The animals were monitored at 14 and 65 days and scored in accordance with the following severity scale: (0) no signs, (1) tail paralysis, (2) weakness in hind legs, (3) paralysis in hind legs, (4) paralysis in hind legs and weakness in front legs, and (5) quadriplegic [23,40]. The increase between the score at 65 days less the score at 14 days was established for the following study groups: control group (not manipulated); EAE group (experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)); EAE + extra-virgin olive oil (EVOO); EAE + hydroxytirosol group (HT); and EAE + oleic acid group (OA). *** $p < 0.001$ vs. control; # $p < 0.05$ vs. EAE; ### $p < 0.001$ vs. EAE; ¶¶¶ $p < 0.001$ vs. EAE + EVOO.

There was a positive correlation between LPS, LBP, LPO, and CP with the clinical score at 65 days less 14 days ($p < 0.05$) in both the small and large intestines.

4. Discussion

This study shows, and confirms for the first time as far as we know, the presence of an intense oxidative stress in non-nervous organs in the model of EAE, enabling us to infer that something similar could occur in patients suffering from MS. This fact has been indirectly endorsed by previous studies on blood in the EAE model, showing that the changes in oxidative stress and inflammation biomarkers are similar to those found in the blood of patients with RR-MS [23]. In addition, and interestingly, this work, also for the first time, proves the protective effect both of EVOO, and of its compounds on non-nervous organs (heart, kidney, liver, and small and large intestines) affected by oxidative damage in the EAE model.

Up to now, oxidative stress produced during MS and EAE has been evidenced in the following target organs: brain, spinal cord, blood, serum, and cerebrospinal fluid [14–18,23]. However, it has not been elucidated whether this oxidative stress could be present in other extra-nervous organs during the disease.

Different expression patterns have recently been revealed in the rat CNS of the collectin surfactant protein-A (SP-A) in inflammatory response modulation in EAE. Also, in vitro treatment of human astrocytes and microglia with LPS promoted SP-A expression in a dose-dependent manner [41]. In fact, its levels were lower in the cerebrospinal fluid of patients with MS [42,43]. SP-A significantly decreases Toll-like receptor 4 and nuclear factor- κ B expression, and reduces interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α levels [41].

The protein SP-A is not only present in the CNS but also in extra-nervous tissues. Thus, it has been localized in the lung, where it plays a basic role in pulmonary homeostasis and inflammatory response, and also in several extrapulmonary tissues among which the intestine, colon, and mucosa are included [41,44,45]. That discovery led us to develop the idea that the inflammation and oxidative stress accompanying MS and EAE could also be present in other extra-nervous tissues where the protein SP-A could express itself.

This actually happened in our results. The LPO and CP concentrations, revelatory of oxidative damage, increased in the heart, kidney, liver and large and small intestines as a result of the EAE. The glutathione redox system, one of the principal organic, antioxidant systems (and the main intracellular one), was also seen to be altered with respect to the individual control, in all the organs studied in EAE rats. That corroborated that the oxidative stress was produced in these extra-nervous organs due to both the production of ROS and to the alteration in body antioxidant defenses.

Accumulating evidence indicates that regular consumption of EVOO, the main source of fat in the Mediterranean diet, is associated with a reduced risk of developing chronic, degenerative disorders such as cardiovascular diseases, type 2 diabetes, and cancer [30]. EVOO is obtained from olives solely by mechanical or other physical preparation methods, under conditions that do not alter its natural composition [46]. EVOO is characterized by very high contents both of monounsaturated fatty acids (mainly oleic acid) and antioxidant molecules (mainly phenolic compounds) [47]. Hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) and tyrosol (3-hydroxyphenylethanol) are considered to be the most abundant and representative phenolic alcohols in olive oil [48–50].

Thus, olive oil administered to rats subjected to brain hypoxia–reoxygenation was demonstrated to exert antioxidant and cytoprotective activity, decreasing brain cell death, LPO level overproduction, counteracting the decrease in glutathione levels, and inhibiting prostaglandin E2 (PGE2) in brain tissues [32,51]. Likewise, long-term, polyphenols-rich extra-virgin olive oil dietary administration in mice counteracted age-related dysfunctions in motor coordination and increased GPx activity in some brain regions such as the cortex and cerebellum [32,52]. Nevertheless, there are few studies on the effects of EVOO administration on the oxidative stress caused by EAE and MS. A recent one from our team [25] disclosed the neuroprotective and antioxidant power of EVOO, HT, and OA on the brain,

spinal cord, and blood against oxidative stress produced by EAE. However, up to now, this antioxidant capacity has not been demonstrated in other body organs also affected by EAE, although it is known that EVOO can be widely distributed over the organic territory. Hydroxytyrosol 14C radioactivity measured in different tissues showed that EVOO spreads to skeletal muscles, liver, heart, kidney, lung, and brain [32,53].

In our study, EVOO returned to normal the changes induced by EAE in GSH, GSSG, the GSH/GSSG ratio, tG, and GPx in the heart, the kidney, and the small and large intestines. A similar effect was noted with the administration of HT and OA.

Also, EVOO, HT, and OA showed the same effectiveness in the reduction of the oxidative metabolism products CP and LPO in all the organs studied.

Although it will be necessary to study the complex molecular mechanisms through which, specifically, EVOO, HT, and OA act on the oxidative stress produced by the EAE, it has been shown that there is a positive correlation between CP and LPO with LPS and LBP in the small and large intestines, and of all of them with the clinical score of 65 days less 14 days.

In a recent publication, our group demonstrated that the LPS and LBP levels in the brain, spinal cord, and blood of rats with EAE, and in the blood of patients with RR-MS, were high, together with other parameters representative of oxidative stress. Treatments with natalizumab, N-acetyl cysteine (NAC), and dimethyl fumarate (DMF) reduced LPS and LBP levels and the oxidative damage present in EAE and MS [23]. The incorporation into the diet of EVOO, HT, and OA also achieved similar results in the three body structures studied [25]. LPS and LBP had a positive correlation with all the parameters, revealing oxidative stress [23,25]. At least part of the oxidative effects noted in the nervous and blood tissues was associated with the changes triggered in LPS and LBP, a sign of possible modifications in the gut microbiota. These facts have been backed up in previous data from our group, as well as in scientific literature data showing the relationship between the gut microbiota and the CNS in what is known as the gut microbiota–brain axis.

One possible explanation for this gut microbiota–brain axis is in a work by Buscarine et al. [22], who discovered that changes in intestinal permeability (IP) are presented in RR-MS, with a possible genetic influence on the determinants of IP changes (as has been inferred from data on twins); IP changes included a deficit of the active mechanism of absorption from the intestinal lumen. These data support the idea that the gut may play an important role in the development of MS. Findings suggest that the relationship between the gut-microbiota composition and host blood immune markers can differ between children with and without MS [54], which supports the hypothesis of this IP in MS.

In our study, LPS and LBP appear to be increased in EAE and positively correlated with the oxidative stress present in the small and large intestines, which are affected by the disease. That This study showed that endotoxins in the intestinal microbiota could travel not only to the CNS through the IP, demonstrated during MS [22], but also to other body organs, and is responsible for inflammatory phenomena and the resulting oxidative damage typical of the EAE. Upregulation of ICAM-1 and VCAM-1 and the changes in the expression of these molecules in the brain blood vessels by the LPS have already been demonstrated [55,56]. These endothelial alterations would be responsible for the diapedesis of the immune cells and for the cerebral inflammatory phenomena causing the oxidative damage during the EAE and MS. Also, oxidative stress stimulates the adhesion of monocytes to the vascular endothelium and it modifies the permeability of the blood–brain barrier so that an intense peripheral stress in RR-MS patients has been observed [57]. Therefore, this inflammatory phenomenon could be repeated in the same way in each of the organs in this study affected by the EAE. In fact, there are signs that activation of the HPA axis by the gut microbiota can occur as a result of increased permeability of the intestinal barrier and a microbiota-driven pro-inflammatory state [26,58].

Finally, EVOO, HT, and OA significantly reduced the LPS and LBP values in intestinal tissue, showing their effectiveness in the fight against bacterial endotoxins, although future studies will be necessary to determine the action mechanism of this process, and its repercussions on that of the

EAE in the heart and kidney, where EVOO, HT, and OA have exhibited their efficacy in overcoming oxidative stress and in contributing to the clinical improvement of the disease

It could be thought that, as in the brain, the bacterial endotoxins from the dysbiosis of the intestinal microbiota travels via the bloodstream not only to the brain vessels but also to other extra-nervous tissues, where it is responsible for the EAE inflammatory phenomenon and oxidative stress due to its alteration in the vascular permeability. EVOO, HT, and OA not only improve the inflammatory phenomenon for its patent activity on the gelatinases (A and B), with a role evidenced in the alteration of blood permeability, but they act on the oxidative stress, sequestering the free radicals that are inhibitors of cyclooxygenase, Fe²⁺, and NO, besides improving motor coordination, as has been demonstrated in Alzheimer [32].

The weaknesses of this study could lie in it not having demonstrated that the molecular action mechanisms witnessed in nervous tissue during the EAE and MS also occur in other extra-nervous tissues or that EVOO, HT, and OA act on the bacterial endotoxin itself and the inflammatory phenomena and oxidative stress triggered by the latter. However, this paper is of indisputable value in that it reveals that there is oxidative stress in non-nervous organs during the EAE, including in the intestinal tissue, in which an increase in bacterial endotoxin was observed; the paper also shows the correlation existing between the LPS levels and the oxidative stress-derived products (LPO and CP) in the intestine and the substantial improvement that the EVOO, HT, and OA exercised on the oxidative and clinical stress in the disease, as well as its role in reducing bacterial endotoxin levels.

5. Conclusions

Therefore, based on all that was expounded above, the conclusions of this study are:

- (1) The oxidative damage of the EAE not only affects the CNS but also the principal body organs (small and large intestines, liver, kidney, and heart).
- (2) The bacterial microbiota endotoxin seems to be implicated in the production of inflammatory phenomena and subsequent oxidative stress in the intestinal tissue and in other organs.
- (3) Treatment with EVOO, HT, and OA reduces the bacterial endotoxin levels in the intestines at the same time as minimizing the oxidative damage in extra-nervous organs.
- (4) EVOO, HT, and OA improve the clinical score of the disease itself.

Taken together, these data highlight the excellent effects of EVOO and its neuroprotective potential. They show that the incorporation and regularity of EVOO in the diet (as a nutritional intervention) would improve the general inflammatory status and, thus, the nerve and peripheric involvement of the patients, underlining its possible use as an adjuvant agent in MS treatments. Future studies will be necessary for:

- (1) verifying the mechanism by which the intestinal microbiota is responsible for the inflammatory phenomena and the oxidative damage produced by the EAE and MS, not only in the CNS, but also in other organs;
- (2) finding out the molecular action mechanisms of LPS in the phenomena leading to the transendothelial migration of the immune system in the CNS and other organs affected by the EAE and MS; and
- (3) identifying the action mechanism/s of the EVOO in its protective effects in EAE and MS.

Author Contributions: Conceptualization, I.T.; methodology, C.C.; E.L.; J.C.-V.; validation, I.T.; E.A.; formal analysis, E.L.; investigation, C.C.; B.M.E.; E.L.; M.F.; J.C.-V.; M.E.V.; J.J.O.-S.; A.S.; R.L.; E.P.; E.A.; I.T.; writing—original draft preparation, B.M.E.; I.T.; writing—review and editing, all.; visualization, B.M.E.; I.T.; project administration, I.T.; funding acquisition, I.T.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We thank M. La Torre for technical support in the collection and laboratory analyses of the samples. In addition, authors wish to express gratitude to Interprofesional del Aceite de Oliva Español by the Extra-virgin olive oil (EVOO).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Compston, A.; Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* **2008**, *372*, 1502–1517. [\[CrossRef\]](#)
2. Ortiz, G.G.; Pacheco-Moisés, F.P.; Bitzer-Quintero, O.K.; Ramírez-Anguiano, A.C.; Flores-Alvarado, L.J.; Ramírez-Ramírez, V.; Macías-Islas, M.A.; Torres-Sánchez, E.D. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: Clinical and basic approach. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 708659. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Hassanpour-Dehkordi, A.; Jivad, N. Comparison of regular aerobics and yoga on the quality of life in patients with multiple sclerosis. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **2014**, *6*, 141.
4. Escribano, B.M.; Aguilar-Luque, M.; Bahamonde, C.; Conde, C.; Lillo, R.; Sanchez-Lopez, F.; Giraldo, A.I.; Cruz, A.H.; Luque, E.; Gascon, F.; et al. Natalizumab Modifies Catecholamines Levels Present in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 4876–4880. [\[CrossRef\]](#)
5. Creanza, T.M.; Liguori, M.; Liuni, S.; Nuzziello, N.; Ancona, N. Meta-Analysis of Differential Connectivity in Gene Co-Expression Networks in Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 936. [\[CrossRef\]](#)
6. Cree, B.A.C. Multiple sclerosis. In *Current Diagnosis and Treatment in Neurology*; Brust, J.C.M., Ed.; Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical: New York, NY, USA, 2007.
7. Morandi, B.; Bramanti, P.; Bonaccorsi, I.; Montalto, E.; Oliveri, D.; Pezzino, G.; Navarra, M.; Ferlazzo, G. Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol. Res.* **2008**, *57*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
8. Goldenberg, M. Multiple sclerosis review. *P&T* **2012**, *37*, 175–184.
9. Spiro, D.B. Early onset multiple sclerosis: A review for nurse practitioners. *J. Pediatr. Health Care* **2012**, *26*, 399–408. [\[CrossRef\]](#)
10. Van Horsen, J.; Witte, M.E.; Schreibelt, G.; de Vries, H.E. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1812*, 141–150. [\[CrossRef\]](#)
11. Das, U.N. Is multiple sclerosis a proresolution deficiency disorder? *Nutrition* **2012**, *28*, 951–958. [\[CrossRef\]](#)
12. Sorto-Gomez, T.E.; Ortiz, G.G.; Pacheco, F.P.; Torres-Sanchez, E.D.; Ramirez-Ramirez, V.; Macias-Islas, M.A.; de la Rosa, A.C.; Velázquez-Brizuela, I.E. Effect of fish oil on glutathione redox system in multiple sclerosis. *Am. J. Neurodegener. Dis.* **2016**, *5*, 145–151. [\[PubMed\]](#)
13. Haider, L.; Fischer, M.T.; Frischer, J.M.; Bauer, J.; Höftberger, R.; Botond, G.; Esterbauer, H.; Binder, C.J.; Witztum, J.L.; Lassmann, H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* **2011**, *134*, 1914–1924. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Adamczyk-Sowa, M.; Galiniak, S.; Żyracka, E.; Grzesik, M.; Naparło, K.; Sowa, P.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartosz, I. Oxidative Modification of Blood Serum Proteins in Multiple Sclerosis after Interferon Beta and Melatonin Treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 7905148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Oliveira, S.R.; Kallaur, A.P.; Simão, A.N.; Morimoto, H.K.; Lopes, J.; Panis, C.; Petenucci, D.L.; da Silva, E.; Cecchini, R.; Kaimen-Maciel, D.R.; et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the expanded disability status scale. *J. Neurol. Sci.* **2012**, *321*, 49–53. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Fiorini, A.; Koudriavtseva, T.; Bucaj, E.; Coccia, R.; Foppoli, C.; Giorgi, A.; Schininà, M.E.; Di Domenico, F.; De Marco, F.; Perluigi, M. Involvement of oxidative stress in occurrence of relapses in multiple sclerosis: The spectrum of oxidatively modified serum proteins detected by proteomics and redox proteomics analysis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, E65184.
17. Mir, F.; Lee, D.; Ray, H.; Sadiq, S.A. CSF isoprostane levels are a biomarker of oxidative stress in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2014**, *1*, E21. [\[CrossRef\]](#)
18. Wang, P.; Xie, K.; Wang, C.; Bi, J. Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Eur. Neurol.* **2014**, *72*, 249–254. [\[CrossRef\]](#)
19. Ochoa-Repáraz, J.; Mielcarz, D.W.; Ditrio, L.E.; Burroughs, A.R.; Foureau, D.M.; Haque-Begum, S.; Kasper, L.H. Role of gut comensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 6041–6050. [\[CrossRef\]](#)

20. Berer, K.; Mues, M.; Koutrolos, M.; Rasbi, Z.A.; Boziki, M.; Johner, C.; Wekerle, H.; Krishnamoorthy, G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* **2011**, *479*, 538–541. [[CrossRef](#)]
21. Lee, Y.K.; Menezes, J.S.; Umesaki, Y.; Mazmanian, S.K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4615–4622. [[CrossRef](#)]
22. Buscarinu, M.C.; Romano, S.; Mechelli, R.; Pizzolato Umeton, R.; Ferraldeschi, M.; Fornasiero, A.; Reniè, R.; Cerasoli, B.; Morena, E.; Romano, C.; et al. Intestinal Permeability in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2018**, *15*, 68–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Escribano, B.M.; Medina-Fernández, F.J.; Aguilar-Luque, M.; Agüera, E.; Feijoo, M.; Garcia-Maceira, F.I.; Lillo, R.; Vieyra-Reyes, P.; Giraldo, A.I.; Luque, E.; et al. Lipopolysaccharide Binding Protein and Oxidative Stress in a Multiple Sclerosis Model. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 199–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Escribano, B.M.; Luque, E.; Aguilar-Luque, M.; Feijoo, M.; Caballero-Villarraso, J.; Torres, L.A.; Ramirez, V.; García-Maceira, F.I.; Agüera, E.; Santamaria, A.; et al. Dose-dependent S-allyl cysteine ameliorates multiple sclerosis disease related pathology by reducing oxidative stress and biomarkers of dysbiosis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *815*, 266–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Conde, C.; Escribano, B.M.; Luque, E.; Aguilar-Luque, M.; Feijoo, M.; Ochoa, J.J.; LaTorre, M.; Giraldo, A.I.; Lillo, R.; Agüera, E.; et al. The protective effect of extra-virgin olive oil in the experimental model of multiple sclerosis in the rat. *Nutr. Neurosci.* **2018**. [[CrossRef](#)]
26. Farzi, A.; Fröhlich, E.E.; Holzer, P. Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics* **2018**, *15*, 5–22. [[CrossRef](#)]
27. Middleton, E., Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *439*, 175–182.
28. Hollman, P.C.; Katan, M.B. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, S75–S80. [[CrossRef](#)]
29. Eastwood, M.A. Interaction of dietary antioxidants in vivo: How fruit and vegetables prevent disease? *QJM Mon. J. Assoc. Phys.* **1999**, *92*, 527–530. [[CrossRef](#)]
30. Santangelo, C.; Vari, R.; Scaccocchio, B.; De Sanctis, P.; Giovannini, C.; D'Archivio, M.; Masella, R. Anti-inflammatory activity of extra virgin olive oil polyphenols: Which role in the prevention and treatment of immune-mediated inflammatory diseases? *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2018**, *18*, 36–50. [[CrossRef](#)]
31. Liuzzi, G.M.; Latronico, T.; Branà, M.T.; Gramegna, P.; Coniglio, M.G.; Rossano, R.; Larocca, M.; Riccio, P. Structure-dependent inhibition of gelatinases by dietary antioxidants in rat astrocytes and sera of multiple sclerosis patients. *Neurochem. Res.* **2011**, *36*, 518–527. [[CrossRef](#)]
32. Angeloni, C.; Malaguti, M.; Barbalace, M.C.; Hrelia, S. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, E2230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Rosenberg, G.A.; Dencoff, J.E.; Correa, N., Jr.; Reiners, M.; Ford, C.C. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: Relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* **1996**, *46*, 1626–1632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Agrawal, S.M.; Lau, L.; Yong, V.W. MMPs in the central nervous system: Where the good guys go bad. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2008**, *19*, 42–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Martín, R.; Carvalho-Tavares, J.; Hernández, M.; Arnés, M.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Nieto, M.L. Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: A potential therapeutic role. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 198–208. [[CrossRef](#)]
36. Martín, R.; Hernández, M.; Córdova, C.; Nieto, M.L. Natural triterpenes modulate immune-inflammatory markers of experimental autoimmune encephalomyelitis: Therapeutic implications for multiple sclerosis. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 1708–1723. [[CrossRef](#)]
37. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1939–1951. [[CrossRef](#)]
38. Flohe, L.; Gunzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 114–121.
39. Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 464–478.

40. Perez-Nievas, B.G.; Garcia-Bueno, B.; Madrigal, J.L.; Leza, J.C. Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: Mechanisms implicated. *J. Neuroinflamm.* **2010**, *7*, 60. [[CrossRef](#)]
41. Yang, X.; Yan, J.; Feng, J. Surfactant protein A is expressed in the central nervous system of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis, and suppresses inflammation in human astrocytes and microglia. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 3555–3565. [[CrossRef](#)]
42. Luo, J.M.; Wan, Y.S.; Liu, Z.Q.; Wang, G.R.; Floros, J.; Zhou, H.H. Regularity of distribution of immunoreactive pulmonary surfactant protein A in rat tissues. *Int. J. Mol. Med.* **2004**, *14*, 343–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Schob, S.; Schicht, M.; Sel, S.; Stiller, D.; Kekulé, A.S.; Paulsen, F.; Maronde, E.; Bräuer, L. The detection of surfactant proteins a, b, c and d in the human brain and their regulation in cerebral infarction, autoimmune conditions and infections of the CNS. *PLoS ONE* **2013**, *8*, E74412. [[CrossRef](#)]
44. Bourbon, J.R.; Ducroc, R. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) is expressed by epithelial cells of small and large intestine. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 12162–12169.
45. Snyder, G.D.; Oberley-Deegan, R.E.; Goss, K.L.; Romig-Martin, S.A.; Stoll, L.L.; Snyder, J.M.; Weintraub, N.L. Surfactant protein D is expressed and modulates inflammatory responses in human coronary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *294*, H2053–H2059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Aparicio-Soto, M.; Sánchez-Hidalgo, M.; Rosillo, M.A.; Castejón, M.L.; Alarcón-de-la-Lastra, C. Extra virgin olive oil: A key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food Funct.* **2016**, *7*, 4492–4505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Quiles, J.L.; Barja, G.; Battino, M.; Mataix, J.; Solfrizzi, V. Role of Olive Oil and Monounsaturated Fatty Acids in Mitochondrial Oxidative Stress and Aging. *Nutr. Rev.* **2006**, *64*, S31–S39. [[CrossRef](#)]
48. Blekas, G.; Vassilakis, C.; Harizanis, C.; Tsimidou, M.; Boskou, D.G. Biophenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3688–3692. [[CrossRef](#)]
49. Granados-Principal, S.; Quiles, J.L.; Ramirez-Tortosa, C.L.; Sanchez-Rovira, P.; Ramirez-Tortosa, M.C. Hydroxytyrosol: From laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 191–206. [[CrossRef](#)]
50. Kitsati, N.; Mantzaris, M.D.; Galaris, D. Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biol.* **2016**, *10*, 233–242. [[CrossRef](#)]
51. González-Correa, J.A.; Muñoz-Marín, J.; Arrebola, M.M.; Guerrero, A.; Narbona, F.; López-Villodres, J.A.; De La Cruz, J.P. Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids* **2007**, *42*, 921–929. [[CrossRef](#)]
52. Pitozzi, V.; Jacomelli, M.; Catelan, D.; Servili, M.; Taticchi, A.; Biggeri, A.; Dolara, P.; Giovannelli, L. Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: Role of oxidative stress. *Rejuvenation Res.* **2012**, *15*, 601–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. D'Angelo, S.; Manna, C.; Migliardi, V.; Mazzoni, O.; Morrica, P.; Capasso, G.; Pontoni, G.; Galletti, P.; Zappia, V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 1492–1498. [[PubMed](#)]
54. Tremlett, H.; Waubant, E. The Gut Microbiota and Pediatric Multiple Sclerosis: Recent Findings. *Neurotherapeutics* **2018**, *15*, 102–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dietrich, J.B. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* **2002**, *128*, 58–68. [[CrossRef](#)]
56. Lee, B.K.; Lee, W.J.; Jung, Y.-S. Chrysin Attenuates VCAM-1 Expression and Monocyte Adhesion in Lipopolysaccharide-Stimulated Brain Endothelial Cells by Preventing NF- κ B Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tasset, I.; Agüera, E.; Sánchez-López, F.; Feijóo, M.; Giraldo, A.I.; Cruz, A.H.; Gascón, F.; Túnez, I. Peripheral oxidative stress in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Clin. Biochem.* **2012**, *45*, 440–444. [[CrossRef](#)]
58. De Punder, K.; Pruimboom, L. Stress induces endotoxemia and lowgradeinflammation by increasing barrier permeability. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).