

## **ACEITE DE OLIVA VIRGEN, EL ALIMENTO CON PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS PREVENTIVAS DE LA ATROSCLEROSIS**

Joaquín Carlos SURRA<sup>2,3</sup>  
María Ángeles NAVARRO<sup>1,3</sup>  
María Victoria MARTÍNEZ<sup>1,3</sup>  
Jesús OSADA<sup>1,2,3</sup>

RESUMEN.— Las enfermedades cardiovasculares (entre las que se incluye la aterosclerosis) representan la principal causa de muerte en España y en los países desarrollados. Durante décadas se las ha asociado con dietas de tipo occidental (ricas en grasas y colesterol), por lo que se han recomendado dietas bajas en grasa en las que se han visto perjudicados alimentos como el aceite de oliva y los frutos secos, ingredientes constituyentes de la tradicional dieta mediterránea. Sin embargo, estudios concluyentes de investigación no solo rechazan esta teoría, sino que confirman categóricamente que la adhesión a este tipo de dieta, en la que el aceite de oliva virgen extra es la principal fuente de grasas, reduce los factores de riesgo y las muertes por este tipo de enfermedades. En nuestro laboratorio se han llevado a cabo una serie de experimentos empleando el ratón carente de apolipoproteína E, modelo animal que

Recepción del original: 20-1-2016

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS). Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177. E-50013 ZARAGOZA. [angelesn@unizar.es](mailto:angelesn@unizar.es), [mvmartig@unizar.es](mailto:mvmartig@unizar.es), [josada@unizar.es](mailto:josada@unizar.es)

<sup>2</sup> Departamento de Producción Animal. Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza. Carretera de Cuarte, s/n. E-20071 HUESCA. [jsurra@unizar.es](mailto:jsurra@unizar.es)

<sup>3</sup> CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición. Instituto de Salud Carlos III. C/ Sinesio Delgado, 4. E-28029 MADRID.

semeja el desarrollo de aterosclerosis humana, sobre el que se ha investigado el efecto de distintos procesos a que han sido sometidos los aceites de oliva (refinados, lavados) y de diferentes tratamientos físicos (prensado o centrifugado) con los que se han obtenido aceites con distinto contenido en compuestos minoritarios. También se ha investigado el efecto de algunos de estos compuestos minoritarios aislados, como el hidroxitirosol o el escualeno, sobre el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Las propiedades protectoras de la aterosclerosis del aceite de oliva virgen pueden atribuirse en parte a la presencia de esos componentes minoritarios y su efecto biológico se reduce o desaparece en los aceites procesados que hayan eliminado dichos componentes.

ABSTRACT.— Cardiovascular diseases (including atherosclerosis) are the main cause of death in Spain and developed countries. Their association, during decades, with Western diet (high fat and cholesterol) resulted in the recommendation of low-fat diets, which prejudiced basic ingredients of the traditional Mediterranean Diet such as olive oil and nuts. However, conclusive studies not only disprove this theory, but, on the contrary, clearly confirm that the adherence to this diet, in which the extra virgin olive oil is the main source of fat, reduces cardiovascular diseases risk factors and death. In our laboratory, we have carried out several experiments using apoE-deficient mouse, an animal model that reproduces the development of human atherosclerosis, and, as such, allowed to study the effects of the different washing and refining steps that olive oil goes through, and of the physical processes (pressure or centrifugation) that produce oils with different content in minors compounds. Also, some studies have been carried out on the isolated effect of some of these minor compounds, such as hydroxytyrosol or squalene, on the development of atherosclerotic lesions. The protective properties of virgin olive oil against atherosclerosis can be partly attributed to the presence of these minor components, whose biological effect fades or disappears in processed oils that have eliminated them.

KEY WORDS.— Extra virgin olive oil, atherosclerosis, apoE-deficient, mice, squalene, hydroxytyrosol.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (las ECV: arterosclerosis, infarto de miocardio y/o accidente cerebro-vascular, etcétera) representan la principal causa de muerte en los países desarrollados. En España, en el año 2012, alcanzaron el 30,3% de todas las causas de defunciones (INE, 2014). Como origen de estas subyace la aterosclerosis, enfermedad sistémica que se caracteriza por la formación de placas en las paredes de las grandes arterias (CHOUHDURY y cols., 2004) por acumulación de lípidos y colesterol oxidados

y de las respuestas celulares de macrófagos, plaquetas, células endoteliales y musculares lisas, provocando el engrosamiento del espacio subendotelial, acompañadas o no de complicaciones trombóticas por la rotura de las placas, con las consiguientes manifestaciones clínicas de infarto de miocardio, accidentes cerebro-vasculares, etcétera (CHOUDHURY y cols., 2004). La enfermedad aterotrombótica es de carácter multifactorial, en la que se incluyen desde un componente genético, con un gran número de genes involucrados; la dieta, por un exceso de ingestión calórica de ciertos componentes, identificados como de alto riesgo, que favorecen el desarrollo de esta patología, y el estilo de vida, caracterizado por factores como el sedentarismo, la obesidad, el tabaquismo, etcétera (LUSIS y cols., 2004).

Las primeras evidencias epidemiológicas que mostraron el nexo de la aterosclerosis y la enfermedad coronaria con el tipo de dieta se pusieron de manifiesto en el *Seven Countries Study* (KEYS, 1970) o *Estudio de los siete países*, en el que intervinieron 13 000 varones con edades comprendidas entre los 40 y los 59 años, aparentemente con buen estado de salud, procedentes de dieciséis poblaciones de siete países diferentes (Italia, Holanda, Estados Unidos, Grecia, Japón, Yugoslavia y Finlandia), cuya dieta se caracterizaba por un alto aporte dietético de grasas. En dicho estudio se relacionó la ingesta de grasas, principalmente ácidos grasos saturados, con el aumento del colesterol en la sangre y las muertes por ECV. Revisiones posteriores de estos estudios confirmaron la estrecha relación existente entre las muertes por ECV con el consumo de ácidos grasos saturados de cadena larga y de ácidos grasos *trans* (KROMHOUT y cols., 1995). También algunos resultados del *Estudio de los siete países* revelaron importantes diferencias en las tasas de patologías cardiovasculares entre las distintas regiones geográficas estudiadas. Así, en los países del área mediterránea, la tasa de mortalidad debida a esta patología era inferior comparada con la de otras regiones, por lo que se dedujo que este hecho podía deberse a la menor ingesta de grasas saturadas y al elevado consumo de ácido oleico aportado por el aceite de oliva (KEYS, 1980), a partir del cual se extendió la noción de *dieta mediterránea* (DiMed). Esta, considerando como tal la alimentación tradicional de hace setenta años de los países del sur de Europa (TRICHOPOULOU y cols., 2003; DE LORGERIL, 2004), se caracteriza por un alto consumo de verduras, frutas, frutos secos y aceite de oliva como la principal fuente de grasa dietética. Actualmente, se reconoce que algunos de los alimentos que componen

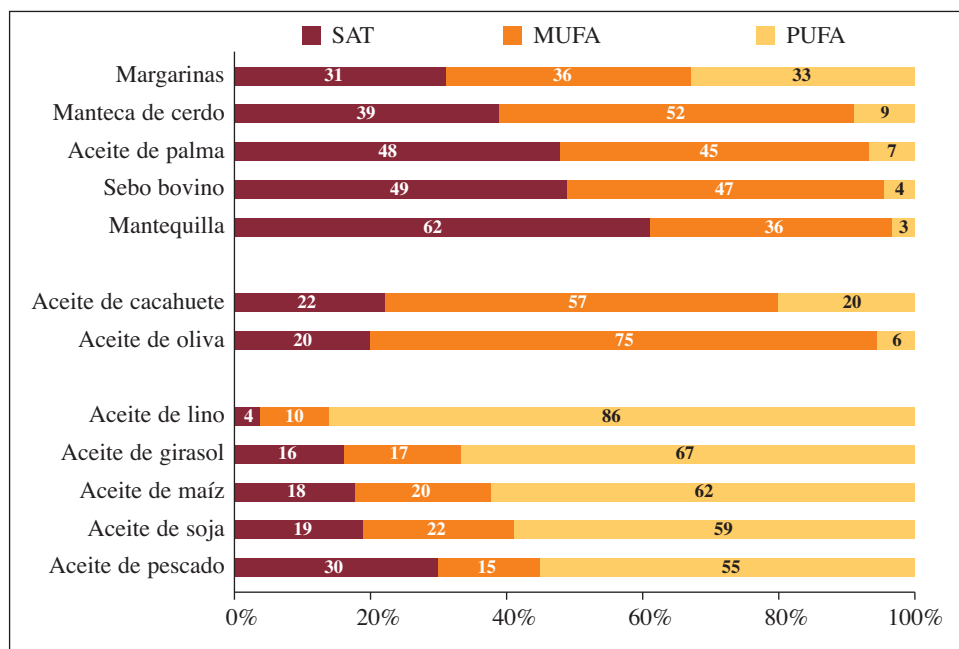
la DiMed contienen numerosos nutrientes con efectos protectores frente a las agresiones de los mecanismos aterogénicos y, por tanto, pueden tener un papel destacado en la prevención de la aterosclerosis. Por otra parte, en la última década, investigaciones epidemiológicas confirman de manera concluyente su papel protector contra el desarrollo de varias enfermedades crónicas y han demostrado los beneficios del consumo regular de aceite de oliva en la prevención de varios factores de riesgo (diabetes, síndrome metabólico y obesidad) de ECV (ESTRUCH y cols., 2013), así como también en la prevención de ciertos tipos de cáncer (de mama y del tracto digestivo) (BUCKLAND y GONZÁLEZ, 2015).

El objetivo de este artículo es el conocimiento de algunos componentes minoritarios del aceite de oliva virgen extra con posible potencial farmacológico en la prevención de la aterosclerosis, centrada en los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación utilizando como modelo animal experimental el ratón carente de apolipoproteína E (ApoE-KO).

#### LA GRASA DE LA DIETA

Por grasas entendemos una serie de nutrientes de la dieta de alto contenido energético (su aporte calórico es más del doble que el de hidratos de carbono y de proteínas), y que, además de sus funciones energéticas, tienen otras numerosas funciones metabólicas moduladoras. Sus constituyentes más abundantes son los triglicéridos, cuya composición es muy heterogénea en función de los ácidos grasos que los componen. Dependiendo de la saturación o la presencia de dobles enlaces en sus ácidos grasos, se han clasificado como grasas saturadas (SAT), con predominancia de ácidos grasos saturados (AGS), sin dobles enlaces y sólidas a temperatura ambiente, y de aceites monoinsaturados (MUFA, de sus siglas en inglés: *mono-unsaturated fatty acids*), con la presencia de un solo doble enlace, o como poliinsaturados (PUFA, *poly-unsaturated fatty acids*), con dos o más dobles enlaces, siendo ambos líquidos a temperatura ambiente. En la figura 1 se muestra la composición media de los distintos ácidos grasos presentes en los triglicéridos de algunas grasas y aceites de consumo humano.

A su vez, en los AG insaturados se diferencian dos tipos dependiendo del carbono del primer doble enlace (considerando desde el del final de la



**Fig. 1.** Porcentajes de los distintos tipos de ácidos grasos constituyentes de diferentes grasas y aceites. Adaptado de SURRA y cols., 2005.

cadena): en el carbono 6, los denominados omega-6 o n-6, y en el carbono 3, los omega-3 o n-3. Por otra parte, la gran mayoría de las grasas naturales poseen una configuración de tipo *cis*, si bien se dan algunas naturales de formas *trans*, el 9-*cis*, y el 11-*trans*, isómero del ácido linoleico. Sin embargo, los ácidos de configuración *trans* de la dieta moderna son artificiales, ya que se generan en los procesos de hidrogenación industrial de ácidos grasos insaturados para darles una mayor consistencia. Sin embargo, desde los estudios de KEYS (1980) ya se puso de manifiesto que todas las grasas y/o aceites no se comportaban de igual manera debido a las diferencias en la proporción de los distintos ácidos grasos que las componían. Según el grado de saturación y longitud de la cadena, los AG dietéticos pueden poseer efectos hipercolesterolemiantes, como sucede con los AG saturados C12:0, C14:0 y C16:0 (láurico, mirístico, palmítico, respectivamente), el C18:0 (esteárico) es de efecto neutro, mientras que los monoinsaturados y poliinsaturados resultan hipocolesterolemiantes (GARDNER y KRAEMER, 1995; HU y cols., 2001; MORENO y MITJAVILA, 2003).

A partir de los estudios de KEYS (1970) se señaló el colesterol como la causa de las ECV y la grasa saturada, como la de la elevación de los niveles de colesterol en la sangre. De ahí que se declarase la guerra a las grasas, dando origen a las consignas nutricionales de hace varias décadas que se fundamentaron en reducir la ingesta de grasas por debajo del 30% de las calorías de la dieta y sustituirlas por hidratos de carbono (MOZAFFARIAN y LUDWIG, 2015). En esta guerra, se vio denostado el aceite de oliva e incluido en la lista de alimentos *poco saludables* al igual que los frutos secos, ambos componentes destacados de la DiMed, debido a su elevado contenido en grasas. Así, de la simpleza aparentemente lógica que relacionó el contenido de grasa en la dieta, dado su innegable mayor poder calorífico, con el aumento de la grasa corporal florecieron en la industria alimentaria los productos desnatados, *light* y otros elaborados con aceites vegetales hidrogenados, que, como se ha comentado, contienen una importante concentración de ácidos grasos *trans*. Sin embargo, no parece que esta estrategia de reducir la ingesta de grasas haya dado sus frutos, dadas las crecientes tasas de obesidad que asolan la sociedad moderna, de lo que resulta que el exceso de peso es uno de los factores de riesgo de las ECV más prevalentes (DE SCHUTTER y cols., 2014). Hoy se sabe que los efectos de las grasas en el organismo y su sustitución por carbohidratos son mucho más complejos de lo que se creía, como lo demuestra un estudio de intervención realizado en una población multiétnica, en el que una dieta baja en grasa no reduce el riesgo de Ecos (HOWARD y cols., 2006).

Por ello, en las últimas décadas ha aumentado el interés por el estudio de los efectos de la grasa de la dieta en la salud, y particularmente en la salud cardiovascular, puesto de manifiesto por el gran número de publicaciones dedicadas a esta cuestión y en las que se demuestra que la relación entre la ingesta de grasa y la salud no depende tanto de su cantidad, sino de su calidad, y vinculada al tipo de ácido graso predominante en la dieta (PÉREZ-JIMÉNEZ y cols., 2007), con lo que el tópico simplista de *grasa* se deduce cuando menos engañoso.

#### EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

El aceite de oliva virgen (del árabe *az-zeit*, que significa literalmente ‘jugo de aceituna’) es el zumo oleoso de las aceitunas, *Olea europaea*, separado de

los demás componentes de este fruto. Cuando se parte de frutos exclusivamente sanos y en su punto óptimo de maduración, el aceite de oliva virgen que se obtiene posee excepcionales características de aspecto, fragancia y sabor delicado, y se convierte en el único aceite vegetal que puede consumirse directamente crudo (ALBA y MARTÍNEZ, 2001). En el proceso de elaboración intervienen una serie de operaciones mecánicas y físicas que, partiendo íntegramente de aceitunas y llevándose a cabo específicamente en condiciones adecuadas para no alterar su calidad, producen la separación de la fracción oleosa del resto de los constituyentes.

Debido a la importancia que tiene el tratamiento del aceite de oliva en la composición final, se hará una breve descripción del mismo. Tras la molturación, que desgarras las membranas celulares y libera los glóbulos de aceite para que formen las gotas oleosas que se unen con el agua del fruto y crean una *pasta*, esta se bate lentamente para facilitar la unión de los glóbulos de aceite en gotas de mayor tamaño. El siguiente paso es la separación de las fases sólida y líquida. En la actualidad, la extracción se realiza por centrifugación (aunque tradicionalmente era por medio de presión de una prensa hidráulica), de la que se obtienen tres componentes: el orujo (restos de piel, hueso y pulpa), en la fase sólida, y el aceite y el alpechín (agua vegetativa), en la fase líquida. El aceite obtenido se decanta, se clasifica según su calidad y se almacena (ALBA y MARTÍNEZ, 2001; OSADA, 2010). Solo el aceite de oliva de determinada calidad puede ser consumido directamente; en cambio, otros aceites de oliva de calidad inferior, llamados *lampantes*, los aceites de orujo de oliva y todos los aceites de origen vegetal deben ser sometidos a un proceso de refinado o purificado por su elevada acidez (ácidos grasos libres) o sus bajas cualidades organolépticas. Este proceso puede hacerse por refinación química (clásico y tradicional) o física (más moderno, empleado por la gran industria); en ambos casos se eliminan los ácidos grasos libres y otros compuestos como pigmentos, ceras y aromas no deseados (desodorización) (ALBA y MARTÍNEZ, 2001). El proceso de refinado tiene un impacto nutricional trascendental, ya que provoca la exclusión de los compuestos minoritarios que poseen especial actividad biológica, como el escualeno, y que están presentes en el aceite de oliva virgen (AOV), ya que pudieran ser estos los responsables, al menos en parte, de los efectos beneficiosos para la salud del AOV y que no están presentes en los aceites vegetales refinados. Además, el refinado puede originar la formación de compuestos no

deseables (cíclicos, AG *trans*), así como la pérdida de aromas y colorantes (OSADA, 2010). Una completa lista de “Denominaciones y definiciones de los aceites de oliva” se puede encontrar en la web del Consejo Oleícola Internacional: <http://www.internationaloliveoil.org>. No obstante, en el mercado solo se pueden encontrar envasada cuatro categorías de aceites: aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva y aceite de orujo de oliva (ALBA y MARTÍNEZ, 2001).

#### COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Los constituyentes del aceite de oliva pueden clasificarse en dos grandes grupos: uno mayoritario, la fracción saponificable, y otro en menor proporción, los minoritarios o fracción insaponificable, que se resume en la tabla 1.

**Tabla 1.** Composición química de la fracción saponificable (composición en ácidos grasos por cromatografía de gases aplicables a los aceites de oliva como características de pureza) y fracción no saponificable (componentes minoritarios) del aceite de oliva.

| <i>Fracción saponificable</i>               |                    | <i>Fracción insaponificable</i>               |                              |
|---|--------------------|---|------------------------------|
| <i>Nombre común (símbolo)<sup>(1)</sup></i> | <i>Porcentajes</i> | <i>Componentes minoritarios<sup>(2)</sup></i> | <i>Concentración (mg/kg)</i> |
| Mirístico (14:0)                            | ≤ 0,03             | Hidrocarburos                                 | 1500-8000                    |
| Palmítico (16:0)                            | 7,5-20,0           | Escualeno                                     | 1250-8000                    |
| Palmitoleico (16:1n7)                       | 0,3-3,5            | Carotenos                                     | 0,5-5                        |
| Margárico (17:0)                            | ≤ 0,30             | Luteína                                       | 3-5                          |
| Heptadecenoico (17:1)                       | ≤ 0,30             | Tocoferoles                                   | 50-300                       |
| Esteárico (18:0)                            | 0,5-5,0            | Clorofilas a y b                              | 0,2-5                        |
| Oleico (18:1n9)                             | 55,0-83,0          | Feofitinas a y b                              | 0,2-20                       |
| Linoleico (18:2n6)                          | 3,5-21,0           | Compuestos terpénicos                         | 1000-3000                    |
| Linolénico (18:3n3)                         | ≤ 1,00             | Esteroles                                     | 800-2600                     |
| Araquídico (20:0)                           | ≤ 0,60             | Compuestos fenólicos                          | 20-1000                      |
| Eicosenoico (20:1n9)                        | ≤ 0,40             | Alcoholes alifáticos                          | 100-200                      |
| Behénico (22:0)                             | ≤ 0,20             |   |                              |
| Lignocérico (24:0)                          | ≤ 0,20             |   |                              |

<sup>(1)</sup> CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL, 2013.

<sup>(2)</sup> Adaptada de JIMÉNEZ y cols., 2001; MONTEORO y cols., 2007; GUILLÉN y cols., 2009.



### *La fracción saponificable*

La fracción saponificable (forman jabones cuando se trata con un hidróxido alcalino) representa  $\approx 99\%$ , en la que principalmente son triglicéridos, en menor medida ácidos grasos libres y pequeñísimas cantidades de otros componentes como mono y diglicéridos, fosfátidos, ceras y ésteres de esteroides (BOSKOU, 1998). En la composición en AG, el aceite de oliva es particularmente rico en ácido oleico (monoinsaturado) y contiene cantidades moderadas de ácido palmítico y linoleico, mientras que es bajo el contenido de esteárico y linolénico. Sin embargo, la composición en ácidos grasos y demás componentes difiere de una muestra a otra, dependiendo de la zona de producción del aceite de oliva, del clima, del grado de madurez de las aceitunas y de su variedad (BOSKOU, 1998).

### *La fracción insaponificable*

La fracción insaponificable (tabla 1) está constituida por compuestos que se pueden obtener tras la saponificación del aceite. Esta fracción, también denominada *componentes minoritarios del aceite de oliva*, contiene una ingente variedad de elementos; no obstante, resulta sumamente difícil determinar todos estos compuestos minoritarios debido a su baja concentración y a su complejidad química. A estos compuestos minoritarios se les atribuye una diversidad de acciones biológicas, efectos beneficiosos sobre la salud por su posible actividad antioxidante, hipolipemian-te o antiaterogénica y también como responsables de la estabilidad del aceite y de sus características organolépticas (CARRASCO PANCORBO y cols., 2004).

Estos constituyentes minoritarios, no obstante, se pierden en gran medida durante los procesos de refinado, lo que le resta al aceite de oliva refinado sus propiedades biológicas y organolépticas si no se enriquece con aceite de oliva virgen (OSADA, 2010). Los elementos menores pueden diferenciarse entre, por un lado, los derivados de los ácidos grasos, como ceras, ésteres de esteroides, fosfátidos, monoglicéridos y diglicéridos, y los no relacionados químicamente con aquellos, como hidrocarburos, carotenoides, clorofilas, tocoferoles, compuestos terpénicos, alcoholes alifáticos, esteroides y compuestos fenólicos (BOSKOU, 1998).

El contenido en hidrocarburos oscila entre el 30 y el 50% de la fracción insaponificable, entre los que destacan el escualeno y en mucha menor cantidad los carotenos (luteína y  $\beta$ -carotenos).

### Escualeno

El escualeno, un hidrocarburo alifático insaturado con seis dobles enlaces conjugados, es el más abundante (hasta el 90%): alcanza concentraciones desde los 1500-8000 (JIMÉNEZ y cols., 2001) hasta 12 000 mg/kg (BOSKOU y cols., 2006) en el AOV, mientras que en los aceites refinados su concentración se reduce drásticamente. Es un precursor de la biosíntesis del colesterol y otros esteroides en plantas y animales, fundamentalmente fitosteroides, y también es un componente mayoritario de los lípidos de humanos (JIMÉNEZ y cols., 2001).

### Pigmentos: carotenos y clorofilas

Los carotenos son otra familia de compuestos presentes en la fracción de hidrocarburos del aceite de oliva virgen en una concentración de 0,5 a 15 mg/kg de aceite. Entre los mayoritarios encontramos la luteína (30-60%) y el  $\beta$ -caroteno (5-15%) (BOSKOU, 1998). A estos compuestos, además de ser pigmentos, se les atribuyen propiedades antioxidantes. Además, el  $\beta$ -caroteno en particular es un precursor de la vitamina A.

La fracción clorofílica, a la que se debe principalmente el color del aceite de oliva, la integran las clorofilas a y b (4-7%) y sus derivados libres de magnesio, las feofitinas a y b (mayoritarias, pues representan el 70-80% del total) (BOSKOU, 1998).

### Tocoferoles

Los tocoferoles tienen propiedades antioxidantes y desempeñan un papel beneficioso en la salud por su actividad antioxidante. El contenido de tocoferoles en el aceite de oliva depende de varios factores, como la variedad de la aceituna o el grado de madurez, entre otros; alcanza valores que oscilan para el aceite de oliva virgen entre los 50 y los 350 mg/kg (BOSKOU, 1998), dependiendo de los países de origen, y se describen cantidades superiores a los 450 mg/kg (UCEDA, 2001). De los varios isómeros

de tocoferoles, el más abundante (< 90% del total) es el  $\alpha$ -tocoferol, y el que presenta una mayor actividad biológica como vitamina E (JIMÉNEZ y cols., 2001). Al igual que sucede con otros compuestos de la fracción insaponificable, el contenido en tocoferoles se ve notablemente modificado en el proceso de refinado del aceite.

### Compuestos terpénicos

Es otra de las fracciones abundantes del aceite de oliva. Pertenecen al grupo de los triterpenos pentacíclicos, dentro de los que destacan los dialcoholes, el uvaol y el eritrodiol, con concentraciones que varían de 10 a 200 mg/kg, así como sus correspondientes ácidos, el ácido oleanólico y maslínico. El uvaol y el eritrodiol están en mayor concentración en aceites de orujo, ya que son más abundantes en la piel de la aceituna: pueden alcanzar los 2800 mg/kg de aceite (BOSKOU, 1998). El aceite de orujo debe refinarse y mezclarse con AOV para que sea apto para el consumo humano, por lo que la cantidad de alcoholes triterpénicos es un parámetro de pureza para detectar la presencia de aceites de orujo. El interés científico por conocer el potencial farmacológico de estos compuestos se debe a su acción biológica en plantas medicinales (OSADA, 2010). Otros compuestos de este grupo son los alcoholes triperpénicos, entre los que destacan por su importancia la  $\beta$ -amirina, el butiroespermol, el cicloartenol y el 24-metilcicloarteno (BOSKOU, 1998).

### Esteroles

Los fitoesteroles son los homólogos en las plantas al colesterol en los animales. Son compuestos tetracíclicos cuya biosíntesis comienza con el escualeno, contribuyen a disminuir la absorción de colesterol y poseen acción hipolipemiente. Los más abundantes son el  $\beta$ -sitosterol (el 75-90% del total de esteroles), el  $\Delta^5$ -avenasterol (el 5-36%) y el campesterol ( $\approx$  3%) (BOSKOU, 1998).

### Compuestos fenólicos

Estos compuestos, mayoritariamente hidrosolubles, presentes en la pulpa de la aceituna, son de naturaleza química heterogénea (se conocen más de 8000 polifenoles vegetales) y forman parte de la fracción polar que afecta

a la estabilidad frente a la oxidación, el sabor y el aroma del aceite de oliva, que no están presentes en ningún otro aceite vegetal. Se puede encontrar una gran variedad en la composición y la concentración de compuestos fenólicos entre aceites de oliva vírgenes, explicadas en parte por la variedad, grado de maduración de la aceituna, región geográfica, técnicas agrícolas, procesos de extracción y método analítico (CICERALE y cols., 2008), entre otros. El rango de concentraciones de polifenoles oscila de los 50-600 (JIMÉNEZ y cols., 2001) a los 800 mg/kg de aceite (CICERALE y cols., 2008), aunque hay aceites con cantidades de fenoles superiores a 1000 mg/kg (MONTEDORO y cols., 2007). Dada la gran variedad de estructuras químicas de los distintos compuestos fenólicos identificados, se han clasificado (JIMÉNEZ y cols., 2001; MONTEDORO y cols., 2007; CICERALE y cols., 2008) de muchas maneras, pero de forma reducida se podrían agrupar así:

- Alcoholes fenólicos: tirosol e hidroxitirosol (en altas concentraciones) (CICERALE y cols., 2008).
- Ácidos fenólicos: los que derivan del ácido benzoico, entre los que se encuentran los ácidos gálico, vanílico, protocatéquico y siríngico y aquellos derivados del ácido cinámico: los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sináptico.
- Secoiridoides: se encuentran la oleuropeína (glicosilada o no), el oleocantal y el ligstrósido.
- Flavonoides: las hay flavonas como la luteolina y apigenina, flavonoles como la quercetina y el kaempferol, y un flavanonol, el (+)-taxifolin, ha sido encontrado recientemente en aceites de oliva españoles (CARRASCO PANCORBO y cols., 2004).
- Lignanós: se incluyen en esta categoría el (+)-pinoresinol y el (+)-1-acetoxypinoresinol.

### Alcoholes alifáticos

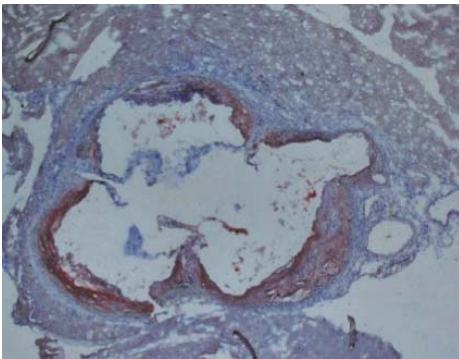
Esta fracción está constituida por alcoholes saturados de cadena lineal con número par de átomos de carbono de 18 a 28. Los mayoritarios son el hexacosanol, el octacosanol y el tetracosanol. Estos alcoholes, al igual que los esteroides y los alcoholes triterpénicos, pueden unirse con ácidos grasos y constituyen los ésteres no glicéridos u otros compuestos como las ceras (BOSKOU, 1998; OSADA, 2010).

## EL RATÓN CARENTE DE LA APOLIPOPROTEÍNA E COMO MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

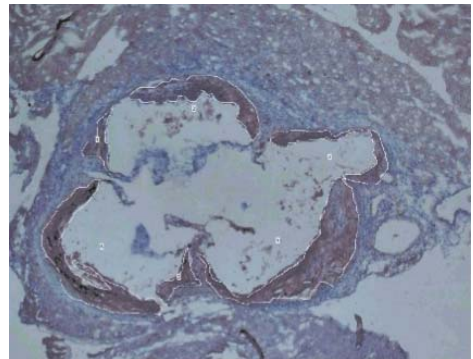
El ratón es un animal muy utilizado en investigación por sus grandes ventajas, se reproduce con facilidad, tiene un tiempo de generación corto, ocupa poco espacio y tiene un bajo coste de mantenimiento, aunque es altamente resistente a enfermedades de humanos como es la aterosclerosis (PAIGEN y cols., 1995). Sin embargo, la generación de ratones carentes de determinados genes mediante manipulación genética ha proporcionado un poderoso instrumento para avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de las enfermedades y por ello han sido reconocidos con la concesión a los creadores de estas herramientas (Capechi, Evans y Smithies) del Premio Nobel de Medicina en 2007. La carencia de la apolipoproteína E en los ratones impide que las partículas remanentes, transportadoras del colesterol, como los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; *very low density lipoprotein*) puedan eliminarse por el hígado, por lo que se acumulan en el plasma y, finalmente, se depositan en el espacio subendotelial de las paredes arteriales. Por ello, el ratón deficiente en apoE desarrolla una extensa aterosclerosis fibroproliferativa espontánea alimentado con la dieta normal del ratón (REDDICK y cols., 1994) y presenta la misma secuencia de formación de la lesión que la establecida en otros modelos animales y en humanos. Así, la semejanza y la facilidad de reproducción en este animal en un corto periodo de tiempo de la enfermedad desarrollada por humanos convierten al ratón ApoE-KO en un modelo relevante para el estudio de los factores predisponentes, como la dieta, lo que está aportando una importante información biológica acerca de la influencia de los diferentes componentes de esta en el desarrollo de la aterosclerosis y de los mecanismos implicados (OSADA y cols., 2000; SARRÍA y cols., 2006). Este tipo de animal es fundamental en la investigación llevada a cabo en nuestro laboratorio, centrada en los efectos beneficiosos del aceite de oliva virgen en la aterosclerosis.

Desde hace más de quince años, en nuestro laboratorio, se llevan a cabo numerosos experimentos en los que se emplea el ratón ApoE-KO, que desarrolla aterosclerosis espontáneamente, y que básicamente tienen un diseño experimental semejante, en el que grupos de ratones, uno de los cuales recibe una dieta *control*, generalmente una dieta de tipo occidental (20% de

grasa y 0,15% de colesterol), se comparan con otros grupos de animales que toman otras dietas, bien sea cambiando el tipo de grasa o bien incorporando o añadiéndose a esa dieta un compuesto minoritario del aceite de oliva que se va a investigar. Tras doce semanas de periodo experimental, los ratones se sacrifican en condiciones humanitarias respetando las normativas de bienestar animal, tras lo cual se procede a la toma de muestras de sangre para la obtención del plasma y a la extracción de una serie de órganos como el corazón (que se conserva congelado para la cuantificación de la lesión aterosclerótica), el hígado y otros tejidos. Con los corazones congelados se realizan una serie de cortes histológicos en las válvulas aórticas en un criostato mantenidos en congelación ( $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, estos cortes son teñidos con Sudan IV para colorear de rojo los depósitos lipídicos de lesión aterosclerótica y, a continuación, se realiza una contrateñición con una solución de hematoxilina y eosina (CALLEJA y cols., 1999), como se muestra en la figura 2a. De estos cortes histológicos se toman imágenes digitalizadas con una cámara acoplada a un microscopio óptico. Para el tratamiento de las imágenes, se emplea el *software* Scion Image que permite, mediante un lápiz digital, circunscribir el área de lesión aterosclerótica y, posteriormente, su cuantificación, como se observa en la figura 2b.



**Fig. 2a.** Corte histológico de una aorta de ratón ApoE-KO en las válvulas aórticas, teñidas con la técnica de Sudan IV para colorear de rojo los depósitos lipídicos de lesión aterosclerótica y contrateñidas con una solución de hematoxilina y eosina (CALLEJA y cols., 1999).

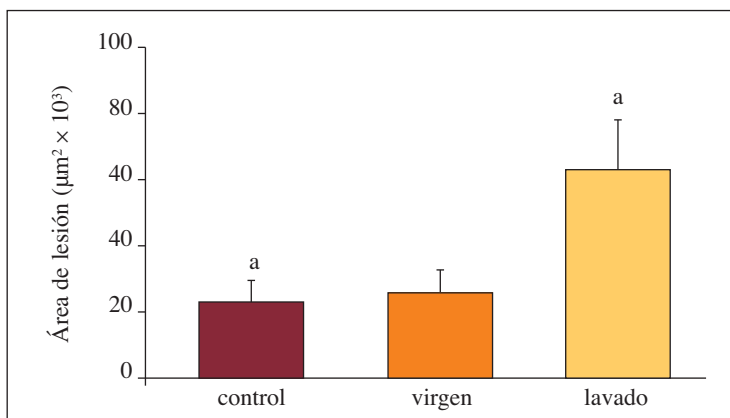


**Fig. 2b.** El mismo corte, en el que se ha seleccionado la lesión contorneando (líneas blancas) las áreas de lesión aterosclerótica con el *software* Scion Image, que permite cuantificar el área seleccionada.

### CONOCIMIENTO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS FRENTE A LA ATEROSCLEROSIS

En uno de los experimentos preliminares, se trató de demostrar la implicación de los componentes minoritarios del AOV. Se testaron dos aceites de oliva virgen, uno de los cuales se sometió a un proceso de lavado que eliminara los compuestos minoritarios solubles, y se elaboraron dietas adicionando ambos aceites al 10% que fueron administradas a ratones ApoE-KO. Como se observa en la figura 3, la eliminación de la fracción hidrosoluble por efecto del lavado provocó la pérdida de las propiedades antiateroscleróticas (OSADA, 2010) del AO lavado en comparación con la dieta control, mientras que con la dieta con AO virgen, a pesar de contener un 10% de aceite añadido, el área de la lesión aterosclerótica fue la misma que en la dieta control.

En un experimento posterior, se evaluó la importancia de los compuestos minoritarios, pero en dos aceites de oliva obtenidos por procedimientos diferentes, uno tradicional por prensado y otro más moderno por centrifugado, y refinados ambos posteriormente con el fin de eliminar los componentes hidrosolubles. De estos tratamientos resultó un aceite obtenido por centrifugado enriquecido en compuestos de la fracción insaponificable, tales como tocoferoles, fitosteroles y triterpenos. Ambos tipos de aceites

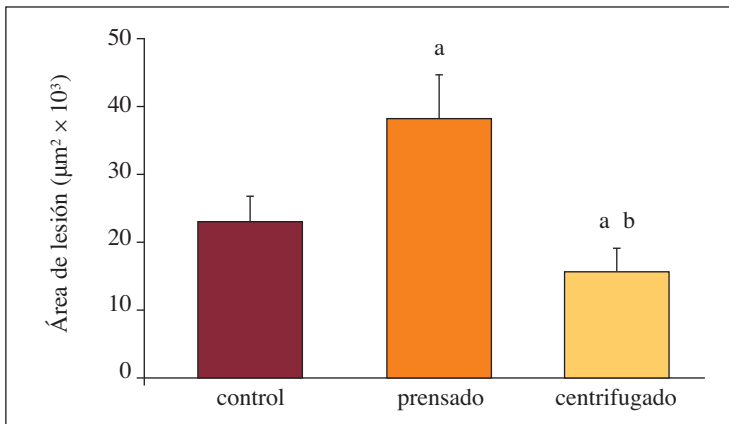


**Fig. 3.** Efecto de una dieta enriquecida con un 10% de aceite de oliva virgen extra (virgen) o aceite de oliva virgen lavado (lavado) en la superficie del área de lesión respecto a ratones alimentados con una dieta control (OSADA, 2010) (resultados no publicados). Diferencias estadísticas, *a*:  $P < 0,05$  mediante análisis estadístico de Mann-Whitney.

se administraron al 10% en la dieta a los ratones ApoE-KO y se compararon con una dieta control sin aceite. Como muestra la figura 4, la dieta suplementada con aceite prensado y refinado incrementó significativamente la lesión aterosclerótica respecto al grupo control, mientras que en los que consumieron la dieta enriquecida con el aceite centrifugado y refinado (enriquecido en compuestos minoritarios insolubles en agua) esta indujo una disminución de la lesión, incluso frente a los del control, a pesar de ser una dieta suplementada con un 10% más de grasa, en este caso el aceite de oliva centrifugado (ACÍN y cols., 2007).

Como se ha podido comprobar por los experimentos anteriores, los componentes de la fracción hidrosoluble del aceite de oliva son importantes, pues retrasan el desarrollo de la aterosclerosis en los ratones ApoE-KO.

No existen dudas de que un factor determinante en el desarrollo de la aterosclerosis es la oxidación de lípidos de las lipoproteínas de baja densidad, las LDL (*Low Density Lipoprotein*, o comúnmente llamado colesterol malo) (LUC y FRUCHART, 1991). Asimismo, se ha relacionado que el consumo de AOV ejerce un papel protector de la oxidación de las LDL y va asociado a su contenido en compuestos fenólicos. Por lo ya mencionado en la composición del aceite de oliva: la presencia en altas concentraciones de

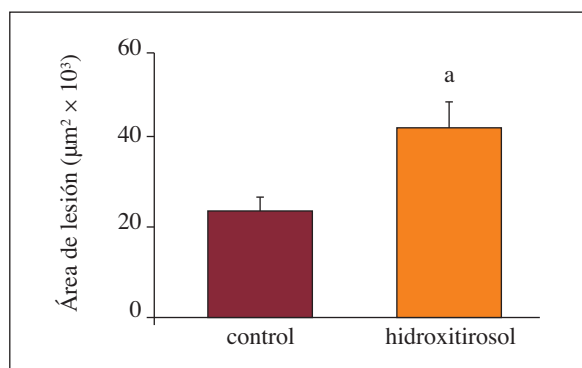


**Fig. 4.** Valores medios de las áreas de lesión en ratones ApoE-KO alimentados con dieta control o enriquecida con un 10% de aceites de oliva prensado o centrifugado, ambos refinados. Diferencias estadísticas, *a*:  $P < 0,05$  respecto a control y *b*:  $P < 0,05$  vs. prensado, mediante prueba estadística de Mann-Whitney (ACÍN y cols., 2007).

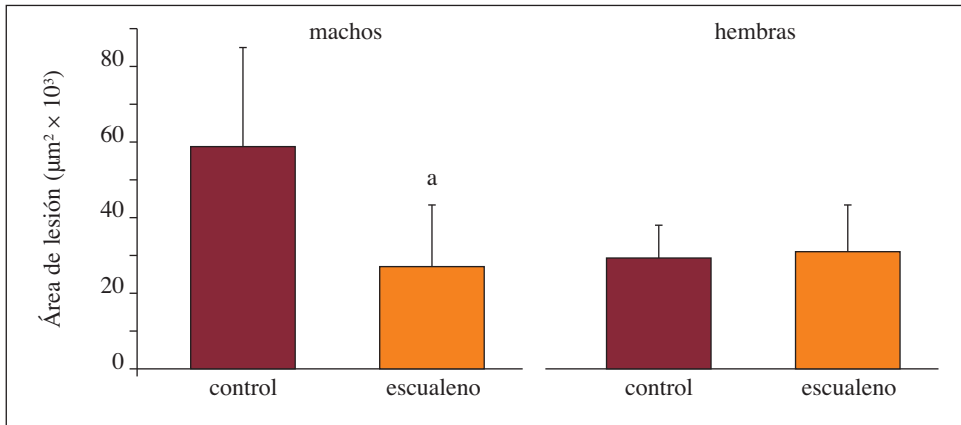


un alcohol fenólico como el hidroxitirosol, que posee una potente capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* (VISIOLI y cols., 2000). Se ha investigado el efecto del hidroxitirosol en el desarrollo de aterosclerosis en ratones ApoE-KO, administrándolo en el pienso a una dosis farmacológica de 10 mg/kg ratón/día. Los resultados indicaron que el hidroxitirosol, a esta dosis y en dietas bajas en colesterol, inducía un mayor desarrollo de la aterosclerosis (ACÍN y cols., 2006), como se muestra en la figura 5. Estos resultados sugieren que compuestos, en este caso el hidroxitirosol, al menos en ratones ApoE-KO, administrados aisladamente fuera de la matriz del alimento original, pueden tener efectos perjudiciales en la aterosclerosis, contrariamente a las nuevas propuestas de las teorías simplistas o minimalistas de que un compuesto administrado aisladamente pueda no tener el efecto deseado que se le presupone si no se mantiene el entorno natural en el que se encuentran estas moléculas (ACÍN y cols., 2006).

Otro compuesto presente en importantes cantidades en el aceite de oliva virgen es el hidrocarburo escualeno, por lo que ha sido también investigado en nuestro laboratorio. El escualeno administrado en la dieta de ratones ApoE-KO a dosis de 1 mg/kg ratón/día redujo el desarrollo de aterosclerosis, pero solo en los machos (fig. 6), no tuvo efecto en las hembras, lo que sugiere una acción dependiente del sexo, al menos en este modelo experimental.



**Fig. 5.** Efecto de la administración de hidroxitirosol en la dieta sobre el área de lesión aterosclerótica en ratón ApoE-KO. Diferencias estadísticas, *a*:  $P < 0,05$  respecto a control (ACÍN y cols., 2006).



**Fig. 6.** Efecto de la suplementación con escualeno en la dieta de ratones ApoE-KO sobre las áreas de lesión ateroscleróticas. Diferencias estadísticas, *a*:  $P < 0,05$  respecto a control (GUILLÉN y cols., 2008).

## CONCLUSIONES

El ratón carente de apolipoproteína E resulta un modelo animal adecuado para abordar el estudio de la influencia del aceite de oliva y/o sus componentes en el desarrollo de la aterosclerosis, lo que ha permitido desentrañar las discrepancias en los incipientes estudios con aceite de oliva al constatare las diferencias en las respuestas a los aceites con contenidos distintos en sus componentes minoritarios y avanzar en el conocimiento del efecto beneficioso de este alimento. También ha contribuido a aclarar que no todas las grasas, un nutriente de alto contenido energético, pueden tener el mismo efecto colesterolémico o aterogénico.

La acción beneficiosa y las propiedades antiateroscleróticas del aceite de oliva virgen pueden atribuirse en parte a la presencia de esos componentes minoritarios en estos aceites. Su potencial efecto biológico se reduce o desaparece en aquellos aceites de oliva que han sido sometidos a ciertos procesos de lavado y/o refinado en los que se han eliminado dichos componentes.

Para la administración de un compuesto aislado con potenciales propiedades farmacológicas no se debe caer en la simplificación de que este vaya a ejercer su efecto como tal en un comprimido. Cada vez hay más consenso en que la matriz en que se encuentra dicho compuesto es importante y que

el alimento en su conjunto es importante para ejercer su efecto, por lo que puede ser más saludable su consumo íntegro que incorporado en alimentos distintos de su *continente* o en suplementos.

#### AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación de los autores está financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad – Fondo Europeo de Desarrollo Regional (2013-41651R), el Fondo Social Europeo – Gobierno de Aragón (B-69) y el CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), como iniciativa del Instituto de Salud Carlos III y del Instituto de Estudios Altoaragoneses (IEA), en su convocatoria de ayudas a la investigación de 2014.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACÍN, S., M.<sup>a</sup> Á. NAVARRO, J. M. ARBONÉS-MAINAR, N. GUILLÉN, A. J. SARRÍA y cols. (2006). Hydroxytyrosol administration enhances atherosclerotic lesion development in apo E deficient mice. *Journal of Biochemistry*, 140: 383-391.
- ACÍN, S., M.<sup>a</sup> Á. NAVARRO, J. S. PERONA, J. M. ARBONÉS-MAINAR, J. C. SURRA y cols. (2007). Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18: 418-424.
- ALBA, J., y L. MARTÍNEZ (2001). Elaboración de aceites de oliva. En J. Mataix Verdú (ed.), *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*: 46-31. Fundación Puleva. Universidad de Granada. Granada.
- BOSKOU, D. (1998). Composición del aceite de oliva. En D. Boskou (ed.), *Química y tecnología del aceite de oliva*: 67-103. AMV Ediciones. Mundi Prensa Libros. Madrid.
- BOSKOU, D., G. BLEKAS y M. TSIMIDOU (2006). Olive oil composition. En D. Boskou (ed.), *Olive Oil, Chemistry and Technology*, 2.<sup>a</sup> ed.: 41 -72. AOCS Press. Champaign (Ill).
- BUCKLAND, G., y C. A. GONZÁLEZ (2015). The role of olive oil in disease prevention: a focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *British Journal of Nutrition*, 113, Suppl. 2: S94-101.
- CALLEJA, L., M. A. PARÍS, A. PAÚL, E. VILELLA, J. JOVEN y cols. (1999). Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19: 2368-2375.
- CARRASCO PANCORBO, A., C. CRUCES-BLANCO, A. SEGURA CARRETERO y A. FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ (2004). Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6687-6693.

- CHOUHDURY, R. P., V. FUSTER y Z. A. FAYAD (2004). Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3: 913-925.
- CICERALE, S., X. A. CONLAN, A. J. SINCLAIR y R. S. J. KEAST (2008). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 218-236.
- CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (2013). Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. <http://www.internationaloliveoil.org/documents/view-file/3617-normaesp> [consulta: 12/1/2016].
- DE LORGERIL, M. (2004). "The Mediterranean-style diet". Is it ideal for the modern world? *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13: S18.
- DE SCHUTTER, A., C. J. LAVIE y R. V. MILANI (2014). The impact of obesity on risk factors and prevalence and prognosis of coronary heart disease-the obesity paradox. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 56: 401-408.
- ESTRUCH, R., E. ROS, J. SALAS-SALVADO, M. I. COVAS, D. CORELLA y cols. (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 368: 1279-1290.
- GARDNER, C. D., y H. C. KRAEMER (1995). Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids: A meta-analysis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15: 1917-1927.
- GUILLÉN, N., S. ACÍN, M.<sup>a</sup> Á. NAVARRO, J. S. PERONA, J. M. ARBONÉS-MAINAR y cols. (2008). Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice. *Atherosclerosis*, 197: 72-83.
- GUILLÉN, N., S. ACÍN, M.<sup>a</sup> Á. NAVARRO, J. C. SURRA, C. ARNAL y cols. (2009). Knowledge of the biological actions of extra virgin olive oil gained from mice lacking apolipoprotein E. *Revista Española de Cardiología*, 62: 294-304.
- HOWARD, B. V., L. VAN HORN, J. HSIA, J. E. MANSON, M. L. STEFANICK y cols. (2006). Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA*, 295: 655-666.
- HU, F. B., J. E. MANSON y W. C. WILLETT (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *Journal of the American College of Nutrition*, 20: 5-19.
- INE (2014). *Defunciones según la causa de muerte en 2012*. Instituto Nacional de Estadística. Madrid.
- JIMÉNEZ, J., D. RONDÓN, L. MARTÍNEZ y J. MATAIX (2001). Composición química de los aceites de oliva. En J. Mataix Verdú (ed.), *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*: 115-136. Fundación Puleva. Universidad de Granada. Granada.
- KEYS, A. (1970). Coronary heart disease in Seven Countries. *Circulation*, 41 (Suppl. 1): 1-211.
- KEYS, A. (1980). *Seven Countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease*. Harvard UP. Cambridge (MA).
- KROMHOUT, D., A. MENOTTI, B. BLOEMBERG, C. ARAVANIS, H. BLACKBURN y cols. (1995). Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Preventive Medicine*, 24: 308-315.

- LUC, G., y J. C. FRUCHART (1991). Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53: 206S-209S.
- LUSIS, A., A. FOGELMAN, y G. FONAROW (2004). Genetic basis of atherosclerosis, part II: clinical implications. *Circulation*, 110: 066-071.
- MONTEDORO, G., A. TATICCHI, S. ESPOSTO, R. SELVAGGINI, S. URBANI y cols. (2007). Antioxidants in virgin olive oil. *Olea*, 26: 5-13.
- MORENO, J. J., y M.<sup>a</sup> T. MITJAVILA (2003). The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 182-195.
- MOZAFFARIAN, D., y D. S. LUDWIG (2015). The 2015 US dietary guidelines: Lifting the ban on total dietary fat. *JAMA*, 313: 2421-2422.
- OSADA, J. (2010). *Aceite de oliva virgen extra y prevención de la aterosclerosis*. Academia de Farmacia Reino de Aragón. Zaragoza.
- OSADA, J., J. JOVEN y N. MAEDA (2000). The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 11: 25-29.
- PAIGEN, B., A. MORROW, C. BRANDON, D. MITCHELL y P. HOLMES (1985). Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, 57: 65-73.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, F., J. RUANO, P. PÉREZ-MARTÍNEZ, F. LÓPEZ-SEGURA y J. LÓPEZ-MIRANDA (2007). The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 1199-1208.
- REDDICK, R., S. ZHANG y N. MAEDA (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E: Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14: 141-147.
- SARRÍA, A. J., J. C. SURRA, S. ACÍN, R. CARNICER, M.<sup>a</sup> Á. NAVARRO y cols. (2006). Understanding the role of dietary components on atherosclerosis using genetic engineered mouse models. *Frontiers in Bioscience*, 11: 955-967.
- SURRA, J. C., C. ARNAL, M.<sup>a</sup> V. MARTÍNEZ-GRACIA y J. OSADA (2005). Efecto de la composición de la grasa de la dieta en la aterogénesis. *Rev. Esp. Obes.*, 3: 183-194.
- TRICHOPOULOU, A., T. COSTACOU, C. BAMIA y D. TRICHOPOULOS (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New England Journal of Medicine*, 348: 2599-2608.
- UCEDA, M. (2001). Tipos y calidad de aceites de oliva. En J. Mataix Verdú (ed.), *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*: 101-113. Fundación Puleva. Universidad de Granada. Granada.
- VISIOLI, F., L. BORSANI y C. GALLI, C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research*, 47: 419-425.